

Estudio de la función y localización de acuaporinas AQPX de *Trypanosoma cruzi*

Ramoa U L^{1,2}, Vitali V^{1,2}, Tinaglini R^{3,4}, Bredeston L², Robello C^{3,4}, Alleva K^{1,2*}, Chiribao M L^{4,5*}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Fisiomatemática, Cátedra de Física, Buenos Aires, Argentina. ²Universidad de Buenos Aires-CONICET, Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas “Prof. Alejandro C. Paladini”, Buenos Aires, Argentina. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴Laboratorio de Interacciones Hospedera Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

*Estos dos autores contribuyeron por igual

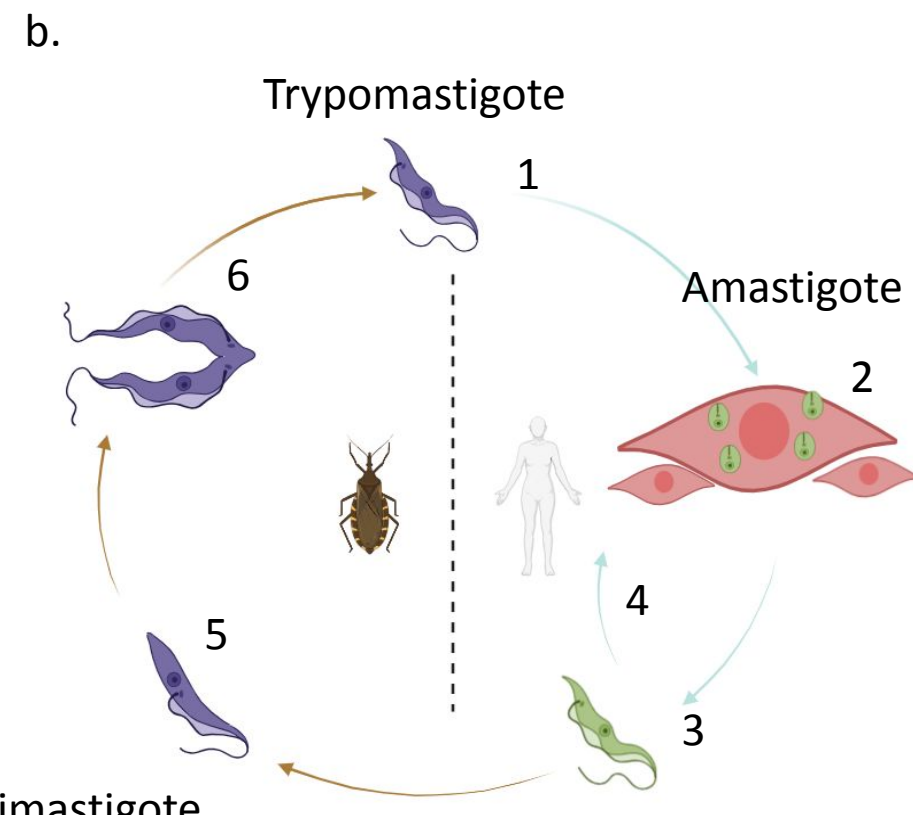
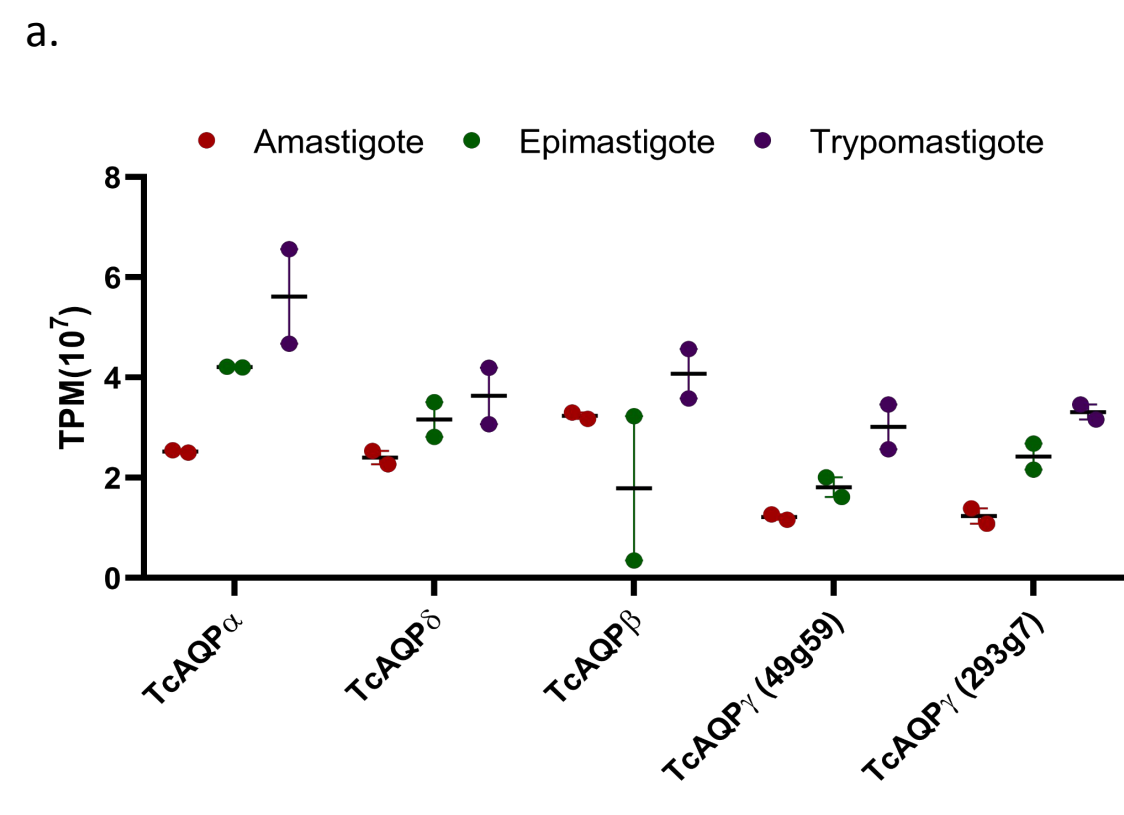
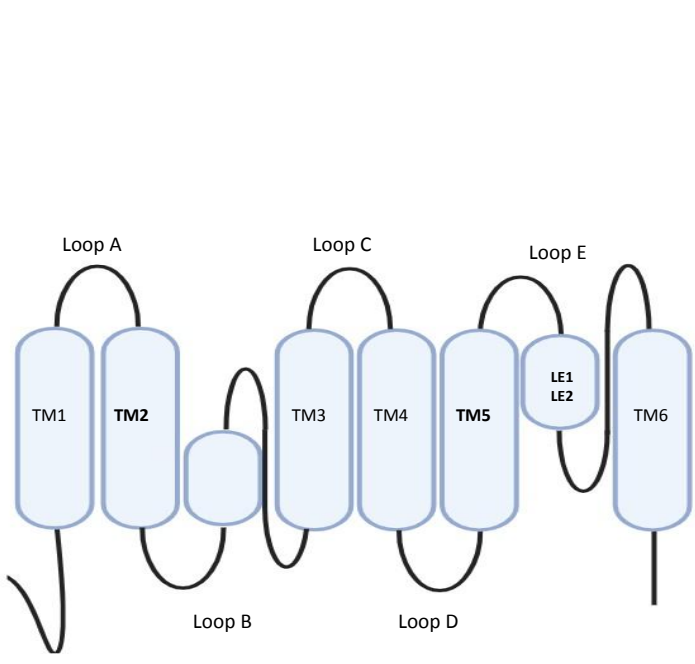
PICT2019-2019-00387, PICT2021-I-A-00040, PIP-11220210100099CO

