

Efecto de la temperatura en el procesamiento postranscripcional del intrón VP1 del SV40 insertado en vectores de expresión transfectados en células de peces

Oscar Hernández Betancourt

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J Finlay
Centro de Inmunología y Productos Biológicos, CENIPBI
AP 150, CP 70100, Camagüey, Cuba
E-mail: oscar@finlay.cmw.sld.cu

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre el mecanismo postranscripcional de corte y empalme de una secuencia heteróloga utilizada como activador transcripcional en células de peces. Se emplearon dos líneas celulares de peces, y una variedad de vectores a los que se les insertaron: el intrón de los genes tardíos VP1 del virus 40 del simio y el primer intrón de la hormona de crecimiento de trucha. Los experimentos se llevaron a cabo a 30 y 37 °C. Se observó la ausencia de actividad cloramfenicol acetil transferasa y de hormona de crecimiento de tilapia en los sobrenadantes y extractos celulares de las líneas transfectadas con los vectores que portaron el intrón VP1 y que se cultivaron a 30 °C. Cuando las células se cultivaron a 37 °C, se observó la expresión de los genes reporteros antes mencionados. La técnica *Northern-blot* evidenció el no procesamiento del intrón VP1 en las líneas de peces cultivados a 30 °C. En cambio, a 37 °C, el intrón VP1 fue correctamente eliminado, mostrándose la talla del ADNc de la hormona (0.8 Kb). El trabajo muestra, por primera vez, el efecto que desempeña la temperatura sobre el procesamiento de un transcripto primario, que porta una secuencia heteróloga utilizada para potenciar la expresión de genes de interés y sugiere un cambio conformacional en la molécula precursora de ARNm como causa de la baja eficiencia mostrada cuando éste es empleado como activador en la transcripción de genes de interés en células de peces.

Palabras claves: splicing, VP1, intrones, vectores de expresión, RNA

Biotecnología Aplicada 2004;21:213-217

ABSTRACT

Effect of temperature on the postranscriptional processing of the VP1 intron from SV40 used in expression vectors transfected in fish cells. The purpose of this paper was to evaluate the effect of temperature on the first transcript processing of a heterologous sequence used as a transcriptional enhancer in fish cells. Several expression vectors and two fish cells lines were used. Several expression vectors were employed. The two cells lines used were cultured at 30 and 37 °C. The first intron from trout growth hormone gene and the SV40 VP1 intron were employed for this assay. At 30 °C, no chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activity and tilapia growth hormone (tiGH) were detected, but when the fish cells were cultured at 37 °C the protein expression was evident for both genes in the culture media and the cell extract. The *Northern-blot* technique was applied to reveal the processing or not of the primary transcript using total RNA from cells lines. The lack of processing of the VP1 intron was evident when a band of 1.8 Kb (VP1 plus CAT cDNA) appeared, revealing a failure in the splicing process at 30 °C. When a *Northern-blot* was used at 37 °C, a band of the correct size (0.8 Kb) from tiGH cDNA was observed, indicating that the VP1 intron was successfully eliminated at this temperature. This is the first report on postranscriptional failure when a heterologous sequence is used in fish cells as a transcriptional enhancer due to low temperature.

Keywords: splicing, VP1, intron, fish cells, expression vectors, RNA

Introducción

Varias secuencias de ADN de diversos orígenes se han empleado tradicionalmente en vectores de expresión, con el fin de estimular los niveles de una proteína de interés en ensayos *in vitro* e *in vivo* mediante combinaciones genéticas [1-3]. Entre ellas los intrones han llamado la atención de diversos grupos [4-6] pues se sabe que en ellos residen importantes secuencias reguladoras de los procesos transcripcionales y postranscripcionales. Un resultado interesante se publicó en 1998 cuando Kolb *et al.* [7] describieron la estructura de un promotor típico eucariótico en el primer intrón de la hormona de crecimiento humana (HCh-N), capaz de guiar la expresión del gen reportero ensayado.

