

Clonamiento y expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* de la acuaporina 2 de *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2)

Silvana Verlezza ^{1,2}, Catherine Figarella ², José Luis Ramírez ², Néstor L. Uzcátegui ^{1,2,*}

Recibido: 7 Septiembre 2009; Aceptado: 25 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, una entidad endémica no controlada y en crecimiento en Latinoamérica. El parásito, durante su ciclo de vida, se ve sometido a cambios bruscos en la osmolaridad. Tales situaciones de estrés osmótico ameritan sistemas fisiológicos que le permitan a estas células adaptarse y sobrevivir a la nueva situación. En distintos organismos, uno de los elementos primordiales que interviene en osmorregulación son las acuaporinas, proteínas de membrana pertenecientes a la familia MIP ("major intrinsic protein"), que permiten el paso selectivo de agua (acuaporinas clásicas) y otras moléculas no cargadas (acuagliceroporinas) a través de membranas biológicas, en función de gradientes osmóticos. En el genoma de *T. cruzi* existen cinco genes que presentan similitud con proteínas de la familia MIP. Una de éstas ya ha sido caracterizada, TcAQP1 (*Trypanosoma cruzi* acuaporina 1), un canal permeable solo al agua. En este artículo de investigación se inició el estudio de un segundo gen con similitud a acuaporina, al cual hemos denominado TcAQP2. El gen TcAQP2 codifica para una proteína de 276 aminoácidos. Por medio de herramientas de bioinformática se realizó la predicción de la estructura de dicha proteína; posee características que permiten ubicarla dentro de la familia MIP. Se realizó el clonamiento y secuenciación de la TcAQP2, detectándose diez mutaciones silentes. Este hecho sugiere que se trata de mutaciones propias de la cepa de *T. cruzi* CL Brener utilizada en el desarrollo experimental de este trabajo. Posteriormente se realizó el subclonamiento de TcAQP2 en el plásmido de expresión en el modelo de levaduras pYES.2 y se transformó en las células de *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión funcional de la TcAQP2 en dichas células, muestra evidencias de que esta proteína interviene en osmorregulación cuando las células son expuestas a choques hiper-osmóticos e hipo-osmóticos, lo que sugiere la participación de la acuaporina como canal para el transporte de agua y/o glicerol a través de la membrana de las levaduras. Igualmente se sugiere que esta acuaporina es capaz de transportar sustancias tóxicas como AsIII y metilglioxal, sin embargo son necesarios estudios profundos en otros modelos biológicos para confirmar este hecho. Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten concluir que esta proteína, expresada heterológicamente en *S. cerevisiae*, representa un canal de agua y/o glicerol que interviene en procesos de osmorregulación.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, acuaporina, proteínas integrales de membrana, osmorregulación.

Cloning and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the aquaporin 2 of *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2)

SUMMARY

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is prevalent throughout Latin America. During its life cycle, the parasite undergoes extreme fluctuations in osmolarity, consequently physiological systems are required to assure its survival. In many organisms one of the more important systems involved in osmoregulation are aquaporins. These proteins are members of the major intrinsic proteins family (MIP). Aquaporins can be divided in two groups according to its permeability: the first one is only permeable to water (orthodox aquaporins) and the second one is permeable to water, glycerol, and other small, uncharged molecules (aquaglyceroporins). In the *T. cruzi* genome there are 5 genes that encode proteins similar to aquaporins. One of these genes (*Trypanosoma cruzi* aquaporin 1, TcAQP1) has been already characterized as a channel that is only permeable to water. It was also demonstrated that TcAQP1 is involved in parasite osmoregulation. In this work, we started to investigate other gene with aquaporin similarity, which we named *Trypanosoma cruzi* aquaporin 2 (TcAQP2). The gene TcAQP2 encodes a protein of 276 aminoacids. The protein has six putative transmembrane domains and the two signature motifs asparagine-proline-alanine (NPA), which is the classical conserve motif in the MIP family proteins. Cloning and sequencing of the TcAQP2 gene allowed the detection of ten silent mutations in all clones analyzed, as compare to the sequence reported in data bank of the parasite, suggesting that they belong to the CL Brener strain used in this study. In order to analyze the TcAQP2 function, subcloning in the plasmid for heterologous expression in yeast (pYES.2) of this gene was performed. After transformation and functional expression of TcAQP2 in *Saccharomyces cerevisiae*, cells were exposed to osmotic stress. The results indicate that this protein is involved in osmoregulation, and suggest that TcAQP2 participate as a channel for water and/or glycerol in the yeast membrane. Additionally, experimental evidences suggest that this channel can transport toxic substances like AsIII and metilglioxal, however, experiments using other heterologous expression systems is required to confirm this fact. Taken together, we concluded that TcAQP2 expressed in *S. cerevisiae* represents a water and/or glycerol channel that is involved in osmoregulation processes.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, aquaporin, integral membrane proteins, osmoregulation.

* Solicitar copia a: nestor.uzcategui@ucv.ve.

1. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis.

2. Fundación Instituto reestudios Avanzados IDEA.

Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, la cual es una entidad endémica en amplio crecimiento en Latinoamérica. Se estima que la Enfermedad de Chagas afecta entre 8 y 11 millones de personas; estando en riesgo de infección aproximadamente 100 millones de personas y causando 14 mil muertes anuales, por lo que esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública con aparentes pocas posibilidades de solución a corto plazo. En la actualidad no existen drogas ni vacunas efectivas contra *T. cruzi* y el control de su vector esencialmente ha sido ineficiente (1). Las drogas medianamente eficaces que se usan en la actualidad fueron desarrolladas a mediados del siglo pasado y están basadas en un conocimiento empírico, por lo tanto, su modo de acción en la mayoría de los casos es desconocido (2).

La generación de conocimientos que permitan el entendimiento detallado de la bioquímica, fisiología y, en general, de la biología de *T. cruzi* favorecerá la identificación de moléculas esenciales para el parásito, que a su vez, sean diferenciales con su contraparte en el hospedero, permitiendo la identificación de nuevos blancos de drogas. En este sentido, proteínas de membrana resultan de particular interés por su accesibilidad en la célula. Entre estas proteínas figuran las acuaporinas; a pesar de su reciente descubrimiento se ha puesto de manifiesto su importancia en la quimioterapia de varias enfermedades causadas por protozoarios (3), en particular como vía de acceso a drogas (4).

El protozoario patógeno *Trypanosoma cruzi*, debe pasar durante su ciclo de vida por cambios bruscos en la osmolaridad de los medios en donde se desarrolla, ya sea en el intestino del insecto vector como en los fluidos intersticiales del hospedador al cual infecta. Estos cambios abruptos de las condiciones ambientales ameritan sistemas fisiológicos que le permitan a estas células adaptarse y sobrevivir a la nueva situación (5).

Las células de *T. cruzi*, cuando son expuestas a estrés hipo-osmótico, poseen mecanismos que intervienen en osmorregulación; principalmente la liberación de aminoácidos citosólicos, y en menor grado, de otros osmolitos como sodio, potasio, cloruro, inositol, metilamina y fosfatos. Sin embargo, son necesarios mecanismos complementarios para mantener el equilibrio osmótico del parásito, que permitan explicar la eficiencia de la respuesta que estas células muestran a cambios de osmolaridad (5).

Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas proteínas son canales que pueden transportar agua a través de los compartimientos celulares (Acuaporinas ortodoxas) y/o pueden

transportar glicerol y otras moléculas no cargadas (Acuagliceroporinas). A las acuaporinas se les han atribuido distintos roles biológicos de gran importancia, en el humano intervienen en la homeostasis del agua, la secreción lacrimal y de saliva, metabolismo de las grasas y del glicerol, mantenimiento de la transparencia del globo ocular, angiogénesis tumoral, transducción de la señal neuronal, entre otras (3). En los últimos años, han sido objeto de estudio en protozoarios como *Leishmania major* en donde se comportan como canales que permiten el paso de sustancias tóxicas al medio intracelular (6).

T. cruzi posee cinco genes que codifican para proteínas de la familia de las acuaporinas (www.genedb.com). En el año 2004, Rohloff y colaboradores, reportaron la existencia de la primera acuaporina de *T. cruzi* (TcAQP1), un canal exclusivo para agua ubicado en el complejo vacuola contráctil y en el acidocalcisoma del parásito. Cuando las células son expuestas a estrés hipo-osmótico, TcAQP1 interviene en la excreción de agua hacia el medio extracelular.

En el presente artículo de investigación se reporta la identificación, secuenciación y el clonamiento de la acuaporina 2 de *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2), y se describe su expresión funcional en el sistema de *Saccharomyces cerevisiae*.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Trypanosoma cruzi: Se cultivaron epimastigotes de la cepa CL Brener en medio LIT, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y cultivados a 26°C.

Saccharomyces cerevisiae: la cepa BY4742 (Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0) se usó como control. Para estudios de fenotipo se empleó BY4742 con una delección para su acuaporina nativa Fps (Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; YLL043:kanMX4). Ambas cepas se obtuvieron de Euroscarf Frankfurt, Alemania. Estas células se cultivaron a 30°C, regularmente en los medios estándar para levaduras: medio enriquecido YPD (de las iniciales en inglés Yeast Extract, Peptone, Dextrose) y medio de selección CM (Completed Minimal medium) (7).

Clonamiento de TcAQP2

Se aisló ARNm a partir de cultivo de *T. cruzi* en fase logarítmica, utilizando el kit RNAeasy (QIAGEN), posteriormente se obtuvo ADNc a partir del ARNm utilizando la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen); ambas metodologías acorde con las instrucciones de la casa comercial. Para la amplificación del gen TcAQP2 se realizó PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores: sentido ATA TCG ATA TGA CGG AGG AGG TTT TGG y

antisentido TCA TCG ATT TAC GAT CCG TAA AGA TGC, diseñados de acuerdo a la secuencia publicada en www.genedb.com (Tc00.1047053504159.40) y con sitios de restricción para la enzima ClaI. Se clonaron los productos de PCR en el plásmido pGEMT easy (Promega), se transformaron bacterias competentes *E. coli* "Top 10" (Invitrogen) con el constructo obtenido, pGEMT easy/TcAQP2, siguiendo protocolos estándar. Se verificó y confirmó la obtención de clones mediante PCR para amplificación de TcAQP2 en las colonias transformadas y análisis de restricción del constructo aislado de dichas colonias utilizando la enzima Cla I (New England Biolabs). El subclonamiento de TcAQP2 en el vector de expresión en levaduras pYES.2 (Invitrogen) se realizó posterior a la digestión con la enzima EcoRI de ambos el plásmido y el constructo pGEMT easy/TcAQP2. La ligación y transformación se realizaron por métodos estándar (7). Finalmente se verificaron los clones obtenidos mediante PCR y análisis de restricción utilizando la enzima BamHI.

Secuenciación de clones

Se realizó la secuenciación de clones obtenidos a través de electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 3130/3130x (Genetic Analyzer Applied), utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en el cual se emplean terminadores fluorescentes, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se utilizaron para la amplificación de los fragmentos los oligonucleótidos cebadores M13 F y M13 R (Invitrogen), que reconocen secuencias del plásmido presentes en los flancos de TcAQP2; de esta manera se obtuvo la secuencia del clon presente en el constructo pGEMT easy/TcAQP2.

Transformación de levaduras *S. cerevisiae* y expresión de TcAQP2

La transformación de levaduras se realizó siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial del plásmido pYES.2 (Invitrogen), el cual posee un promotor para galactosa. La expresión de TcAQP2 en las células transformantes se realizó adicionando al medio CM-U (sin uracilo) este carbohidrato. La inducción se mantuvo durante toda la noche a 30°C.

Fenotipo de choque hiper-osmótico y de transporte de compuestos tóxicos

Luego de realizar la inducción de la expresión de TcAQP2 en el sistema de levaduras, se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10 de los cultivos. Estas diluciones se sembraron en placas de medio CM-U (selección de levaduras con el constructo) con galactosa (mantenimiento de la inducción) conteniendo: 3% NaCl; 0,8 M de sorbitol; 0,5 mM de AsIII o 1 mM de metilglioxal. Se incubaron por 48 horas a 30°C y se observaron los fenotipos obtenidos.

Fenotipo de choque hipo-osmótico

Con el fin de obtener protoplastos las células transformadas fueron cultivadas hasta su fase logarítmica en presencia de galactosa e incubadas con la enzima litica por 4 horas a 30°C en constante rotación (7). Posteriormente se realizó el choque hipo-osmótico disminuyendo la osmolaridad de la solución en un 50% utilizando agua destilada. El cambio del volumen de los protoplastos se registró inmediatamente después del choque a una longitud de onda de 600 nm durante 90 segundos.

