

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Desenvolvimento de transgenes para estudos de crescimento em zebrafish (*Danio rerio*)

Guilherme Sampaio Sansão

Dr. Luis Fernando Marins

Monografia apresentada como requisito da
Disciplina de Trabalho de Graduação II -
15125 - do Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Novembro/2016

Agradecimentos

Gostaria de fazer uma pequena menção à todos que fizeram parte da minha construção como pesquisador, biólogo e ser humano nestes últimos 6 anos. Seria impossível resumir aqui todos que me influenciaram neste período, sendo assim citarei alguns nomes e grupos e peço para que qualquer um lendo esta dissertação que tenha convivido comigo durante esse período sinta-se contemplado por este agradecimento.

Entretanto algumas pessoas não podem deixar de ser citadas. Entre as influências que me fizeram seguir a carreira acadêmica a minha base familiar foi de extrema importância. Cresci sob os cuidados de duas figuras paternas de grande peso, enquanto uma me ensinou a observar o mundo natural e ter o ímpeto de aprender cada vez mais, a outra me ensinou a questionar o mundo, aprender com o processo de desconstrução de ideias e perseverar naquilo que acredito. Já minha mãe foi meu principal suporte moral, sempre me estimulando a seguir adiante e me manter fiel ao que acredito. Minhas irmãs, por outro lado são meu porto seguro, possuem a incrível capacidade de me transportar para um lugar onde o tempo não existe e a relação que tínhamos quando crianças apenas se somam com as experiências que vamos adquirindo. Tenho muitos agregados à este núcleo familiar e todos fazem parte de quem eu sou também. Obrigado, Andrea, Matheus, Christian, Cynthia, Pricilla, Cacá e aos recém chegados sob comando do capitão Paulo também.

A família nos é dada pela vida, e neste quesito fui muito afortunado, entretanto os amigos são a família que nós escolhemos. Sou muito grato a todos que fizeram parte dessa minha trajetória, seja nos corredores do ICB, no K'maradas, dividindo casas, frequentando outras (Lilith ou Fafá), me emprestando colo em minhas idas à POA, dividindo vinhos e jantares, entre outros. Algumas pessoas que não posso me esquecer são Sidnei Afonso Bruce Nelson, Cezar Motta, André Colferai, Marcola Minini, Adriano Borowski, Regina Coimbra, Cássia Rodrigues, Bruno Monster, Lilith, Lincon, Claudio, Bianca Righi, Arthur, e vizinha.

Muito do conhecimento que assimilei durante esses últimos anos foram fruto de uma mediação muito forte de algumas pessoas, entre estas sou especialmente grato ao Luis Fernando Marins (Luf ou Luffy para os mais ousados), Marcio Azevedo Figueiredo, Michael Waters (Mike) e Andrew Brooks. Essas foram pessoas que me guiaram diretamente pelas

partes práticas e efetivas da ciência, me ensinaram as teorias, técnicas, organização e planejamento, registro, escrita e oratória.

Entre as pessoas que mais marcaram minha vida, uma colona Alemã, se sobressai. Com a dona Ruth aprendi e apreciei as pequenas sutilezas que fazem da vida bela, além de como ser companheiro, amigo, sobreviver a condições adversas e ser vida loka.

Por último, minha formação não seria possível sem o financiamento pelo suado dinheiro da população brasileira e pela concessão de bolsas pelo CNPq, infraestrutura e professores pela FURG e UQ.

Muito obrigado a todos!

Sumário

1. Lista de Abreviaturas.....	5
2. Resumo.....	7
3. Abstract.....	8
4. Introdução Geral.....	9
5. Artigo.....	17
5.1. Resumo.....	17
5.1. Introdução.....	18
5.2. Materiais e Métodos.....	20
5.2.1. Construções Genéticas.....	20
5.2.2. Transformação Bacteriana.....	22
5.2.3. Purificação dos Plasmídeos.....	22
5.2.4. Confirmação das Construções Genéticas.....	23
5.2.5. Microinjeção.....	23
5.2.6. Manutenção dos Reprodutores e Larvas.....	23
5.2.7. Bioética.....	24
5.3. Resultado e Discussão.....	24
5.3.1. Plasmídeo Base das Variantes do GHR.....	24
5.3.2. pJun3alaGHR.....	25
5.3.3. p2CysGHR.....	26
5.3.4. pP442TGHR.....	26
5.3.5. Plasmídeo Base da Variante do IGF1R.....	26
5.3.6. pCD8/IGF1R.....	27
5.4. Conclusão.....	29
5.5. Referências.....	29
5.6. Tabelas.....	32
5.7. Figuras.....	33
6. Considerações Finais.....	39
7. Referências Bibliográficas.....	40

Lista de Abreviatura

AKT: Proteína Cinase B

DEC: Domínio Extracelular

DIC: Domínio Intracelular

DJ: Domínio Justamembrana

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*)

DTM: Domínio Transmembrana

ERK: Cinase Regulada por Sinal Extracelular (do inglês: *Extracellular signal-Regulated Kinase*)

EGFP: Proteína Verde Fluorescente (do inglês: *Enhanced Green Fluorescent Protein*)

GH: Hormônio do Crescimento (do inglês: *Growth Hormone*)

GHIH: Hormônio Inibidor do Hormônio do Crescimento (do inglês: *Growth Hormone-Inhibiting Hormone*)

GHR: Receptor do Hormônio do Crescimento (do inglês: *Growth Hormone Receptor*)

GHRH: Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (do inglês: *Growth Hormone Releasing Hormone*)

IGF: Fator de Crescimento tipo Insulina (do inglês: *Insulin-like Growth Factor*)

JAK2: Janus Cinase 2 (do inglês: *Janus Kinase 2*)

KB: Quilo base (do inglês: *Kilobase*)

mRNA: RNA mensageiro

CMLC2: Miosina Cardíaca Cadeia Leve 2 (do inglês: *Cardiac Myosin Light Chain 2*)

MYL2: Miosina Cadeia Leve 2 (do inglês: *Myosin Light Chain 2*)

ORF: Fase de Leitura Aberta (do inglês: *Open Reading Frame*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polimerase Chain Reaction*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês: *Phosphoinositide 3-kinase*)

RNA: Ácido ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)

RNAi: RNA de interferência

STAT: Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (do inglês: *Signal Transducers and Activators of Transcription*)

TIRs: Repetições Terminais Invertidas (do inglês: *Terminal Inverted Repeats*)

TMD: Domínio Transmembrana (do inglês: *Transmembrane Domain*)

TR: Transcriptase Reversa

UBB: Ubiquitina B

Desenvolvimento de construções genéticas para estudos de crescimento em zebrafish (*Danio rerio*)

Resumo

A aquacultura tem sido alvo crescente de investimentos. Para maximizar a produtividade deste setor, peixes transgênicos com taxas de crescimento elevadas foram criados pela superexpressão do hormônio do crescimento. Em 2012, um estudo demonstrou crescimento rápido em zebrafish (*Danio rerio*) induzido pela ação constitutiva do receptor do hormônio do crescimento (GHR) de forma hormônio-independente, abrindo novas possibilidades de alterações genéticas com aplicações na aquacultura. A ação constitutiva e menor taxa de degradação de receptores do eixo somatotrófico já foi descrita em culturas celulares de mamíferos, e a análise de seus efeitos no crescimento de peixes pode se tornar uma ferramenta de grande interesse comercial. No presente estudo, três conformações distintas do GHR e uma do receptor do Fator de Crescimento tipo-Insulina I (IGF1R) foram analisadas pelas suas possibilidades em aumentar as taxas de crescimento. Para o GHR foram utilizadas as mutações S246C e V253C, que parecem manter o receptor constitutivamente ativo; o GHR com os domínios extracelular e justamembrana substituídos por um zíper de leucina seguido de três resíduos de alanina, que causa uma ativação do receptor de forma hormônio-independente; o GHR com a mutação P442T, minimizando a degradação desta proteína; e o receptor de IGF1 constitutivamente ativo pela inserção da região extracelular do receptor CD8 na região transmembrana deste, agindo de forma análoga ao GHR com zíper de leucina. Desta forma, foram criados quatro vetores de expressão, com as conformações de receptores descritas acima, com objetivo de alcançar um crescimento elevado e efeitos colaterais negativos reduzidos na aquacultura.

Palavras chave: Aquacultura, GHR, IGF1R, Proteína Quiméricas, Transgenia

Development of genetic constructs for growth studies in zebrafish (*Danio rerio*)

Abstract

Aquaculture has been target of increasing investment. In order to maximize aquaculture productivity transgenic fish have been created with enhanced growth by overexpressing growth hormone (GH) from a transgene. In 2012, a study reported a hormone-free increased growth in zebrafish (*Danio rerio*) by constitutively activating the growth hormone receptor (GHR), opening a new set of genetic manipulations with possible applications to aquaculture. Constitutively active and low degradations rate receptor had been reported in mammal cellular cultures, the use of those receptors in fish could reveal itself as tools of great commercial interest. In our study, three genetic manipulations to the GHR and one to the IGF1R have been examined for growth enhancement ability in zebrafish. There were GHR S246C and V253C activation mutations; a constitutively active GHR with 3 alanine residues above the transmembrane domain below a leucine zipper; a P495T GHR, which minimizes the receptor degradation; and a constitutively active IGF1R with the CD8 extracelular domain above the transmembrane domain. Here, these 4 constructs were made, described as above, as a mean to achieve maximum growth in aquaculture and reduced side effects.

Keywords: Aquaculture, Chimeric Proteins, GHR, IGF1R, Transgenic

Introdução geral

A população humana está continuamente aumentando em número. Em 2015 chegamos ao marco de 7,3 bilhões de pessoas, e estima-se que o número será de 9,7 bilhões em 2025 e 11,2 em 2100 (United Nations 2015). Além do crescimento populacional, que por si só aumenta a pressão sobre os recursos alimentares, existe também um aumento no consumo de pescado *per capita*, que atingiu o recorde de 20 kg em 2014 (FAO 2016). Com um número tão elevado de pessoas, consumindo cada vez mais pescados, é imperativo acessar outros nichos de produção de organismos aquáticos para sanar a demanda que este contingente necessitará.

De acordo com o relatório da FAO: “The state of World Fisheries and Aquaculture” (2016), o consumo de pescados aumentou consideravelmente nos últimos anos, impactando os recursos pesqueiros profundamente. Este efeito pode ser observado pela sobrepesca de 31,4% dos estoques pesqueiros, e na utilização total de 58,1%, restando apenas 10,5 % de recursos sub-explorados, com uma tendência da diminuição desta última parcela. Com a estagnação da indústria pesqueira, a produção em cativeiro tem ganhado espaço no mercado mundial. Esta relação é tão evidente que, em 2014, a produção da aquacultura ultrapassou a da pesca, contribuindo com a produção de 73,8 milhões de toneladas de animais aquáticos e movimentando cerca de 160,2 bilhões de dólares. Deste total produzido, cerca de 49,8 milhões de toneladas, ou 68%, são peixes (FAO 2016).

Neste contexto, de forma semelhante à ocorrida na agricultura, a manipulação genética dos organismos aquáticos cultiváveis pode ser uma das principais ferramentas para ganho de produtividade na aquacultura (Muir 2004). A prática da transgenia já foi relatada em mais de 50 espécies de peixes (Cows et al. 2010), diversos destes possuindo interesse para a aquacultura comercial. Entre eles, destacam-se a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Chourrout 1986), o catfish (*Ictalurus punctatus*) (Dunham et al. 1987), a carpa (*Cyprinus carpio*) (Chen et al. 1992) e o salmão (*Salmo salar*) (Cook et al. 2000). Ainda que existam alguns estudos com intuito de aumentar a robustez dos organismos cultivados em relação a patógenos e ao ambiente (Hew et al. 1992; Dunham et al. 2002), a maior parte das manipulações tiveram o intuito de melhorar as taxas de crescimento e conversão alimentar pela superexpressão do hormônio do crescimento (GH). Este tipo de manipulação genética já é

uma realidade pois, em 2015, um salmão geneticamente modificado (*AquaAdvantage Salmon*) foi aprovado para produção e venda em escala comercial nos EUA (FDA 2015). Apesar disso, estudos com o peixe zebrafish (*Danio rerio*) mostraram efeitos colaterais negativos deste tipo de transgenia tais como: diminuição no sucesso reprodutivo (Figueiredo et al. 2013), baixa resistência a variações ambientais (Almeida et al. 2013) e imunodeficiência (Batista et al. 2014). Conclui-se, então, que uma abordagem molecular mais refinada na indução do crescimento de forma hormônio-independente possibilitaria uma otimização desta tecnologia.