Muchos son los factores que actúan sobre la regulación del proceso transcripcional y postranscripcional de un

gen, entre los que se encuentran: la secuencia del promotor adyacente, activadores en 5', terminadores [8-10] así como la longitud y secuencia del intrón empleado [11, 12]. En cambio, poca atención se le ha prestado al efecto que un factor físico, como la temperatura, pueda ejercer sobre los complejos mecanismos antes mencionados. Cambios en la estructura celular durante el proceso de hipertermia a nivel de membrana plasmática, mitocondria, así como la reestructuración de los nucleosomas se publicaron con anterioridad [13, 14]. También se ha demostrado que estos cambios pueden ocurrir de forma irreversible, en dependencia de la temperatura alcanzada en el proceso estudiado [15].

Existen varios trabajos que reportan el efecto de la temperatura a nivel molecular sobre el mecanismo

1. Devlin RH, Yesaki TY, Biagi CA, Donaldson EM, Swanson P, Chan W. Extraordinary salmon growth. *Nature* 1994;371:209-10.

2. Tsai HJ, Tseng FS, Liao IC. Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into genome of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Can J Fish Aquat Sci* 1995;52:776-87.

3. Carvan MJ 3rd, Dalton TP, Stuart GW, Nebert DW. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann NY Acad Sci* 2000;919:133-47.

postranscripcional de *splicing* [16-18]; en cambio, estudios realizados para evaluar este evento en células de peces, no han sido publicados, aun cuando muchas secuencias heterólogas provenientes de mamíferos o de virus infectivos de éstos, se utilizaron en peces. Teniendo en cuenta que estas secuencias son normalmente procesadas a la temperatura óptima de 37 °C, nos planteamos como hipótesis, que la baja efectividad de estas secuencias no homólogas empleadas como activadores, se deben a fallas en la maquinaria transcripcional o postranscripcional, debido a las bajas temperaturas propias de los cultivos celulares de peces. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de este factor sobre el mecanismo molecular, mediante el empleo del intrón VP1 del virus 40 del simio (SV40) insertado en varios vectores de expresión, haciendo uso de dos líneas celulares de peces. Se muestra que la inhibición de la expresión de los genes *cat* y *HCTi* por parte de los vectores que incluyeron el intrón de SV40, a temperaturas inferiores de 37 °C, se debió a fallas ocurridas a nivel postranscripcional en el procesamiento del mismo (corte y empalme).

Materiales y métodos

Construcciones genéticas empleadas

Las construcciones genéticas derivaron del plásmido pSVL (Amersham) a los cuales se les insertaron los promotores CMV (citomegalovirus humano), RSV (virus del sarcoma de Rous) y TK (timidina quinasa), los detalles aparecen publicados por Hernández *et al.* [9]. Cada vector con un promotor dio lugar a tres construcciones genéticas, una sin intrón, otra con el intrón VP1 del virus 40 del simio (SV40), y una tercera con el primer intrón de la hormona de crecimiento de trucha (INTT). Para evaluar el efecto de cada intrón ensayado, se conformaron tres series integradas por tres vectores de expresión para cada gen reportero usado: la enzima cloramfenicol acetil transferasa (CAT) y la hormona de crecimiento de tilapia (HCTi). Las series son: *cat*: grupo control, CMV-*cat*, RSV-*cat*, TK-*cat* (vectores carentes de intrones); *INTT-cat*: CMVINTT-*cat*, RSVINTT-*cat*, TKINTT-*cat* (vectores con el INTT fusionado al ADNc del *cat*); *VP1-cat*: CMVVP1-*cat*, RSVVP1-*cat*, TKVP1-*cat* (vectores portadores del intrón VP1); la misma nomenclatura fue utilizada cuando el ADNc del gen reportero se sustituyó por el de la hormona de crecimiento de tilapia. Los intrones se ubicaron en todas las construcciones quiméricas ensayadas en el extremo 5' de los dos genes reporteros empleados.