Herramientas de bioinformática

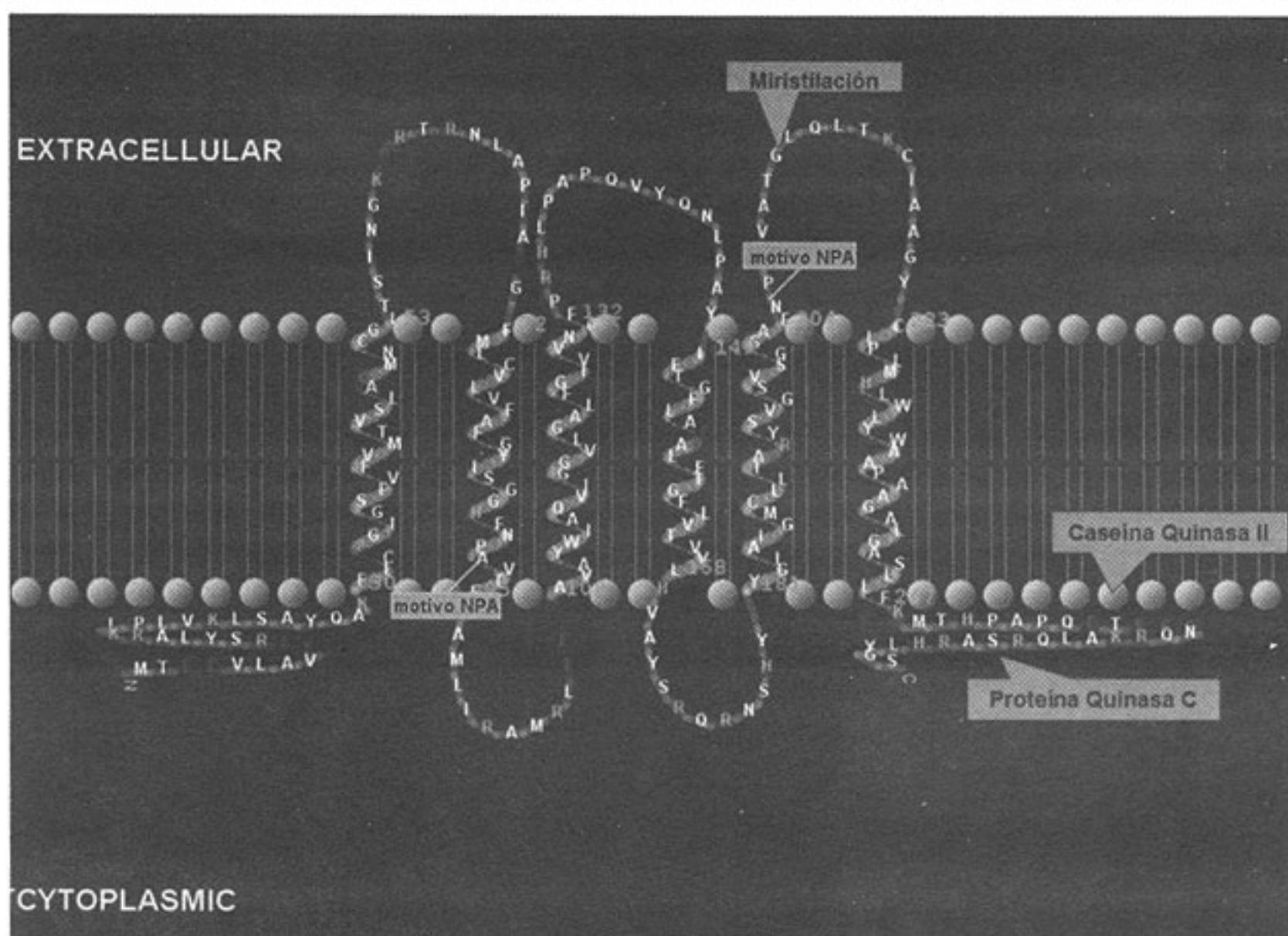
La secuencia del gen se obtuvo del servidor www.genedb.com. La manipulación de la secuencia se realizó con el software DNAMAN. Los dominios Transmembrana se calcularon utilizando el sitio <http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html> y la representación de la proteína en la membrana se obtuvo de <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/> respectivamente. Los sitios putativos de miristilación, caseína quinasa y proteína quinasa C fueron identificados en la dirección electrónica <http://us.expasy.org/prosite>.

Resultados

Análisis de la secuencia de la proteína TcAQP2

Se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *Trypanosoma cruzi* para identificar secuencias que tuviesen suficiente similitud con acuaporinas de otros organismos. Se obtuvo 5 secuencias, una de las cuales esta reportada en la literatura *TcAQP1* y caracterizada como una acuaporina ortodoxa (8) de las restantes se seleccionó la secuencia Tc00.1047053504159.40 (de acuerdo a www.genedb.com) que presenta un número importante de características de la familia MIP, a la cual pertenecen las acu(glicero)porinas, y se le denominó *TcAQP2*. Utilizando herramientas de bioinformática se realizó la predicción de los dominios Transmembrana de la proteína TcAQP2, codificada por este gen, y su representación en dos dimensiones (Figura 1). El gen consta de 831 pb y codifica para una proteína de 276 aminoácidos con extremos C- y N-terminal libres claramente definidos. Como se mencionó anteriormente, la proteína putativa TcAQP2 muestra las características propias de los miembros pertenecientes a la familia de acuaporinas: seis hélices Transmembrana unidas por cinco lazos conectores y las dos secuencias consenso altamente conservadas en esta familia, asparagina-prolina-alanina (NPA). TcAQP2 posee sitios putativos de modificaciones post-transduccionales: miristilación en la posición 210, fosforilación de caseína quinasa II en el triptófano ubicado en la posición 257 y proteína quinasa C en la serina 269 (Figura 1), sitios conocidos que juegan un rol importante en el plegamiento y regulación de la actividad biológica de las proteínas en general.

Figura 1. Predicción de la estructura bidimensional de TcAQP2 utilizando el servidor [http:// bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/](http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/). Predicción de Hélices Transmembranales, Motivos NPA, Sitios de Fosforilación y Miristilación.



Clonamiento de TcAQP2

Se estandarizó el PCR para la amplificación del gen *TcAQP2*. Las condiciones que mostraron los mejores resultados fueron: 200 ng de ADNc, 1 μ M de cebadores y 45°C de temperatura de hibridación (Figura 2A). Posterior a la estandarización se realizó una reacción de ligación con el producto de PCR y el plásmido de clonamiento pGEMT easy (Promega). Se realizó la transformación en células competentes *E. coli* y los clones obtenidos se verificaron por medio de PCR directamente de las colonias transformantes por amplificación del gen *TcAQP2* (Figura 2B). Se obtuvieron tres colonias positivas. Igualmente se verificaron los clones por medio de análisis de restricción utilizando la enzima Cla I, obteniendo el patrón de bandas esperado para las tres colonias que resultaron positivas en el PCR; aproximadamente 831 pb para el gen y 3015 para el plásmido PGMT-easy (Figura 2C).

Secuenciación de clones

Se realizó la secuenciación de los clones, con el fin de conocer la composición de nucleótidos exacta del gen y, adicionalmente, descartar constructos con errores en la secuencia introducidos por la ADN polimerasa utilizada en la técnica de PCR. Luego de analizar tres de los clones obtenidos se observó que las secuencias de los mismos son idénticas, a su vez, presentaron 10 mutaciones únicas puntuales, al compararlas con el gen reportado en la base de datos del parásito. Las mutaciones encontradas fueron: C24G,

T55C, C58T, C96T, G99A, C153T, C161T, C417T, C432T Y C807T (Figura 3). Sin embargo todas estas mutaciones son silentes puesto que la traducción a proteína genera la misma secuencia de aminoácidos tanto para la TcAQP2 clonada como para la reportada en el proyecto genoma.

Subclonamiento de TcAQP2 en el plásmido de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* pYES.2.

Para estudiar la proteína codificada por el gen *TcAQP2* se realizó el subclonamiento de este gen en plásmido de expresión en levaduras pYES.2. Se verificaron los clones mediante amplificación de TcAQP2 por PCR en colonias de bacterias transformadas. La mayoría de los clones evaluados presentaron una banda en el peso molecular que corresponde a *TcAQP2* (Figura 4A). De estos clones positivos se escogieron al azar cinco y se le realizó un análisis de restricción utilizando la enzima BamHI, con lo cual se confirmaron los clones y, además, se verificó a la dirección del gen en el plásmido, para garantizar su expresión. Cuando el gen está en la dirección correcta la digestión con esta enzima genera dos fragmentos, uno de 6401 pb y otro de 130 pb, mientras que en el caso incorrecto los tamaños de los fragmentos son 730 pb y 5700 pb. De los cinco clones se obtuvo uno con un constructor con inserción correcta (Figura 4B), este se utilizó para transformar levaduras y estudiar la función de la proteína en este modelo biológico.

Figura 2. Clonamiento de TcAQP2 A.- Gel de agarosa mostrando amplificación de *TcAQP2* por PCR a partir de ADNc de epimastigotes de *T. cruzi* B.- PCR de colonias para demostrar transformantes con el constructo pGEM-Teasy/TcAQP2. C.- Análisis de restricción (enzima *Cla*I) para la confirmación de los clones portadores del constructo pGEM-Teasy/TcAQP2. M: marcador; 1, 2, 3 y 4 corresponden a cuatro de las colonias que fueron tomadas al azar.

