

Doble regulación de la expresión génica de la histona H2A de *Trypanosoma cruzi*

Double regulation of *Trypanosoma cruzi* histone H2A gene expression

MARAÑÓN, C.¹; PUERTA, C.^{1*} y LÓPEZ, M.C.¹

- ¹ Instituto de Parasitología y Biomedicina. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Calle ventanilla, n.º 11. 18001 Granada. España.
- * Dirección actual: Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

RESUMEN

En el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* la histona H2A está codificada por dos unidades génicas, organizadas en dos agrupaciones independientes localizadas en un mismo cromosoma. Estas unidades se diferencian por la adición de una secuencia de inserción en el extremo 3' de la unidad básica, y dan lugar a dos transcritos poliadenilados de 1 y 0,7 Kb de tamaño. La presencia de mensajeros para la H2A en el citoplasma del parásito es específica de los estadios replicativos a través de una regulación transcripcional. En estos estadios replicativos el nivel de mensajeros para la H2A está sujeto a una regulación post-transcripcional acoplada a la replicación del ADN.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*. Histonas. Expresión génica. Regulación transcripcional.

ABSTRACT

The histone H2A proteins of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* are coded by two tandemly repeated genes having different sized. They are organized in two independent clusters, but located in the same chromosome. These two units are originated by addition of an insertion sequence at the 3' end of the basic unit. Two H2A polyadenilated transcripts of 1 and 0.7 Kb are transcribed. The presence of H2A messengers in the cytoplasm for H2A is specific of the replicative stages of the parasite through a transcriptional regulation. In these replicative stages the steady state level of the H2A messengers are subjected to post-transcriptional regulation, coupled to DNA replication.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Histones. Gene expression. Transcriptional regulation.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 229-235]

INTRODUCCIÓN

Las histonas son un grupo bien definido de proteínas estructurales de bajo peso molecular, muy conservadas evolutivamente, que constituyen la base proteica del nucleosoma en todos los eucariotas (1). En esta estructura se encuentra un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. El tetrámero es la estructura proteica que se une en primer lugar e interacciona directamente con la doble cadena de ADN. La histona H1 interacciona con el ADN nucleosomal sólo cuando éste está ya empaquetado alrededor de las histonas del núcleo (2). Las histonas no tienen un papel meramente estructural en la compactación de la cromatina, sino que se han identificado dominios reguladores en estas proteínas. Concretamente, en la histona H2A de levadura se han descrito dos dominios represores, que son dirigidos hacia genes concretos mediante los productos de los llamados genes de regulación de histonas (3).

Aunque los genes que codifican este tipo de proteínas tienen una secuencia muy conservada en todos los eucariotas (4), su organización varía mucho en la escala filogenética (5). Así, en eucariotas inferiores, los genes de las histonas se suelen encontrar dispersos en el genoma, mientras que en eucariotas superiores se encuentran repetidos en tándem formando agrupaciones, que pueden ser: i) regulares, las unidades en tándem son iguales; ii) irregulares, las distintas unidades que conforman el tándem difieren en secuencia, longitud y en sus zonas intergénicas; iii) mixtas, en un mismo genoma pueden encontrarse los dos tipos de agrupación.

La estructura de los mensajeros generados por estos genes varía en función del acoplamiento o no de la expresión a la replicación del ADN (6). Los mensajeros dependientes de replicación no son poliadenilados en eucariotas superiores, y tienen en su extremo 3' una estructura en horquilla muy conservada, fundamental para una traducción eficiente (7). Esta estructura se ha evidenciado como el lugar en el que se modula su estabilidad a lo largo del ciclo celular (8). Sin embargo, en eucariotas inferiores estos mensajeros están poliadenilados, y la estructura en horquilla podría estar conservada estructuralmente, pero no en su secuencia (9). Esta conformación es la misma en mensajeros independientes de replicación. En genes dependientes de replicación la expresión de los mensajeros está restringida a la fase S del ciclo celular. Los genes independientes de replicación, llamados genes de reemplazamiento, se expresan en un nivel basal a lo largo de todo el ciclo, y a menudo codifican proteínas con modificaciones en su estructura primaria.