Por consultas: uramoa@docente.ffyb.uba.ar

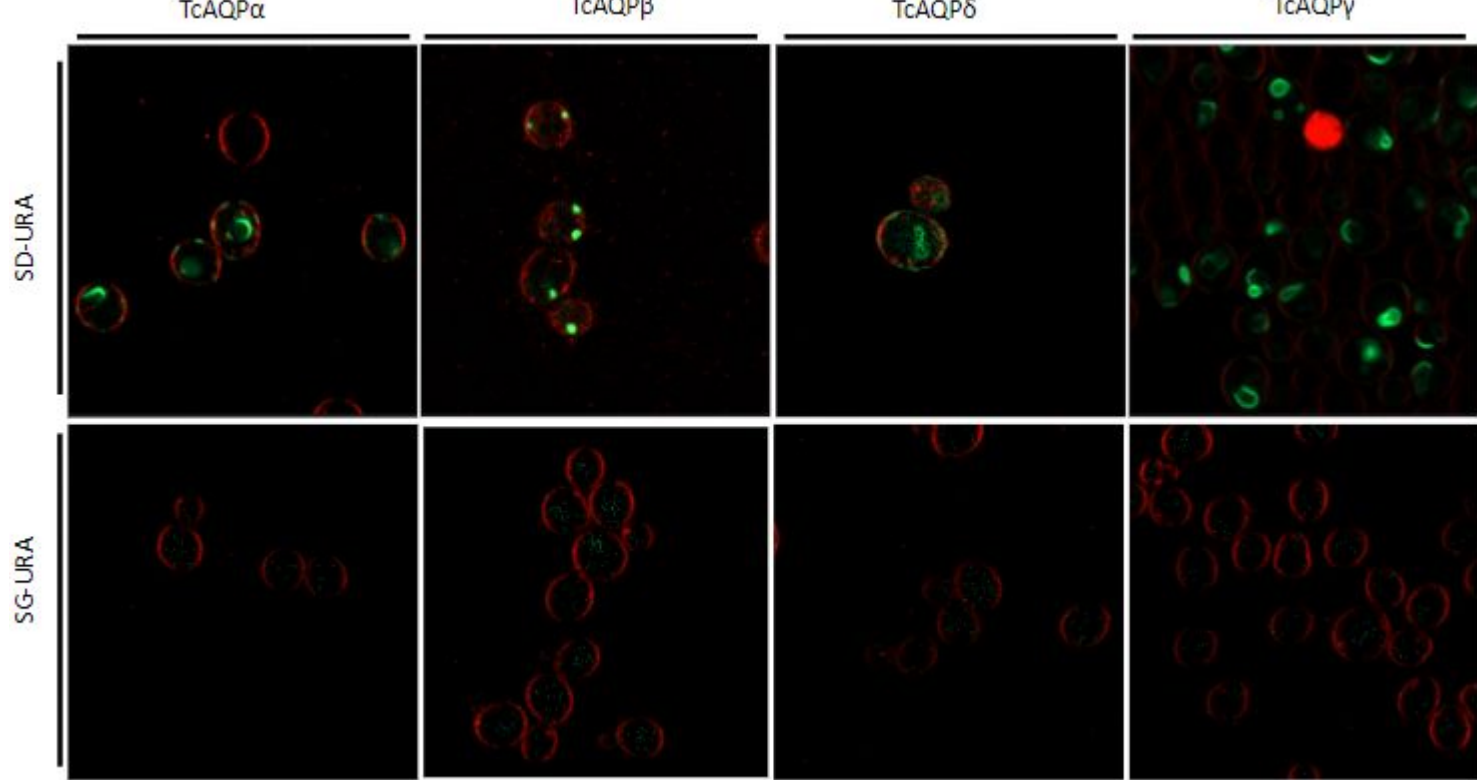
Relevancia de las acuaporinas de *Trypanosoma cruzi* - Subfamilia AQPX

Las acuaporinas de *T. cruzi* pertenecen a la subfamilia AQPX de canales MIP (*mayor intrinsic proteins*). Se encuentran solo en organismos unicelulares como bacterias y parásitos kinetoplastidos. Existen diferencias entre esta subfamilia y otros grupos de acuaporinas: no conservan el principal filtro de selectividad y su perfil de permeación es desconocido. Análisis computacionales de las AQPX, sugieren que sus poros conductores serían más amplios y menos restrictivos, permitiendo el transporte de moléculas pequeñas, H₂O, H₂O₂ como también moléculas más grandes y cargadas. En este contexto, surge el interrogante de si las AQPX en *Trypanosoma cruzi* pueden ser parte central de las respuestas redox de estos parásitos.