Em peixes, o hormônio do crescimento, também conhecido por somatotrofina, é o principal hormônio do eixo somatotrófico. Sua liberação pela hipófise é estimulada pelo hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e inibida pelo hormônio inibidor do hormônio do crescimento (GHIH), ambos produzidos pelo hipotálamo. Existem vias alternativas no estímulo da expressão do GH na hipófise, alguns exemplos são a grelina, a dopamina e o hormônio liberador de gonadotrofinas (Björnsson et al. 2002). O GH estimula a expressão de fatores de crescimento ao se ligar ao receptor do hormônio do crescimento (GHR) na membrana das células, gerando uma mudança na conformação da região intracelular que possibilita as Janus Cinase 2 (JAK2) dar início a uma cascata de reações fosforilando os Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (STATs), Fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)-proteína Cinase B (AKT), ou Cinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK). Estes fatores, por sua vez, podem atuar no crescimento e, principalmente no fígado, na expressão de Fatores de Crescimento tipo-Insulina 1 (IGF1). O IGF1 atua, majoritariamente, na musculatura esquelética estimulando a hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares. Ao se ligar ao seu receptor (IGF1R), o complexo induz as vias MAPK-ERK e PI3K-AKT, de forma semelhante ao GHR (Fuentes et al. 2013).

O GHR possui uma distribuição ampla, estando presente em todos os tecidos dos vertebrados, porém normalmente mais concentrados no fígado (Björnsson et al. 2002). Estes receptores, classificados como citocinas classe I, são provavelmente os receptores mais bem estudados. Possuem uma grande homologia entre todos os grupos de vertebrados e suas vias de sinalização são conservadas até mesmo em invertebrados (Moller et al. 2009). As proteínas que formam o GHR apresentam-se em dímeros e sua estrutura proteica pode ser separada em 4 regiões de acordo com seu posicionamento quanto à membrana plasmática da célula. Sob este conceito o receptor é dividido em: domínio extracelular (DEC); domínio justamembrana (DJ);

domínio transmembrana (DTM) e domínio intracelular (DIC) (Brooks et al. 2014). O GHR apresenta algumas regiões bem conservadas: um motivo conservado caracterizado pelos aminoácidos GEFS, no DEC, apontado como o principal local de ligação do receptor ao GH; o *box1*, no DIC, é a região de ligação da JAK2 (Postel-Vinay e Finidori 1995); o *box2*, DIC, é apontado como domínio responsável pela internalização do GHR (Govers et al. 1997); além do motivo reconhecido pelos aminoácidos PAGE que parece atuar na degradação desta proteína (Rudd et al. 2006) (Figura 1).

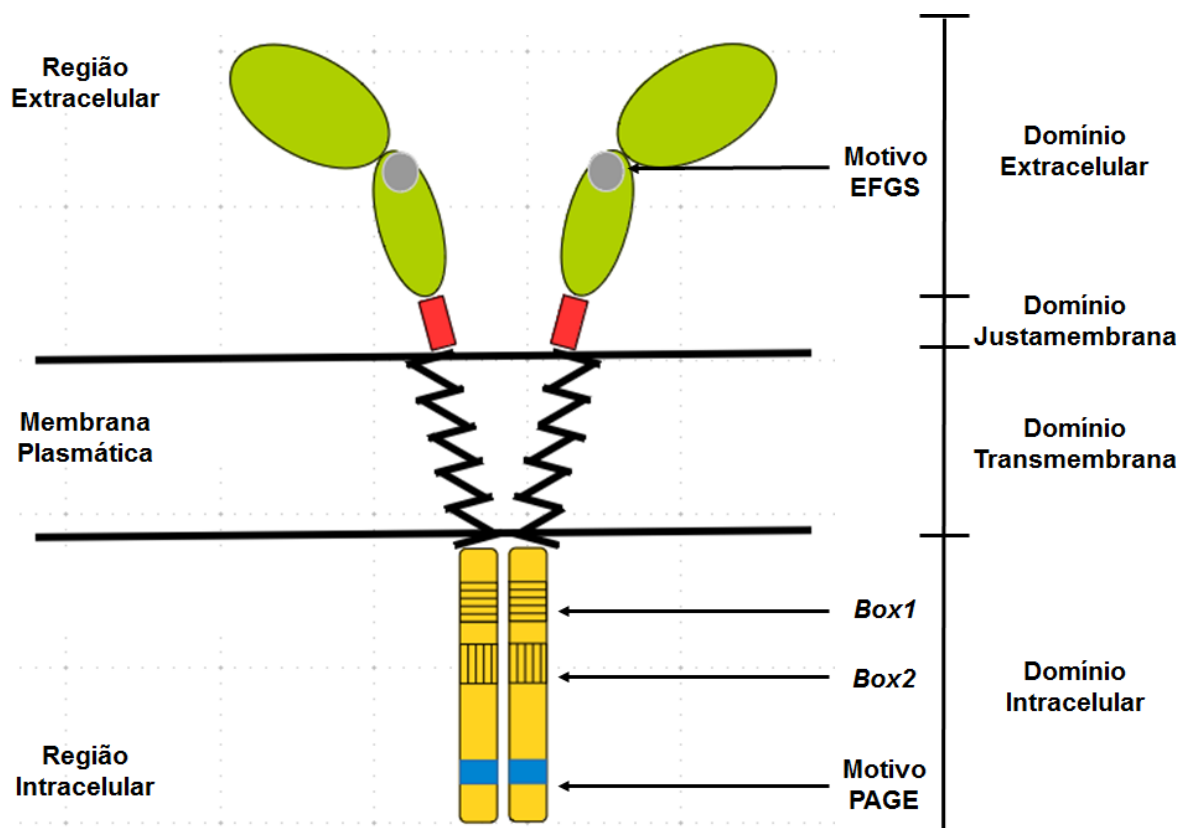


Figura 1. Representação esquemática dos domínios e motivos conservados do GHR. Em verde está representado o domínio extracelular; em cinza o motivo GEFS, sítio de ligação do receptor a seu agonista; em vermelho, o domínio justamembrana; as linhas pretas em ziguezague representam o domínio transmembrana; em amarelo, o domínio intracelular; a caixa com linhas horizontais simboliza a região do *Box1*; a caixa com linhas verticais, o *Box2*; e em azul está representada a sequência PAGE.

Com as informações sobre a estrutura do receptor, um trabalho do grupo de pesquisa do Dr. Michael Waters (Universidade de Queensland, Austrália) demonstrou uma proliferação

celular e taxas de crescimento aumentadas em zebrafish devido à uma ativação constitutiva do receptor do hormônio do crescimento (GHR) (Ahmed et al. 2011). Nesse estudo, a expressão constitutiva do receptor foi obtida pela substituição da região extracelular deste por um zíper de leucina proveniente de um fator de transcrição suíno conhecido por *c-jun*. Os zíperes de leucina ligam-se por complementaridade alterando, desta forma, a estrutura intracelular do receptor, mimetizando a interação com o GH. Este trabalho abriu novas possibilidades na manipulação genética aplicada à aquicultura pela modificação na estrutura de receptores alterando o padrão de fosforilação de citocinas intracelulares.

Além da possibilidade de ação constitutiva de receptores, o grupo do Dr. Waters demonstrou, em outro trabalho, uma série de mutações que podem não apenas deixar o GHR constitutivo, mas também aumentar a estabilidade do receptor e suas vias de sinalização, induzindo assim o crescimento. Entre as mutações com maior indução do processo proliferativo estão as mutações F263C e I278C (equivalente a S246C e V253C no GHR de zebrafish), que atuam na formação de pontes dissulfeto no DJ aumentando o espaço entre as regiões do *box1* do dímero, mantendo o receptor constitutivamente ativo. Também, foi demonstrado que a presença do zíper de leucina seguido de três resíduos de alanina logo acima do TMD pode manter o GHR constitutivamente ativo de uma maneira mais intensa. Isto ocorre porque cada alanina adicionada causa uma rotação em 100° na estrutura intracelular, resultando no máximo de ativação pela JAK2 (Brooks et al. 2014). Outra possibilidade para induzir o crescimento é através da mutação P495T (equivalente à P442T), modificando o motivo PAGE do GHR. Esta mutação foi primariamente identificada em pacientes com câncer de pulmão, estando associada com altas taxas de proliferação celular (Rudd et al. 2006).

Contudo, não é apenas o GH/GHR que tem atuação no crescimento. Como citado anteriormente, o IGF1 está associado ao crescimento do músculo esquelético (Schiaffino et al. 2011; Clark et al. 2015) e pode gerar respostas mais eficientes que o GH por afetar um menor número de sistemas (especialmente ao se considerar que o IGF1 também é produzido pela ativação do GHR no fígado) evitando assim desperdício de energia e efeitos colaterais. Desta forma, a produção de receptores de IGF1 (IGF1R) constitutivamente ativos poderia gerar importantes indutores de crescimento em peixes. Acordando com esta ideia, Kim et al. (2007) estabeleceram uma linhagem celular humana expressando o IGF1R constitutivamente ativo (utilizando-se a estrutura extracelular do receptor CD8 acoplada à região transmembrana do

IGF1R) e puderam observar uma taxa proliferativa elevada e imortalização das células, que cresciam em cultivo sem a necessidade de se adicionar fatores de crescimento.

Mesmo que exista uma vasta gama de possibilidades de construções que podem induzir o crescimento de peixes, analisar o crescimento de tantos vetores em organismos com longos ciclos de vida é inviável. Devido a isto, o zebrafish tem ganhado importância, mostrando-se um excelente modelo para testes iniciais de manipulação genética aplicada à aquacultura (Udvadia e Linney 2003). Pertencente à família Cyprinidae, este peixe é nativo de rios da região dos Himalaias na Ásia (Spence et al. 2007). Devido à sua rusticidade e características ornamentais, tem sido alvo de cultivo por aquarofilistas em diversos países do mundo. No fim dos anos 60, além de seu uso como ornamental, o zebrafish começou a ser utilizado como modelo biológico para pesquisas. George Streisinger, pesquisador da Universidade de Oregon (EUA), desejava desvendar os mecanismos moleculares do neurodesenvolvimento humano e para isso necessitava de um modelo que tivesse genoma e desenvolvimento neuronal homólogos ao humano, porém simples o bastante para que o desenvolvimento fosse facilmente observado e pudesse ser mantido em laboratório sem dificuldades. Após estudar vários modelos potenciais, Streisinger apontou o zebrafish como modelo animal ideal para suas pesquisas devido às seguintes características: (1) facilidade de manejo e reprodução em laboratório; (2) fertilização externa e produção de centenas de embriões por dia; e (3) embriões transparentes, o que permitia a visualização dos processos embrionários em tempo real de forma não invasiva. Devido a estas características, não foi por acaso que Streisinger teve sucesso em torná-lo o primeiro vertebrado a ser clonado (Streisinger et al. 1981).

Influenciados pelos trabalhos pioneiros realizados na Universidade de Oregon, pesquisadores de todo o mundo começaram a realizar estudos com este teleósteo. Em 2013, um grupo de cientistas do Wellcome Trust Sanger Institute (Reino Unido), sequenciou o genoma do zebrafish. Com a análise destes dados e comparação com sequências disponíveis na plataforma *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), foi possível observar que cerca de 70% de seus genes são ortólogos aos genes humanos, sendo que destes, 82% possuem relevância a doenças humanas (Howe et al. 2013).

