

Mecanismos post-transcripcionales en la regulación de la expresión de los genes *hsp70* de *Leishmania*

Post-transcriptional mechanisms regulating *hsp70* gene expression in *Leishmania*

QUIJADA, L.; REQUENA, J. M.; SOTO, M. y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Universidad Autónoma de Madrid.
28049 Madrid. España.

RESUMEN

Los tripanosomátidos representan uno de los grupos de organismos eucariotas más tempranos en la evolución. Durante su larga historia evolutiva, los tripanosomátidos han desarrollado una impresionante variedad de estilos de vida y adaptaciones al parasitismo. El ciclo de vida parasítico de estos organismos está caracterizado por una sucesión de formas diferentes adaptadas a los diferentes ambientes que encuentran en sus hospedadores mamíferos e insectos vectores. Tal vez como reflejo de su origen ancestral, estos organismos poseen una variedad de mecanismos moleculares inusuales implicados en la regulación de la expresión génica. En este contexto, una característica general de la expresión génica en estos parásitos protozoos es la fuerte regulación a nivel post-transcripcional que presentan. En este trabajo se discuten algunos avances recientes implicados en la comprensión de la expresión génica en tripanosomátidos y su regulación.

Palabras clave: Tripanosomátidos. Expresión génica. Regulación. Mecanismos post-transcripcionales.

ABSTRACT

Trypanosomatids represent one of the earlier groups of eukaryotic organisms in evolution. During their long evolutionary history, the trypanosomatids have developed an impressive variety of life styles and adaptations to parasitism. The parasitic cycle of these organisms is characterized by a succession of different forms adapted to the different environments they encounter in their mammalian hosts and insect vectors. Perhaps as a reflection of their ancient origin, these organisms possess a variety of unusual molecular mechanisms that result in regulated gene expression. In this context, a general feature of gene expression in these protozoan parasites is its high regulation at post-transcriptional level. In this work, some recent advances in understanding the mechanisms of gene expression in trypanosomatids and its regulation are discussed.

Key words: Trypanosomatids. Gene expression. Regulation. Post-transcriptional mechanisms.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 305-317]

Las especies pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* están constituidas por parásitos protozoos que son transmitidos por insectos vectores a sus hospedadores mamíferos. Esta oscilación entre dos hospedadores ha dado lugar a unos ciclos de vida en estos organismos, que están caracterizados por una sucesión de formas que deben adaptarse a los distintos ambientes hostiles que encuentran. En este contexto, los tripanosomátidos han desarrollado un programa de cambios en la expresión génica que les permite su diferenciación y adaptación al medio. El descubrimiento en los tripanosomas de varios procesos genéticos moleculares atípicos en el resto de eucariotas, ha abierto el camino hacia la comprensión de cuáles son los mecanismos que regulan su expresión génica.

ORGANIZACIÓN GÉNICA

En tripanosomátidos, los genes codificantes de proteínas carecen de intrones y generalmente aparecen empaquetados en agrupaciones de repeticiones directas en tándem del mismo marco de lectura abierto, que se separa del siguiente marco de lectura por regiones cortas de ADN que reciben el nombre de regiones intergénicas. Con frecuencia, se encuentra que la repetición posicionada en el extremo 3' de la agrupación presenta fuertes divergencias localizadas únicamente en la secuencia nucleotídica que corresponderá posteriormente a la región 3' no traducida (3'UTR) del ARN mensajero (ARNm). Dentro de este esquema general, se encuentran varios ejemplos, como las tres copias de los genes calmodulina en *Trypanosoma brucei* (1), las ocho copias de los genes Pro-1 en *Leishmania enriettii* (2), genes con dos repeticiones como los codificantes para las proteínas P0 (3), LiP y LiP' (4) de *L. infantum*, o las seis copias halladas en *L. infantum* para los genes hsp70 (5). Sin embargo, existen variaciones sobre esta organización. Así, la agrupación descrita para los genes msp de *L. chagasi* presenta una misma región codificante asociada a tres 3'UTR diferentes en un mismo locus (6), por otra parte, hay ejemplos en los que la copia génica con 3'UTR divergente no está ligada al mismo locus que el resto (7) o que ni siquiera están ligadas al mismo cromosoma (8). Aumentando en grado de complejidad, se ha descrito en *T. cruzi* una agrupación génica cuya unidad de repetición está constituida por dos genes distintos, de manera que la agrupación presenta dichos genes en forma alternante (9).

