

Tesina de Grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Biología Celular y Molecular

Estudio de la localización y dinámica de expresión de los homólogos de PP1 y POC1 en *Toxoplasma gondii*

Fabiana Cristina González Ramírez

Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Institut Pasteur de Montevideo
Laboratorio de Biología de Apicomplejos

Orientadora: Dra. María Eugenia Francia
Febrero de 2020

Agradecimientos

A Eugenia por esta invaluable oportunidad, por permitirme creer en que lo que uno se proyecta y que las metas sí se pueden alcanzar por más distante que parezca.

A mis compañeros del Api Lab, Andrés y Ramiro, por haber contado con sus palabras de orientación y apoyo.

A toda la gente de UBM, que también formaron parte de esta experiencia y de mis primeros pasos en la mesada, siempre me tendieron una mano cuando necesitaba.

A Marcela de la Unidad de Microscopía del Instituto por compartir tiempo y conocimiento conmigo durante mi formación en microscopía.

A la Unidad mixta Pasteur INIA donde realizamos los trabajos de cultivo celular.

A mi familia, por acompañarme desde el remoto momento en el que decidí estudiar Ciencias.

Al tribunal, por la atenta y crítica lectura de este trabajo.

Todas estas personas, que sin ellas no hubiese sido posible alcanzar este momento cúlmine de mi carrera (de grado, eso espero).

Tabla de Abreviaturas

nm	Nanómetros
μm	Micras
μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
cDNA	ADN copia
MEB	Microscopía electrónica de barrido
CRISPR	Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas9	Endonucleasa asociada al sistema CRISPR
PP1	Protein phosphatase 1
POC1	Proteína centriolar 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
V	Voltios
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
csp	cantidad suficiente para
ON	Over Night
PBS	Buffer fosfato salino
BSA	Seroalbúmina bovina

Resumen

Las infecciones por *Toxoplasma gondii* poseen una elevada prevalencia a nivel mundial, se estima que un tercio de la población se encuentra afectada por este parásito. Si bien este parásito no es capaz de producir la muerte en individuos inmunocompetentes, las infecciones crónicas causan morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, así como a alteraciones en el desarrollo fetal en infecciones que se dan durante el embarazo. Además, estas infecciones se dan en otros endotermos como el ganado, produciendo importantes pérdidas en el sector agroindustrial. Su particular ciclo de vida sucede en una amplia diversidad de hospederos y su capacidad de invadir una gran cantidad de tipos celulares, hacen que *T. gondii* sea un organismo que ha colonizado una gran cantidad de ambientes y que posea una distribución global.

Su fácil cultivo y su maleabilidad genética hacen que sea un buen modelo de laboratorio dentro del filo Apicomplexa, propiciando así la comprensión de mecanismos que se encuentran en otros parásitos del filo de mayor importancia clínica como lo es *Plasmodium falciparum*. La búsqueda de blancos terapéuticos contra estos parásitos ha impulsado la investigación para una mejor comprensión sobre los mecanismos de replicación del parásito. El centrosoma cumple un rol central en los procesos de división y de regulación del ciclo celular, encontrándose ahí un sinnúmero de potenciales blancos moleculares que se podrían usar para interferir con la proliferación del parásito. En el presente trabajo, se propone validar un modelo de centrosoma propuesto para *T. gondii* buscando una aproximación a la localización y dinámica a lo largo del ciclo celular de potenciales proteínas ortólogas humanas en *T. gondii*. Para alcanzar el objetivo se introdujo a través de recombinación homóloga y tecnología CRISPR-Cas, el tag 3HA en el extremo C-terminal del marco de lectura de las proteínas POC1 y PP1, de esta forma se logró observar su localización celular por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Mediante la utilización de marcadores del ciclo celular como centrina, se observó la dinámica de expresión a lo largo del ciclo celular y se logró determinar que PP1 adquiere una localización centrosomal en algún momento de la fase G1. En lo que resta del ciclo, PP1 se localizó en el núcleo como se ha descrito en trabajos anteriores. POC1 no se logró observar en ningún momento colocalizar con centrina en el centrosoma, sin embargo, se logró describir una distribución nuclear alternante entre una distribución más general difusa y una más discreta en determinadas regiones de la cromatina. Si bien POC1 en la mayoría de los organismos eucariotas es una proteína involucrada en el proceso de ensamblaje de cilios y flagelos y en el control de la elongación de los microtúbulos centriolares, en Apicomplejos esta proteína no estaría codificada en su genoma según análisis previos de las secuencias génicas realizado por otros autores. Sin embargo, partiendo de las observaciones del knock-in del homólogo de POC1 en *T. gondii*, es posible hipotetizar que esta proteína se encontraba en el ancestro y que sufrió una divergencia funcional a lo largo de la evolución, posiblemente adquiriendo funciones vinculadas a la regulación de la expresión génica con respecto al ciclo celular.