Com o zebrafish se consolidando, cada vez mais, como um modelo para estudo de doenças humanas, a possibilidade de manipular geneticamente esse organismo se tornou interessante ao abrir novas possibilidades de estudos sobre a função de genes específicos ao se

superexpressar, silenciar ou mutá-los (Lieschke e Currie 2007). O primeiro relato de transgenia em zebrafish ocorreu em 1988, onde um plasmídeo contendo um gene de interesse (neste trabalho, resistência à higromicina) foi microinjetado em células-ovo de zebrafish (Stuart et al. 1988). Outros métodos de transfecção de um transgene foram testados, porém a microinjeção ainda é o método mais utilizado. Ainda que existam diversos relatos de modelos geneticamente modificados criados por microinjeção, sua integração apenas ocorre em, aproximadamente, 5% dos embriões manipulados e a taxa de mortalidade varia entre 57% e 97% (Stuart et al. 1988). Por conseguinte, para diminuir os esforços na criação de modelos geneticamente modificados foram propostas alternativas, como a utilização de elementos de transposição, que podem aumentar a capacidade de integração de um transgene (Kawakami et al. 2000).

Os elementos de transposição são regiões no DNA que tem a capacidade de se mover de uma posição no genoma para outra, randomicamente. Sua descoberta foi feita pela cientista Barbara McClintock ao estudar a relação entre o padrão de pigmentação do milho (*Zea mays*) com características citogenéticas. McClintock percebeu que a presença de um elemento *Ds* (dissociação), que tinha sua posição e ação regulada por outro elemento *Ac* (ativador), gerava uma quebra no cromossomo 9 das sementes, fazendo com que nestas células a pigmentação não ocorresse. Somado a isso, quando a pesquisadora tentou identificar a posição dos elementos *Ac*, ela percebeu que estes também se moviam (McClintock 1950).

Os elementos *Ac/Ds* são transposons de DNA, ou transposons classe II. Este tipo de elemento de transposição se caracteriza por mover-se através de intermediários, fita dupla ou simples, de DNA. A maior parte dos transposons conhecidos apresentam repetições terminais invertidas (*TIRs*). Estas regiões são reconhecidas pelas enzimas de transposição (transposases) que os reconhecem, excisando assim a região flanqueada pelos *TIRs* e reintegrando-a em uma região aleatória do genoma. O espaço resultante da excisão do transposon pode ser reparada sem a adição de nenhum elemento, forma conhecida como transposição *corta-cola*, ou pode ser preenchida por uma cópia do transposon, via sistema de reparo (*gap repair*) (Slotkin e Martienssen 2007). Existem, somado a estes, outros dois tipos de transposons de DNA conhecidos: os helitrons e os mavericks, que possuem mecanismos de transposição mais complexos e ainda pouco conhecidos (Feschotte e Pritham 2007).

Além do transposons de DNA, existem também outra classe de elementos de transposição de RNA. Os retrotransposons, ou transposons classe I, se caracterizam pela necessidade de uma transcriptase reversa (TR) para se transporem, logo codificam RNAs que posteriormente são transcrito em DNA que então são transpostos. Assim, os retrotransposons tem uma capacidade de produzir grandes quantidades de elementos, por um sistema *copiadora* (Kazazian 2004; Slotkin e Martienssen 2007). Ambos os tipos de elementos de transposição, DNA e RNA, podem ser classificados como: (1) autônomos, que se caracterizam por elementos capazes codificar o próprio maquinário enzimático necessário à sua transposição (como é o caso do elemento *Ac*); ou (2) Não-autônomos, elementos que não tem capacidade própria de transposição, normalmente devido a mutações ocorridas no gene que codifica a transposase, inativando-o (McClintock 1950). Esses elementos móveis descobertos no milho não são exclusivos a estes vegetais, estão presentes em todas os animais e plantas. Um transposon autônomo foi identificado no peixe medaka (*Orizias latipes*) devido a uma mutação reversível no gene da tirosinase. Esta sequência, nomeada como *Tol2*, foi reconhecida como um transposon classe II, com grande similaridade aos elementos de transposição da família hAT (a mesma família do elemento *Ac*) (Koga et al. 1996). Para determinar a funcionalidade deste transposon, Kawakami et al. (2000) coinjetaram o mRNA da transposase do próprio *Tol2* com um plasmídeo contendo as regiões de transposição do *Tol2* em embriões de zebrafish (que não contém naturalmente o *Tol2*). Estes autores demonstraram que não apenas a transposase (transcrita *in vivo* a partir do mRNA injetado) era funcional, mas também que a eficiência da integração era muito superior às técnicas convencionais de transgenia.

Baseado neste sistema, foi desenvolvido o *Tol2kit* (Kwan et al. 2007), com a proposta de melhorar a eficiência da manipulação genética, ao aumentar a taxa de integração de fragmentos de DNA no genoma em modelos biológicos de pesquisa. Este kit contempla uma grande diversidade de construções que funcionam como bioblocos, sendo eles: regiões promotoras, proteínas fluorescentes marcadoras, locais para inserção de genes de interesse, marcadores para anticorpos e terminadores, todos contendo sítios de recombinação *att* (Hartley 2000), permitindo assim que construções distintas sejam arranjadas entre si da forma que mais agrada ao usuário.

Utilizando-se a plataforma *Tol2kit* para integração de transgenes, em um modelo de ciclo de vida curto como o zebrafish, diversos transgenes com modificações na conformação de receptores podem ser inseridos para estudar as suas atuações no crescimento. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi de criar diferentes vetores para modificação genética de zebrafish com os receptores GHR e IGF1R otimizados para promover o máximo de crescimento de forma hormônio-independente.

Desenvolvimento de construções genéticas para estudos de crescimento em zebrafish (*Danio rerio*)

Guilherme S. Sansão^{1,*}, Marcio A. Figueiredo¹; Andrew Brooks²; Michael J. Waters²; Luis
Fernando Marins¹

¹Universidade Federal do Rio Grande. Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular. Rio Grande, RS, Brasil.

²Universidade de Queensland. Instituto de Biologia Molecular. Brisbane, QLD, Austrália.

*Autor para correspondência. gssansao@gmail.com

Resumo

A aquacultura tem sido alvo crescente de investimentos. Para maximizar a produtividade deste setor, peixes transgênicos com taxas de crescimento elevadas foram criados pela superexpressão do hormônio do crescimento. Em 2012, um estudo demonstrou que ao se ativar constitutivamente o receptor do hormônio do crescimento (GHR) de zebrafish, uma taxa de crescimento elevada foi induzida, abrindo novas possibilidades de manipulações genéticas aplicadas à aquacultura. Neste trabalho, três manipulações no GHR e uma no receptor do Fator de Crescimento tipo-Insulina 1 (IGF1R) foram analisadas para induzir o crescimento em zebrafish. As alterações analisadas foram: o GHR com as mutações ativacionais S246C e V253C; o GHR constitutivamente ativo pela presença de um zíper de leucina seguido de três resíduos de alanina acima do domínio transmembrana; a mutação P442T no GHR, que minimiza a degradação do receptor; e o IGF1R constitutivamente ativo com a região extracelular do receptor CD8 ligado ao domínio transmembrana. Assim, quatro construções foram criadas, contendo genes de receptores modificados como descrito acima, de forma a estimular a maior indução de crescimento possível, porém com uma redução nos efeitos colaterais que ocorrem pelo excesso de hormônio circulante.

Palavras chave: Aquacultura, GHR, IGF1R, Proteínas Quiméricas, Transgenia

Introdução

A aquicultura é um dos setores econômicos de maior crescimento na atualidade, tendo produzido 73,8 milhões de toneladas de organismos aquáticos em 2014. Com o aumento da população humana, aumento do consumo *per capita* de pescados e a estagnação na produtividade pesqueira, a tendência é de que a representatividade da aquicultura no mercado mundial aumente ainda mais (FAO 2016). Devido a este aumento na demanda da produção aquícola, a utilização de peixes geneticamente modificados é possibilidade interessante para aumentar a produtividade deste setor. Existem relatos de manipulação genética em mais de 50 espécies de peixes (Cows et al. 2010). Entre estes, uma atenção especial deve ser dada ao peixe ornamental zebrafish (*Danio rerio*) por possuir um tamanho pequeno, ciclo de vida rápido, facilidade na coleta e manipulação genética de embriões, representando um bom modelo para testes iniciais de transgenia em peixes de cultivo (Udvardia e Linney 2003). Resultados obtidos com este modelo podem ser extrapolados para espécies comercialmente importantes na aquicultura.

Entre as principais características importantes para a aquicultura, previamente utilizadas em transgenes em peixes, pode-se citar a resistência ao frio, a resistência a doenças e melhores taxas de crescimento e conversão alimentar (Hew et al.1992; Cook et al. 2000; Dunham et al. 2002). Estas últimas são as mais estudadas, especialmente pela superexpressão do hormônio de crescimento (GH). As pesquisas sobre este tipo de transgênese culminaram na aprovação para produção e comercialização de um peixe geneticamente modificado pela primeira vez na história (FDA 2015). Entretanto, alguns estudos apontam que esse tipo de manipulação pode gerar efeitos colaterais indesejáveis aos peixes, como uma diminuição no sucesso reprodutivo (Figueiredo et al. 2013), baixa resistência a variações ambientais (Almeida et al. 2013) e imunodeficiência (Batista et al. 2014).

O GH é liberado pela hipófise na corrente sanguínea sendo o principal mediador do eixo somatotrófico. Sua ação sobre o crescimento pode ser direta, via GHR, ou indireta, ao estimular a produção de fatores de crescimento tipo-insulina, ou IGFs (em especial o IGF1) (Fuentes et al. 2013). O GHR ocorre em dímeros e é um receptor encontrado em todos os tecidos dos vertebrados, comumente mais concentrados no fígado, apresentando alguns domínios bem conservados em todos os táxons que o expressam. As principais regiões de

homologia são: o domínio de ligação ao GH (FEGS), ocorrendo na região extracelular; já no interior da célula o *box1*, região responsável pela ligação com o JAK2, o principal mediador intracelular de hipertrofia e hiperplasia (Postel-Vinay e Finidori 1995); o *box2*, região associada à internalização do receptor (Govers et al. 1997); além de um motivo PAGE, que parece atuar na degradação desta proteína (Rudd et al. 2006) (Figura 1). O IGF1, por sua vez, é produzido no fígado, como um dos subprodutos da sinalização do GH, e é então liberado na corrente sanguínea onde poderá se ligar aos seus receptores, abundantes no músculo esquelético, e sinalizar para as vias de crescimento (Fuentes et al. 2013).

Em vista às desvantagens do crescimento estimulado pela superexpressão do GH, uma abordagem mais eficiente na regulação dos fatores de crescimento poderia trazer ganhos significativos para a aquacultura mundial. Sob esta perspectiva, Ahmed et al. (2011) demonstraram que quando o receptor do hormônio do crescimento (GHR) é mutado de forma a estar constitutivamente ativo, pela substituição da região extra e justamembrana por um zíper de leucina, a taxa proliferativa e expressão de fatores de crescimento ficam elevadas, induzindo o crescimento do peixe. Os zíperes atuam ligando-se um ao outro por complementaridade acarretando em uma mudança conformacional no domínio intracelular que separa as regiões do *box1* uma da outra, permitindo a ativação da JAK2, de forma similar a ligação induzida via GH. Este trabalho abriu a possibilidade de uma nova forma de transgênese, permitindo realizar-se um ajuste fino da regulação fisiológica do crescimento.