Una característica común a todas estas agrupaciones es la de tener un promotor situado en posición 5' con respecto a la agrupación génica, desde el cual se transcribe todo el locus. Esta forma de transcripción recibe el nombre de transcripción policistrónica. Tal vez debido a este tipo de transcripción, surge otro nivel de organización génica, en el que desde un sólo promotor se

podrían transcribir dos agrupaciones génicas distintas que pueden estar constituidas por isoformas de un mismo gen (10) o bien por genes no relacionados (11).

Existe un caso particular de organización génica en *T. brucei*, en los sitios de expresión de los genes para la Glicoproteína Variable de Superficie (VSG), que se expresan en la forma sanguínea del parásito (revisado en 12). En estos *loci* se encuentra que precediendo al gen VSG se hallan ligados varios genes, diferentes entre sí. Todos ellos, incluyendo el gen VSG, forman una unidad policistrónica, ya que se transcriben desde un sólo promotor, y por lo tanto están sometidos al mismo control transcripcional que el gen VSG. Este tipo de organización génica recuerda a la de ciertos operones bacterianos, en el sentido de que las funciones de estos Genes Asociados al Sitio de Expresión (ESAGs) del gen VSG parecen ser necesarias exclusivamente en la forma sanguínea del parásito, de un modo parecido a como ocurre en bacterias cuando se pone bajo el control de un solo promotor varios genes estructurales necesarios únicamente bajo una determinada situación fisiológica.

PROMOTORES DE LA TRANSCRIPCIÓN

Históricamente, las unidades de transcripción eucarióticas han sido subdivididas en tres clases, cada una de ellas transcrita por una ARN polimerasa (pol) diferente. La clasificación se basa en las sensibilidades diferenciales que presentan las ARN polimerasas I, II y III al compuesto á-amanitina. En células animales, la ARN pol I es resistente, la ARN pol II es muy sensible, y la ARN pol III es sólo moderadamente sensible a á-amanitina. La ARN pol I transcribe los genes de ARN ribosomal (ARNr), la pol II transcribe los genes codificantes de proteínas, y la pol III transcribe ciertos ARNs pequeños y estables como son los genes de los ARN de transferencia (ARNt) y los genes ARNr 5S. En función de sus sensibilidades a á-amanitina se han identificado las tres clases de ARN polimerasas en tripanosomátidos (13) y los genes correspondientes a la subunidad mayor de cada una de estas enzimas han sido clonados y caracterizados (14-16). Es más, se han encontrado dos genes ligeramente diferentes para la ARN pol II en los tripanosomas que presentan variación antigénica (17).

La regulación de la transcripción no ha podido ser estudiada en estos organismos en profundidad, hasta que recientemente han sido desarrollados vectores y sistemas de transfección (18-21). Posteriormente, el abordaje experimental más frecuentemente empleado para la determinación de posibles secuencias promotoras ha sido la transfección de dichas secuencias, adyacentes a un gen señal, y sobre las cuales se practican delecciones seriadas, o bien se introducen mutaciones mediante sustituciones en bloque, para analizar qué efecto tienen sobre la actividad enzimática que expresa el gen señal.

Así, se han definido en tripanosomátidos las secuencias promotoras de la ARN pol I. Estos promotores son los más estudiados en tripanosomas hasta la fecha. Al igual que en el resto de eucariotas superiores se hallan delante de las unidades de transcripción de los genes ARNr (22). Sin embargo, también aparecen promotores de este tipo en algunos genes codificantes para proteínas, concretamente en los genes VSG (23) y en los genes PARP (24). Se ha propuesto que debido a que la adición del *cap* en 5' del ARN mensajero en los tripanosomas se realiza mediante *trans-splicing* (ver más adelante), podría anularse el requerimiento de una transcripción mediada por ARN pol II en genes codificantes para proteínas (25).