Índice de Contenido

1 Introducción	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> es el agente etiológico de la toxoplasmosis	1
1.1.1 Taxonomía	1
1.1.2 Toxoplasmosis	2
1.2 Ciclo de vida	3
1.3 Ciclo lítico	6
1.3.1 Invasión	6
1.3.2 Egreso	7
1.4 Polaridad y ultraestructura celular del taquizoito	7
1.4.1 Dando forma a la polaridad	8
1.4.2 Un arsenal exclusivo: micronemas, roptrias y gránulos densos	9
1.5 Un organismo modelo del filo Apicomplejos	9
1.6 Ciclo celular de <i>Toxoplasma</i>	10
1.6.1 Regulación	11
1.7 El centrosoma como componente clave en la regulación del ciclo celular: Modelo de centrosoma en apicomplejos	12
1.7.1 El modelo canónico	12
1.7.2 Hacia un modelo de centrosoma en <i>T. gondii</i>	15
1.7.3 Eje centrocono-centrosoma-cinetocoro	15
1.7.4 Aspectos regulatorios del centrosoma	16
1.7.5 Diseccionando la ultraestructura	16
1.8 Planteo del trabajo	17
1.8.1 Objetivos generales	17
1.8.2 Objetivos específicos	18
2 Materiales y métodos	19
2.1 Clonación en el vector pLIC_3HA_CAT	19
2.1.1 Amplificación por PCR de los insertos	19
2.1.2 Construcción de los vectores pLIC_PP1 y pLIC_POC1	20
2.2 Mutagénesis del vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT	21
2.2.1 Introducción de las guías en los vectores de CRISPR por mutagénesis	21
2.2.2 Secuenciación de pSAG1::Cas9-U6::sgPP1 y pSAG1::Cas9-U6::sgPOC1	22
2.3 Transfección, cultivo y microscopía	22
2.3.1 Cultivo de los parásitos	22
2.3.2 Transfección y cultivo	22
2.3.3 Identificación de la localización de PP1 y POC1 por inmunofluorescencia y cuantificación	22

2.4 Clonación del cDNA de PP1 y POC1 en pGEM-T	23
2.4.1 Obtención de ARNs de parásitos con Trizol	23
2.4.2 Generación de los ADNc por tratamiento con transcriptasa reversa	23
2.4.3 Clonación en pGEM-T	23
3 Resultados	26
3.1 Generación de los knock-in en parásitos	26
3.1.1 Construcción de los vectores pLIC_PP1 y pLIC_POC1	27
3.1.2 Inserción de las secuencias de los ARN guía en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT	28
3.1.3 Detección del knock-in en parásitos por PCR	31
3.2 Identificación de la localización de las proteínas por inmunofluorescencia y cuantificación	31
3.2.1 Identificación de POC1	33
3.2.2 Identificación de la localización de PP1	34
3.2.3 Cuantificación y aproximación al ciclo celular	37
4 Discusión	39
4.1 POC1, una eventual divergencia evolutiva en los Apicomplexa	39
4.2 El homólogo de PP1, una posible localización centrosomal	40
5 Perspectivas	44
5.1 Clonación en pGEM de los ADNc de PP1 y POC1	44
Bibliografía	46

1 Introducción

1.1 *Toxoplasma gondii* es el agente etiológico de la toxoplasmosis

En 1908 Nicolle y Manceaux, investigadores del Institut Pasteur de Túnez, encontraron organismos unicelulares en tejidos del roedor, *Ctenodactylus gondii*. En principio pensaron que era *Leishmania*, ya que éste era utilizado como modelo para el estudio de la leishmaniasis. Pero al final se dieron cuenta de que estaban frente a un nuevo organismo, al cual denominaron *Toxoplasma gondii*. Según los autores, “toxo” hace referencia a la forma arqueada del organismo, “plasma” significa vida, y el epíteto proviene del hospedero en el cual lo encontraron. El mismo año, en Brasil, Splendore encontró el mismo parásito en un conejo el cual también pensó erróneamente que era *Leishmania* (Dubey, 2014).