Cultivos celulares y transfecciones

Se utilizaron las líneas celulares de peces: EPC (células epiteliales de carpa), TO₂ (células de ovario de tilapia). La temperatura para el cultivo varió según la línea celular: EPC a 30 °C, en el caso de TO₂, estas se cultivaron a 30 °C, y posterior a la transfección, se cultivaron a 37 °C. Los ensayos se realizaron de forma transitoria por un periodo de 72 h; se logró una línea estable de EPC mediante la selección con el análogo de la neomicina (G418). El cultivo de estas líneas así como el método de transfección empleado, se describió previamente [10].

Ensayos para la determinación de CAT y HCTi

El ensayo para la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) se realizó de acuerdo al método descrito [19], incubando el extracto proteico con la mezcla de reacción la cual contenía el sustrato [³H] Acetil CoA, durante 2 h. Todos los experimentos se realizaron por duplicado para cada vector que conforma la serie. Se calculó la actividad enzimática mediante el uso de una curva patrón realizada con la enzima comercial (Promega S.A) y el resultado se expresa como promedio. Los niveles de HCTi se determinaron en el medio de cultivo, 72 h posterior a la transfección, mediante un radioinmunoanálisis (RIA), normalizado para esta hormona [20].

Análisis de ARN por Northern-blot

El ARN total se extrajo de células en cultivo, usando el método de guanidium tiocianato a pH ácido [21]. La técnica *Northern-blot* se realizó con 10 µg de ARN total, según Sambrook, *et al.* [22]. Como sondas se utilizaron el ADNc de la *HCTi*, y del gen *cat*. Estos fragmentos de ADN, fueron marcados con α fósforo³² (P³², Amersham, UK) mediante la técnica de oligo al azar [23]. Finalmente, las membranas se expusieron en placas de rayos X (Fuji, Japón) durante 24 h y 15 días a -70 °C.

Resultados

Inhibición de la expresión de los genes reporteros a temperaturas inferiores a 37 °C

La figura 1 compara la expresión lograda por cada serie o vectores agrupados en las líneas EPC y TO₂ a 30 y 37 °C respectivamente, cuando se utilizó el gen reportero CAT. Esto permitió evaluar el efecto que tuvo la inserción de los intrones VP1 e INTT sobre la expresión del gen asociado a la temperatura. El resultado se muestra como la media de las transfecciones realizadas en duplicado para cada vector de la serie (n=6). El intrón INTT insertado en las construcciones transfectadas en la línea celular EPC cultivada a 30 °C, si bien no logró un efecto activador, permitió detectar actividad enzimática en el extracto celular de esta línea. En cambio, llamó la atención la inhibición total que ejerció el intrón VP1 del SV40 a esta temperatura, lo cual se observa al comparar las series INTT-*cat* y VP1-*cat*. Un resultado comparable se obtuvo con la línea de ovario de tilapia TO₂ cultivada a 20 °C y con las embrionarias de carpa CHSE cultivada a 30 °C (resultados no mostrados). Teniendo en cuenta que se trata de una secuencia no homóloga de peces, de origen viral y que infecta células de mamíferos, donde su procesamiento y eliminación ocurren a 37 °C, nos propusimos evaluar si la inhibición total causada por este intrón es debida, en parte, a la baja temperatura utilizada en los cultivos celulares de peces, por lo que estudiamos el mecanismo en la línea TO₂. Esta línea celular es capaz de crecer a una temperatura que no es propia de la fisiología de los peces (37 °C). Como muestra la figura 1 se encontró actividad enzimática cuando se transfectaron los vectores portadores del intrón VP1 (VP1-*cat*) en esta línea celular (0.67x10³ u CAT), evidenciándose el efecto positivo de la temperatura en la expresión de este gen.

4. Moore DD, Marks AR, Buckley DI, Kapler G, Payvan F, Goodman HM. The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1985;82:699-702.

5. Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *NAR* 1991; 19:3979-86.

6. Yang BY, Chan KM, Lin CM, Chen TT. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone 1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;340:359-68.

7. Kolb A, Gunzburg WH, Bremm G, Erfle V, Salmons B. A functional eukaryotic promoter is contained within the first intron of the hGH-N coding region. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:332-7.

8. Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1991; 88:478-82.

9. Hernández O, Attal J, Beazorti M, Theron M, Puissant C, Houdebine LM. Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Mol Mar Biol Biotech* 1993a; 2:181-8.