Los promotores de los genes PARP y ARNr son estructuralmente los más parecidos. Los dos consisten en un "núcleo promotor" compuesto por dos elementos esenciales, cuyo espaciamiento parece ser crítico, que están centrados aproximadamente a -30 y -60 pares de bases con respecto al sitio de iniciación de la transcripción, y ambos parecen tener un "elemento de control por encima" (UCE) alrededor de la posición -200, que determina la máxima actividad del promotor. Por el contrario, los genes VSG parecen retener en el "núcleo promotor" su máxima actividad y carecen de UCE (revisado en 12). Cuando se comparan las secuencias nucleotídicas de estos elementos entre especies se observa una falta de conservación de secuencia, hecho consecuente con su incapacidad para promover transcripción cuando se introducen en organismos relacionados (22). Así mismo, tampoco existe una conservación de secuencia entre los promotores VSG, ARNr, y PARP dentro de la misma especie.

Cuando se llevaron a cabo estos ensayos para genes transcritos por la ARN pol II, los resultados revelan una ausencia aparente de promotores al comienzo de las agrupaciones génicas. Aunque no se han identificado todavía, se postula, debido a la existencia de transcripción policistrónica, que es probable que los promotores estén localizados por encima de las agrupaciones génicas. Sin embargo, otros autores, además encuentran en las regiones intergénicas de algunos genes actividad promotora, por lo que proponen múltiples unidades de transcripción solapadas en un mismo *locus* (26). Hoy día, no se conoce si la transcripción mediada por la ARN pol II está controlada por promotores bien definidos. Un ejemplo de esta aparente falta de estructura consenso, aparece en los estudios realizados sobre los genes codificantes del miniexón en *L. tarentolae* (27). Estos genes se encuentran en múltiples copias organizadas en tándem, pero cada una se transcribe independientemente por una ARN pol II. Sin embargo, la búsqueda de secuencias promotoras en las regiones intergénicas no ha dado ningún resultado. Hasta la fecha, sólo se ha encontrado una secuencia en *L. enriettii*, que actúa en forma *cis*, de manera similar a un promotor, y que determina la hebra de DNA que será transcrita, en función de su orientación (28).

En cuanto a los promotores asociados a la ARN pol III, se ha descrito un ejemplo en *T. brucei*, para los genes U2-snRNA (29). Curiosamente, estos genes son transcritos por la ARN pol II en otros eucariotas. Se han encontrado tres elementos de secuencia implicados en la transcripción: un elemento intragénico cercano al sitio de inicio de la transcripción, y dos elementos extragénicos situados por encima del sitio de iniciación que mantienen una alta homología con las secuencias consenso de las cajas A y B. Las cajas A y B son secuencias de unos 12 nucleótidos cada una, y que unidas, funcionan como promotores en los genes ARNt de eucariotas. Sin embargo, en los genes ARNt de eucariotas se encuentran intragénicamente y con orientación inversa a la encontrada en *T. brucei*. La caja B se centra aproximadamente en la posición -120 y la caja A sobre -160 en *T. brucei*. El elemento intragénico parece estar interviniendo en la colocación de la polimerasa en el sitio correcto de iniciación de la transcripción. Por analogía con el sistema de la RNAsa P en levadura, en el que se ha observado la unión de un factor de transcripción llamado TFIIC a las cajas A y B (30), se anticipa que TFIIC se implicaría también en la expresión del gen U2-snRNA de *T. brucei*, con su función de activador (31).

REGULACIÓN A NIVEL DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Típicamente, este es un punto principal de regulación de la expresión génica en la mayoría de los organismos eucariotas estudiados. Junto con las secuencias promotoras, existen otros elementos de secuencia, que determinan la unión de factores de transcripción al ADN bajo ciertas condiciones fisiológicas, de modo que se altera la frecuencia de iniciaciones de la transcripción, y por lo tanto, la cantidad de ARNm de un gen concreto.