1.1.1 Taxonomía

Toxoplasma es un miembro del filo Apicomplexa, el cual fue descrito por primera vez por Levine en 1980. Las relaciones filogenéticas del filo Apicomplexa con otros grupos de protozoarios ha sido una tarea discutida. Actualmente se encuentran comprendidos dentro del reino Protista y a su vez, en conjunto con los ciliados y los dinoflagelados forman el infra reino (o superfilo) Alveolata, cuyos miembros comparten un sistema de alvéolos membranoso periférico los cuales en Apicomplejos se denomina complejo de membrana interno (IMC). Este filo se definió para protozoarios unicelulares con un IMC y un complejo apical (anillos polares, roptrias, micronemas, conoide y microtúbulos subpeliculares), todos ellos parásitos intracelulares obligados con reproducción sexual en sus hospederos definitivos y, reproducción asexual de estados haploides por fisión binaria, endodigenia, endopoligenia y/o esquizogonia en sus hospederos intermediarios, y locomoción que puede ser por deslizamiento, flexión del cuerpo, crestas longitudinales y/o cilios. (Levine 1980, emend. Adl et al. 2005). Los Apicomplejos presentan la particularidad de haber evolucionado a partir de organismos fotosintéticos de vida libre originados por dos eventos subsecuentes de endosimbiosis. La fuerza impulsora de la posterior divergencia del linaje Apicomplexa es el cambio completo a un estilo de vida parasitario, esto condujo a reducciones significativas del contenido genético (Woo et al, 2015). Las proteínas perdidas incluyen proteínas de flagelos y las necesarias para la fotosíntesis. Por otro lado, las proteínas secretoras necesarias para invadir y sobrevivir dentro de un huésped, y un nuevo aparato de movilidad adaptado a un citoesqueleto multicapa, destacan las funciones adquiridas durante la evolución del filo Apicomplexa (White & Suvorova, 2018).

La diversidad de Apicomplejos es algo que todavía permanece en misterio. Según Adl, sólo el 0.1% de las especies de Apicomplejos se han identificado, lo que sería cerca de las 6000 especies descritas sobre un total estimado de 1.2-10 millones de especies superando a los insectos (Adl et al, 2007). El endoparasitismo unicelular dificulta el trabajo de elucidación de su filogenia, además de que se conocen muy pocos rasgos que permitan establecer su filogenia, como pueden ser sus ciclos de vida, estadios o ultraestructura. Esto, sumado a un muestreo sesgado hacia especies de relevancia para la salud humana y animal dificulta aún más la recabación de datos que permitan hacer reconstrucciones filogenéticas y taxonomía (Morrison, 2009). Tradicionalmente la clasificación de los apicomplejos estaba basada en datos fenotípicos como ciclos de vida, rango de huéspedes, tipos de tejidos que parasitan, características morfológicas y ultraestructura. Esta modalidad se sigue considerando ya que no se ha llegado a un

consenso sobre su taxonomía basada en datos moleculares (Adl et al, 2005). Por lo tanto, todavía no existe una filogenia resuelta y robusta que permita hacer una taxonomía sólida. Actualmente el filo Apicomplexa se divide en cuatro grupos: los coccidios, los gregarines, los hemosporidios y los piroplasmidos (Adl et al, 2005; Sogin & Silberman, 1998). La taxonomía de *T. gondii* es la siguiente: Filo Apicomplexa (Levine, 1970), Clase Sporozoa (Leuckart, 1879), Subclase Coccidiasina (Leuckart, 1879), Orden Eimeriorina (Leger, 1911), Familia Toxoplasmatidae (Biocca, 1956) y Género *Toxoplasma* el cual contiene una sola especie, *T. gondii* (Figura 1).