10. Hernández O, Theron M, Puissant C, Beazorti M, Attal J, LeBail P, Cabrera E, Leonart R, de la Fuente J. Effect of intervening sequences in the transient expression of tilapia growth hormone in mammalian and fish cells. *Advances In Modern Biotechnology* 1993b;10:158-61.

11. Bai G, Stuebing EW, Parker HR, Harlow P, Nemer M. Combinatorial regulation by promoter and intron 1 regions of the metallotheoneine SpMTA gene in the sea urchin embryo. *Mol Cell Biol* 1993;13:993-1001.

12. Liu K, Sandgren E, Palmiter R, Stein A. Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment *in vitro* and in transgenic mice. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1995;92:7724-8.

13. Iwami M, Furuya I, Kataoka H. Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*. *Insect Biochem Mol Biol* 1996;26:25-32.

14. Verdone L, Cesari F, Denis CL, Di Mauro E, Caserta M. Factors affecting *Saccharomyces cerevisiae* ADH2 chromatin remodeling and transcription. *J Biol Chem* 1997;272:30828-34.

15. Wang Y, Perrault AR, Iliakis G. Replication protein a as a potential regulator of DNA replication in cells exposed to hyperthermia. *Radiat Res* 1998;149: 284-93.

16. Karcher D, Bock R. Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing reactions in the plastid *ndhB* transcript. *Curr Genet* 2002;41:48-52.

17. Madrid C, Nieto J, Paytubi S, Falconi M, Gualerzi C, Juez A. Temperature and HNS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* 2002;184:5058-66.

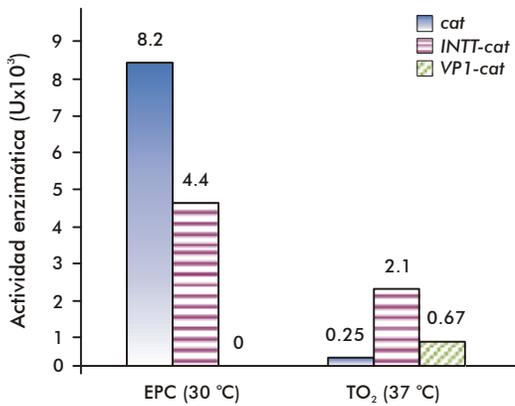


Figura 1. Comparación de la expresión de CAT en las líneas celulares de peces EPC y TO₂ transfectadas y cultivadas a 30 °C y 37 °C respectivamente. Los experimentos se realizaron en condiciones transitorias (72 h) en duplicado para cada vector que conforma la serie. El ensayo se realizó con los extractos celulares como se explica en Materiales y métodos. Los resultados se muestran como el valor medio de cada serie (n=6) y se expresa en unidades enzimáticas. Cada serie está conformada por tres vectores. Para cada línea celular y temperatura ensayada se utilizaron los vectores carentes de intrones como control y aparecen en la leyenda como cat. La serie INTT-cat son los resultados de los tres vectores que portan el intrón INTT de trucha. VP1-cat indica el resultado obtenido con los tres vectores portadores del intrón VP1 proveniente del SV40.

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores, principalmente la expresión lograda a 37 °C, se diseñó un nuevo experimento donde el gen reportero CAT se sustituyó por el ADNc de la HCti. Se utilizaron las líneas EPC de carpa y TO₂ de tilapia, cultivadas a 30 y 37 °C respectivamente.

La figura 2 muestra los resultados que corroboraron la expresión de HCti (1.6 ng/mL) en el medio de cultivo de las células TO₂ a 37 °C que confirma, una vez más, el efecto positivo de este factor sobre la expresión. La inhibición total causada por el intrón VP1 se evidenció nuevamente en las células EPC crecidas a 30 °C. Con la finalidad de analizar las causas moleculares que originaron esta diferencia de expresión entre las temperaturas estudiadas, se utilizó la técnica Northern-blot, para identificar posibles fallas o cambios a nivel de la molécula de ARN.