En los tripanosomátidos, hay varias líneas de evidencia que indican que las agrupaciones génicas se transcriben de forma policistrónica, desde un promotor situado en 5', generando un ARN precursor que deberá ser procesado para producir los ARNm maduros (32, 33, revisado en 34). A pesar de este origen transcripcional común, algunos genes pertenecientes a una misma unidad, pueden presentar patrones de expresión marcadamente diferentes al resto. En este sentido, se encuentra que el ARNm de la isoforma glicosomal de la Fosfoglicerato Kinasa (PGK) es abundante en la forma celular de *T. brucei* que reside en el mamífero, pero no en la forma celular que reside en el insecto, mientras que ocurre lo contrario para el ARNm de la isoforma citosólica de la PGK. Sin embargo, ambos ARNm proceden de un precursor común (33). Otro ejemplo bien caracterizado aparece en los genes *gp63* de *L. chagasi*, donde según la fase celular del parásito se producen cambios en la abundancia de los ARNm de determinadas copias de la agrupación génica que

difieren en sus 3'UTRs, aunque sus tasas de transcripción se mantienen constantes (35). Es más, se ha analizado en varios representantes de estos organismos, genes codificantes de proteínas de choque térmico (hsp) que presentan aumentos en los niveles de mensajero correlacionados con un aumento de la temperatura, y en todos los casos sus tasas de transcripción permanecen inalteradas (5, 36, 37). Todo este cuerpo de datos conduce a la conclusión principal de que en los tripanosomátidos, los controles de la expresión génica operan fundamentalmente a niveles post-transcripcionales y no a nivel de la iniciación de la transcripción.

PROCESAMIENTO DEL ARNm PRECURSOR: *TRANS-SPLICING* Y POLIADENILACIÓN

La conversión de los ARNm policistrónicos a ARNm monocistrónicos se produce mediante dos escisiones de la molécula precursora. Una se asocia al proceso de *trans-splicing*, tras la cual se une un segmento de ARN de 39 nucleótidos llamado mini-exón o *spliced-leader* a todos los ARNm de genes codificantes de proteínas (revisado en 38). A su vez, el mini-exón deriva de un transcrito precursor (medARN) codificado dentro de un gen que se encuentra repetido y organizado en tándem. La secuencia correspondiente al mini-exón presenta una alta conservación entre las diferentes especies de tripanosomátidos (27, 38). Los genes codificantes del mini-exón no se transcriben policistrónicamente, sino de forma independiente (27, 39) y los transcritos adquieren una estructura *cap* probablemente añadida en los primeros estadios de la iniciación transcripcional (27), de manera que la adición del mini-exón a los ARNs codificantes conlleva la simultánea adición de la estructura *cap* al mensajero maduro. La segunda escisión se asocia con la poliadenilación, que ocurre en algún punto dentro de 1 kilobase por encima del sitio aceptor del mini-exón. Estos dos cortes generan ARNs mensajeros que portan tanto el *cap* en 5', como las secuencias poli(A) en 3' (40).

Los motivos de secuencia implicados en el *trans-splicing*, están constituidos por el dinucleótido AG precedido por una región rica en pirimidinas. La región rica en pirimidinas se ha mostrado esencial para un correcto *trans-splicing*, mientras que el dinucleótido AG es el sitio aceptor del mini-exón. Estas secuencias aparecen conservadas en el mecanismo de *cis-splicing* de mamíferos (41-43). Sin embargo, no existen en tripanosomátidos motivos de secuencia conservados que participen en la poliadenilación, en contraste con el resto de eucariotas (44). Una reciente serie de observaciones ha revelado que en realidad la poliadenilación y el *trans-splicing* están acoplados en tripanosomátidos (40, 45). En primer lugar, el sitio de poliadenilación se describe más apropiadamente como región de poliadenilación, tal y como se