Filtro de selectividad				
<i>T. cruzi</i> AQPX	TM2	TM5	LE1	LE2
TcAQPα	I	S	G	V
TcAQPβ	I	S	G	A
TcAQPγ	V	G	G	V
TcAQPδ	E	R	G	V
Otras MIPs ya estudiadas				
PIPs (AQPs clásicas)	F	H	T	R
TIPs/AQP (Acuaamonioporinas)	H	I	A/G	R
AQPs de bacterias (Acuaporinas no ortodoxa)	F	H	T/X	R
GLPs de bacterias (GLPs)	W	G	F/Y/P	R



Expresión de TcAQPX en dos sistemas heterólogos

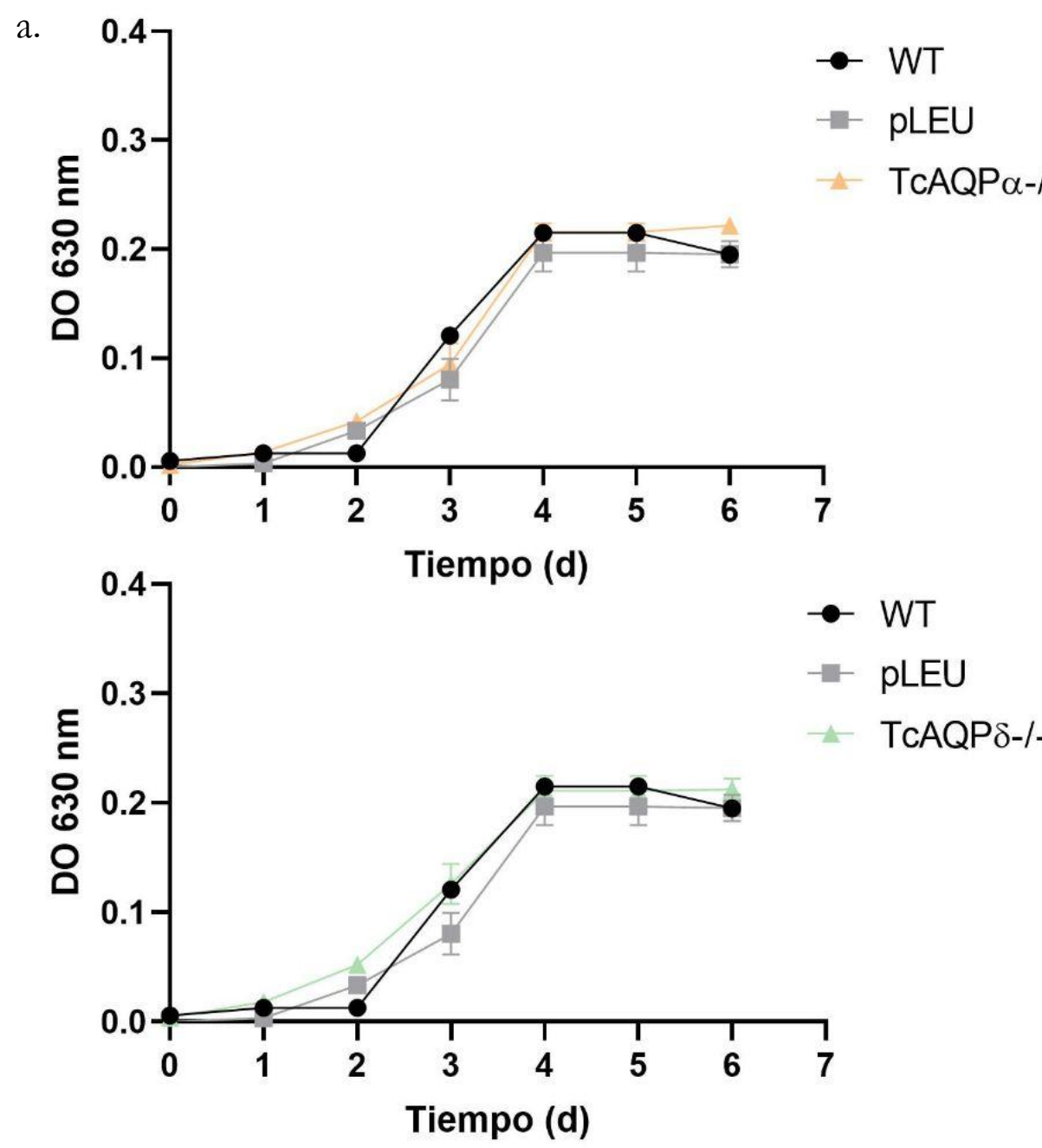
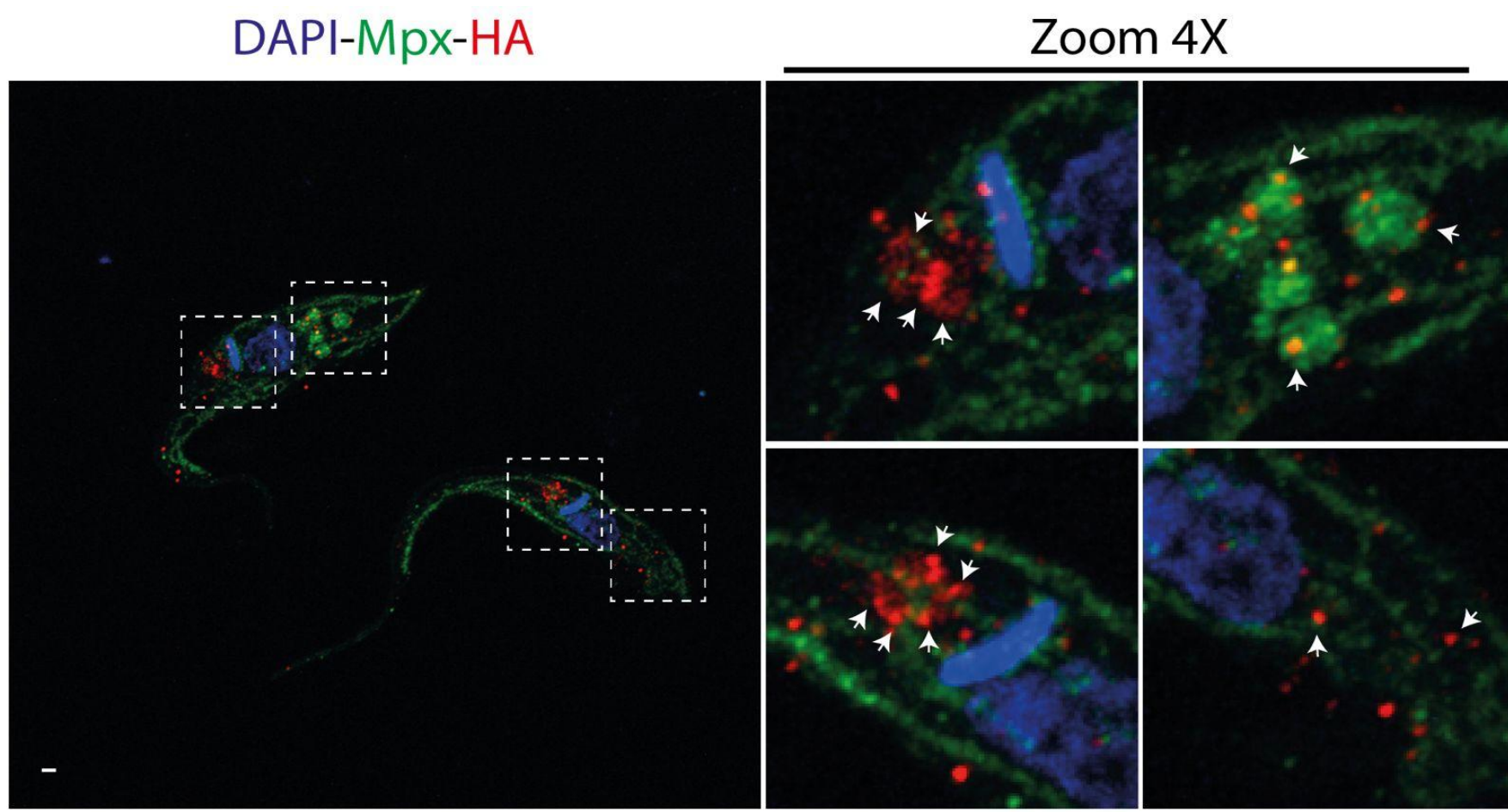
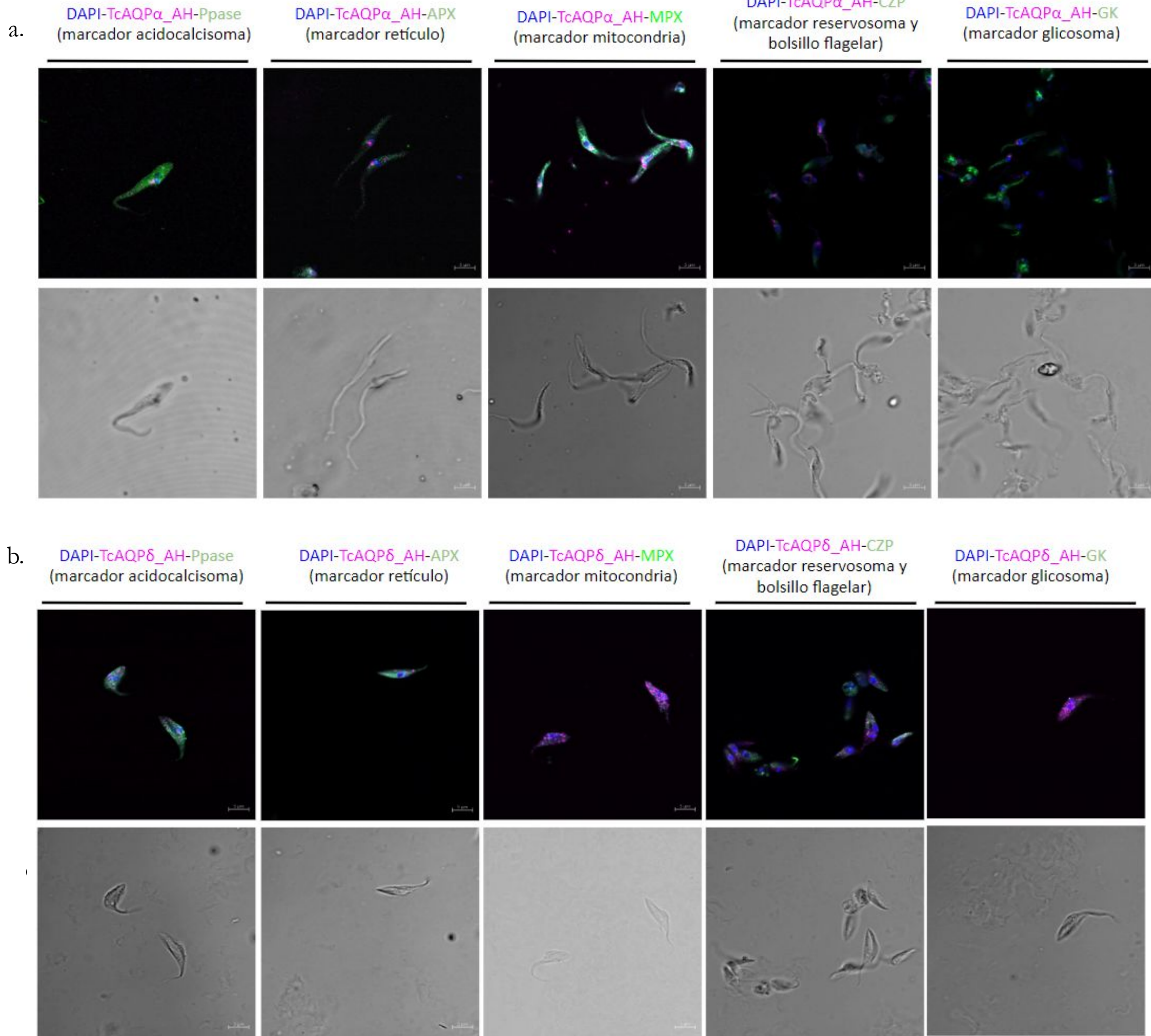
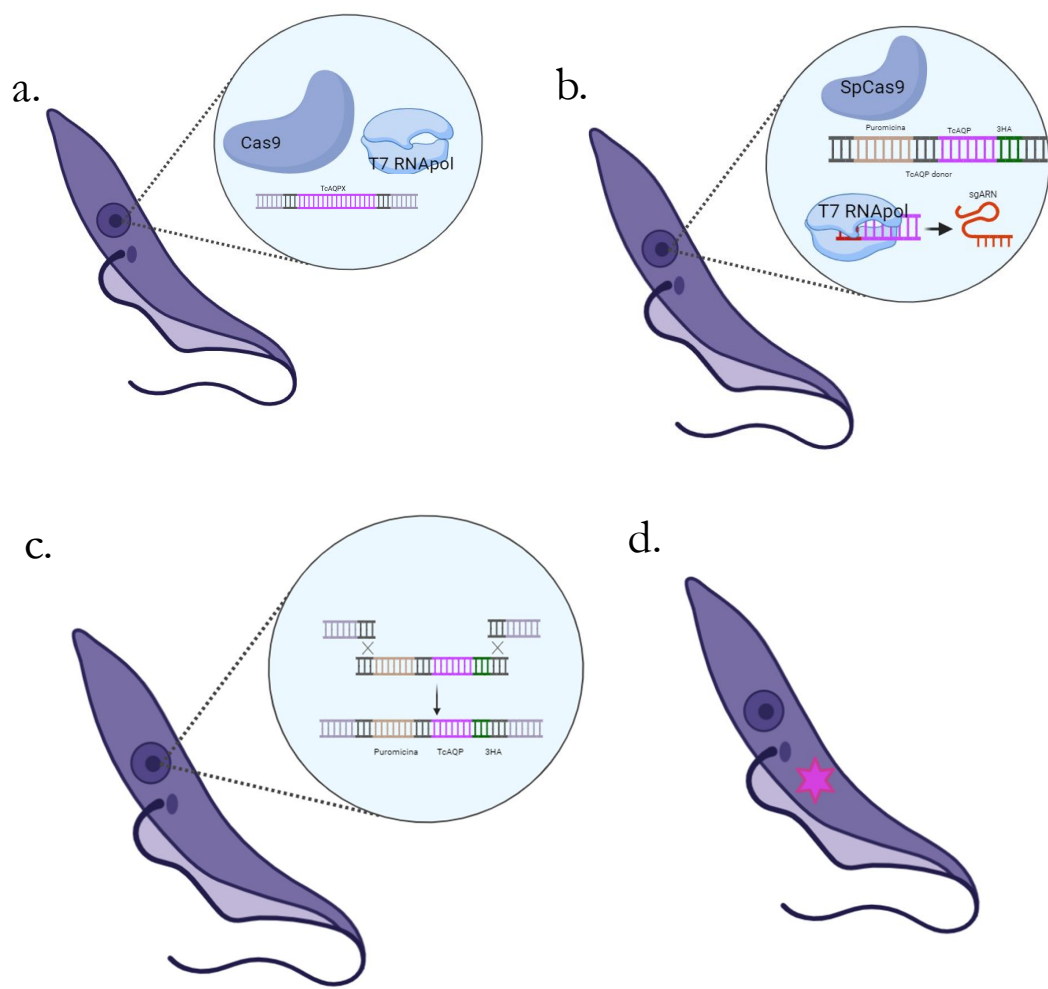


La cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan TcAQPα, β, γ y δ muestran un patrón de localización intracelular. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con células vivas (OD: 0.5), FM-64 (0.16 mM, rojo) fue empleado como marcador de la membrana plasmática. Los clones cultivados en condiciones estándar de crecimiento (T*: 29 °C; buffer YPD 0.1% glucosa, 2% galactosa para la inducción).

La viabilidad de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan TcAQPα, β, γ y δ en el ensayo funcional bajo estrés de H₂O₂ no se ve afectada. Los 4 genes TcAQPX y un control positivo (MtPIP2;3) fueron clonados en un vector de expresión que contiene una secuencia de etiqueta GFP-octa-His en el extremo C-terminal y el marcador de selección URA. Se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* FGY217. Los clones cultivados en condiciones estándar de crecimiento (T*: 29 °C; YPD 0.1% glucosa, 2% galactosa para la inducción) fueron colocados en placas con medio de cultivo SD-URA (control sin inducción) o placas SG-URA (que permite la expresión de la proteína) con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 0.2, 0.6, 1.2 μM de H₂O₂). Se evalúa el crecimiento 6 días después de la siembra comparando el crecimiento de las colonias.

No fue posible medir la permeabilidad osmótica en oocitos que expresan TcAQPα, β, γ y δ. La permeabilidad osmótica al agua (P_i) de membrana de oocitos inyectados con ARNc de TcAQPα, β, γ, δ y un control (MtPIP2;3 acuaporina de la subfamilia PIP de *Medicago truncatula*) se determinó midiendo la variación de volumen del oocito de *Xenopus laevis* en respuesta a una dilución 1/5 del buffer con agua destilada. Los cambios en el volumen fueron monitoreados por video y las imágenes fueron analizadas tratando cada imagen del oocito como una esfera en crecimiento cuyo volumen podría inferirse a partir de su área transversal.

