

Caracterización de las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan la enzima de *Entamoeba histolytica* EhToxin-like

Yazmín López Navarro, Ricardo A. Rodríguez Ojeda, Mayra C. Rodríguez, G. Araceli López Andrade, Juan Carlos Torres Guzmán, Eva E. Avila

1 [Departamento de Biología, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]

Resumen

Entamoeba histolytica es el protozoario parásito que causa la amebiasis en los seres humanos, esta infección es la 6^o causa de morbilidad entre las enfermedades transmisibles en México. La amebiasis intestinal es una enfermedad diarreica que empeora la nutrición en niños, sobre todo aquellos con baja ingesta alimenticia. En el genoma de *E. histolytica* está codificada una enzima denominada EhToxin-like que tiene estructura y actividad enzimática similares a la toxina diftérica; in vitro ésta modifica el factor de alargamiento de la síntesis de proteínas EF-Tu de *Escherichia coli*. Como el factor EF-Tu además de estar involucrado en la síntesis de proteínas en bacterias también participa en la síntesis de proteínas mitocondriales, nuestro grupo de investigación está estudiando el efecto de EhToxin-like en levaduras, como modelo de células eucariontes. En esta investigación se analizó el efecto que tiene la enzima EhToxin-like en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Para analizar el posible efecto de EhToxin-like, se utilizaron tres cepas de *S. cerevisiae*: una transformada con el vector vacío en donde no se expresa la enzima, ésta se denominó pYES2 y fue utilizada como control; la segunda cepa es la que expresa la enzima EhToxin-like y la tercera posee una mutación en el aminoácido 354,

cambiando el ácido glutámico por glutamina, ésta se nombró EhTox E354Q. Para el análisis se utilizaron cepas recién cosechadas crecidas en medio mínimo con glucosa, condición no inductora para la expresión de EhToxin-like, o en el mismo medio con galactosa para inducir la expresión de EhToxin-like y de la mutante EhTox-E354Q. Se tiñeron con Mitotracker-red CMXRos las mitocondrias de las tres cepas de *S. cerevisiae* en las diferentes condiciones de crecimiento y se observaron por microscopía confocal. Las mitocondrias de levaduras que expresan EhToxin-like se observaron más pequeñas y con una tinción difusa comparadas con la cepa de *S. cerevisiae* que está transformada con el vector pYES2 vacío. Además, las cepas que expresan EhToxin-like son de menor tamaño que la cepa control.

Abstract

Entamoeba histolytica is the parasitic protozoan that causes amebiasis in humans, this infection is the 6th cause of morbidity among communicable diseases in Mexico. Intestinal amebiasis is a diarrheal disease that worsens nutrition in children, especially those with low food intake. The *E. histolytica* genome encodes an enzyme called EhToxin-like, which has similar enzyme structure and activity to diphtheria toxin. *In vitro*, EhToxin-like

modifies the elongation factor EF-Tu that participates in the synthesis of proteins in *Escherichia coli*. As the EF-Tu factor besides being involved in protein synthesis in bacteria also participates in the synthesis of mitochondrial proteins, our research group is studying the effect of EhToxin-like in yeasts, as a model of eukaryotic cells. In this study, we analyze the effect of the enzyme EhToxin-like on the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Three different *S. cerevisiae* were used to determine the possible effect of EhToxin-like: the control strain called pYES2 was transformed with the empty vector, the second strain is the one that expresses the enzyme EhToxin-like, and the third one has a mutation in amino acid 354, changing glutamic acid to glutamine, this was named EhTox E354Q. For the analysis, freshly harvested strains grown in minimal medium with glucose, a non-inductive condition for the expression of EhToxin-like, or in the same medium with galactose used to induce the expression of EhToxin-like and the mutant EhTox-E354Q. The mitochondria of the three *S. cerevisiae* strains under different growth conditions were stained with Mitotracker-red CMXRos and observed by confocal microscopy. The yeast mitochondria expressing EhToxin-like were observed smaller and with diffuse staining compared to the *S. cerevisiae* strain that is transformed with the empty pYES2 vector. Additionally, the cells that express EhToxin-like are smaller than the control strain.