Existem diversas modificações de receptores em linhagens celulares que induzem uma maior taxa proliferativa e expressão de fatores de crescimento em culturas celulares, que poderiam ser extrapolados para peixes. Entre as principais estão: a mutação no GHR P495T (equivalente à P442T), que diminui a taxa de degradação do receptor (Rudd et al. 2006) ; modificações estruturais que simulam a conformação induzida pelo agonista e aumentam ainda mais o espaço entre os *box1* dos dímeros do receptor, sendo exemplos o GHR constitutivamente ativo por um zíper *jun* seguido de 3 resíduos de alanina acima do domínio transmembrana; e o GHR constitutivo através das mutações F263C e I278C (equivalente a S246C e V253C no GHR de zebrafish), que aproximam as regiões justamembrana por pontes dissulfeto, atuando de forma semelhante ao zíper (Brooks et al. 2014); e pela expressão constitutiva do IGF1R, o principal fator de crescimento associado à musculatura esquelética, através da união da estrutura extracelular do receptor CD8 à região transmembrana do IGF1R,

o CD8 por sua vez também atua na união da porção justamembrana da proteína quimérica CD8/IGF1R (Kim et al. 2007). O presente estudo teve como objetivo a criação de vetores para a manipulação genética de zebrafish com potencial de aumentar suas taxas de crescimento de forma hormônio-independente.

Material e Métodos

Construções genéticas

Este trabalho foi realizado em uma parceria entre o Instituto de Biologia Molecular da Universidade de Queensland (Austrália) e o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como resultado do programa de mobilidade acadêmica Ciências sem Fronteiras (CNPq). Desta forma, as construções foram feitas por duas metodologias distintas de acordo com o local onde foram produzidas. Na Universidade de Queensland a clonagem do vetor de expressão do GHR, e seus mutantes, baseou-se na plataforma Multisite Gateway (Invitrogen), enquanto que na FURG, o plasmídeo com o IGF1R constitutivo foi criado por PCR utilizando-se a DNA polimerase *Taq Platinum* (Thermo Fisher Scientific).

O GHR foi modificado em três conformações distintas, cada uma apresentando seu próprio vetor de expressão. Todas as PCRs feitas para as modificações foram feitas com a enzima de alta fidelidade *Phusion Hot Start II* (Thermo Fischer Scientific) A primeira modificação baseia-se em um zíper de leucina seguido de três resíduos de alanina associados às regiões transmembrana e intracelular do GHR (Figura 2 d). O plasmídeo contendo esse receptor quimérico foi denominado pJun3alaGHR. Uma segunda alteração foi feita utilizando as mutações ativadoras S246C e V253C diretamente no GHR (Figura 2 c), sendo este plasmídeo denominado p2CysGHR. Outro mutante foi o GHR com a substituição P442T no domínio PAGE, chamado de pP442TGHR. Por último, para o IGF1R foi realizada apenas uma modificação, onde domínio extracelular do receptor CD8 foi associado às regiões transmembrana e intracelular do IGF1R, sendo esta construção nomeada pCD8-IGF1R.

O gene do GHR foi amplificado do cDNA de zebrafish por PCR, com a dna polimerase *Phusion Hot Start II*, utilizando os primers GHR-F e GHR-R (Tabela 1) desenhados para anelar nas regiões à 5' e 3' do gene, que apresenta sua sequência disponível

no GenBank (zfGHRa - NM_001083578), contendo porções extras com sítios de recombinação (*attB1* e *attB2*) para o Gateway. Este gene foi sequenciado e, então, utilizado como molde para as modificações posteriores (Figura 3 a).

Para as mutações do pJun3alaGHR o sítio de recombinação (N-terminal), o peptídeo sinal, o zíper, os resíduos de 3 alaninas e o início da região transmembrana (TMD) do GHR foram sintetizados anelando-se os primers PEP SINAL, JUN-F, e JUN3ALA-R (Tabela 1), que continham essas sequências, criando assim um fragmento final por PCR. Concomitantemente, o GHR foi reamplificado, porém com o primer GHRTMD (Tabela1) anelando na região inicial do TMD. Os dois fragmentos foram então anelados (pela sobreposição no TMD) e unidos por PCR (Figura 3 c). As mutações para o p2CysGHR e pP442TGHR também foram realizadas por PCR com o primer GHR-F utilizado para a amplificação inicial e o 2CYS-R ou P495T-R anelando na região a ser modificada contendo as mutações desejadas (S246C e V253C para o p2CysGHR, e P442T para o pP442TGHR). Ao mesmo tempo que uma outra PCR foi realizada com o primer 2CYS-F ou P495T-R (Tabela 1) anelando na mesma região, contendo as mutações, e o GHR-R (Tabela 1) utilizado na amplificação inicial. Os produtos das duas PCRs foram então anelados (uma vez que ambos os primers com as mutações eram complementares) e, mais uma vez, unidos em uma terceira PCR (Figura 3 b).

Os variantes de GHR resultantes foram clonados no vetor pDON221 (Life Technologies) e então recombinados com plasmídeos do *Tol2kit* (Kwan et al. 2007) via Multisite Gateway (Invitrogen). Os plasmídeos utilizados foram: o pENTR5'ubi, apresentando um promotor de ubiquitina b; o pDON221 com o gene de interesse; o p3E-polyA, expressando um sinal de poliadenilação; além do pDestTol2pACrymCherry, que contém as regiões do *Tol2* e um promotor de alfa-cristalino direcionando a expressão de uma mCherry (proteína fluorescente vermelha).

Uma metodologia distinta foi utilizada no plasmídeo pCD8-IGF1R. Esta construção é um híbrido entre pMyoRED (previamente produzido no Laboratório de Biologia Molecular do ICB/FURG) e pDestTolGC2 (*Tol2kit*). Primeiro foi realizada uma PCR do pDestTolGC2 amplificando o exon 4 do transposon *Tol2* com os primers P1F, que contia uma região extra com sítio de retrição para a endonuclease MluI (New England Biolabs), e P1R, com sítio para a BsiWI (New Engand Biolabs). Seguidamente foi realizada uma PCR amplificando todo o

arcabouço do pMyoRED pelos primers P2F, também com um sítio para a BsiWI, e P2R, com sítio para a MluI. Os dois produtos foram digeridos com as enzimas de restrição BsiWI e MluI, para formar terminais coesivos e então ligados por uma T7 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific), gerando um plasmídeo intermediário pMyoRED-Tol2. Outra PCR utilizando o pDestTolGC2 como DNA molde foi realizada com os primers P3F, com sítio para NheI (New England Biolabs), e P3R, com sítio para Kpn2I (New England Biolabs), amplificando o exon 1 do *Tol2*, além do promotor da miosina cardíaca cadeia leve 2 (CMLC2) direcionando a expressão de uma proteína verde fluorescente (EGFP) para o coração. Uma última PCR então foi realizada amplificando todo o plasmídeo pMyoRED-Tol2 pelos primers P4F, com sítio para Kpn2I, e P4R, com sítio para NheI. Os dois produtos foram tratados com as endonucleases NheI e Kpn2I e posteriormente ligados por uma T7 DNA ligase, resultando no pGFP/RED-Tol2. O pGFP/RED-Tol2 possuía o promotor da miosina de cadeia leve 2 (MYL2) direcionando a expressão de uma proteína vermelha fluorescente (DsRED). O gene da DsRED foi então substituído pelo gene do receptor quimérico CD8/IGF1R, sintetizado pela empresa Epoch LifeScience (EUA), gerando assim o vetor de expressão pCD8/IGF1R (Figura 4). Todas as PCR realizadas neste processo foram utilizando a enzima DNA polimerase *taq platinum* (Thermo Fisher Scientific).

Transformação bacteriana

As construções foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* quimio competentes (Top10, Invitrogen) por choque térmico através de protocolos previamente estabelecidos (Sambrook et al. 1987). Como os plasmídeos criados apresentam um gene de resistência à canamicina, este antibiótico foi utilizado para selecionar as cepas transgênicas.

Purificação dos plasmídeos

A fim de recuperar a construção genética, as cepas de bactérias identificadas em meio sólido foram cultivadas em meio líquido, contendo antibiótico, por 16 horas a 37°C, em agitação de 250 rpm. Após este período, as soluções foram centrifugadas e o precipitado foi purificado utilizando-se o kit de mini prep *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences).

Confirmação das construções genéticas

Após a purificação, os plasmídeos recuperados foram quantificados em fluorímetro através do kit *Qubit dsDNA BR* (Invitrogen). Seguido à quantificação, uma alíquota dos plasmídeos foi cortada em regiões específicas utilizando-se enzimas de restrição e então analisada em eletroforese em gel de agarose 1%. Fragmentos produzidos com tamanho equivalente ao que se estimaria devido à distância entre os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas utilizadas confirmaram a montagem do plasmídeo que, posteriormente, foi confirmado também por sequenciamento.

Produção do mRNA da transposase

Para testar a integração dos vetores por transposição, a construção foi coinjetada com o RNA da transposase. Para obter o mRNA, o plasmídeo pCS2FA-transposase, oriundo do *Tol2kit*, foi utilizado para uma transcrição *in vitro* através do kit *mMESSAGE mMACHINE SP6 Transcription* (Thermo Fischer Scientific), o mRNA proveniente foi então purificado utilizando-se o kit *MEGAclear Transcription Clean-up* (Thermo Fischer Scientific).

Microinjeção

Na microinjeção foram coinjetados o vetor de expressão pJun3alaGHR e o mRNA da transposase em concentrações iguais de 50 ng/μL. Com um pico injetor motorizado *IM-30* (Narishige) foram administrados cerca de 300 pL de solução no citoplasma de um zigoto recém fertilizado antes da primeira mitose ocorrer. Estas manipulações em zebrafish foram realizadas no Instituto de Biologia Molecular da UQ para validar o marcador de transgenia (mCherry).

Manutenção dos reprodutores e larvas

A manutenção dos reprodutores e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) foi realizada de acordo com Lawrence (2007).

Bioética

A utilização de animais para o estudo foi realizado de acordo com a regulamentação da Universidade de Queensland, local onde a prática foi realizada possuindo um protocolo de aprovação sob o número: IMB/002/14/NHMRC.

Resultados e Discussão

Plasmídeo base das variantes do GHR

Todas as conformações do GHR desenvolvidas estão inseridas em um plasmídeo base criado por recombinação contendo um promotor de alfa-cristalino direcionando a expressão de uma mCherry (proteína fluorescente vermelha), um promotor de ubiquitina direcionando a expressão do gene de interesse seguido de um sinal de poliadenilação. Todo o cassete está flanqueado pelas regiões do *Tol2* (Figura 6 a,b,c.).

As sequências do *Tol2* permitem que ao se coinjectar a construção com o mRNA da transposase do *Tol2*, a enzima, traduzida *in vivo*, reconheça esta construção e a integre no genoma. A taxa de integração do transgene por esta técnica é relatada como superior a 50% dos embriões microinjetados (Kwan et al. 2007), muito acima dos 5% por metodologias tradicionais (Stuart et al. 1988).

A proteína fluorescente e o promotor de alfa-cristalino possuem a função de atuar como um marcador de transgenia, desta forma os peixes portando os transgenes podem ser facilmente identificados em microscópio de fluorescência. Com esse tipo de fenótipo não é necessário retirar tecido, extrair DNA e realizar uma PCR para confirmar a integração, que pode ser feita ainda em estágios embrionários. Em testes feitos na Universidade de Queensland, alguns embriões foram microinjetados com essas construções, a expressão de uma fluorescência no olho da larvas permitiu a validação do gene repórter (Figura 5).