Estudio molecular del procesamiento de los intrones INTT y VP1 en cultivos estables de peces (EPC) a 30 °C

Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 30 °C en cultivos estables de EPC, transfectadas con vectores de las diferentes series.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos mediante el empleo de esta técnica, aplicando 10 µgs de ARN total para cada vector. En las líneas 2 y 5 (pTKINTT-cat y pCMVINTT-cat), el intrón de trucha fue correctamente procesado, localizándose la banda correspondiente al ARNm del cat en la talla esperada (0.8 Kb), al igual que las líneas 6 y 9, pertenecientes a los plásmidos carentes de intrones (pCMV-cat y pRSV-cat). Por el contrario, el vector que porta el intrón VP1 (línea 4), generó la acumulación de un transcripto primario en la talla de 1.8 Kb superior a la esperada (indicado por la flecha), que evidencia que el mecanismo de corte y

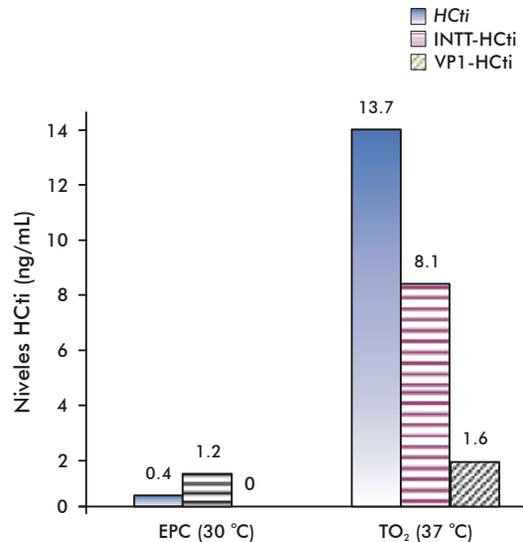


Figura 2. Expresión de hormona de crecimiento de tilapia (HCti) en medios de cultivo de diferentes líneas celulares EPC y TO₂ crecidas a 30 °C y 37 °C respectivamente. El gen reportero cat se sustituyó por el ADNc de la HCti. Se emplearon los vectores de expresión antes mencionados. Se utilizó el método de RIA para la cuantificación de la hormona en el sobrenadante de los medios de cultivos. El valor reflejado aparece como la media de ensayos realizados en duplicados en cada línea celular y se expresan en ng/mL. Para cada línea celular y temperatura ensayada se utilizaron los vectores carentes de intrones como control y aparecen en la leyenda como HCti. La serie INTT-HCti son los resultados de los tres vectores que portan el intrón INTT de trucha. VP1-HCti indica el resultado de los tres vectores portadores del intrón VP1 proveniente del SV40.

empalme no fue eficiente cuando se utilizó esta secuencia viral en la línea celular de carpa estudiada, inhibiendo los niveles de proteína CAT.

Efecto de la temperatura sobre el procesamiento del intrón VP1 en células TO₂ a 37 °C

El experimento anterior mostró que la maquinaria transcripcional de estas células (EPC), reconoce las secuencias presentes en esta combinación genética

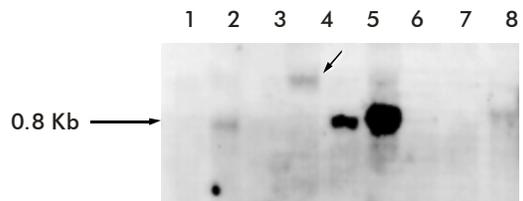


Figura 3. Resultado del Northern-blot realizado para el análisis del procesamiento de los intrones en clones estables de células EPC cultivadas a 30 °C, la selección de los mismos se realizó con un análogo de la neomicina (G418). Se aplicaron 10 µg de ARN total y se transfirió el resultado de la corrida electroforética al soporte sólido (Hybond N⁺), el cual fue hibridado con el ADNc del gen cat (10⁶ cpm/mL de solución de hibridación). Línea 1. pTKVP1-cat, Línea 2. pTKINTT-cat, Línea 3. pTK-cat, Línea 4. pCMVVP1-cat, Línea 5. pCMVINTT-cat, Línea 6. pCMV-cat, Línea 7. pRSVVP1-cat, Línea 8. pRSVINTT-cat, Línea 9. pRSV-cat. La flecha en el lado izquierdo de la figura indica la talla de la molécula en Kb. La flecha superior en la figura (línea 4), muestra la banda de 1.8 Kb correspondiente al transcripto no procesado en la construcción que porta el intrón VP1.