La regulación génica se aplica en varios niveles. El primero de ellos es a través de un promotor mediante la llamada regulación transcripcional, que es responsable del aumento de la transcripción de 3 a 6 veces en la fase S (10). El segundo nivel o regulación post-transcripcional hace aumentar unas 5 veces la cantidad de mRNA en fase S a través de una degradación selectiva

de los mensajeros en fase G2 temprana, por medio de una proteína que se une a la estructura en horquilla en 3', con actividad ARNasa por sí misma o bien actuando como activador o puente de unión para una nucleasa. De esta manera la vida media de los mensajeros se encuentra acoplada al ciclo celular por medio de su estructura en horquilla. Las señales citoplásmicas que se han postulado como candidatas a disparar la actividad ARNasa son la propia concentración de proteína histona (11) y los nucleótidos libres de guanosina (12).

La cromatina nuclear de los tripanosomas está también organizada en filamentos de nucleosomas, con una organización básica similar a la de los eucariotas superiores, pero no idéntica, ya que presenta un grado de compactación menor que lleva a la no generación de la fibra de 30 nm propia de eucariotas superiores. Las propias histonas presentan diferencias respecto a las de eucariotas superiores en su estructura primaria, sus propiedades bioquímicas y su interacción con el ADN (13).

En tripanosomátidos los genes suelen estar agrupados en tándem y la transcripción de estas agrupaciones es policistronica, bajo el control de promotores lejanos (14). La regulación por la activación de promotores es de poca relevancia, de tal forma que la transcripción primaria suele ser constitutiva. Sin embargo, genes pertenecientes al mismo policistron pueden ser objeto de regulación post-transcripcional diferente, sobre todo mediante el control de la estabilidad del mensajero, a través de las diferentes regiones 3' no traducidas o 3'UTRs. La regulación de los genes de histonas en tripanosomátidos es bastante variada; mientras que en *T. cruzi* el mRNA de la H2B está acoplado al ciclo celular (15), en las especies del género *Leishmania* no se ha descrito tal fenómeno (16, 17).

TRANSCRIPCIÓN Y REGULACIÓN DE LOS GENES DE LA HISTONA H2A DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

En *Trypanosoma cruzi* se han descrito dos tipos de genes para la histona H2A, aunque ambos codifican una proteína idéntica. Ambas unidades génicas, de 0,76 y 1,2 Kb respectivamente, se encuentran agrupadas en tándem en el mismo cromosoma de forma que las unidades de menor tamaño son cinco veces más abundantes que las más largas (18). La diferencia entre ambas unidades es la inserción de 0,43 Kb en el extremo 3' de uno de los subtipos capaz de dotar de señales de procesamiento al pre-mARN (19). Estudios de *northern blot* con ARN total extraído en las distintas fases del ciclo del parásito y una sonda correspondiente a la zona codificante de las unidades génicas, evidencia la presencia de dos mensajeros de 0,7 y 1 Kb respectivamente en los estadios replicativos del parásito, mientras que en tripomastigotes, formas no replicativas, no pudo detectarse expresión alguna. Cuando se pro-

cedió a la separación de ARN poliadenilado y no poliadenilado, la señal sólo se obtuvo en la fracción poliadenilada. Si en lugar de usar como sonda la zona codificante para la H2A se utiliza la unidad de inserción de 0,43 Kb, sólo se obtiene hibridación con el mensajero de mayor tamaño, evidenciando el origen de ambos mensajeros. La expresión de este mensajero con respecto al de menor tamaño se calculó mediante densitometría como 2:3 en las formas epimastigotas. Así, la unidad de mayor peso podría considerarse como más activa, si comparamos la proporción de unidades génicas con la proporción de mensajeros que generan.