O promotor utilizado para direcionar a expressão dos GHR otimizados é um promotor de Ubiquitina B (UBB). Este promotor foi caracterizado por Mosimann et al. (2011), como uma alternativa aos promotores constitutivos vigentes por apresentar uma expressão forte em todos os tecidos (por exemplo, o promotor da β -actina, muito utilizado para expressão ubíqua de transgenes em peixes, não apresenta uma expressão forte em eritrócitos). Contudo, ao

observar-se o padrão de expressão de uma EGFP direcionada por este promotor, no trabalho de Mosimann et al (2011), a sua expressão na musculatura esquelética de adultos parece ser, comparada a outros tecidos, baixa. Ainda assim sua expressão é percebida facilmente no músculo, porém por não haver uma expressão máxima, uma diminuição no desempenho do transgene pode ser esperada. Além disso, a expressão do transgene em órgãos como olho, cérebro, gônadas, rins, entre outros, podem acarretar em efeitos colaterais semelhantes ou até mais graves que o induzidos pela superexpressão do GH. Entretanto, mesmo que essa construção mantenha os mesmos efeitos deletério induzidos pela superexpressão do GH para o peixe, por haver menos hormônio circulante existe uma menor propensão de se causar efeitos colaterais no consumidor de organismos portando este transgene, acarretando em uma maior aceitação e potencial de comercialização destes peixes.

pJun3alaGHR

A construção *pJun3alaGHR* possui o gene do GHR truncado, onde a região extracelular foi substituída por um zíper de leucina *c-jun* seguido de três resíduos de alanina. A estratégia para gerar esta construção foi eficiente. Não foi observada nenhuma mutação que pudesse alterar a função dos domínios que constituem o receptor quimérico planejado. O GH, quando se liga ao GHR, induz uma aproximação das regiões justamembrana do receptor, o que induz uma mudança conformacional do resto da proteína ativando as vias de crescimento. O zíper *c-jun* possui a capacidade de formar homodímeros, assim ao se substituir a região extracelular e justamembrana por estes elementos, as regiões equivalentes à justamembrana se aproximam pela atração *c-jun/c-jun*, induzindo as vias de crescimento de forma análoga à sinalização via GH (Behncken et al. 2000). Ainda que esta ação constitutiva seja suficiente para ativar as vias de crescimento, a adição de aminoácidos neutros após o zíper pode posicionar a região transmembrana de forma a aumentar sinalização do eixo somatotrófico. Assim, no trabalho de Brooks et al (2014), a adição de três alaninas (cada uma causando uma rotação de aproximadamente 100°) demonstrou causar a maior taxa proliferativa em células humanas. Isso parece ocorrer devido a um maior afastamento das regiões *box1* nesta conformação, ativando a JAK2 (Brooks et al. 2014). Conseqüentemente, é esperado que a taxa de crescimento de peixes transgênicos com esse transgene seja ainda maior que o criado por Ahmed et al. (2011), que possuía apenas o zíper de leucina.

p2CysGHR

O GHR codificado pelo p2CysGHR apresenta duas substituições de aminoácido, um na região justamembrana, S246C, e outro na transmembrana, V253C. As duas cisteínas adicionadas interagem com as cisteínas presentes no outro GHR do dímero trazendo as regiões justa e transmembrana mais próximas alterando a conformação do receptor de forma semelhante ao zíper. Entretanto, como é mantida a região extracelular, as interações entre a região extracelular e transmembrana são mantidas e a estrutura do receptor pode ficar ligeiramente distinta. Apenas a comparação da alteração molecular *in vivo* poderá fornecer informações sobre qual dos dois mecanismos de ativação constitutiva é o mais eficiente.

pP442TGHR

No plasmídeo pP442TGHR foi induzida a mutação P442T. Esta mutação no domínio PAGE parece diminuir a taxa de degradação do receptor, mantendo sua atividade aumentada. Um peixe contendo esta mutação pode apresentar um crescimento acelerado. Entretanto, essa construção é dependente de hormônio. Caso esta alteração tenha um efeito positivo no crescimento, esta poderá ser inserida no GHR constitutivamente ativo. Ao se somar uma maior sinalização para o crescimento (pelo GHR constitutivo) com um receptor imune à uma inativação endógena (ao se mutar o domínio PAGE), poderá obter-se as construções mais efetivas possíveis em termos de ganho de biomassa.

Construção base da variante do IGF1R

O plasmídeo utilizado como vetor de expressão para o IGF1R modificado, diferentemente das construções do GHR que foram sintetizados por recombinação, foi sintetizado por PCR. Ao se realizar o sequenciamento das regiões de ligação dos fragmentos que o constituem, foram encontradas diversas mutações. Entretanto, estas não parecem alterar a funcionalidade do plasmídeo, uma vez que aquelas que ocorreram nas regiões codificantes não alteraram a sequência de aminoácidos de forma significativa (mutações silenciosas). Ainda que as DNA polimerases sejam eficientes na união de fragmentos de DNA, estas enzimas apresentam uma taxa de erro que aumenta a cada reamplificação da sequência. Desta forma a utilização polimerases de alta fidelidade para a formação de vetores recombinantes é

imprescindível e, além disso, deve-se evitar o uso amplificações repetidas de uma mesma região, principalmente em estudos baseados em mudanças conformacionais geradas por mutações dirigidas.

Assim como as outras construções, esse plasmídeo apresentou as regiões *Tol2* facilitando a integração do transgene e um marcador de transgenia por fluorescência. A fluorescência foi dirigida pelo promotor *cm1c2*, sendo assim, ao invés terem sido identificados por uma fluorescência no olho, esta será no coração (Figura 6 d). Ainda que este promotor não permita que organismos adultos sejam identificados, ao se estabelecer uma linhagem e se separar ainda quando larvas os transgênicos, não existe diferença de funcionalidade quando comparado ao alfa-cristalino.

O promotor que direciona a expressão do IGF1R quimérico, também é o promotor da *myl2*. Desta forma, a expressão do transgene não será ubíqua, mas restrita ao músculo esquelético. Esta é uma característica particularmente importante, pois existe uma provável diminuição dos efeitos colaterais deletérios da indução do crescimento pelo transgene. Além disso, as células da musculatura esquelética são naturalmente ricas em receptores IGF1R. Desta forma, todos os mediadores de crescimento associados ao IGF1R estarão presentes e agirão de forma mais previsível sob a atuação do transgene. Entretanto, como a MYL2 não apresenta uma expressão forte em tecidos ósseos, conjuntivos e epiteliais, é possível que o crescimento, mediado pelo seu promotor, seja influenciado negativamente por uma ausência de estruturas de ancoragem, sustentação ou mobilização espacial que sustentem as células em hiperplasia e hipertrofia. Os efeitos do promotor da MYL2 comparado a um promotor de expressão ubíqua poderá gerar informações sobre o quanto uma atuação tecido-específica pode influenciar no crescimento e efeitos colaterais da indução do eixo somatotrófico de forma ubíqua ou somente na musculatura esquelética.

pCD8/IGF1R

O gene do receptor quimérico CD8/IGF1R sequenciado não apresentou nenhuma anomalia quanto à estrutura proposta. O CD8 atua em dímeros e, ao se utilizar a região extracelular deste receptor com a estrutura transmembrana e intracelular do IGF1R, a estrutura da molécula criada mantém a sinalização do IGF1R constitutivamente ativada. A indução de crescimento via sinalização por IGF1R é uma via ainda não estudada e seus efeitos no

crescimento podem ser interessantes. Como o IGF1R não tem uma distribuição tão ampla como o GHR, suas vias de sinalização podem ser específicas para apenas certos tipos celulares. Desta forma, assim como o promotor da MYL2, a superexpressão do IGF1R constitutivamente ativo pode ser uma alternativa a indução do crescimento com efeitos adversos indesejáveis reduzidos.

Tanto o GHR quanto o IGF1R constitutivamente ativos são alternativas de transgenes hormônio-independentes para induzir o crescimento em peixes. Esta estratégia pode ser vantajosa por reduzir possíveis riscos dos transgênicos afetarem pessoas ou animais que os consumam, uma vez que não haverá uma quantidade elevada de hormônio circulante nestes. Além disso, existe a possibilidade de se diminuir os problemas da atuação do GH em sistemas indesejados pela atuação direcionada pela promotor. Contudo, principalmente ao se utilizar promotores de expressão ubíqua, existe a possibilidade de se agravar ainda mais os efeitos colaterais da manipulação ao se diminuir a capacidade das células em regular a disponibilidade de receptores. Assim, a avaliação da expressão dos transgenes produzidos em zebrafish deverão permitir uma melhor elucidação sobre as vantagens riscos e cuidados ao se manipular geneticamente um organismo pela alteração da estrutura de receptores.

Ao se estimular a produção de fatores de crescimento em demasia, pode-se acarretar não só em um maior acúmulo de biomassa, como também uma maior propensão a neoplasias. Muitas das manipulações possíveis nos receptores para aumento de taxas proliferativas, como é o caso o GHR P442T, foram identificadas justamente por pela sua associação a tumores (Rudd et al. 2006). Mesmo que um peixe com tumores não seja interessante para a aquacultura, o zebrafish também é um organismo muito utilizado no estudo de doenças humanas (Lieschke e Currie 2007). Assim, caso ocorra formação de tumores devido ao uso destas construções, os modelos gerados poderão fornecer informações valiosas para pesquisas médicas. Outra utilização possível dos modelos com os receptores mutados seria o estabelecimento de culturas celulares. O zebrafish possui poucas linhagens celulares estabelecidas. Entretanto, este número poderia ser significativamente aumentado a partir da utilização dos receptores de crescimento constitutivamente ativados como forma de imortalização celular.

Conclusão

Em síntese, foram criados quatro plasmídeos para a manipulação genética de zebrafish, sendo eles os: pJun3alaGHR, p2CysGHR, pP442TGHR, pCD8IGF1R (Figura 6). Estas construções representam transgenes inovadores pela utilização de diferentes receptores do eixo somatotrófico constitutivamente ativos, uma provável otimização na transdução de sinal pelo receptor além de uma taxa reduzida de degradação destes. As construções foram todas desenhadas para transfecção em zebrafish, porém podem ser extrapoladas para peixes com maior relevância comercial caso haja interesse. Adicionalmente, estas construções poderiam ser utilizadas no estabelecimento de novas culturas celulares para pesquisas médicas.

Referências

- Ahmed ASI, Xiong F, Pang S-C, et al (2011) Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res* 20:557–67. doi: 10.1007/s11248-010-9439-9
- Almeida DV, de Martinez Gaspar Martins C, de Azevedo Figueiredo M, et al (2013) Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Transgenic Res* 22:75–88. doi: 10.1007/s11248-012-9627-x
- Batista CR, Figueiredo MA, Almeida D V., et al (2014) Impairment of the immune system in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 36:519–524. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.022
- Behncken SN, Billestrup N, Brown R, et al (2000) Growth hormone (GH)-independent dimerization of GH receptor by a leucine zipper results in constitutive activation. *J Biol Chem* 275:17000–7. doi: 10.1074/JBC.275.22.17000
- Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, et al (2014) Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344:1249783. doi: 10.1126/science.1249783
- Cook J., McNiven M., Richardson G., Sutterlin A. (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188:15–32. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00331-8

- Cows IG, Bolland JD, Nunn AD, et al (2010) Defining environmental risk assessment criteria for genetically modified fishes to be placed on the EU market. EFSA Support Publ. doi: 10.2903/SP.EFSA.2010.EN-69
- Dunham RA, Warr GW, Nichols A, et al (2002) Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. Mar Biotechnol (NY) 4:338–44. doi: 10.1007/s10126-002-0024-y
- FAO (2016) The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome
- FDA (2015) Freedom of information summary of the opAFP-GHc2 rDNA construct in EO-1 α lineage Atlantic salmon (AquAdvantage Salmon). NADA 141-454. FDA
- Figueiredo MA, Fernandes R V, Studzinski AL, et al (2013) GH overexpression decreases spermatic parameters and reproductive success in two-years-old transgenic zebrafish males. Anim Reprod Sci 139:162–7. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.012
- Fuentes EN, Valdés JA, Molina A, Björnsson BT (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system. Gen Comp Endocrinol 192:136–148. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.06.009
- Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ (1997) Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. EMBO J 16:4851–8. doi: 10.1093/emboj/16.16.4851
- Hew CL, Davies PL, Fletcher G (1992) Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. Mol Mar Biol Biotechnol 1:309–17.
- Kim H-J, Litzemberger BC, Cui X, et al (2007) Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. Mol Cell Biol 27:3165–75. doi: 10.1128/MCB.01315-06
- Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, et al (2007) The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. Dev Dyn 236:3088–99. doi: 10.1002/dvdy.21343
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture 269:1–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367. doi: 10.1038/nrg2091
- Mosimann C, Kaufman CK, Li P, et al (2011) Ubiquitous transgene expression and Cre-based recombination driven by the ubiquitin promoter in zebrafish. *Development* 138:169–77. doi: 10.1242/dev.059345
- Postel-Vinay MC, Finidori J (1995) Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *Eur J Endocrinol* 133:654–9. doi: 10.1530/EJE.0.1330654
- Rudd MF, Webb EL, Matakidou A, et al (2006) Variants in the GH-IGF axis confer susceptibility to lung cancer. *Genome Res* 16:693–701. doi: 10.1101/gr.5120106
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1987) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Stuart GW, McMurray J V, Westerfield M (1988) Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103:403–12.
- Udvardia AJ, Linney E (2003) Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol* 256:1–17. doi: 10.1016/S0012-1606(02)00083-0