deduce de la microheterogeneidad que se presenta en el ARNm del gen *dhfr-ts* y otros genes de *Leishmania* (40). En segundo lugar, cuando se producen mutaciones en el sitio aceptor de *splicing*, aparecen sitios aceptores alternativos dentro de la región intergénica que simultáneamente conllevan desplazamientos del sitio de poliadenilación. En tercer lugar, el uso de los sitios de poliadenilación está asociado al espaciamiento entre el sitio aceptor del *splicing* y el sitio de poliadenilación, de manera que si se producen mutaciones en el sitio aceptor de *splicing*, pero no se altera el espaciamiento con respecto al sitio de poliadenilación, éste se conserva. Finalmente, construcciones que mantienen el sitio aceptor de *splicing*, pero que introducen deleciones en la región intergénica producen un desplazamiento hacia arriba del sitio de poliadenilación en el ARNm precedente (40). Estas observaciones han llevado a construir un modelo para la elección del sitio de poliadenilación en *Leishmania*. Las secuencias por encima del sitio aceptor del *splicing* serían sondeadas en dirección 3'-5' hasta identificar un sitio de poliadenilación aceptable. Después del ensamblaje del *spliceosoma* en el sitio aceptor de *splicing*, se reclutaría un complejo de poliadenilación y se iniciaría el rastreo hacia arriba. Tras la identificación de un sitio susceptible de poliadenilación, se procedería a una escisión y la poliadenilación ocurriría de modo similar a otros eucariotas. Alternativamente, el rastreo 3'-5' podría resultar de la activación de una exonucleasa 3'-5' posteriormente a la adición del mini-exón (40).

MECANISMOS POST-TRANSCRIPCIONALES EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TRIPANOSOMÁTIDOS

La organización génica de estos organismos y la transcripción policistrónica, unidas a la observación de grandes diferencias entre los niveles de transcritos provenientes de un mismo *locus*, ha conducido a la conclusión de que los mecanismos que determinan la abundancia de un ARN mensajero, operan fundamentalmente a nivel post-transcripcional. Hay varios ejemplos de genes pertenecientes a una agrupación génica, que difieren entre sí en sus niveles de ARNm, y cuyas diferencias en secuencia nucleotídica residen en sus regiones no traducidas (UTRs), mientras que mantienen conservadas las regiones codificantes de la proteína (3-5). La explicación podría encontrarse en la necesidad de expresar constantemente determinados genes (*genes house-keeping*), en organismos que probablemente han adoptado diferentes mecanismos de regulación para los diferentes hospedadores que atraviesan en su ciclo de vida. En cualquier caso, estos hallazgos apuntan hacia un papel preponderante de las UTRs en la regulación de los niveles estacionarios de los ARNm en estos protozoos. Es más, podría avanzarse que las variedades de UTRs deberían tener una correspondencia con las variedades en los tipos de regulación.

En los últimos años, muchas investigaciones se han centrado en el estudio del papel que están jugando en tripanosomátidos las UTRs en la regulación de la expresión génica. En *L. amazonensis* se ha estudiado la expresión inducible por choque térmico del gen hsp83 y se ha concluido que el aumento de ARNm-hsp83 inducido por una elevación de la temperatura, se debe a un aumento en la estabilidad del transcrito (37). Es más, se ha comprobado que las UTRs del mensajero son los determinantes del aumento de la vida media del transcrito asociado al calor. Concretamente, una región de 100 nucleótidos de la 5'UTR en combinación con la 3'UTR afectan la estabilidad del ARNm-hsp83 de manera dependiente de temperatura (46). También en *L. infantum* se han encontrado cambios en la estabilidad de los transcritos expresados de genes hsp70 inducibles por choque térmico, que se asocian a un aumento de temperatura. Estos mensajeros se diferencian de los derivados de un gen hsp70 constitutivo únicamente en su secuencia 3'UTR (5). La estabilidad que determinan las UTRs de los ARNm parece ser un mecanismo importante en la regulación no sólo de genes inducibles, sino también de genes regulados por el estadio celular del parásito. Así, se ha demostrado que una porción de la 3'UTR del ARNm del gen VSG de *T. brucei*, confiere un aumento de estabilidad al ARNm de un gen señal, cuando se transfecta esta construcción en la forma sanguínea del parásito, en comparación con la estabilidad obtenida con la misma construcción transfectada a parásitos que se encontraban en la fase celular residente en el insecto vector (47). En conjunto, todos estos datos indican que las UTRs pueden infundir al mensajero, de forma regulable, una estabilidad que determina su abundancia en la célula.