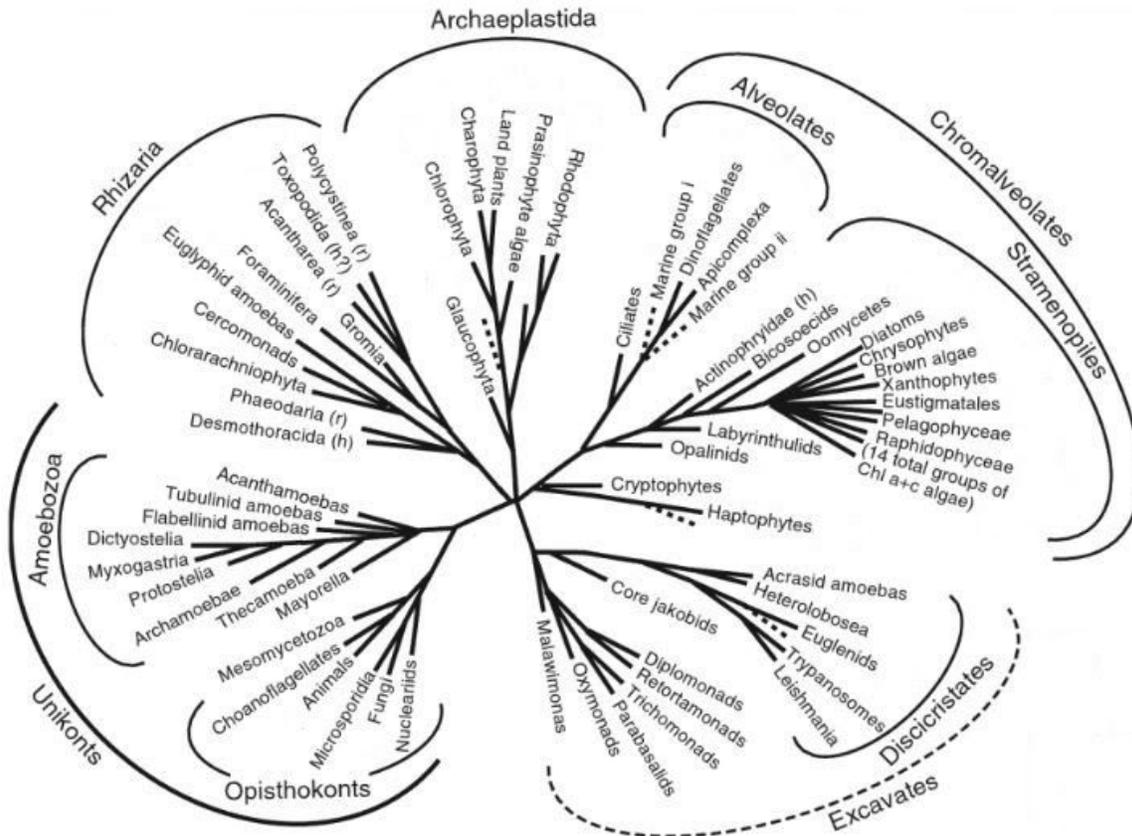


Figura 1. Árbol filogenético basado en datos moleculares y ultraestructurales. Dentro del superfilo Alveolata se encuentran los Apicomplejos junto con los Dinoflagelado y los Ciliados. Adaptado de Fehling et al, 2007.

1.1.2 Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozoo *Toxoplasma gondii*, siendo una de las zoonosis más comunes globalmente que afecta a endotermos (Frenkel, 1988). Se estima que un tercio de la población mundial ha sido infectada por este parásito (Tenter et al 2000). Los cambios ambientales producidos por el calentamiento global, la rápida urbanización, el crecimiento y aumento de la densidad poblacional, han cambiado la distribución y transmisión de enfermedades parasitarias incluida la toxoplasmosis (Patz et al, 2000). Las elevadas temperaturas y los climas húmedos en las regiones tropicales propician la supervivencia de *T. gondii*, que junto con encarecidas condiciones sanitarias hacen que sea más fácil la transmisión del parásito. Sin embargo también se ha reportado una alta

seroprevalencia del parásito en latitudes más altas, como en Europa, el cual viene asociado a cuestiones culturales como es el consumo de carne poco cocinada.