Tabelas

TABELA 1. PRIMERS UTILIZADOS
PRIMERS NUCLEOTÍDEOS

GHR-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGAGAAAGTCCTTTTCATCTGTATC TTGTTCCACC
GHR-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGGTGTAATGTTGTCCAGAAGGT CAGGAGTC
2CYS-F	GCACGTTTCCGATGGCGCTGTGCTTGAGTTTTATACTGATTG
2CYS-R	GCACAGCGCCATCGGAAACGTGCATTCTTTGCT
P495T-F	AAGTGATTTTACAACCGCTGGAGAAAGTGATGC
P495T-R	GCATCACTTCTCCAGCGGTTGTGAAATCACTT
PEP SINAL	TCACTTTTTCTCCAGCCGAGCGATTGCGAACACCAGTCCTTTTCCACACAT
JUN-F	ATCGCTCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTTGAAAGCTCAAAACTCCGAGCTGG CATCCACCGCCAACATGCTCAG
JUN 3ALA-R	GGCAGCGGCGGCCGCTTCATGACTTTCTGCTTAAGCTGTGCCACCTGTTCCCTGA GCATGTTGGCGGTGGATGC
GHR TMD	GCGGCCGCCGCTGCCTCAACGTTTCCGATGGCGCTGG
P1F	CGCGTACGGCTCCCCGGTCCATCTACCC
P1R	CGACGCGTAGCTGTTTCCTGCTCGAGGGC
P2F	CGCGTACGTGGCAAGTGTAGCGGTCACGC
P2R	CGACGCGTCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTC
P3F	CGGCTAGCGGGCTTGTGAAGGTAGGGGGT
P3R	CGTCCGATCAGGGGGAGGTGTGGGAGGT
P4F	CGTCCGGAAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCA
P4R	CGGCTAGCTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC

Figuras

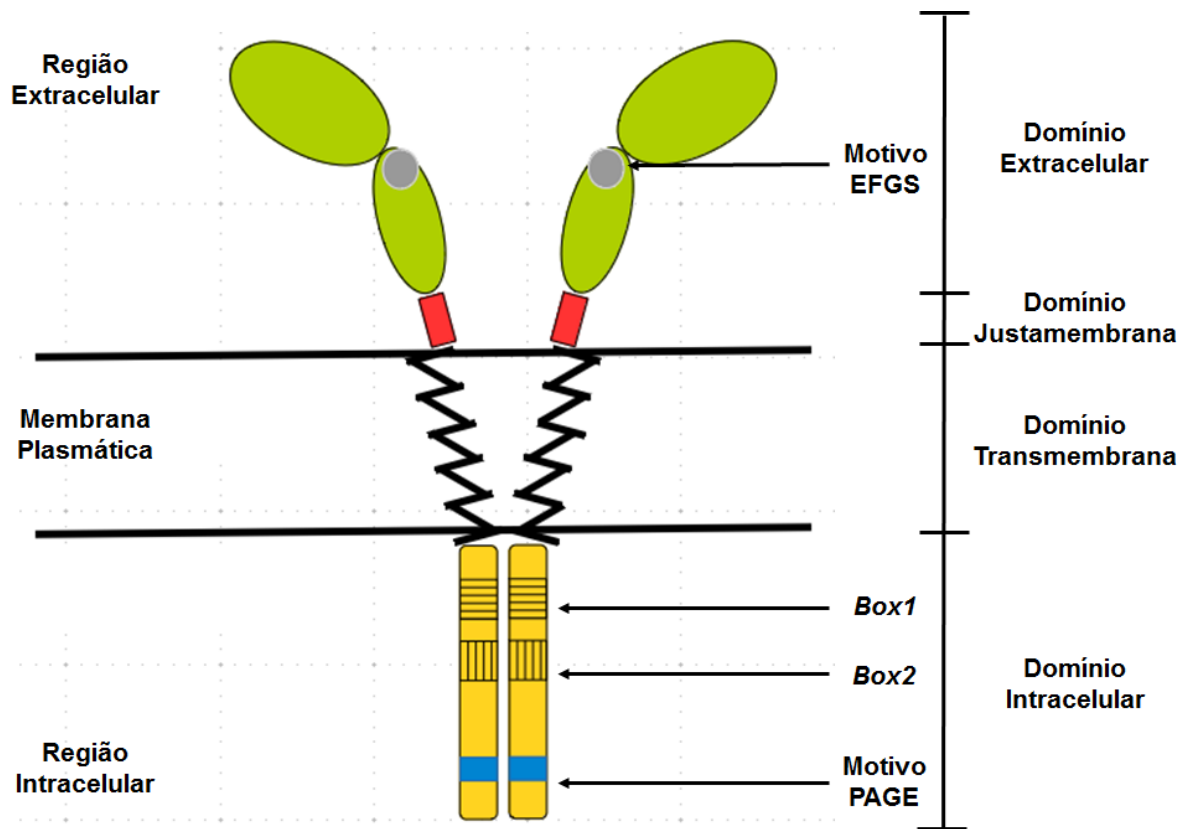


Figura 1. Representação esquemática dos domínios e motivos conservados do GHR. Em verde está representado o domínio extracelular; em cinza o motivo GEFS, sítio de ligação do receptor a seu agonista; em vermelho, o domínio justamembrana; as linhas pretas em ziguezague representam o domínio transmembrana; em amarelo, o domínio intracelular; a caixa com linhas horizontais simboliza a região do *Box1*; a caixa com linhas verticais, o *Box2*; e em azul está representada a sequência PAGE.

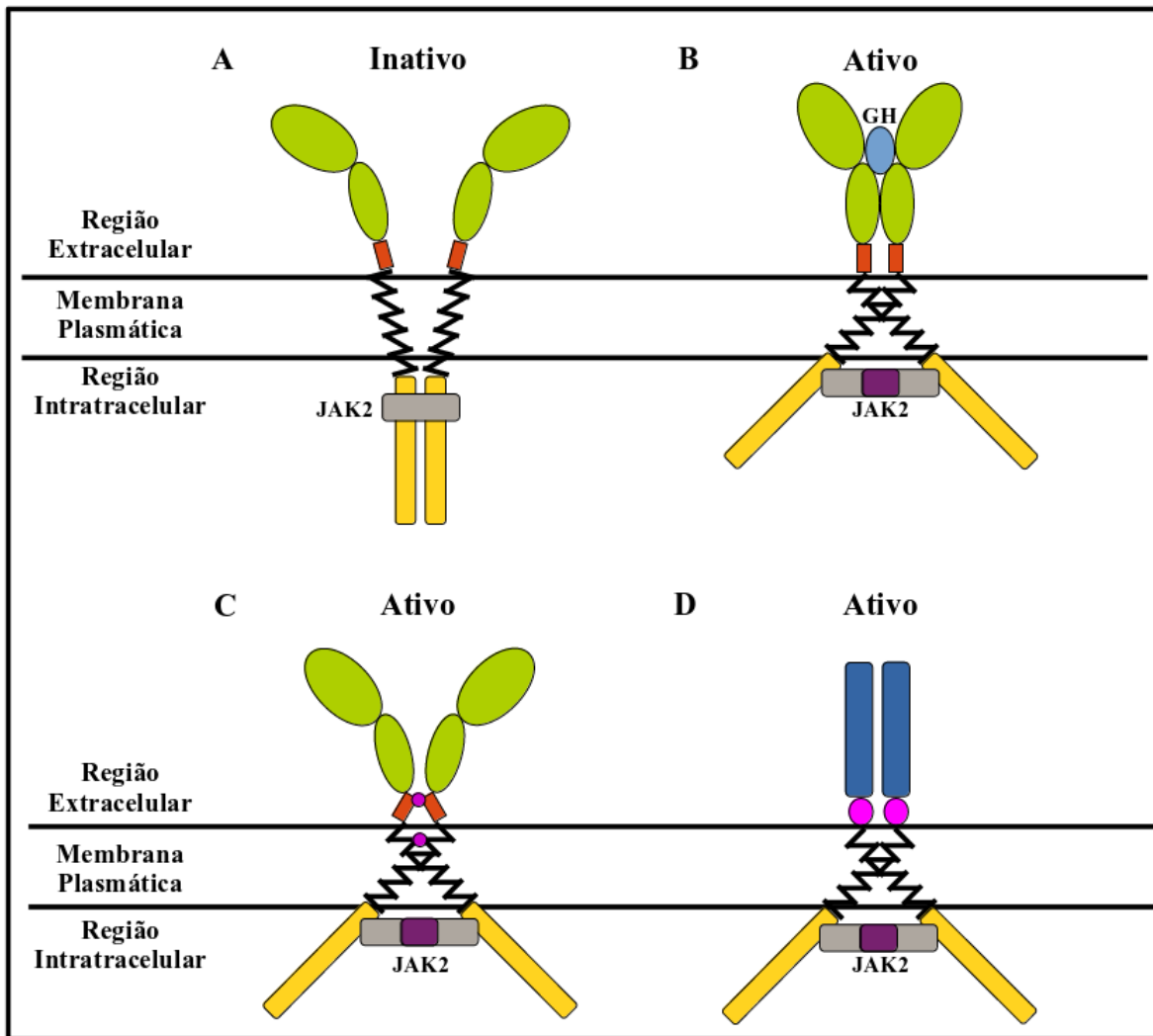


Figura 2. Esquema da estrutura do dímero de GHR em diferentes conformações. (A) O GHR selvagem está representado com diferentes regiões. Em verde está o domínio extracelular (DEC), em vermelho o domínio justamembrana (DJ); em ziguezague, o domínio transmembrana (DTM); em amarelo, o domínio intracelular (DIC); e em cinza está representada a um dímero de JAK2 inativada sobreposta associada à região *box1*. (B) Ativação do GHR pelo GH (em azul). Pode-se perceber que o distanciamento do DIC permite o posicionamento correto dos domínios de ativação das JAK2 (em roxo). (C) GHR com as mutações ativadoras S246C e V253C. A presença das pontes dissulfeto (em magenta) causada pela interação das cisteínas adicionadas mimetiza a ação do GH no receptor. (D) GHR constitutivamente ativo pela substituição dos DEC e DJ por um zíper de leucina seguido de 3 resíduos de alanina. Em azul está o zíper de leucina que atua em complementaridade e, de forma semelhante ao GH, deixa as regiões equivalentes à DJ próximas uma da outra; em rosa, as 3 alaninas corrigem o dobramento do receptor para manter a sinalização em seu ótimo.