Otro medio documentado que emplean estos organismos para modificar la expresión de un gen se define a nivel de la traducción del ARNm. Mediante este mecanismo, se producen bajo distintas situaciones fisiológicas para la célula, distintos grados de traducibilidad de un mismo transcrito. De hecho, en ocasiones pueden ocurrir simultáneamente aumentos de la estabilidad unidos a un aumento de la traducción del transcrito, como en el caso del mencionado ARNm-hsp83 de *L. amazonensis*. En este ejemplo, las mismas secuencias UTRs implicadas en incrementar la estabilidad del mensajero bajo un choque térmico, son necesarias para que tenga lugar la elevación de la traducción al aumentar la temperatura, lo que ha llevado a sugerir que podría haber una relación entre la maquinaria de traducción y la estabilidad del ARNm (46). Los genes de las proteínas de superficie gp72 y gp85 de *T. cruzi*, están regulados específicamente por estadio celular, de modo que la proteína gp85 se expresa en la forma sanguínea, mientras que la proteína gp72 es propia de la forma que se encuentra en el insecto. Las regiones 3'UTR de cada uno de los genes han mostrado conferir al transcrito de un gen señal un aumento de la eficiencia de la traducción cuando se transfecta adyacente a la gp72-3'UTR en las formas residentes en el insecto, y una disminución de la

traducción cuando se transfecta adyacente a la gp85-3'UTR, de manera que estas regiones representan ejemplos de regulación positiva y negativa a nivel de la eficiencia de la traducción del mensajero (48).

Finalmente, se ha encontrado una regulación a nivel del procesamiento del ARN precursor. En *T. brucei*, en un sitio de expresión de VSG, se ha mostrado que los transcritos del gen ESAG 6, presentes en la forma del parásito que se hospeda en el insecto, tienen un *splicing* anormal. Sin embargo, en la forma sanguínea del parásito, mediante *splicing* alternativo se generan con frecuencias parecidas dos transcritos diferentes de ESAG 6, pero sólo aquellos transcritos que sufren el *splicing* más cerca del codón de iniciación son estables y se acumulan en el citoplasma. Por el contrario, en la forma residente en el insecto no se utiliza el sitio aceptor de *splicing* proximal al gen, por lo que se generan ARNm de ESAG 6 con largas regiones 5'UTR que son inestables (49, 50).

EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIBLE

Hasta la fecha, los genes de estrés y de histonas son los más estudiados dentro de genes cuya expresión se modula fisiológicamente en una forma dada del parásito.

GENES DE CHOQUE TÉRMICO

Todos los organismos estudiados responden a las elevaciones ambientales de la temperatura y a ciertos estrés químicos con el aumento de la síntesis de un conjunto de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSPs). Los tripanosomátidos experimentan una elevación de temperatura durante sus ciclos de vida cuando son transferidos desde los insectos vectores a los mamíferos hospedadores. Este cambio de temperatura afecta a la expresión génica e induce una diferenciación morfológica (51). Sin embargo, aunque la respuesta al choque térmico se conserva, la forma de llevarla a cabo es distinta a la del resto de eucariotas, en concordancia con las características propias de la expresión génica descritas en estos organismos. Aunque la mayoría de los eucariotas responden al choque térmico aumentando la tasa de transcripción de los genes hsp, los tripanosomátidos no inducen la transcripción de dichos genes (5, 36, 37, 52). A partir de esta característica en común, existe una variedad de mecanismos a través de los cuales se produce la respuesta. Los transcritos de los genes hsp83 de *L. amazonensis* presentan un aumento de estabilidad asociado al incremento de temperatura y en combinación con un aumento de la eficiencia de traducción del ARNm (37). En *T.*

traducción cuando se transfecta adyacente a la gp85-3'UTR, de manera que estas regiones representan ejemplos de regulación positiva y negativa a nivel de la eficiencia de la traducción del mensajero (48).