Introducción

Entamoeba histolytica es uno de los principales parásitos inductores de diarrea que causa una morbilidad elevada principalmente en niños con condiciones precarias en países en desarrollo. Este

parásito causa amebiasis intestinal y absceso hepático en los seres humanos; alrededor del 10% de la población mundial está infectada y ~10% de la población infectada manifiesta síntomas de la enfermedad, con una letalidad de entre 0.1 y 0.25% (1).

Se han descrito que *E. histolytica* posee actividad enzimática de ADP-ribosilación, ésta es catalizada por ADP-ribosil transferasas, estas enzimas transfieren ADP-ribosa del $-NAD^+$ a un aceptor proteico. La transferencia de ADP-ribosa participa en la regulación de diversas funciones, en la muerte celular y como toxinas implicadas en patogenicidad de varias bacterias. La enzima EhToxin-like es una ADP-ribosil transferasa producida por *E. histolytica* que pertenece al grupo de la toxina diftérica (2).

La toxina diftérica es una exotoxina potente que es producida por *Corynebacterium diphtheriae*, bacteria causante de una infección respiratoria grave. La toxina diftérica modifica el factor de alargamiento eucariótico EF-2 deteniendo la síntesis de proteínas de las células del hospedero. Esta toxina se distribuye a órganos distantes por el sistema circulatorio y puede causar parálisis e insuficiencia cardíaca congestiva (3). Por su parte, EhToxin-like modifica *in vitro* el factor de elongación tu (EF-Tu), factor indispensable en la síntesis de proteínas en procariontes y mitocondrias (2).

Para estudiar a EhToxin-like se ha empleado *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo de células eucariotas. Actualmente el genoma de *S. cerevisiae* está totalmente secuenciado y es un modelo experimental ideal por su capacidad de sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas o de nula actividad mitocondrial. Hemos observado (4) que

las levaduras transformadas con el marco de lectura abierto EHTOXIN-L bajo condiciones inductoras tienen un tamaño más pequeño que las no transformadas. Lo anterior sugiere una deficiencia en el funcionamiento de las mitocondrias de *S. cerevisiae*. Por estas razones el objetivo de este estudio es analizar la tinción de las mitocondrias de *S. cerevisiae* en condiciones en las cuales se induce la expresión de la enzima EhToxin-like de *E. histolytica*.

Materiales y métodos

Crecimiento de *S. cerevisiae* cepa BY4741 en medio mínimo

Crecimiento en placa en medio mínimo selectivo no inductor: Base nitrogenada sin aminoácidos (Difco, cat. No. 291940), glucosa 2%, His+, Leu+, Met+, Ura- con 5% de agar bacteriológico. Se estrilaron las cepas de *S. cerevisiae* pYES2-EHTOXIN-LIKE, pYES2-EHTOXIN-LIKE E354Q y la que contiene el vector vacío pYES2, las cajas de cultivo se incubaron a 28°C durante 48-72 horas.

Se inoculó una colonia de cada cepa transformante en 2 mL de medio mínimo líquido no inductor (Base nitrogenada, glucosa 2%, His+, Leu+, Met+, Ura-) incubándose con agitación a 150 rpm, a 28°C por 24 h.

Crecimiento de *S. cerevisiae* cepa BY4741 en medio inductor

Se centrifugó 1 mL del preinóculo a 5000 xg por 5 min y se realizó un lavado resuspendiendo la pastilla en 1 mL de agua y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 mL de medio mínimo inductor (Base nitrogenada, galactosa 2%, rafinosa 1%, His+, Leu+, Met+, Ura-). Se incubó el cultivo a 28° C con agitación constante (150 rpm) por 24 o 48 horas.

Tinción de las mitocondrias

Después del crecimiento se centrifugó 1 mL del cultivo a 5000 xg por 5 min y se resuspendió la pastilla celular en 50 µL de agua. Posteriormente, se agregó de MitoTracker Red CMXRos (clorometil-X-Rosamina, Invitrogen, No. catálogo M71512) a una concentración final de 2 µM y las muestras se prepararon para su observación en el microscopio confocal.