18. Revers L, Cardone J, Bonatto D, Saffi J, Grey M, Feldmann H, et al. Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *NAR* 2002;30:4993-5003.

19. Nordeen S, Green P, Fowlkes D. A rapid sensitive and inexpensive assay for chloramphenicol acetyl transferase. *DNA* 1987;6:173-8.

20. Ricordel MJ, Smal J, LeBail PY. Application of a recombinant cichlid growth hormone radioimmunoassay to measure native GH in tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred at different temperatures. *Aquat Living Res* 1995;8:153-60.

21. Puissant C, Houdebine LM. An improvement of the single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* 1990;18:148-50.

22. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor (NY) 1989.

23. Feinberg A, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum. Anal Biochem* 1984; 137:266-7.

(pCMVVP1-*cat*), al generar un transcripto primario y, además, evidenció fallas en el evento encargado del procesamiento (corte y empalme) del intrón VP1, lo cual trajo como consecuencia la acumulación del precursor.

En la figura 4 se observa el estudio molecular llevado a cabo mediante *Northern-blot* en las células TO₂ transfectadas con los diferentes vectores (Figura 4) y cultivada a 37 °C. Esta técnica arrojó un resultado por primera vez visto en células de peces, a 37 °C la secuencia heteróloga empleada (VP1) es correctamente procesada. En la línea 6 (flecha) se muestra la señal del ARNm correspondiente a la construcción pTKVP1-HCti, la cual coincide con la talla esperada para el ADNc de la HCti (0.8 Kb), comparable con la talla obtenida por los vectores pCMV-HCti (sin intrón, línea 2) y pCMVINTT-HCti, pTK-INTTHCti (líneas 3 y 5 respectivamente). Estos resultados confirman el efecto positivo que presenta el incremento de la temperatura sobre el correcto procesamiento de esta secuencia heteróloga, posterior a la transcripción, que permitió detectar los niveles de proteína CAT y HCti en los experimentos anteriores (Figuras 1 y 2).

Discusión

Está claro que la temperatura es un factor físico relacionado con los procesos celulares, e influye en el correcto funcionamiento y control de estos. Los cambios que este factor ocasiona en los diferentes mecanismos moleculares han sido abordados por diferentes autores [13, 14]. Karcher y Bock [16], trabajando con un gen del plastidio del tabaco, encuentran que en la medida que se incrementó la temperatura a 42 °C, se incrementaron también los sitios de bloqueo que afectaron la edición del ARNm.

No obstante los trabajos publicados relacionados con el tema, los estudios para esclarecer el compromiso que existe entre la temperatura y los mecanismos moleculares, no están en modo alguno agotados. En el caso particular de los peces, este es el primer trabajo que refiere la acción de la temperatura sobre la eficiencia de la maquinaria postranscripcional de la célula en el procesamiento de un intrón foráneo. El intrón VP1 del SV40 se encuentra entre las secuencias empleadas como activador transcripcional en la década de los años 90 por varios autores [9, 10, 24, 25], quienes coinciden en su baja efectividad como activador transcripcional

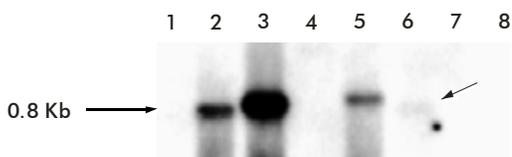


Figura 4. Northern-blot realizado a células de peces TO₂ transfectadas con diferentes plásmidos, y cultivadas a 37 °C durante 72 h. Se aplicaron 10 mg de ARN total, el soporte utilizado (Hybond N⁺), fue hibridado con el ADNc de la hormona de crecimiento de tilapia (HCti).