Finalmente, se ha encontrado una regulación a nivel del procesamiento del ARN precursor. En *T. brucei*, en un sitio de expresión de VSG, se ha mostrado que los transcritos del gen ESAG 6, presentes en la forma del parásito que se hospeda en el insecto, tienen un *splicing* anormal. Sin embargo, en la forma sanguínea del parásito, mediante *splicing* alternativo se generan con frecuencias parecidas dos transcritos diferentes de ESAG 6, pero sólo aquellos transcritos que sufren el *splicing* más cerca del codón de iniciación son estables y se acumulan en el citoplasma. Por el contrario, en la forma residente en el insecto no se utiliza el sitio aceptor de *splicing* proximal al gen, por lo que se generan ARNm de ESAG 6 con largas regiones 5'UTR que son inestables (49, 50).

EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIBLE

Hasta la fecha, los genes de estrés y de histonas son los más estudiados dentro de genes cuya expresión se modula fisiológicamente en una forma dada del parásito.

GENES DE CHOQUE TÉRMICO

Todos los organismos estudiados responden a las elevaciones ambientales de la temperatura y a ciertos estrés químicos con el aumento de la síntesis de un conjunto de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSPs). Los tripanosomátidos experimentan una elevación de temperatura durante sus ciclos de vida cuando son transferidos desde los insectos vectores a los mamíferos hospedadores. Este cambio de temperatura afecta a la expresión génica e induce una diferenciación morfológica (51). Sin embargo, aunque la respuesta al choque térmico se conserva, la forma de llevarla a cabo es distinta a la del resto de eucariotas, en concordancia con las características propias de la expresión génica descritas en estos organismos. Aunque la mayoría de los eucariotas responden al choque térmico aumentando la tasa de transcripción de los genes hsp, los tripanosomátidos no inducen la transcripción de dichos genes (5, 36, 37, 52). A partir de esta característica en común, existe una variedad de mecanismos a través de los cuales se produce la respuesta. Los transcritos de los genes hsp83 de *L. amazonensis* presentan un aumento de estabilidad asociado al incremento de temperatura y en combinación con un aumento de la eficiencia de traducción del ARNm (37). En *T.*

cruzi también se ha implicado un aumento de la eficiencia de la traducción en la regulación de la expresión de los genes *hsp70* (53).

Por otra parte, se ha encontrado que los genes *hsp70* de *L. major* (7) y de *L. infantum* (5) presentan dos variantes: La primera está formada por un grupo de copias repetidas de genes *hsp70* que muestran aumentos en los niveles estacionarios de ARNm por efecto del calor. La segunda es una copia única que presenta niveles estacionarios de ARNm constantes. En *L. infantum* se ha determinado que el aumento de los niveles de mensajero asociado al calor ocurre por un aumento en la estabilidad del transcrito (5). Sin embargo, es interesante destacar que el mecanismo que determina el aumento de estabilidad de estos transcritos es diferente al que opera sobre los mensajeros de los genes *hsp83*. La degradación de los ARNm-*hsp83* es dependiente de síntesis activa de proteínas, lo que sugiere la implicación de una nucleasa lábil activa principalmente a 26°C (37). Sin embargo, en el caso de los genes *hsp70*, la estabilidad del transcrito requiere síntesis de proteínas, lo que podría explicarse por una proteína reguladora lábil inducida por el choque térmico implicada en la estabilización (5).