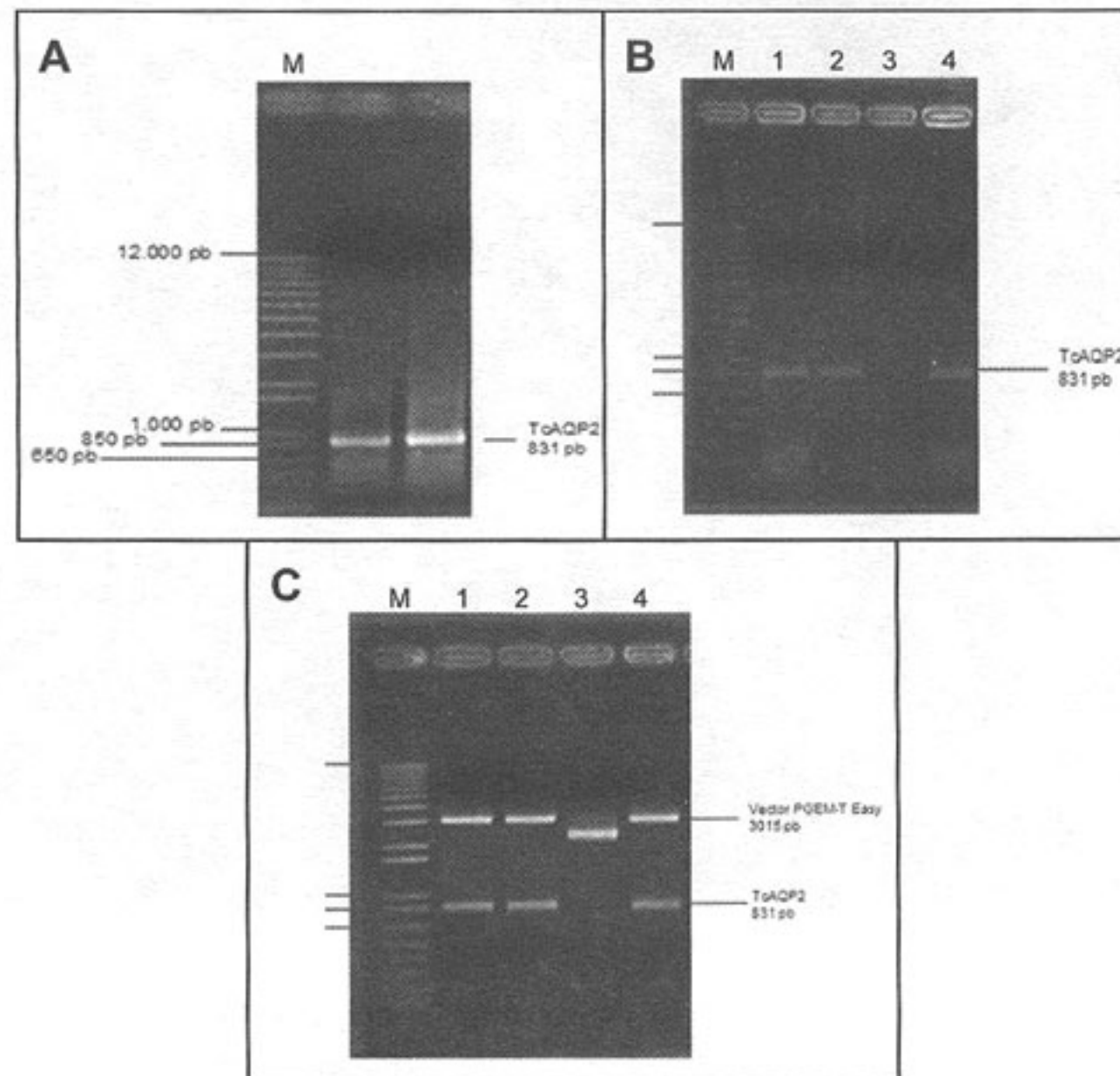


Figura 3. Secuenciación del Gen TcAQP2 clonado, comparación con el gen reportado en el proyecto genoma de *T. cruzi*. Se observaron 10 mutaciones silentes que no cambian la secuencia de la proteína.