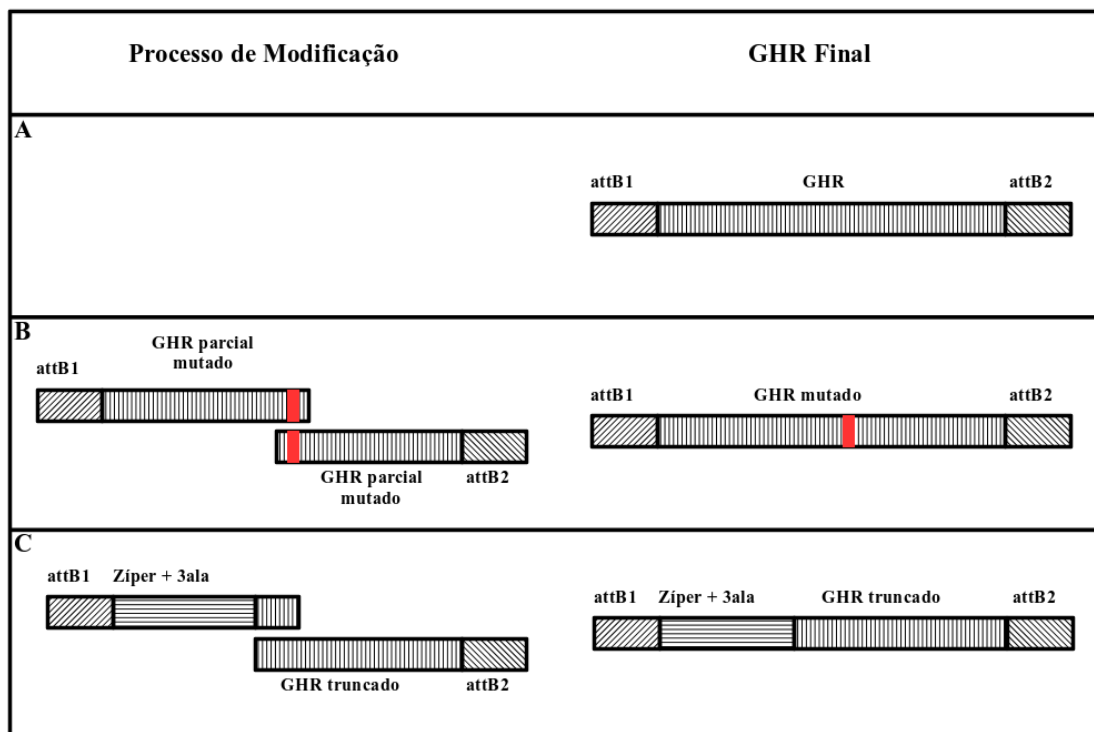


Figura 3. Processo de modificação da sequência do GHR para otimizar sua conformação. (A) Representação do produto de PCR oriundo da amplificação do gene do GHR realizada com primers contendo sequências extras às de anelacão no gene, sendo estas as regiões de recombinação (*attB1* e *attB2*). O produto desta PCR contendo o gene do GHR e sítios de recombinação foi utilizado para as modificações posteriores. (B) Sobre o gene do GHR com os sítios de recombinação foram feitas duas PCRs concomitantemente, utilizando-se primers contendo a mutação desejada (S246C e V253C ou P495T) a 5' e outro na região mais externa do gene com a recombinação a 3' e com o primer 5' contendo a mutação e o 3' anelando na região mais externa. Estes amplicons foram anelados e unidos por PCR resultando no gene do GHR contendo as mutações dirigidas, em vermelho, flanqueado pelos sítios *attB*. (C) Também utilizando-se o gene do GHR com os sítios de recombinação como DNA molde foi feita uma PCR com primers anelando a 5' na região do domínio transmembrana (DTM) e a 3' na região de final do gene com o sítio *attB2*. Este produto foi então anelado à um fragmento criado sinteticamente contendo a região de recombinação *attB1*, o zíper de leucina seguido de três alaninas e um fragmento do DTM do GHR (para o anelamento). Os dois produtos foram unidos por PCR dando origem ao gene de interesse do pJun3alaGHR.

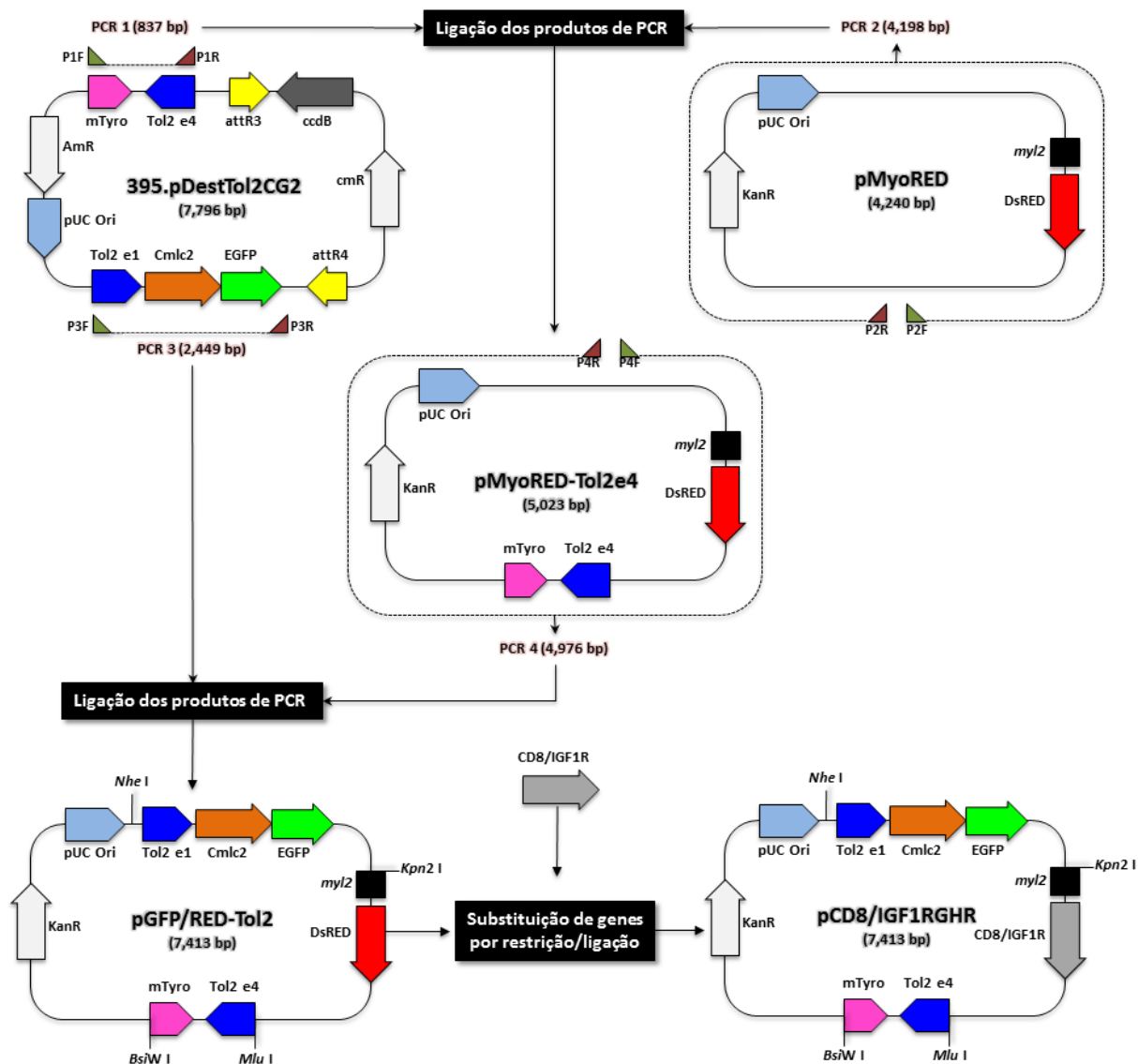


Figura 4. Ilustração sobre a metodologia utilizada para a síntese do vetor pCD8/IGF1R. Os plasmídeos pDestTol2CG2 (*Tol2kit*) e pMyoRED (previamente produzido no laboratório de biologia molecular da FURG) foram utilizados como base para a construção final. Primeiro uma PCR foi feita para amplificar o exon 4 do Tol2 do pDestTol2GC2 (PCR1). Concomitantemente, uma PCR foi realizada amplificando todo o arcabouço do pMyoRED (PCR2). Os primers utilizados foram desenhados de forma a conter regiões extras com sítios de restrição. Os produtos das PCR foram assim digeridos com endonucleases (específicas para os sítios inseridos pelos primers) para formar terminais coesivos e então ligados por uma T7 DNA ligase formando o plasmídeo pMyoRED-Tol2e4. Uma outra PCR utilizando o pDestTol2CG2 (PCR3) foi realizada de forma a amplificar o exon 1 do Tol2 (Tol2e1) o promotor da miosina cardíaca leve 2 (CMLC2) direcionando o gene da proteína verde fluorescente (EGFP). Seguidamente, o pMyoRED-Tol2e4 foi amplificado em sua totalidade (PCR4). Os dois produtos de PCR foram tratados com enzimas de restrição e então ligados gerando o pGFP/RED-Tol2. Este vetor possuía a sequência do gene de uma proteína vermelha fluorescente (DsRED), que era direcionada pelo promotor da miosina cadeia leve 2 (*myl2*). Este gene foi substituído por restrição e ligação pelo gene do CD8/IGF1R, produzido sinteticamente. A construção resultante apresenta assim o receptor quimérico direcionado pelo *myl2* e um marcador de transgenia (EGFP) direcionado para o coração (CMLC2) flanqueados pelos exons do *Tol2*.

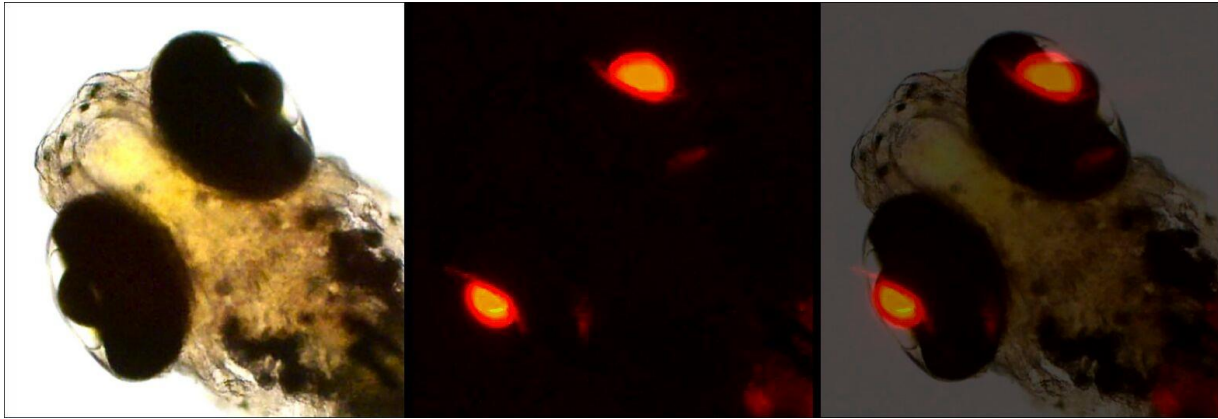


Figura 5. Validação do gene repórter. Uma larva de zebrafish transgênica pode ser facilmente identificada em microscopia de epifluorescência pela expressão da *mCherry* no cristalino. À esquerda a imagem da larva transgênica contendo a construção do pJun3alaGHR em luz branca. No centro, sob excitação de uma luz verde, percebe-se então a fluorescência vermelha expressa nos olhos dos peixes transgênicos. À direita as imagens estão sobrepostas.