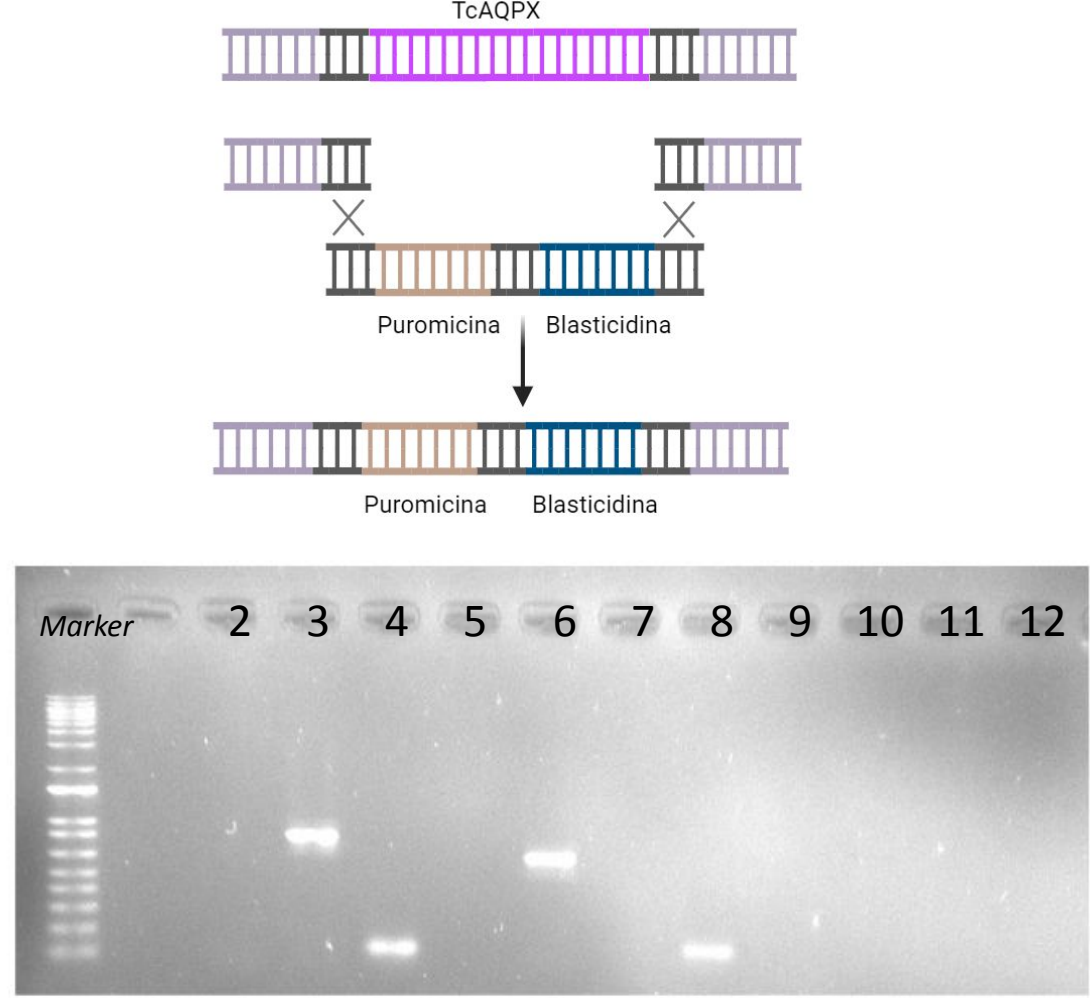
Localización de TcAQPα y TcAQPδ en *Trypanosoma cruzi*



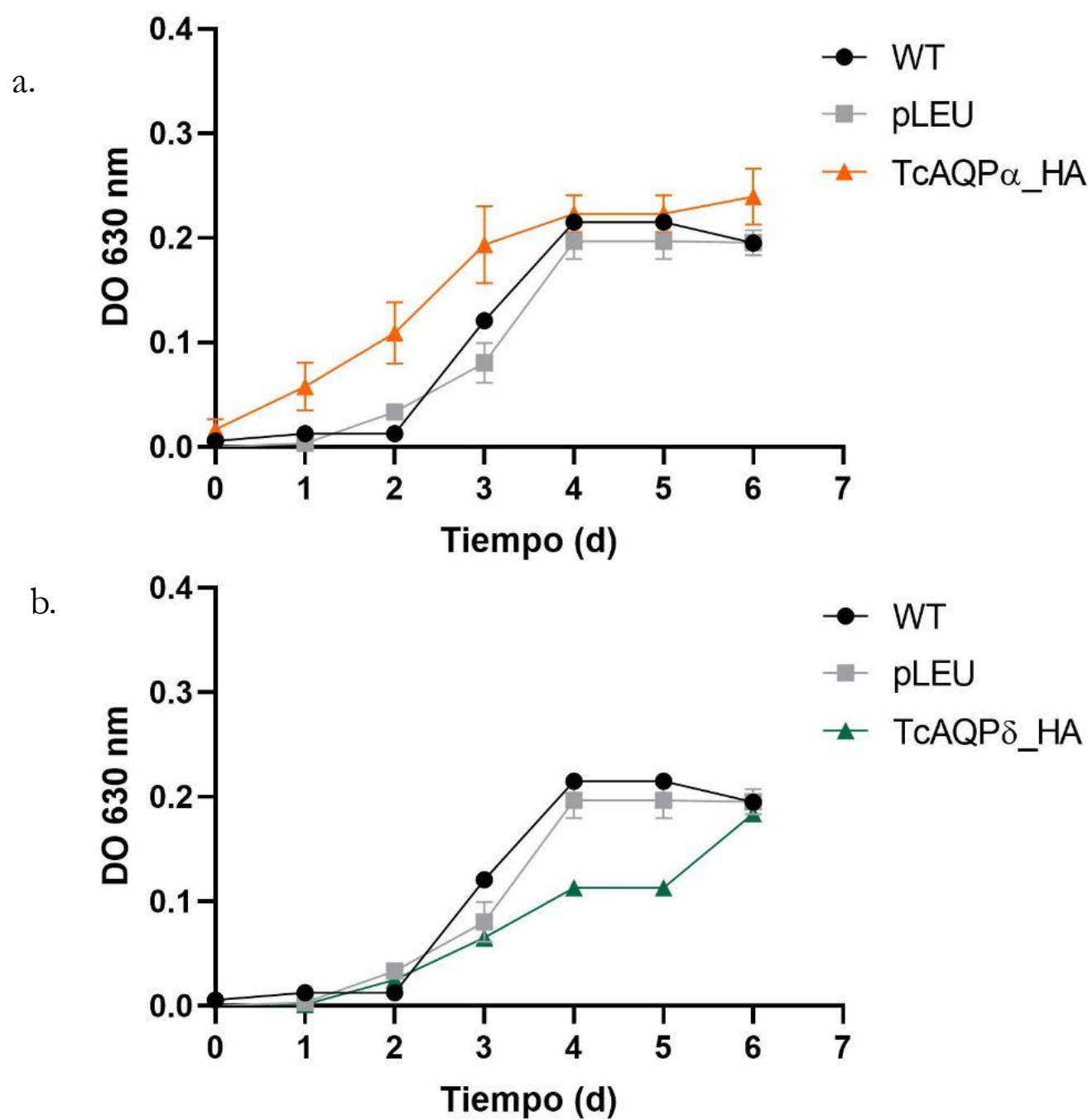
Generación de líneas editadas TcAQPα_HA y TcAQPδ_HA
a. Se utilizó una cepa pLEW cuya cepa base Dm28c expresa constitutivamente SpCas9 y ARNpolIT7. b. Se diseñaron sgARNs para cada TcAQP utilizando EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/>). Se co-transfectó con un ADN *donor* para introducir una etiqueta de hemaglutinina (3xHA) en el extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga. Este, además, posee un marcador de resistencia a blasticidina y/o puromicina que permite la selección. d. Se obtuvieron dos líneas de parásitos que expresan TcAQPα_HA y TcAQPδ_HA