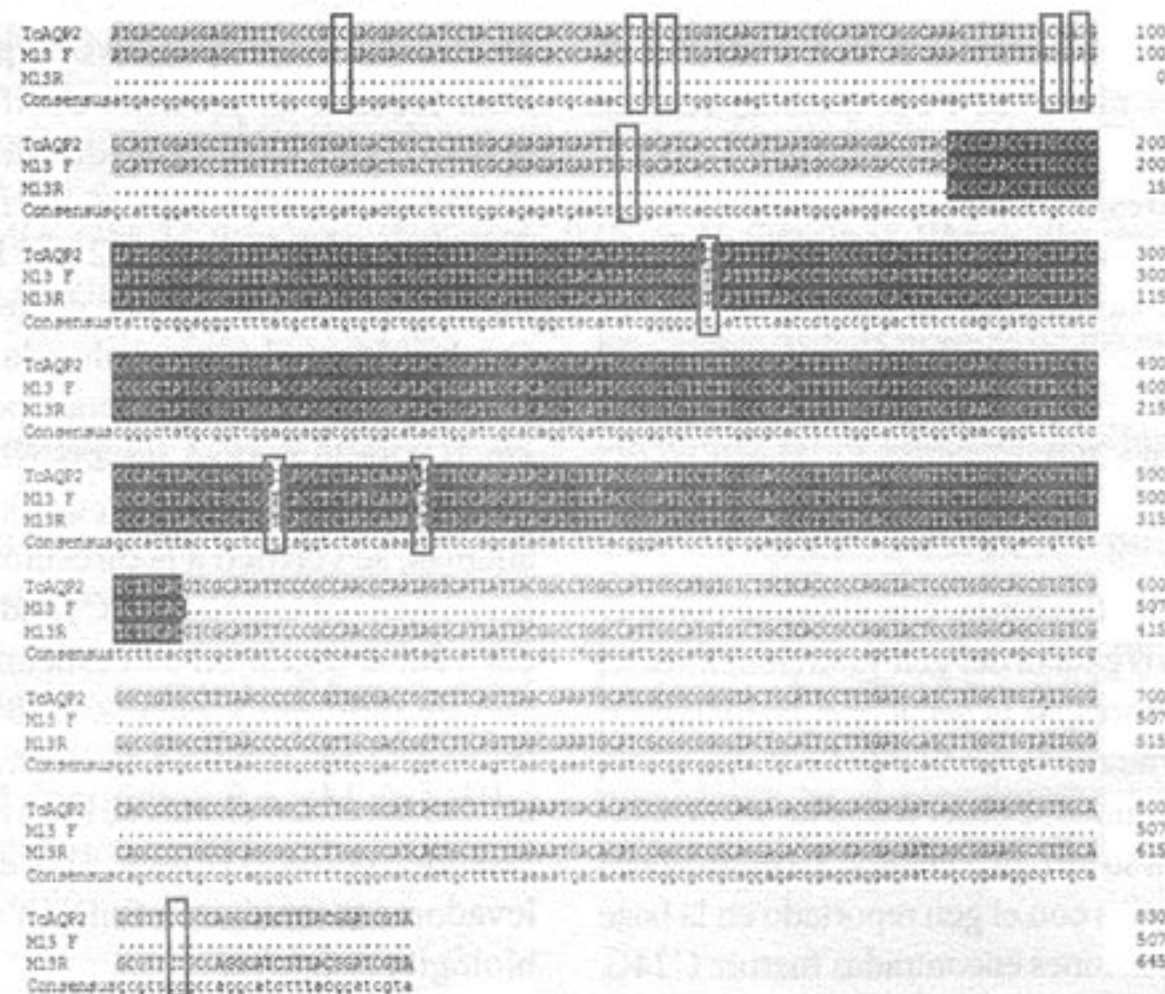
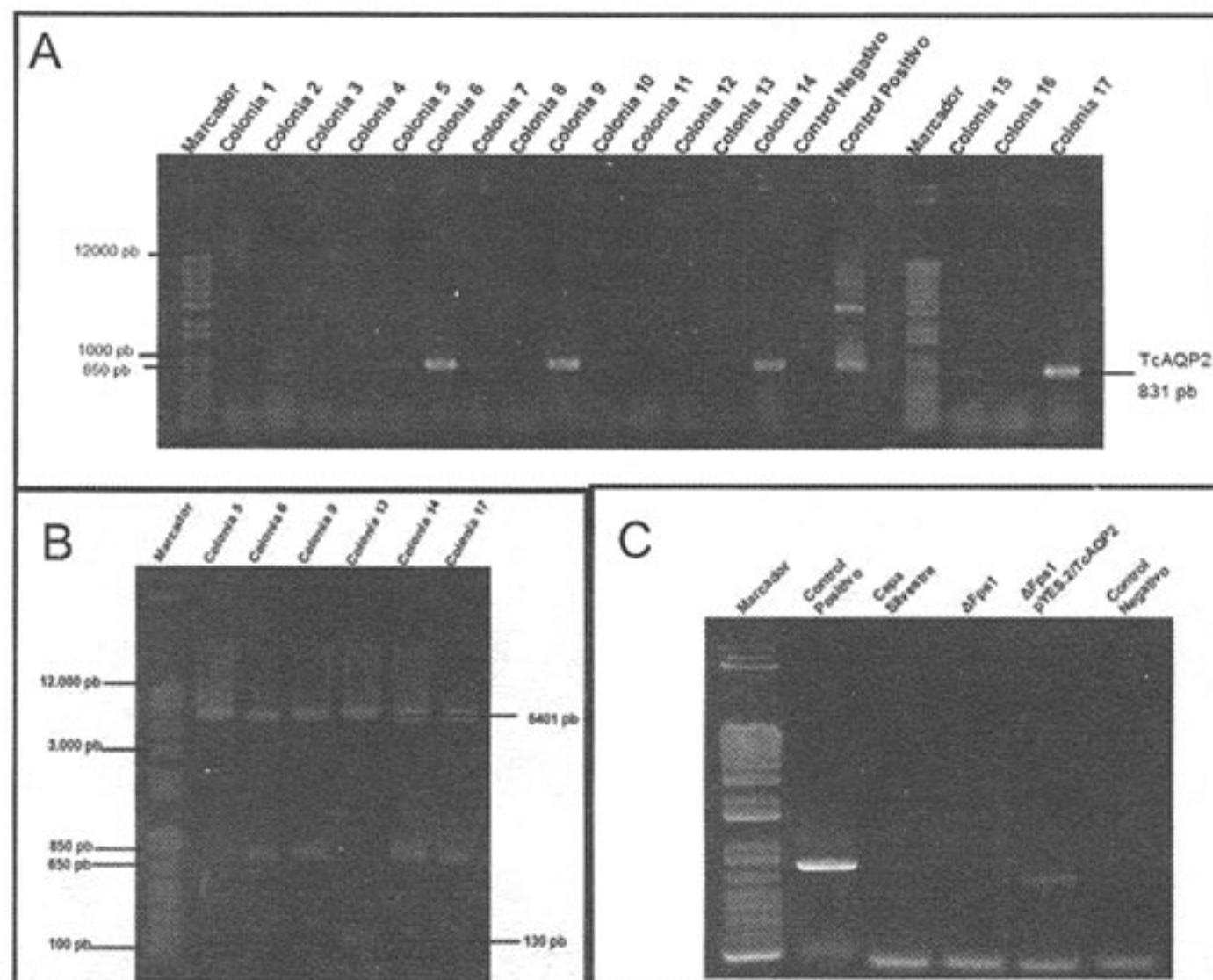


Figura 4. Subclonamiento de TcAQP2 en plásmido de expresión en levaduras pYES.2 A.- PCR de colonias para identificar transformantes. B.- Análisis de restricción (enzima BamHI) para confirmar los clones portadores del constructo PYES.2/TcAQP2 C.- Amplificación de la secuencia de TcAQP2 a partir de ADNc de levaduras transformantes. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles de izquierda a derecha: 1) marcadores de peso molecular, 2 Control positivo, ADN de *T. cruzi*, se observa una banda que corresponde al gen *TcAQP2*. 3y4 Cepa silvestre y mutante Δ Fps1 transformadas con pYES.2, respectivamente, no presentan amplificación. 5 Cepa mutante Δ Fps1 con el constructo pYES.2/TcAQP2, se observa banda que corresponde al gen *TcAQP2*. 6 Control negativo, amplificación sin el uso de algún molde de ADN.



Transformación del constructo pYES.2/TcAQP2 en *Saccharomyces cerevisiae* y evaluación de la expresión del gen *TcAQP2*

Se transformó la cepa silvestre de *S. cerevisiae* con el plásmido pYES.2, como un control, para observar el comportamiento fisiológico de la cepa. Igualmente, la misma cepa pero con una delección de su acuaporina nativa (Δ Fps1) se transformó con el plásmido pYES.2, como un control experimental, para observar el comportamiento de la cepa sin la acuaporina. Finalmente, esta última cepa se transformó con el constructo pYES.2/TcAQP2, con el objeto de evaluar si TcAQP2 es una acuaporina y si interviene en osmoregulación, a través de la comparación con los controles anteriormente señalados. Antes de realizar los experimentos se verificó la expresión del gen *TcAQP2* mediante el aislamiento de ARNm de las levaduras, luego de la inducción de su expresión utilizando galactosa. Se realizó la síntesis del ADNc y posteriormente PCR para el gen de *TcAQP2*. Los resultados muestran la amplificación de TcAQP2 únicamente en la cepa que fue transformada con el constructo pYES.2/TcAQP2 (Figura 4C) lo cual indica que el sistema de expresión heteróloga está funcionando y que los cambios observados en los distintos fenotipos se deben a la expresión de la proteína TcAQP2.

Choque hiper-osmótico

Se realizó el fenotipo en células de levadura induciendo choques hiper-osmóticos. Se cultivaron las levaduras transformadas en medio líquido CM-U, en presencia de galactosa, aproximadamente 16 horas, luego de lo cual se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de agar CM-U galactosa, en presencia (condición experimental) y ausencia (condición control) de diferentes osmolitos.