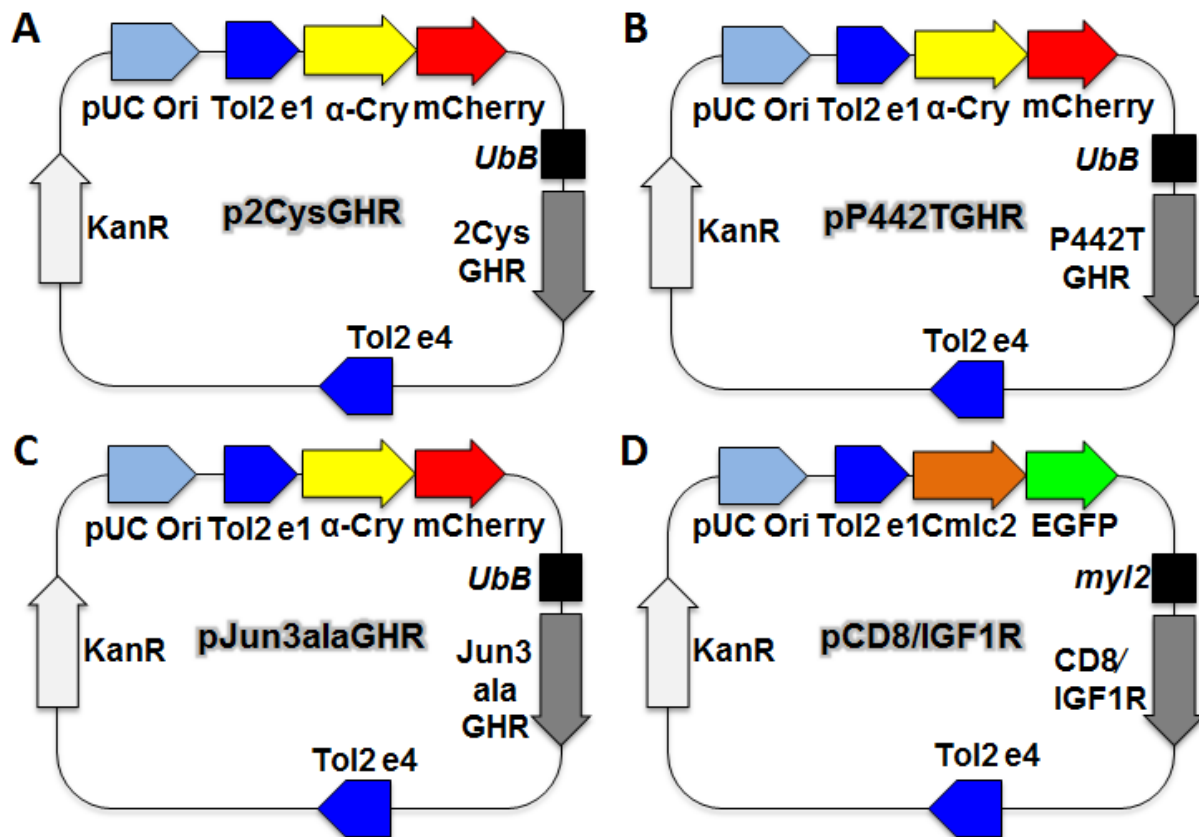


Figura 6. Mapa dos vetores de expressão finais contendo os transgenes criados. (A) A construção p2CysGHR, em branco está a resistência à canamicina, em azul claro a origem de replicação (pUC Ori), em azul escuro as regiões de reconhecimento pela transposase (*Tol2*), em amarelo o promotor do α -cristalino (α -Cry), em vermelho o gene da mCherry, uma proteína vermelha fluorescente, em preto o promotor da Ubiquitina B (*UbB*) e em cinza o gene do receptor do homônio do crescimento com as mutações ativantes S246C e V253C. (B) construção pP442TGHR com as mesmas regiões que o plasmídeo p2CysGHR porém em cinza o gene representado é o do GHR com a mutação P442T. (C) A construção pJun3alaGHR com as mesmas regiões que os dois plasmídeos anteriores porém em cinza está representado o gene do receptor quimérico do GHR com o *c-jun* seguido de três resíduos de alanina na região extracelular. (D) O plasmídeo pCD8/IGF1R, em branco está a resistência à canamicina, em azul claro a origem de replicação (pUC Ori), em azul escuro as regiões de reconhecimento pela transposase (*Tol2*), em marrom o promotor da miosina cardíaca (*cmlc2*), em verde está o gene repórter caracterizado por uma proteína verde fluorescente (EGFP), em preto o promotor da miosina cadeia leve (*myl2*), em cinza o gene do receptor quimérico CD8/IGF1R.

Considerações finais

As principais vantagens da utilização da manipulação genética por técnicas moleculares sobre o melhoramento genético são o ganho de tempo nas modificações, inserção de características não presentes no background genético da espécie e um melhor controle sobre a forma como as características adquiridas poderão agir (Gepts 2002). Entretanto, ao se observar que o único peixe transgênico liberado para consumo (FDA 2015) apresenta uma série de efeitos colaterais causados pela superexpressão do GH (Figueiredo et al. 2013; Batista et al. 2014), uma abordagem mais precisa se mostra importante. O GH, assim como outros hormônios, possui uma atuação multisistêmica, desta forma a manipulação de receptores para que sejam ativados independentes do hormônio permitem o direcionamento dos efeitos induzidos pelo agonista apenas nas células desejadas.

Neste trabalho utilizamos três formas distintas de ativação constitutiva de receptores (por zíperes de leucina, resíduos de cisteína e receptor do CD8), previamente validadas em culturas celulares (Kim et al. 2007; Brooks et al. 2014). As construções produzidas apresentam duas formas de ativação das vias de sinalização, uma pela ação constitutiva do receptor e outra pela diminuição da internalização do receptor. Como as construções possuem o intuito de aumentar o crescimento em peixes, as regiões transmembrana e intracelular de dois receptores, GHR e IGF1, que induzem as vias de crescimento foram utilizadas para avaliar o mais efetivo.

Apesar das questões específicas da estimulação do eixo somatotrófico, o presente estudo também possui um caráter metodológico. Para a síntese dos plasmídeos duas alternativas foram utilizadas: uma por recombinases e outra por PCR. O uso de recombinases é bem consolidado, simples e eficiente, entretanto devido ao custo alto das enzimas necessárias para este processo, esta prática é inviável em muitos laboratórios. O uso de PCR para a formação de plasmídeos foi efetiva no resultado final, porém apresentou uma taxa de mutação relativamente alta. Desta forma, é imprescindível o uso de polimerases de alta fidelidade e, mesmo com estas, a reamplificação de um mesmo fragmento deve ser evitada. Deve-se ter uma atenção especial no seu uso em trabalhos de precisão como o da modificação estrutural de proteínas.

O presente estudo resultou na síntese efetiva de quatro plasmídeos com grande potencial na otimização da transgenia de peixes para ganho de biomassa. As construções genéticas aqui produzidas permitirão a produção de novas linhagens de zebrafish transgênicos,

as quais poderão gerar novos conhecimentos sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos nas vias de sinalização intracelular responsáveis pela proliferação das células e o crescimento tecidual.

Referências bibliográficas

- Ahmed ASI, Xiong F, Pang S-C, et al (2011) Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res* 20:557–67. doi: 10.1007/s11248-010-9439-9
- Almeida DV, de Martinez Gaspar Martins C, de Azevedo Figueiredo M, et al (2013) Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Transgenic Res* 22:75–88. doi: 10.1007/s11248-012-9627-x
- Batista CR, Figueiredo MA, Almeida D V., et al (2014) Impairment of the immune system in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 36:519–524. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.022
- Behncken SN, Billestrup N, Brown R, et al (2000) Growth hormone (GH)-independent dimerization of GH receptor by a leucine zipper results in constitutive activation. *J Biol Chem* 275:17000–7. doi: 10.1074/JBC.275.22.17000
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, et al (2002) Growth Hormone Endocrinology of Salmonids: Regulatory Mechanisms and Mode of Action. *Fish Physiol Biochem* 27:227–242. doi: 10.1023/B:FISH.0000032728.91152.10
- Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, et al (2014) Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344:1249783. doi: 10.1126/science.1249783
- Chen TT, Kight K, Lin CM, et al (1992) Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2:88–95.
- Chourrout D (1986) Techniques of chromosome manipulation in rainbow trout: a new evaluation with karyology. *Theor Appl Genet* 72:627–32. doi: 10.1007/BF00289000
- Clark DL, Clark DI, Hogan EK, et al (2015) Elevated insulin-like growth factor 2 expression may contribute to the hypermuscular phenotype of myostatin null mice. *Growth Horm IGF Res* 25:207–18. doi: 10.1016/j.ghir.2015.06.007

- Cook J., McNiven M., Richardson G., Sutterlin A. (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188:15–32. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00331-8
- Cows IG, Bolland JD, Nunn AD, et al (2010) Defining environmental risk assessment criteria for genetically modified fishes to be placed on the EU market. *EFSA Support Publ.* doi: 10.2903/SP.EFSA.2010.EN-69
- Dunham RA, Eash J, Askins J, Townes TM (1987) Transfer of the Metallothionein-Human Growth Hormone Fusion Gene into Channel Catfish. *Trans Am Fish Soc* 116:87–91. doi: 10.1577/1548-8659(1987)116<87:TOTMGH>2.0.CO;2
- Dunham RA, Warr GW, Nichols A, et al (2002) Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar Biotechnol (NY)* 4:338–44. doi: 10.1007/s10126-002-0024-y
- FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.* Rome
- FDA (2015) Freedom of Information Summary of the opAFP-GHc2 rDNA construct in EO-1 α lineage Atlantic salmon (AquAdvantage Salmon). NADA 141-454. FDA
- Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331–68. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090448
- Figueiredo MA, Fernandes R V, Studzinski AL, et al (2013) GH overexpression decreases spermatid parameters and reproductive success in two-years-old transgenic zebrafish males. *Anim Reprod Sci* 139:162–7. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.012
- Fuentes EN, Valdés JA, Molina A, Björnsson BT (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol* 192:136–148. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.06.009
- Gepts P (2002) A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. *Crop Sci* 42:1780. doi: 10.2135/cropsci2002.1780
- Govers R, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ (1997) Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *EMBO J* 16:4851–8. doi: 10.1093/emboj/16.16.4851
- Hartley JL (2000) DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 10:1788–1795. doi: 10.1101/gr.143000

- Hew CL, Davies PL, Fletcher G (1992) Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1:309–17.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498–503. doi: 10.1038/nature12111
- Kawakami K, Shima A, Kawakami N (2000) Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11403–8. doi: 10.1073/pnas.97.21.11403
- Kazazian HH (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626–32. doi: 10.1126/science.1089670
- Kim H-J, Litzgenburger BC, Cui X, et al (2007) Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Mol Cell Biol* 27:3165–75. doi: 10.1128/MCB.01315-06
- Koga A (2004) Transposition mechanisms and biotechnology applications of the medaka fish Tol2 transposable element. *Adv Biophys* 38:161–80.
- Koga A, Suzuki M, Inagaki H, et al (1996) Transposable element in fish. *Nature* 383:30–30. doi: 10.1038/383030a0
- Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, et al (2007) The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn* 236:3088–99. doi: 10.1002/dvdy.21343
- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367. doi: 10.1038/nrg2091
- McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36:344–55.
- Moller N, Vendelbo MH, Kampmann U, et al (2009) Growth hormone and protein metabolism. *Clin Nutr* 28:597–603. doi: 10.1016/j.clnu.2009.08.015
- Muir WM (2004) The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep* 5:654–9. doi: 10.1038/sj.embor.7400197

- Muñoz-López M, García-Pérez JL (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* 11:115–28. doi: 10.2174/138920210790886871
- Postel-Vinay MC, Finidori J (1995) Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *Eur J Endocrinol* 133:654–9. doi: 10.1530/EJE.0.1330654
- Rudd MF, Webb EL, Matakidou A, et al (2006) Variants in the GH-IGF axis confer susceptibility to lung cancer. *Genome Res* 16:693–701. doi: 10.1101/gr.5120106
- Schiaffino S, Mammucari C, Glass D, et al (2011) Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1:4. doi: 10.1186/2044-5040-1-4
- Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272–285. doi: 10.1038/nrg2072
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2007) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev* 83:13–34. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x
- Streisinger G, Walker C, Dower N, et al (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291:293–6. doi: 10.1038/291293a0
- Stuart GW, McMurray J V, Westerfield M (1988) Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103:403–12.
- Tidwell JH, Allan GL (2001) Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Rep* 2:958–63. doi: 10.1093/embo-reports/kve236
- Udvardia AJ, Linney E (2003) Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol* 256:1–17. doi: 10.1016/S0012-1606(02)00083-0
- United Nations (2015) World Population Prospects: The 2015 Revision.