La transmisión de toxoplasmosis adquirida se da por carnivorismo o por la ingesta de ooquistes provenientes de las heces de felinos infectados (Weinman & Chandler, 1954; Hutchison, 1965), así como de manera vertical por vía transplacentaria. Se ha demostrado que formas enquistadas de *T. gondii* que se encuentran en la carne cruda o poco cocida una vez que son ingeridas, la cobertura que recubre al quiste se degrada por acción de los jugos gástricos y es liberada una forma del parásito llamada bradizoito que resiste lo suficiente como para pasar a través del sistema digestivo e infectar al individuo. En el caso de hervíboros, la alta prevalencia se explica por la ingesta de alimentos contaminados con ooquistes. Los animales que entran en contacto con agua, suelos o vegetales contaminados tienen la posibilidad de infectarse con *T. gondii* a través de la ingesta accidental de los ooquistes. Los ooquistes son formas de resistencia que tiene el parásito y que son liberados en las heces de los félidos. La ingesta de bradizoitos enquistados en carne junto con la contaminación de alimentos y ambientes con ooquistes explica la alta prevalencia de infecciones con *T. gondii* en humanos y otros animales endotermos. Otra forma menos frecuente que se ha reportado es a través del trasplante de órganos (Ryning et al, 1979). En general, se considera que las primoinfecciones son asintomáticas en individuos inmunocompetentes, y evolucionan a infecciones crónicas latentes. Sin embargo, recientemente se han caracterizado cepas denominadas “atípicas” que logran establecer infección sintomática y hasta causar la muerte, en individuos inmunocompetentes. Así mismo, una infección congénita puede ser adquirida luego de una infección materna durante el embarazo. La gravedad de los síntomas depende de la genética de la cepa, y el estadio del embarazo en el cual se contrae la infección. El espectro de síntomas que pueden darse en la toxoplasmosis congénita van desde visión levemente reducida hasta retinocoroiditis con pérdida total de la visión, convulsiones, calcificaciones intracerebrales e hidrocefalia en los casos más severos. Esta condición es única de la toxoplasmosis congénita en humanos y no ha sido reportada en otros animales (Sabin, 1942). En infecciones durante el embarazo de pequeños rumiantes se producen abortos o alteraciones en el desarrollo fetal. La infección con *T. gondii* es considerada una de las causas más importantes de pérdidas reproductivas en ganado pequeño (Belluco et al., 2016). En el mundo se han publicado dos estudios reportados en Gran Bretaña y Uruguay sobre el impacto económico que acarrear los abortos en ovinos, en Uruguay se estimaba en el 1993 una pérdida de entre 1.4 y 4.68 millones de dólares solo teniendo en cuenta los abortos (Freyre et al, 1997).

Las infecciones crónicas en pacientes inmunocomprometidos son de gran riesgo ya que pueden reactivarse y conducir a una infección aguda produciendo morbilidad y mortalidad. Tal es el caso de los pacientes con SIDA, cuando apareció la epidemia en la década de los 80 una de las principales causas de los decesos fueron cuadros de encefalitis producidos por reactivación de infecciones con *T. gondii* (Porter & Sande, 1992; Luft & Remington, 1983).

1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* a grandes rasgos se puede interpretar como dos ciclos que se solapan: uno sexual y otro asexual. En estos existen múltiples posibilidades que permiten la supervivencia y transmisión del parásito, ya que *T. gondii* es un organismo que puede prescindir de una u otra etapa para su transmisión y además posee un rango de hospedadores muy amplio. En el hospedador definitivo, por definición, es donde se da la etapa sexual del ciclo y en este caso ocurre en los félidos. Cualquiera

individuo de la familia Felidae puede ser hospedador definitivo para *T. gondii*. Mientras que el hospedador intermediario puede ser cualquier célula nucleada de un animal endotermo (mamíferos y aves) incluido los mismos felidos.