Cuando el estudio de dependencia de la expresión con el estadio del parásito se realizó a nivel de transcripción primaria de ARN, ensayos de *run-on* pusieron en evidencia que los genes de la H2A están sujetos a una regulación transcripcional de tal manera que los diferentes genes se transcriben mucho más activamente en los estadios replicativos del parásito. Para dilucidar si esta transcripción diferencial se debe a un acoplamiento de la transcripción a la replicación de ADN, se incubaron formas epimastigotas replicativas con diversos inhibidores de la replicación, dado que hasta la fecha no es posible estudiar el ciclo celular de *T. cruzi* mediante cultivos sincrónicos. La 8-hidroxiurea inhibe la ribonucleótido reductasa, impidiendo de esta forma que en el núcleo exista una concentración suficiente de deoxinucleótidos trifosfato libres que permita su incorporación al ADN y, por tanto, la replicación del mismo. Células tratadas con 8-hidroxiurea quedan detenidas al principio de la fase S. A usar 8-hidroxiurea a una concentración de 100 µg/ml sobre cultivos de epimastigotes en fase logarítmica de crecimiento se observa un descenso en la abundancia citoplasmática de ambos mensajeros codificantes para la H2A, mantenida a lo largo del tiempo en consonancia con el bloqueo de la replicación. Ello estaría indicando que estos mensajeros tienen su expresión acoplada a replicación de ADN. Sin embargo, la adición de afidicolina, un inhibidor de la ADN polimerasa I que conduce a la detención al inicio de la fase S de las células tratadas, produce un efecto inesperado sobre el nivel de mensajeros de la H2A. Cuando epimastigotes en fase logarítmica de crecimiento se trataron con afidicolina a concentración 10 µM pudo constatar que, si bien un bloqueo de la replicación conduce en las dos primeras horas a un descenso brusco en la cantidad de mensajeros detectable en el citoplasma, estos niveles de mensajeros van recuperándose a partir de ese momento hasta alcanzar valores de base o incluso ampliamente superiores. En ningún momento de la cinética pudo detectarse un desbloqueo en la síntesis de ADN.

Con el fin de conocer si el efecto de la afidicolina en la expresión citoplásmica de los mensajeros de la H2A es reflejo de un patrón semejante en la transcripción primaria de estos genes, se realizaron experiencias de *run-on* con núcleos de epimastigotes tratados con afidicolina. Estas experiencias revelaron que la transcripción primaria no se afecta por afidicolina, o lo que

es lo mismo, no está acoplada a la síntesis de ADN. Así, en epimastigotes el acoplamiento de la expresión de los genes de la H2A a la replicación se lleva a cabo mediante un mecanismo post-transcripcional.

La cicloheximida es un inhibidor de la tARNaminoacil transferasa y, por tanto, bloquea la elongación de la cadena polipeptídica en la síntesis de proteínas. Para delimitar si la diferencia de estabilidad de los ARN mensajeros de la H2A es dependiente de síntesis proteica, se incubaron epimastigotes con 50 µg/ml de cicloheximida. A esta concentración no sólo se inhibe la síntesis proteica, sino también la de ADN, sin embargo, a pesar de este bloqueo en la replicación, la cicloheximida es capaz de disparar los niveles de los mensajeros de la H2A. Por tanto, estos resultados estarían evidenciando la posible existencia de un factor proteico lábil que se induce en ausencia de replicación y que está implicado en la degradación de los mensajeros de la H2A. Más aún, la cicloheximida consigue recuperar los niveles reducidos de mensajeros citoplasmáticos que se observan en parásitos tratados con afidicolina. El efecto atípico producido por la afidicolina sobre los mensajeros de la H2A podría explicarse dado que la afidicolina, descrita clásicamente como un inhibidor muy específico de la ADN polimerasa I, también puede tener otros efectos paralelos. Por ejemplo, inhibe proteínas con actividad nucleasa que reconocen estructuras secundarias complejas de ácidos nucleicos (20). Estas nucleasas son también inhibibles por nucleótidos libres y por iones fluoruro. Tratamiento de epimastigotes durante 2h con NaF 10mM, concentración que no afecta ni a la replicación ni a la síntesis proteica, condujo a un aumento moderado de la abundancia citoplasmática de los mensajeros de la H2A, y este aumento ocurre aún cuando los parásitos tienen su replicación bloqueada como efecto de una incubación del mismo tiempo con afidicolina. Por tanto, NaF podría estar inhibiendo la actividad nucleasa que degrada selectivamente los mensajeros de la H2A de forma acoplada al ciclo celular, de forma similar al efecto observado con la afidicolina.