Evaluación de respuesta al estrés por H₂O₂ e infectividad de las líneas TcAQPα/- y TcAQPδ/-

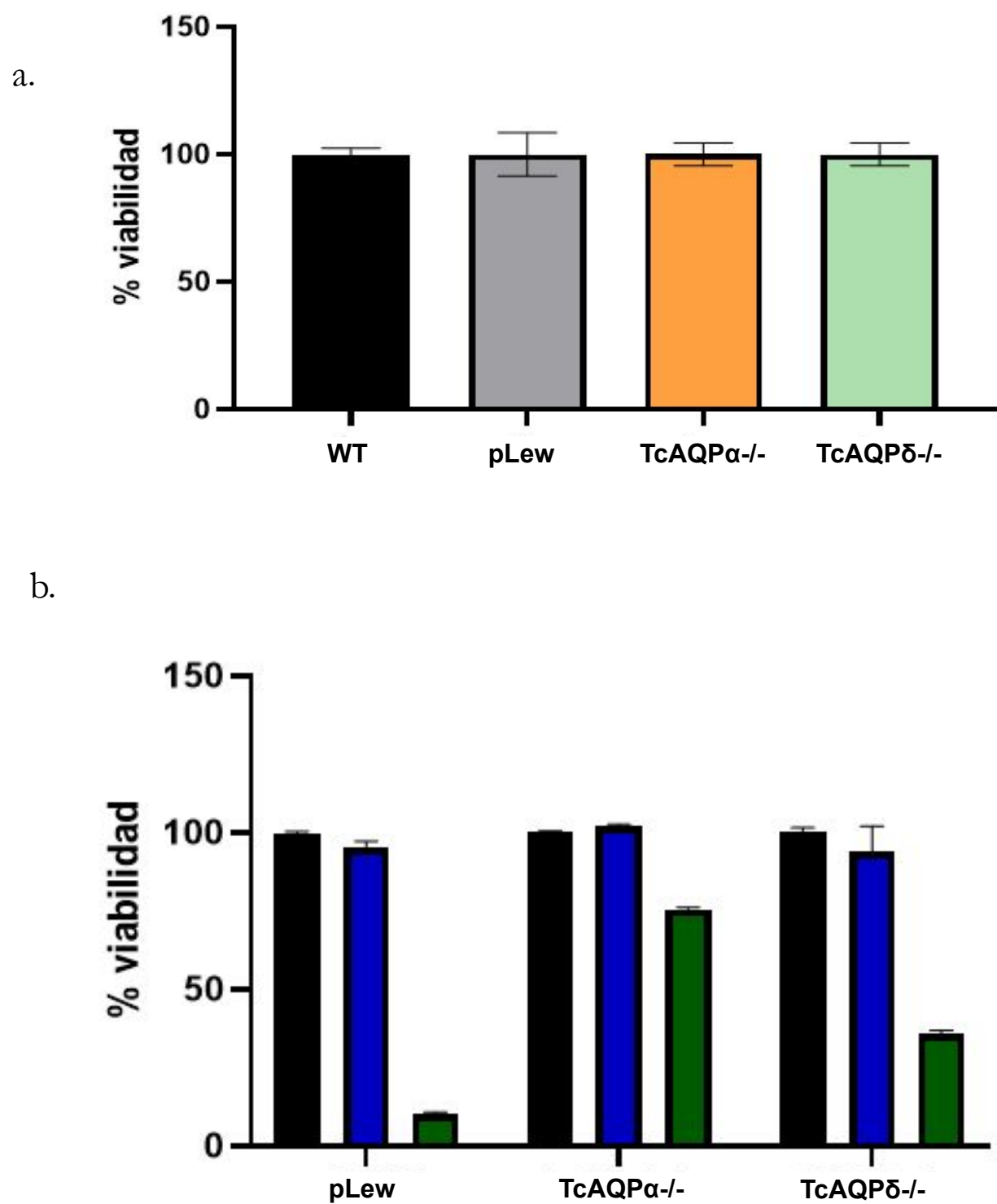
Generación de líneas deficientes de TcAQPα y TcAQPδ
En el caso de la generación de las líneas deficientes de TcAQPα y TcAQPδ se co-transfectó con un ADN *donor* para inducir la reparación de roturas de doble hebra mediante recombinación homóloga en las regiones flanqueantes de 200 pb del gen de interés, llevando un marcador de resistencia a blasticidina y puromicina.