Montaje de las muestras para observación microscópica de levaduras vivas

Se utilizó una película de agarosa al 1 % sobre un cubreobjeto de 75 mm X 25 mm, se colocaron 5 µL de la suspensión de levaduras ya teñidas con el MitoTracker Red CMXRos sobre la agarosa y se colocó otro cubreobjetos igual sobre la muestra. Se invirtió la película de agarosa y se colocó sobre la platina del microscopio. Inmediatamente después se observó en el microscopio confocal (Carl Zeiss, LSM700) en el objetivo de 40X con aceite de inmersión. Longitud de onda de excitación 579 nm y de emisión 599 nm.

Resultados y discusión

Se encontró que las levaduras crecidas en condiciones inductoras que expresan la enzima EhToxin-like y la mutante EhToxin-like E354Q se observaron más pequeñas, en comparación con la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el vector pYES2 vacío. Este resultado había sido ya reportado por nuestro grupo (4).

Además, por medio de la microscopía confocal observamos que las levaduras que expresan EhToxin-like y la mutante parecen tener mitocondrias más pequeñas con una tinción más difusa tanto a las 24 como a las 48 horas de inducción. Esta observación resulta de la comparación con la cepa control de *S. cerevisiae* en donde no se expresa la enzima (cepa pYES2), en esta cepa observamos mayor definición de

las mitocondrias con una tinción más clara y las mitocondrias se observan de mayor tamaño como puntos rojos debido al MitoTracker Red (CMXros). Es importante saber que la acumulación del MitoTracker Red (CMxRos) depende del potencial de la membrana mitocondrial, sugiriendo que se ve afectado en las cepas que expresan EhToxin-like. Esto podría afectar la función mitocondrial (5); Sin embargo, se requiere analizar la ultraestructura de las mitocondrias de las cepas empleadas en este estudio por microscopia electrónica y determinar alguna función mitocondrial como la síntesis de ATP. Nuestra investigación sugiere que las levaduras están sufriendo un daño mitocondrial.

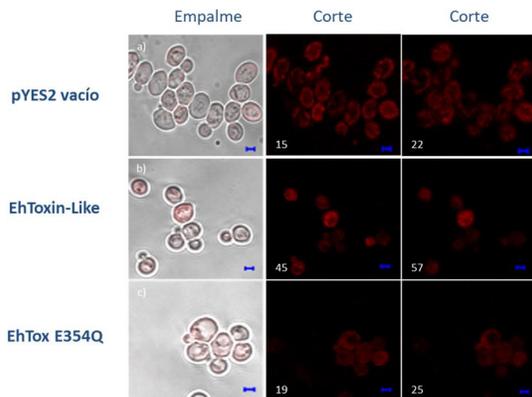


Figura 1. Tinción de las mitocondrias de *S. cerevisiae* a las 24 horas de crecimiento en medio no inductor. La cepa de *S. cerevisiae* BY4741 se transformó con pYES2 vacío (a), con pYES-EHTOXIN-LIKE (b) o con pYES-EHTOXIN-LIKE E354Q (c). En la figura se muestra el empalme del campo claro con la fluorescencia y dos rebanadas virtuales de cada muestra, los números en el extremo inferior izquierdo indican el número de la rebanada. Todos los cortes o rebanadas fueron de 0.25 µm de grosor. En la muestra pYES2 vacío se realizaron 37 cortes (a); en la muestra EhToxin-like 75 cortes (b), y en EhTox E354Q 44 cortes (c). La barra corresponde a 2 µm.