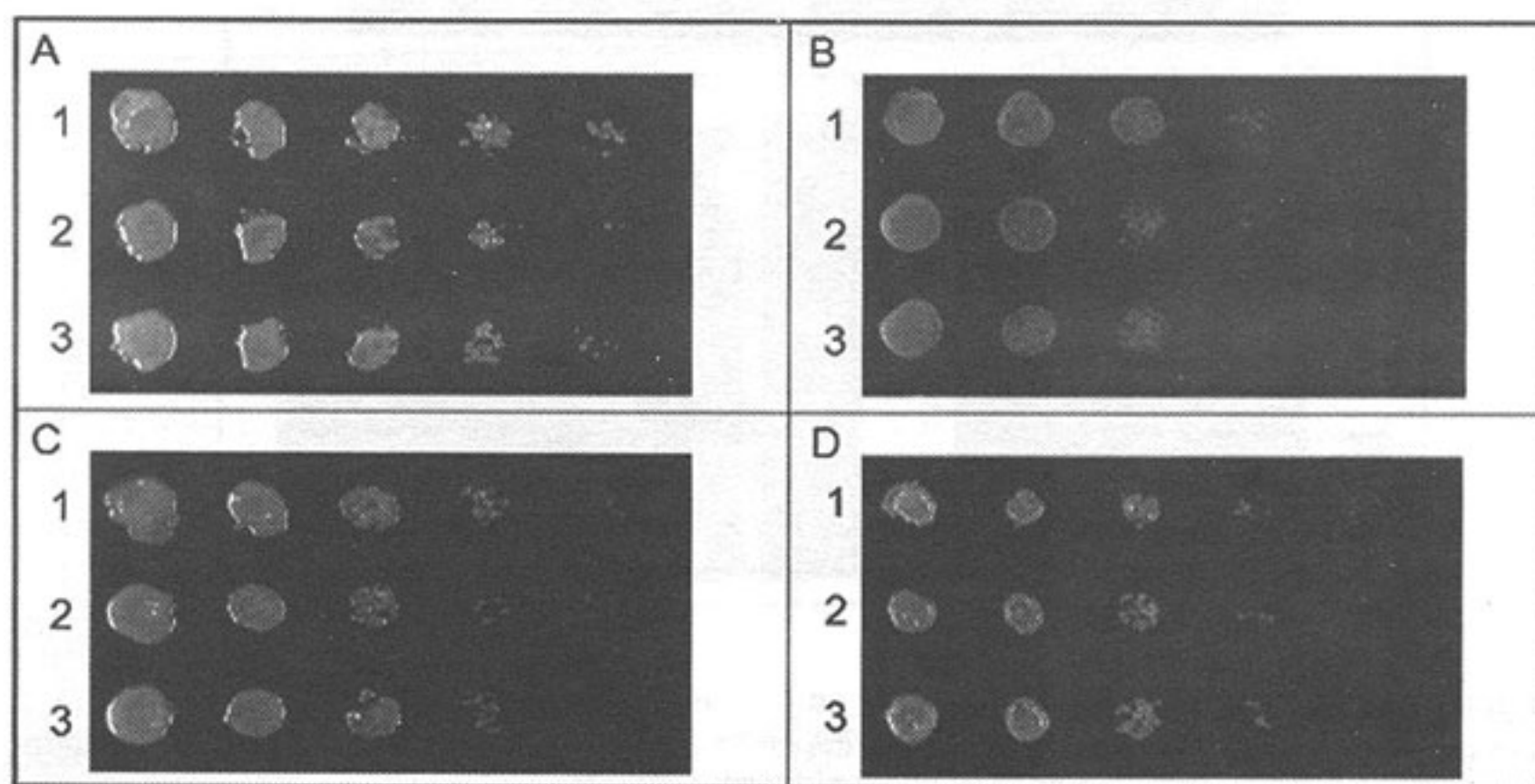
Saccharomyces cerevisiae, posee una acuagliceroporina, Fps1, que está involucrada en osmoregulación a través del transporte de glicerol. En condiciones de hiperosmolaridad, las levaduras evitan la pérdida de agua acumulando glicerol en el medio intracelular para aumentar la osmolaridad interna y compensar el estrés hiperosmótico. Se postula que dicha acumulación ocurre por la activación de enzimas que intervienen en la biosíntesis de glicerol, por la estimulación de la vía glicolítica y finalmente cerrando el canal de glicerol Fps1, para evitar el escape de este compuesto hacia el medio extracelular (9).

Bajo condiciones control, iso-osmótica, en medio CM-U con galactosa, todas las células crecen sin dificultades. Cuando

las células se sometieron a choque hiper-osmótico con NaCl 3%, la cepa silvestre control, creció sin inconvenientes en el medio, ya que como se describió anteriormente, el canal Fsp1 se cierra y evita la salida de glicerol permitiendo así el crecimiento de la célula (9). La cepa mutante Δ Fsp1 no posee su acuagliceroporina, y por lo tanto, el glicerol no podrá salir de la célula, en consecuencia, las levaduras crecen normalmente en el medio. En el caso de las células transformantes mutantes Δ Fsp1 que expresan la TcAQP2, se espera que ésta, siendo un canal para agua/glicerol, se encuentre constitutivamente en su estado abierto, debido a que es una expresión heteróloga y la levadura no presenta los mecanismos necesarios para controlar

un canal proveniente de otro organismo (10). En consecuencia levaduras expresando un canal de este tipo deben presentar alguna dificultad para crecer en condiciones hiper-osmóticas. De hecho, en la Figura 5A se observa, que las células transformantes mutantes Δ Fsp1 que expresan la TcAQP2 muestran claramente una tasa de crecimiento ligeramente menor a las mutantes Δ Fsp1 que no la expresan (Figura 5A, líneas 2 y 3), el mismo fenotipo se reprodujo usando sorbitol como osmolito (resultados no mostrados). Ello nos sugiere que TcAQP2 es un canal que interviene en el transporte de agua y/o glicerol, y que además, su función esta relacionada con osmorregulación.

Figura 5.- Fenotipo de células mutantes Δ Fsp1 expresando TcAQP2. A: Condición control sin estrés osmótico o tóxico (Medio CM-U con galactosa). B: Choque hiperosmótico con NaCl 3%. C: En presencia de Metilglioxal 1 mM. D: En presencia de AsIII 0,5 mM. Línea 1, cepa silvestre control (Transformada con pYES.2). Línea 2, cepa mutante Δ Fsp1 (Transformada con pYES.2). Línea 3 cepa mutante Δ Fsp1 (Transformada con pYES.2/TcAQP2).



Transporte de compuestos tóxicos por TcAQP2

El Arsénico (As) y el Antimonio (Sb) son compuestos tóxicos que han sido la base química de quimioterapéuticos contra Trypanosomatídeos durante años (6). El tratamiento de la Enfermedad del Sueño se basa en un compuesto de arsénico orgánico y en el caso de la Leishmaniasis, se utilizan drogas que contienen antimonio. Resulta interesante que algunas acuagliceroporinas son capaces de transportar SbIII y AsIII, un ejemplo de ellas lo constituye la acuagliceroporina 1 de *Leishmania major* (LmAQP1) (4). Adicionalmente, LmAQP1 posee una alta permeabilidad al metilglioxal (6). Por esta razón AsIII y metilglioxal fueron incluidos en el análisis del fenotipo de TcAQP2, con la finalidad de contribuir con la definición del patrón de permeabilidad de esta proteína y mostrar la importancia farmacológica de las acuaporinas como vía de acceso a drogas.