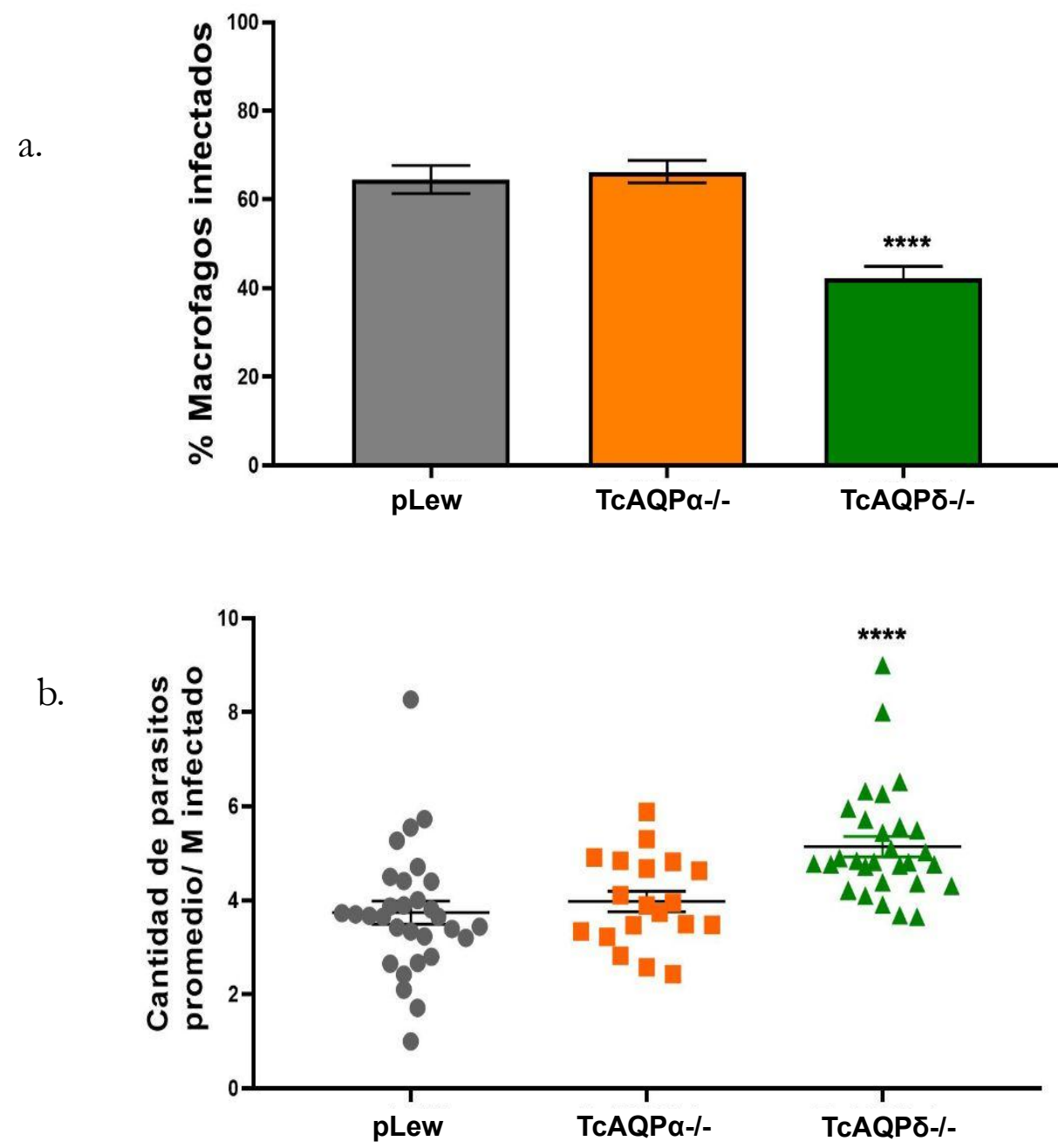
Las líneas deficientes de acuaporinas TcAQPδ y TcAQPα fueron confirmadas mediante PCR. Calle 2 ADN genómico de la cepa TcAQPα/- + primers TcAQPα; calle 3 ADN genómico de la cepa TcAQPα/- + primers TcAQPδ; calle 4 ADN genómico de la cepa TcAQPα/- + primers MPX; calle 6 ADN genómico de la cepa TcAQPδ/- + primers TcAQPα; calle 7 ADN genómico de la cepa TcAQPδ/- + primers TcAQPδ; calle 8 ADN genómico de la cepa TcAQPδ/- + primers MPX; calles 11,12 y 13 CN de la PCR



El desarrollo de TcAQPα/- y TcAQPδ/- es similar a pLEW y WT. Para caracterizarlas funcionalmente se evaluaron las cuatro cepas en condiciones de crecimiento control (medio LIT +10% SFB a 28°C) midiendo la DO a 630 nm del cultivo durante 6 días.
a. Curva de crecimiento de TcAQPα/-, pLEW y WT
b. Curva de crecimiento de TcAQPδ/-, pLEW y WT



La viabilidad de TcAQPα/- y TcAQPδ/- no presenta diferencias con pLEW y WT y demuestran una tolerancia mayor al tratamiento con H₂O₂ a 250 μM . a. La determinación se realiza en cultivo de parásitos, se agrega resazurina (400 μM) al medio y se incuba durante 24h. La resazurina se convierte en resorufina en presencia de células metabólicamente activas, lo que se traduce en un cambio de color observable. Este cambio se cuantifica para determinar el porcentaje de viabilidad celular midiendo su DO a 430 y 595 nm. b. Se repitió el tratamiento con agregado de H₂O₂ en concentraciones 0, 150 y 250 μM por 30 min.



La infectividad de TcAQPδ/- que pLEW pero su replicación intracelular es mayor. Los macrófagos son infectados con tripomastigotes de líneas TcAQP o WT. La infección se realiza con una relación parásitos/células de 5:1. y se lavan. Después de 48 h, las células se fijan con PFA al 4% y se montan con DAPI. La cantidad de células infectadas y amastigotes por célula infectada se determina mediante microscopía de epifluorescencia.

Conclusiones

La expresión de las acuaporinas *Trypanosoma cruzi* (TcAQPX) en sistemas heterólogos presenta una localización intracelular lo que nos dificulta medir su función de transporte en estos sistemas. Se generaron dos líneas de parásitos (TcAQPα_HA y TcAQPδ_HA) mediante la edición génica por CRISPR/Cas9. Estas líneas no mostraron diferencias fenotípicas respecto a la cepa base. Mediante inmunofluorescencia indirecta, se localizó específicamente TcAQPα_HA y se confirmó su ubicación intracelular mediante UExM en la base del flagelo cerca del kinetoplasto. También se determinó la localización intracelular de TcAQPδ_HA dentro de pequeñas vesículas a lo largo del parásito. Adicionalmente, se generaron dos líneas deficientes de acuaporinas (TcAQPα/- y TcAQPδ/-). Se demostró que estos genes no son esenciales para la supervivencia del parásito y que presentaron una mayor resistencia al estrés inducido por H₂O₂. TcAQPδ/- presentó un fenotipo menos infectivo, pero con mayor replicación intracelular en macrófagos. Estos hallazgos sugieren que las AQPX de *Trypanosoma cruzi* son canales intracelulares con una posible función en la señalización redox de este parásito.

Referencias

Referencias

- Tesan, F. C., Lorenzo, R., Alleva, K., & Fox, A. R. (2021). AQPX-cluster aquaporins and aquaglyceroporins are asymmetrically distributed in trypanosomes. In Communications Biology (Vol. 4, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02472-9>
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M. L., Libisch, G., & Robello, C. (2023). 3D genome organization drives gene expression in trypanosomes. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2023.04.01.535209>