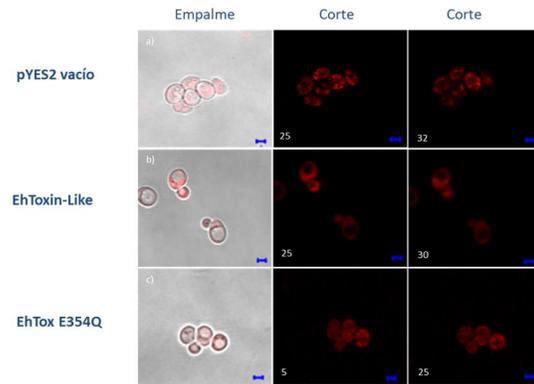


Figura 2. Tinción de las mitocondrias de *S. cerevisiae* a las 24 horas de incubación en medio inductor. La cepa de *S. cerevisiae* BY4741 se transformó con pYES2 vacío (a), con pYES-EHTOXIN-LIKE (b) o con pYES-EHTOXIN-LIKE E354Q (c). En la figura se muestra el empalme del campo claro con la fluorescencia y dos rebanadas virtuales de cada muestra, los números en el extremo inferior izquierdo indican el número de la rebanada. Todos los cortes o rebanadas fueron de 0.25 µm de grosor. En la muestra pYES2 vacío se realizaron 55 cortes (a); en la muestra EhToxin-like 61 cortes (b), y en EhTox E354Q 91 cortes (c). La barra corresponde a 2 µm.

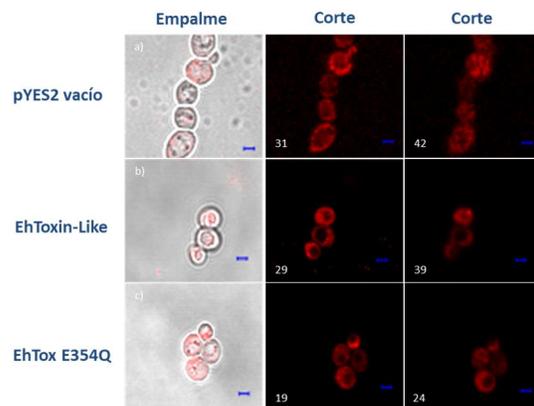


Figura 3. Tinción de las mitocondrias de *S. cerevisiae* a las 48 horas de crecimiento en medio inductor. La cepa de *S. cerevisiae* BY4741 se transformó con pYES2 vacío (a), con pYES-EHTOXIN-LIKE (b) o con pYES-EHTOXIN-LIKE E354Q (c). En la figura se

muestra el empalme del campo claro con la fluorescencia y dos rebanadas de cada muestra, los números en el extremo inferior izquierdo indican el número de la rebanada. Todos los cortes fueron de 0.25 μm de grosor. En la muestra pYES2 vacío se realizaron 67 cortes (a); en la muestra EhToxin-like 61 cortes (b), y en EhTox E354Q 45 cortes (c). La barra corresponde a 2 μm .

Conclusiones

En conclusión, las mitocondrias de *S. cerevisiae* que expresan EhToxin-like y la mutante E354Q parecen ser más pequeñas y con una tinción más difusa; sin embargo, se necesitan más estudios para caracterizar el existe daño mitocondrial.

Perspectiva

Realizar otros ensayos para evaluar la función mitocondrial como cuantificar la cantidad de ATP, producida por las cepas de *S. cerevisiae* y estudiar el posible efecto de EhToxin-like en células humanas.

Referencias

1. Singh, A., Banerjee, T., Kumar, R., & Shukla, S. K. (2019). Prevalence of cases of amebic liver abscess in a tertiary care centre in India: A study on risk factors, associated microflora and strain variation of *Entamoeba histolytica*. PLOS ONE, 14(4).
2. Avila, E. E., Rodriguez, O. I., Marquez, J. A., & Berghuis, A. M. (2016). An *Entamoeba histolytica* ADP-ribosyl transferase from the diphtheria toxin family modifies the bacterial elongation factor Tu. Molecular and Biochemical Parasitology, 207(2), 68674.
3. Murphy J. R. (1996). Capítulo 32 *Corynebacterium Diphtheriae*, Medical Microbiology. 4th edition. Baron S, editor. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

4. Rodriguez Ramirez O. I. (2018). Efecto de la enzima Eh Toxin-Like de *Entamoeba histolytica* en la morfología y viabilidad de células eucariotas. Tesis, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, DCNE.

5. Poot M., Zhang Y. Z., Kramer J. A., Wells K. S., Jones I. J., Hanzel D. K., Lugade A. G., Singer V. L., & Haugland R. P. (1996). Analysis of Mitochondrial Morphology and Function with Novel Fixable Fluorescent Stains. The Histochemical Society, Inc. 44(12), 1363-1372.