En general a ciertas concentraciones, el AsIII y el metilglioxal son compuestos tóxicos para todas las células, por lo tanto si

se transportan al interior de las mismas, en este caso al interior de las levaduras, se esperaría un crecimiento disminuido en el medio conteniendo estos compuestos. Como se puede observar en la Figura 5 (Parte C y D), las células mutantes Δ Fsp1 expresando la TcAQP2 presentan diferencias menores en su crecimiento con respecto a la mutante Δ Fsp1 con el plásmido pYES.2 solo. Este resultado sugiere que esta proteína podría ser capaz de transportar compuestos tóxicos hacia el interior celular, sin embargo este hecho debe ser confirmado utilizando otros sistemas de expresión.

Choque hipo-osmótico

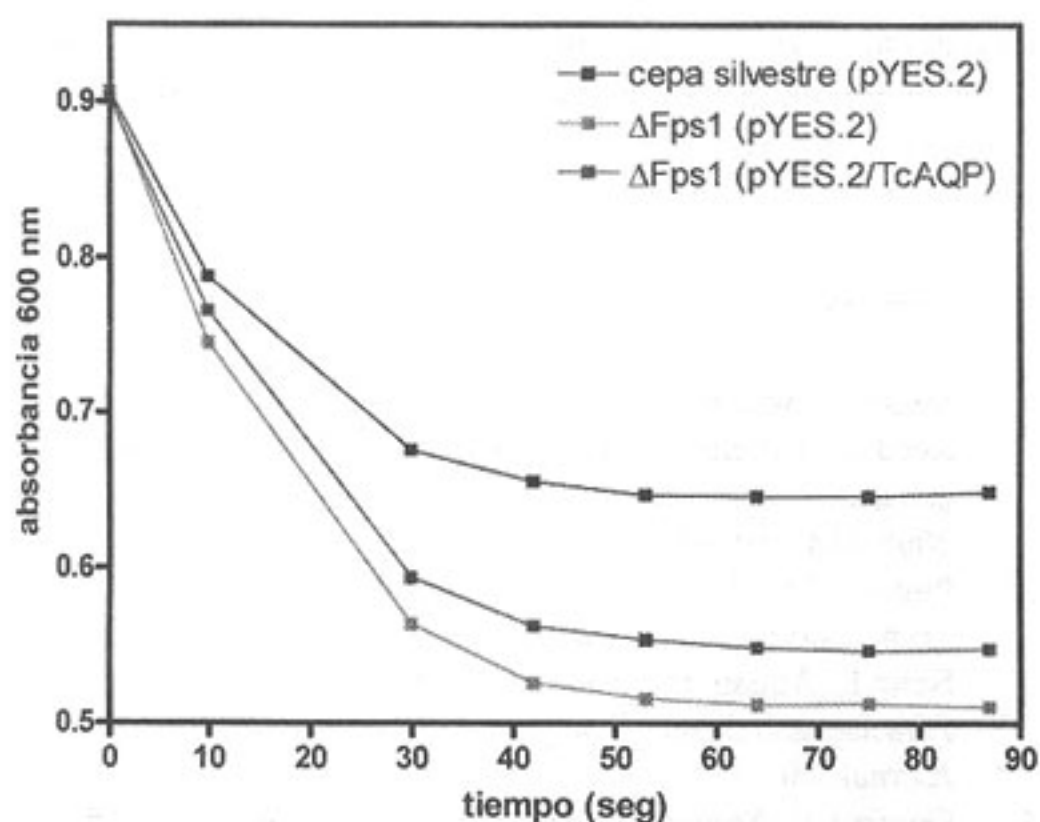
Con el objeto de definir aún más si TcAQP2 está involucrada en osmoregulación, se realizaron experimentos de choque hipo-osmótico. Las células transformadas y tratadas con litocasa (para eliminar su pared celular), fueron expuestas a choque hipo-osmótico. El estrés osmótico se provocó al disminuir la osmolaridad de la solución donde se encontraban los

protoplastos de 1 M a 0,5 M de Sorbitol, esto trae como consecuencia el transporte de agua hacia el interior de los protoplastos causando un incremento de volumen de los mismos. El registro del aumento de volumen fue monitoreado a 600 nm durante 90 segundos y se evidenció por un descenso en la densidad óptica medida. El valor inicial de la densidad óptica fue ajustado a 0,9 para todos los transformantes.

Cuando las levaduras son expuestas a estrés hiposmótico en primer lugar ocurre entrada de agua hacia el medio intracelular, y luego se activa el mecanismo de osmorregulación por medio de la Fps1, a través de la cual se transporta glicerol hacia el medio extracelular para compensar de esta manera la osmolaridad (11).

La cepa mutante DFps1 no posee el mecanismo de la acuagliceroporina para compensar el choque hiposmótico, por lo que el descenso de la densidad óptica es mucho mayor que en el caso de la cepa silvestre (Figura 6). La presencia de la TcAQP2 en la cepa mutante DFps1 permite responder más favorablemente al choque hipo-osmótico controlando el incremento del volumen de estos protoplastos, esto se evidencia en la Figura 6 en donde se observa que el descenso de la densidad óptica de la cepa mutante DFps1 que expresa la TcAQP2 es menor al descenso de la cepa mutante DFps1, complementando parcialmente la función de la acuagliceroporina Fps1 ausente en la levadura. Este resultado corrobora los experimentos de choque hiper-osmótico e indica que la TcAQP2 interviene en el mecanismo de osmorregulación en el sistema de *Saccharomyces cerevisiae* a través del transporte de agua y/o glicerol.

Figura 6. Respuesta a estrés hiposmótico de protoplastos de *S. cerevisiae*. El experimento representa uno de tres experimentos que mostraron la misma tendencia y se realizaron como descrito en materiales y métodos.



Discusión

En el genoma de *T. cruzi* existen cinco genes con similitud a secuencias de la familia MIP. Hasta la fecha sólo se ha expresado funcionalmente y estudiado la acuaporina 1 de *T. cruzi* (5,8). TcAQP1 es una acuaporina ortodoxa con baja permeabilidad al agua que, sin embargo, tiene un rol fundamental en la osmorregulación del parásito. *T. cruzi* cuenta con 4 genes más que codifican para acuaporinas putativas y que no han sido estudiados, por lo que resulta de gran interés definir la función e importancia farmacológica de estas proteínas en el parásito. En el presente trabajo de investigación se inició la caracterización de la TcAQP2, a través de su clonamiento y expresión funcional en el modelo de *S. cerevisiae*, con el objeto de definir si esta proteína es una acu(glicero)porina y si ésta participa en procesos de osmorregulación.

El gen *TcAQP2* codifica para una proteína con características que permiten ubicarla dentro de la familia de las acuaporinas. Además posee sitios putativos para fosforilación de tipo Caseína quinasa II y Proteína quinasa C, los cuales podrían estar involucrados en la regulación de la función de esta proteína (12,13). Adicionalmente, posee un sitio putativo para miristilación, el cual podría tener un importante rol en la estabilidad de la proteína en la bicapa lipídica.

El gen que codifica para TcAQP2 se clonó y se secuenció. Se evaluaron tres de los clones obtenidos, todos presentaron la misma composición nucleotídica. Al comparar la secuencia obtenida con la reportada en el genoma de *T. cruzi* se observaron diez mutaciones puntuales en la secuencia, de carácter silente que no cambian la composición de los aminoácidos de la TcAQP2 con respecto a la secuencia que está reportada en el genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org). Debido a que las mutaciones detectadas se encuentran en todos los clones secuenciados se descarta la posibilidad de errores producidos por la enzima polimerasa utilizada, se trata de mutaciones propias de la cepa de *T. cruzi* CL Brener que se utilizó en el desarrollo experimental de este trabajo.