Con objeto de dilucidar si la propia proteína H2A es capaz de desatar la señal de degradación de los mensajeros a través de su propia concentración citoplasmática, se procedió a la incubación de epimastigotes con metionina marcada radiactivamente y 8-hidroxiurea. En diferentes momentos se tomó una alícuota del cultivo y se obtuvo un extracto de proteínas citoplasmáticas, que se inmunoprecipitó con un suero dirigido contra un epítipo de la proteína H2A. De esta forma se puso de manifiesto que la 8-hidroxiurea conduce, tras un primer incremento en los niveles citoplasmáticos de la proteína, a una disminución sostenida de las proteínas histonas en el citoplasma, paralela a la disminución de los mensajeros. Esta cinética estaría evidenciando una implicación del nivel de H2A citoplásmico en el mecanismo de regulación de sus propios mensajeros (21). Sin embargo, cuando el mismo estudio se hizo usando afidicolina como inhibidor, si bien se observa en un primer momento

un efecto similar al obtenido con la 8-hidroxiurea, esta disminución va seguida de una acumulación de H2A hasta altos niveles, sin que esto se traduzca en una menor estabilidad de los mensajeros. Estos resultados muestran que, sin excluir que el incremento inicial de H2A en el citoplasma pueda ser señal reguladora de los mensajeros que la codifican, debe existir otro mecanismo involucrado en la regulación de estos mARNs, independiente de la síntesis de H2A y su concentración en el citoplasma. Si en lugar de adicionar el inhibidor y el precursor marcado simultáneamente al principio del ensayo se procede con pulsos de 1h de metionina marcada radiactivamente, podrá estudiarse la síntesis de proteínas en cada momento del estudio. Efectivamente, a partir de 16h de incubación la síntesis de H2A no se corresponde con los niveles de transcritos en el citoplasma, sino que es mucho menor, probablemente reflejo de una rápida degradación de proteínas histonas que se están sintetizando. Así, una alta concentración de H2A podría ser tóxica en el citoplasma y disparar un mecanismo que no modula la estabilidad de sus mensajeros, sino la de la propia histona que se está sintetizando a partir de los mismos (22).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LEWIN, B.: *Genes IV* (1980), 519-539. Wiley, N. Y.
- (2) HAYES, J. J., CLARK, D. J., WOLFFE, A. P.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1991), **64**:1-10.
- (3) RECHT, B., DUNN, A., OSLEY, M. A.: *Mol Cell Biol* (1996), **16**: 2545-2553.
- (4) WELLS, D. E.: *Nucleic Acids Res* (1986), **14**:119-149.
- (5) HENTSCHET, C. C., BIRNSTIEL, M. L.: *Cell* (1981) **25**:301-313
- (6) MARZLUFF, W. F.: *Gene expression* (1992), **2**:n.2, 93-97.
- (7) GALLIE, D. R., LEWIS, N. J., MARZLUFF, W. F.: *Nucleic Acid Res* (1996), **24**:1954-1962.
- (8) DOMINSKI, Z., SUMEREL, J., HANSON, R. J., WHITFIELD, M. L., MARZLUFF, W. F.: *Nucleic Acids Symp Ser* (1995), **33**:234-236.
- (9) WU, R. S., BONNER, W. M.: *Cell* (1981), **27**:321-330.
- (10) OSLEY, M. A.: *Annu Rev Biochem* (1991) **60**:827-861.
- (11) PELTZ, S. W., ROSS, J.: *Mol. Cell. Biol.* (1987) **7**: 4345-4356
- (12) MARZLUFF, W. F., PANDEY, N. B.: *Trends Biochem Sci* (1988), **13**:49-52.
- (13) HECKER, H., BETSCHART, B., BENDER, K., BURRI, M., SCHLIMME, W.: *Int J Parasitol* (1994), **24**:809-819.
- (14) VANHAMME, L., PAYS, E.: *Microbiological Reviews* (June 1995), 223-240.
- (15) GARCÍA-SALCEDO, J. A., OLIVER, J. L., STOCK, R. P., GONZÁLEZ, A.: *Mol Microb* (1994) **13**(6):1033-1043.
- (16) GENSKE, J. E., CAIRNS, B. R., STACK, S. P., LANDFEAR, S. M.: *Mol Cell Biol* (1991), **11**:240-249.
- (17) SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., ALONSO, C.: *Biochem J* (1996), **318**:813-819.
- (18) PUERTA, C., MARTÍN, J., ALONSO, C., LÓPEZ, M. C.: *Mol and Biochem Parasitol* (1994), **64**:1-10.
- (19) VÁZQUEZ, M. P., SCHIJMAN, A. G., LEVIN, M. J.: *Mol and Biochem Parasitol* (1994), **64**:327-336.