REPROGRAMACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES NUCLEOLARES DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DE LA CARPA

Vera María Inés, Kausel Gudrun, Ríos M. y Krauskopf M.
Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

El ajuste de las funciones celulares y moleculares parece ser un mecanismo fundamental a través del cual los peces euritermales compensan los cambios de temperatura de su medio ambiente. Los eventos responsables de la adaptación estacional involucrarían la expresión génica tanto a nivel de transcripción como de traducción.

En el pez *Cyprinus carpio*, el proceso de aclimatización conlleva cambios a nivel celular y molecular. A nivel ultraestructural destaca la segregación de los componentes nucleolares en células hepáticas e hipofisiarias durante las condiciones de adaptación a invierno, la que se revierte en verano donde los componentes del nucléolo se observan entremezclados. A nivel molecular, la síntesis de RNA y de proteínas está disminuída también durante la aclimatización invernal. Morfológicamente la segregación de los componentes nucleolares refleja una inactivación temporal de la expresión de los genes de RNA ribosomal. La segregación nucleolar y la disminución de la síntesis de RNA total durante la aclimatización invernal de la carpa, nos llevó a postular que la expresión de los genes nucleolares se reprograma como parte de la respuesta compensatoria del pez frente a los cambios estacionales de su medio ambiente.

Para probar nuestra hipótesis de trabajo se usaron diferentes aproximaciones experimentales. El nivel de transcripción *in situ* se observó en cortes ultrafinos de hepatocitos de carpa, por medio de la técnica de la RNAsa-oro coloidal. Los resultados indicaron que existen profundas diferencias en el contenido de rRNA nuclear en células provenientes de ambos estados adaptativos, siendo notoriamente inferior en nucléolos segregados. Concordantemente, la cantidad de RNA sintetizada *in vitro* en hipófisis de carpas aclimatizadas a invierno es notablemente menor y el procesamiento de los precursores de rRNA está claramente deprimido. Por el contrario, en pituitarias de carpas aclimatizadas a verano la velocidad y cantidad de RNA síntetizada y su procesamiento fue significativamente mayor. Para corroborar el compromiso de los eventos de procesamiento de los precursores de rRNA en la respuesta adaptativa de la carpa se midió el contenido de U3 RNA en ambos estados de aclimatización. Con este propósito se realizó hibridaciones *in situ*, en cortes histológicos de pituitarias, con una sonda oligonucleotídica de una región altamente conservada de este snoRNA, que hibrida con U3 RNA de carpa. El número de células que hibridaron positivamente con esta sonda fue marcadamente superior en las muestras provenientes de carpas adaptadas a verano.

La actividad de la RNA polimerasa I se midió en núcleos de hepatocitos de carpas de ambas estaciones, en ensayos ejecutados a la temperatura correspondiente a la estación y a la de la estación contraria. No hubo diferencias significativas en su actividad entre ambas condiciones de aclimatización. Al parecer, esta enzima no estaría comprometida en la regulación de la expresión de los genes de rRNA durante la respuesta adaptativa de la carpa. Sin embargo, en la reprogramación que representa la dinámica de los componentes nucleolares durante el proceso de aclimatización, podrían estar implicados factores de transcripción específicos, entre otras proteínas de localización exclusivamente nucleolar, así como factores cis ubicados en la región regulatoria de los genes de rRNA.

La búsqueda de elementos reguladores de la expresión de estos genes implica contar con clones que contengan tanto la secuencia codificante como el espaciador intergénico. Con este propósito se construyeron bibliotecas de DNA genómico de carpa del que se han aislado clones que contienen parte de la secuencia codificadora del rRNA 28S, correspondiente al dominio D3, y el rRNA 5,8S. El estudio de estos clones permitirá, por una parte, conocer la organización de los genes de RNA ribosomal de carpa, que no han sido reportados en la literatura y contar con secuencias reguladoras que permitan estudiar la modulación de la expresión de estos genes a través de su interacción con elementos trans específicos, tanto activadores como represores de la transcripción.

La reprogramación de la expresión nucleolar que acontece en teleósteos representa un fenómeno de particular interés, toda vez que puede contribuír al conocimiento de regiones reguladoras claramente distintas a las que caracterizan a los genes de homeotermos. Tanto estas regiones como las secuencias promotoras, podrían ser utilizadas en construcciones génicas de beneficio en la producción de peces transgénicos.(Financiado por Grants FONDECYT 1940845, ICGEB GE/GLO/90/004 y DID UACH 1330-2-09).