Línea 1: pRSVINTT-HCti, Línea 2: pCMV-HCti, Línea 3: pCMVINTT-HCti, Línea 4: pTK-HCti, Línea 5: pTKINTT-HCti, Línea 6: pTKVP1-HCti, Línea 7: pE300HCti15, Línea 8: Control Negativo (RNA total de células TO₂ no transfectadas). La flecha en el lado izquierdo del gráfico, indica la talla del ADNc de la HCti. La flecha sobre la figura señalando la línea 6, muestra la banda en la talla esperada para el ARNm de la hormona.

en células de peces. Esta secuencia pertenece a un virus que infecta los simios y que, por consiguiente, su procesamiento y eliminación ocurre a 37 °C. Como esta, otras secuencias aisladas de mamíferos se emplearon para potenciar la expresión de varios genes en peces antes que se identificaran secuencias homólogas de éstos para tales fines, sin tenerse en cuenta que el objetivo podría verse afectado por las temperaturas inferiores en que se desarrollan estos organismos acuáticos (menos de 37 °C). Poseer una línea celular de tilapia (TO₂), adaptable a la temperatura donde normalmente ocurre el procesamiento de este intrón (37 °C) y fuera del rango fisiológico de la gran mayoría de las especies de peces, sugirió la idea de estudiar el evento postranscripcional de corte y empalme del mismo, en un grupo filogenéticamente distante como los peces y, por consiguiente, evaluar si la inhibición de la expresión observada en estudios referidos con anterioridad, estuvo asociada a este factor, ya que se ha demostrado que la misma puede influir en el proceso transcripcional de algunos genes [18, 26]. Kurihara y Handa [27] en estudios realizados con el gen mitocondrial *cox2* del trigo, detectaron la acumulación del precursor no procesado, debido a las bajas temperaturas. Un resultado similar se obtuvo con el gen de la β -globina humana [28] donde estudian el procesamiento de variantes mutadas en el intrón 2 del gen, en células culticadas a diferentes temperaturas, y observan la acumulación a 16, 21 y 25 °C, no siendo así a 30 y 37 °C, lo cual compromete la regulación postranscripcional. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo. El empleo del intrón VP1 en una variedad de vectores, combinado a otros elementos reguladores, comunes en las tres series conformadas y ensayadas en células de peces a temperaturas inferiores de 37 °C, mostró una inhibición total en la expresión de dos genes reporteros utilizados, contrario a la débil expresión de la hormona de crecimiento (HC) bovina publicada por el grupo de Petitclerc [24]. Las diferencias de expresión obtenidas por ambos grupos cuando emplean el intrón VP1, sugiere la influencia del gen reportador empleado en ambos casos al generar estructuras secundarias diferentes en los precursores formados que influyen, por consiguiente las diferencias en estos resultados es desconocida. La combinación de secuencias diferentes puede originar estructuras secundarias diferentes en los precursores formados que influyen, por consiguiente, en el correcto procesamiento y eliminación de esta secuencia, tengamos en cuenta que la homología entre ambas hormonas es inferior al 80%. Anteriormente, Friedenreich y Scharl [29] trabajaron con el gen de la HC humana en células de peces y se evidenciaron insuficiencias en el mecanismo de corte y empalme de estos intrones de mamíferos, así como en la traducción en el sistema *in vitro* por ellos utilizados, que sugieren limitaciones en el uso de secuencias heterólogas.

En estos estudios, los resultados sugieren que la inhibición de los niveles de expresión observada a 30 °C, cuando el intrón VP1 estuvo presente, se debió a fallas postranscripcionales, evidenciada por la presencia de un transcripto primario no procesado y acumulado en una talla superior a la esperada (1.8 Kb). Aunque se conoce que el evento que ocurre posterior a la transcripción es universal, varias causas pueden, de

24. Petitclerc D, Attal J, Theron M, Bearzotti M, Bolifraud G, Kann M, et al. The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in mammary gland of transgenic mice. *J Biotech* 1995;40:169-78.