Por otra parte, se ha descrito una organización para los genes *hsp70* de *T. brucei* similar a la caracterizada para estos genes en *L. major* y *L. infantum* (54). Existen cinco copias génicas que aumentan los niveles estacionarios de los ARNm derivados en respuesta al choque térmico. Aparece también una copia que no altera los niveles estacionarios de ARNm por temperatura. Sin embargo, las copias inducibles se expresan con niveles 100 veces mayores que la expresión de la copia constitutiva en la forma sanguínea del parásito, mientras que en la forma residente en el insecto, se reducen los niveles de expresión de las copias inducibles (55). En *L. major* y *L. infantum* la copia génica constitutivamente expresada presenta niveles mayores que los de los genes con expresión inducible en la forma del parásito que se encuentra en el insecto (5, 7). Aunque no se han estudiado los niveles relativos en la forma celular que reside en el mamífero, podrían tener una regulación específica de estadio celular, de manera parecida a como ocurre en *T. brucei*.

GENES DE HISTONAS

Una característica específica de los tripanosomátidos es la ausencia de cromosomas condensados en cualquier fase del ciclo celular, a pesar de que su ADN se asocia con todas las clases de histonas y se empaqueta formando nucleosomas (56). Los genes que codificantes de las histonas H1, H2A, H2B y H3 de varias especies de tripanosomátidos han sido clonados (57-64). Los datos sobre organización genómica y expresión génica todavía son muy escasos, aunque se ha mostrado que los transcritos de las histonas están poliadenilados,

del mismo modo que las variantes expresadas constitutivamente en eucariotas superiores, pero al contrario que las histonas reguladas por ciclo celular (65). Se han encontrado estructuras con forma de horquilla en las 3'UTRs similares a las implicadas en el procesamiento de las regiones 3'UTRs de los ARNm de histonas inducibles por ciclo celular (8, 57, 61-64, 66). Sin embargo, la regulación de la expresión de los genes de las histonas y su relación con la replicación del ADN, no son bien conocidas (12). Si bien existe una regulación de la expresión dependiente de la tasa de crecimiento (8, 57, 63) similarmente a como ocurre en eucariotas superiores, parece que se lleva a cabo de forma distinta entre *Leishmania* y *Trypanosoma*. En *Trypanosoma* la regulación de la expresión de los genes H3, H2A (8) y H2B (58) está ligada de alguna forma a la síntesis de ADN, mientras que en *Leishmania* la regulación de dichos genes es independiente de la síntesis de ADN (8, 57).

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización del presente trabajo, el grupo ha sido financiado por los siguientes proyectos: I+D 0020/94 de la Comunidad Autónoma de Madrid, PTR94-0091 del Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo y BIO96-0405 del Programa Nacional de Biotecnología. También queremos agradecer la ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TSCHUDI, C., YOUNG, A. S., RUBEN, L., PATTON, C. L., RICHARDS, F. F.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1985), **82**:3998-4002.
- (2) STEIN, D. A., CAIRNS, B. R., LANDFEAR, S. M.: *Nucleic Acids Res* (1990), **18**:1549-1556.
- (3) SOTO, M., REQUENA, J. M., ALONSO, C.: *Mol Biochem Parasitol* (1993), **61**:265-274.
- (4) SOTO, M., REQUENA, J. M., GARCÍA, M., GÓMEZ, L. C., NAVARRETE, I., ALONSO, C.: *J Biol Chem* (1993), **268**:21835-21843
- (5) QUIJADA, L., SOTO, M., ALONSO, C., REQUENA, J. M.: *J Biol Chem* (1997), en prensa.
- (6) ROBERTS, S. C., SWIHART, K. G., AGEY, M. W., RAMAMOORTHY, R., WILSON, M. E., DONELSON, J. E.: *Mol Biochem Parasitol* (1993), **62**:157-172.
- (7) LEE, M. G. S., ATKINSON, B. L., GIANNINI, S. H., VAN DER PLOEG, L. H. T.: *Nucleic Acids Res* (1988), **16**:9567-9585.
- (8) SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., ALONSO, C.: *Biochem J* (1996), **318**:813-819.
- (9) TEIXEIRA, S. M. R., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E.: *J Biol Chem* (1995), **270**:22586-22594.
- (10) BRINGAUD, F., BALTZ, T.: *Mol Cell Biol* (1993), **13**:1146-1154.
- (11) CHUNG, S. H., SWINDLE, J.: *Nucleic Acids Res* (1990), **18**:4561-4569.