La TcAQP2 fue expresada funcionalmente en mutantes DFps1 de *S. cerevisiae*. La evidencia experimental que soporta este hecho se basa en la demostración de: A) la expresión específica de su ARN mensajero, observada a través de la amplificación por PCR con cebadores específicos B) la expresión de la proteína codificada por *TcAQP2*, comprobada indirectamente por los estudios fenotípicos.

Las acuaporinas son proteínas de membrana que intervienen en un sin número de funciones, entre las que se cuentan, migración celular; hAQP3 (14), LmAQP1 (6), también como sillar estructural; hAQP0, en el metabolismo del glicerol;

hAQP3 y hAQP7. Sin embargo, la función más estudiada de estas proteínas de membrana y la que refleja mejor su vínculo con sus propiedades de permeabilidad es la participación en osmoregulación y en el mantenimiento de la estructura celular. Por tal motivo se inició el estudio de la función de TcAQP2 a través de experimentos que pudieran evidenciar la participación de la misma en estos procesos. Las levaduras que se encuentran expresando la TcAQP2 mostraron un fenotipo tanto en condiciones hiper-osmóticas como hipo-osmóticas. En condiciones hiper-osmóticas, aunque tenue, el crecimiento de estas levaduras fue afectado, lo cual representa un fenotipo característico de las acuaporinas heterológamente expresadas, en razón de que ellas no son reguladas por las levaduras y se presentan como canales activos constitutivamente abiertos; lo cual se traduce en una incapacidad para regular su homeostasis interna (9,10). En condiciones hipo-osmóticas *S. cerevisiae* presenta varios mecanismos que permiten la adaptación de las células al medio en el que se encuentran (11). La entrada de agua hacia el medio intracelular activa el mecanismo de osmorregulación; uno de los primeros eventos es la apertura de Fps1, lo cual permite la liberación de glicerol hacia el medio extracelular para compensar de esta manera la osmolaridad y, por tanto, mantener el tamaño y forma celular (11). La cepa que no posee su acuagliceroporina (mutante Δ Fps1), muestra una respuesta disminuida ante un choque hipo-osmótico. La evidencia experimental obtenida en este estudio corrobora tal afirmación. Por otra parte, la presencia de la TcAQP2 en esta cepa permite la recuperación parcial del volumen celular, lo cual se evidenció por una menor disminución de la densidad óptica respecto a la cepa mutante Δ Fps1, aproximándose más al comportamiento de la cepa silvestre. En conjunto estos resultados demuestran la colaboración de TcAQP2 en los eventos de osmorregulación, mediante su participación en el paso de glicerol y/o agua a través de la membrana de la levadura. Para complementar este estudio, se requiere caracterizar la permeabilidad de la proteína a dichas sustancias a través de la cuantificación directa del transporte de estos solutos.

Las acuagliceroporinas son proteínas que intervienen en el transporte de drogas al interior celular. LmAQP1 representa la vía de acceso a SbIII, el compuesto activo de la droga glucantime, una de las principales líneas quimioterapéuticas en contra de la leishmaniasis (4), a su vez se ha demostrado que la regulación de la expresión de este canal en cepas silvestres implica la aparición de resistencia en estos parásitos (6). Asimismo se ha demostrado que las acuagliceroporinas de *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium* son posibles blancos de drogas, ya que representan vías de acceso a sustancias tóxicas para estos parásitos (10,15).

Para evidenciar la capacidad de transporte de compuestos tóxicos por parte de TcAQP2 se realizaron estudios de

citotoxicidad de AsIII y metilglioxal en levaduras expresando TcAQP2, con ello se intenta aportar más evidencias de que esta proteína es una acuagliceroporina, y a su vez mostrar la importancia de la misma como vía de ingreso a drogas. Estos compuestos son transportados por algunas acuaporinas de protozoarios; la LmAQP1 tiene una alta permeabilidad al AsIII y metilglioxal, hecho que explica la sensibilidad de *L. major* a estos compuestos (6). Igualmente la acuaporina de *P. falciparum* (PfAQP) es capaz de transportar metilglioxal al interior de la célula, lo que afecta la proliferación del parásito en el glóbulo rojo (15). Las acuaporinas involucradas en el transporte de estos solutos son acuagliceroporinas; la similitud de la estructura espacial de AsIII y metilglioxal con el glicerol, favorecen su paso al interior de la célula. El fenotipo de citotoxicidad obtenido para la TcAQP2, aunque tenue, sugiere que estos compuestos se transportan a través de este canal, ya que se observan diferencias en el crecimiento de las células que expresan TcAQP2 comparadas con las células control, cuando son expuestas a estas sustancias tóxicas. Sin embargo, se requieren estudios de permeabilidad para confirmar el transporte de AsIII y metilglioxal. Los fenotipos tanto de osmoregulación como de transporte de sustancias tóxicas, aunque evidentes, resultaron ser débiles, es posible que esta proteína, como ya fue reportado para TcAQP1 (8) sea un canal de baja permeabilidad a sus sustratos, sin embargo, no por ello menos importante para la fisiología del parásito (5). No se puede descartar que la proteína de *T. cruzi* expresada en este sistema heterólogo pudiera modificar su actividad como canal. En la actualidad se están desarrollando experimentos con otros sistemas de expresión heteróloga y homóloga para definir con precisión la conductancia de estos canales para sus distintos sustratos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto de grupo PG 09.00.7059.2007 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) y el presupuesto ordinario de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) (POA-2008).

Referencias

1. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler R, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118:1301-1310.
2. Pinto J. The Treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis) *Annals of Internal Medicine*. 2006;144:10.
3. Beitz E: Aquaporin Water and Solute Channels from Malaria Parasites and Other Pathogenic Protozoa. *Medicinal Chemistry Journal*. 20
4. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S,

- Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279: 3010-3017.
5. Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279: 52270-52281.
6. Figarella K, Uzcátegui N, Yao Z, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R. Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Molecular Microbiology*. 2007; 65: 1006-1017.
7. Ausbel F, Brent R, Kinston R, Moore D, Seidman J, Struhl K. *Saccharomyces cerevisiae*. Current Protocols in Molecular Biology 2000. Jhon Wiley and Sons, Inc.
8. Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A Functional Aquaporin Co-Localizes with the Vacuolar Proton Pyrophosphatase to Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279:38673-38682.
9. Pettersson N, Hagstrom J, Bill R, Hohmann S. Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 2006; 50:247-255.
10. Uzcátegui N, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, Palmada M, Figarella K, Boehmer C, Lang F, Beitz E, Duszenko M. Cloning, Heterologous Expression and Characterization of three Aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279:42669-42676.
11. Hohmann S. Osmotic stress signaling and Osmoadaptation in yeasts. *Microbiology Molecular Biology*. 2002; 66: 300-372.
12. Yuan G, Hsien-yu W. Casein Kinase 2 Is Activated and Essential for Wnt/ β -Catenin Signaling. *The Journal of Biological chemistry*, 2006; 281: 18394-18400.
13. Mellor H, Parker P. The extended protein kinase C superfamily. *The Journal of Biological chemistry*. 1998; 332: 281-292.
14. Papadopoulos M, Saadoun S, Verkman . Aquaporins and cell migration. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2007; 456:693-700
15. Pavlovic-Djuranovic S, Kun J, Schultz J, Beitz E. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the Plasmodium aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1758: 1012-1017.