25. Attal J, Cajero-Juarez M, Petitclerc D, Theron MC, Stinnakre MG, Bearzotti M, Kann G, Houdebine LM. The effect of matrix attached regions (MAR) and specialized chromatin structure (SCS) on the expression of gene constructs in cultured cells and in transgenic mice. *Mol Biol Rep* 1995; 22:37-46.

26. Elliot W, Elliot D. *Biochemical and Molecular Biology*. Oxford University Press (Oxford) 1997.

27. Kurihara S, Handa H. Low temperature affects the processing pattern and RNA editing status of the mitochondrial *cox2* transcripts in wheat. *Curr Genet* 2001; 40:203-8.

28. Gemignani F, Sazani P, Morcos P, Kole R. Temperature-dependent splicing of β -globin pre-mRNA. *NAR* 2002;30: 4592-98.

29. Friedenreich H, Scharl M. Transient expression directed by homologous and heterologous promoters and enhancer sequences in fish cells. *NAR* 1990;40: 3299-305.

forma particular, incrementar o disminuir su eficiencia. Es importante mencionar que en ensayos realizados con anterioridad [9], un intrón del mismo origen (el pequeño "t" de SV40) fue procesado a la temperatura aquí ensayada (30 °C), lo que descarta la hipótesis sobre la activación de posibles elementos específicos involucrados en este evento, a temperaturas elevadas (37 °C) y confirma la universalidad del mismo. Este resultado, en cambio, nos lleva a reflexionar sobre el efecto que la talla de ambos intrones pudiera ejercer en el procesamiento (69 pb del intrón t vs 1000 pb del VP1), si se tiene en cuenta la influencia que estas secuencias ejercen sobre la estructura secundaria de la molécula precursora de ARNm. Lo antes expuesto sugiere que la temperatura de 37 °C pudiera provocar un cambio de conformación en el transcrito primario, creando una estructura más abierta o relajada, fácilmente accesible a los factores involucrados en el corte y la consiguiente maduración del ARNm [17]. La temperatura es un factor estudiado, así como su efecto en los fenómenos biológicos como los aquí discutidos. Katayama *et al.*, [30] demuestran que las curvaturas en el ADN se incrementan a bajas temperaturas, propiedad no excluyente para la molécula de ARN, donde su estructura puede ser sensible a este factor. Se han descrito cambios considerables en la molécula de ARN debido a la temperatura, como es el enmascaramiento que sufre la secuencia del Shine-

Dalgamo a 30 °C por un gran lazo que bloquea la unión del ribosoma, el cual se abre a 37 °C, expone la región y permite la traslación [29]. Otros estudios de la temperatura asociados al proceso postranscripcional de corte y empalme mostraron la inhibición del proceso a 42 °C, la cual bloquea el mecanismo y trae como consecuencia la acumulación de especies de moléculas de ARNm no apropiadas [16, 31, 32].

El trabajo aquí presentado muestra, por primera vez el efecto positivo que ejerce la temperatura sobre el mecanismo postranscripcional de *splicing* en un intrón aislado de un virus que infecta células de mamífero (SV40) y que es insertado en vectores de expresión que fueron transfectados en células de peces. Este trabajo sugiere, además, un cambio conformacional en la molécula precursora que favorece el mecanismo a 37 °C, y brinda las bases para el diseño de nuevos experimentos que confirmen esta hipótesis.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biología del Desarrollo y la Reproducción perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA) de Jouy en Josas quien acogió y entrenó al autor de este trabajo en el año 1991; muy especialmente al Dr. Louis Marie Houdebine. Agradecer también al CES quien financió la beca durante este periodo.

30. Katayama S, Matsushita O, Tamai E, Miyata S, Okabe A. Phased A-tracts bind to the α subunit of RNA polymerase with increased affinity at low temperature. *FEBS Lett.* 2001;509:235-8.

31. Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 2002;110:551-61.

32. Shen J, Bell CJ, Hirsh J. Tissue-specific alternative splicing of *Drosophila* dopamine decarboxylase gene is affected by heat shock. *J Mol Cell Biol* 1993;13:4549-55.

Recibido en marzo de 2004. Aprobado en agosto de 2004.