En un ciclo asexual se pueden distinguir dos estadios. El taquizoito es de forma alargada y arqueada, con un extremo anterior más agudo y uno posterior. El taquizoito posee varios organelos comunes a otros tipos celulares como mitocondrias, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi y un núcleo central o posterior. Además posee organelos específicos de este grupo como el apicoplasto, roptrias, micronemas y gránulos densos, todos ellos implicados en el proceso de invasión de la célula hospedera. El taquizoito es un estadio fácil de cultivar y propagar en líneas celulares de uso frecuente en el laboratorio, por lo que es el estadio mejor conocido. Como su nombre lo define, taqui- quiere decir que es la forma más activa del parásito con una alta tasa proliferativa. Este es capaz de invadir cualquier célula nucleada de un endotermo mediante un proceso activo y una vez dentro de ella se aloja en una vacuola denominada vacuola parasitófora donde queda protegido de ser atacado por las defensas de la célula (Dubey, 2014). En el interior de la vacuola el parásito se reproduce de forma asexual por endodiogenia, proceso por el cual se forman dos células hijas dentro de la célula parental, consumiendo a esta última. Los eventos de endodiogenia se dan cada 6 a 8 horas *in vitro* hasta que la célula hospedera queda llena de parásitos (cerca de 64 a 128 individuos). Por último, ésta es lisada por un mecanismo activo, denominado “egreso,” liberando los parásitos al medio (Radke & White, 1998; Blader et al, 2015). Esta proliferación dispara una respuesta inmune produciendo una infección aguda en el huésped la cual expone al parásito a un ataque por parte del sistema inmune. La forma en que el parásito evita ser descubierto, es diferenciándose en “bradizoitos” y formar quistes tisulares, siendo la respuesta inmune la desencadenante de esta diferenciación. La forma latente de la infección, el bradizoíto, es ligeramente diferente del taquizoito. El bradizoíto se encuentra dentro de quistes tisulares mayormente en el tejido muscular y nervioso del hospedero, constituyendo una infección crónica. Dentro de los tejidos se incluyen ojos, músculo cardíaco y esquelético, y cerebro; además, en menor medida, se pueden encontrar en órganos viscerales (Sogin & Silberman, 1998). Sin embargo, el bradizoíto no es un organismo estático, regularmente rompe su vacuola parasitófora (quiste tisular) y lisan su célula hospedera para invadir nuevas células (Halonen & Weiss, 2013). El bradizoíto constituye una estrategia del parásito para ocultarse dentro del hospedador sin ser detectado por el sistema inmune, a la espera de que el individuo sufra una caída en el mismo que propicie la diferenciación de los bradizoitos en taquizoitos (reactivación) permitiendo así la proliferación del parásito. Asimismo, los quistes tisulares pueden ser ingeridos por algún depredador del huésped, los bradizoitos son liberados por las enzimas del tracto digestivo e infectan el enteroepitelio para posteriormente diferenciarse en taquizoitos y así establecer nuevamente una infección aguda que se propaga por los distintos tejidos de un nuevo hospedero. De esta forma se completa la fase asexual del ciclo.

Por otro lado, existe la fase sexual que se da exclusivamente en los felidos. Esta comienza cuando un gato consume carne o vísceras de un animal infectado con quistes tisulares, taquizoitos, o es expuesto en un ambiente contaminado con ooquistes. El período prepatente se define como el intervalo de tiempo que existe entre que el gato ingiere *T. gondii* en alguno de sus estadios y libera los ooquistes al medio, su duración varía en función del estadio del parásito que infecta: de 3 a 10 días en el caso de quistes tisulares y de 19 días o más en el caso de taquizoitos y ooquistes (Dubey & Frenkel, 1972, 1976; Dubey, 1996). Los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares son liberados por acción de proteasas presentes en el estómago e intestino delgado, estos son capaces de resistir el pasaje por el tracto

digestivo hasta llegar al intestino delgado, donde penetran en el enteroepitelio e inician ciclos de reproducción sexual y asexual (Dubey & Frenkel, 1972). Dentro de las células epiteliales *T. gondii* se diferencia en un nuevo estadio conocido como esquizonte. Este es el nombre que recibe la célula parental que produce los precursores de los gametos, los merozoitos. A su vez los merozoitos se diferencian en gametos femeninos y masculinos (macro y microgametos, respectivamente). El gameto masculino tiene dos flagelos que los utiliza para nadar y llegar al gameto femenino a fecundarlo. Posteriormente se forma una pared alrededor del gameto fertilizado para dar lugar a la formación de ooquistes, estructuras de resistencia que son liberadas al lumen del intestino del gato mediante la ruptura de las células epiteliales una vez maduros. En el lumen, los ooquistes permanecen sin esporular hasta que son expulsados con la heces del gato. Una vez en el exterior, los ooquistes esporulan, dando

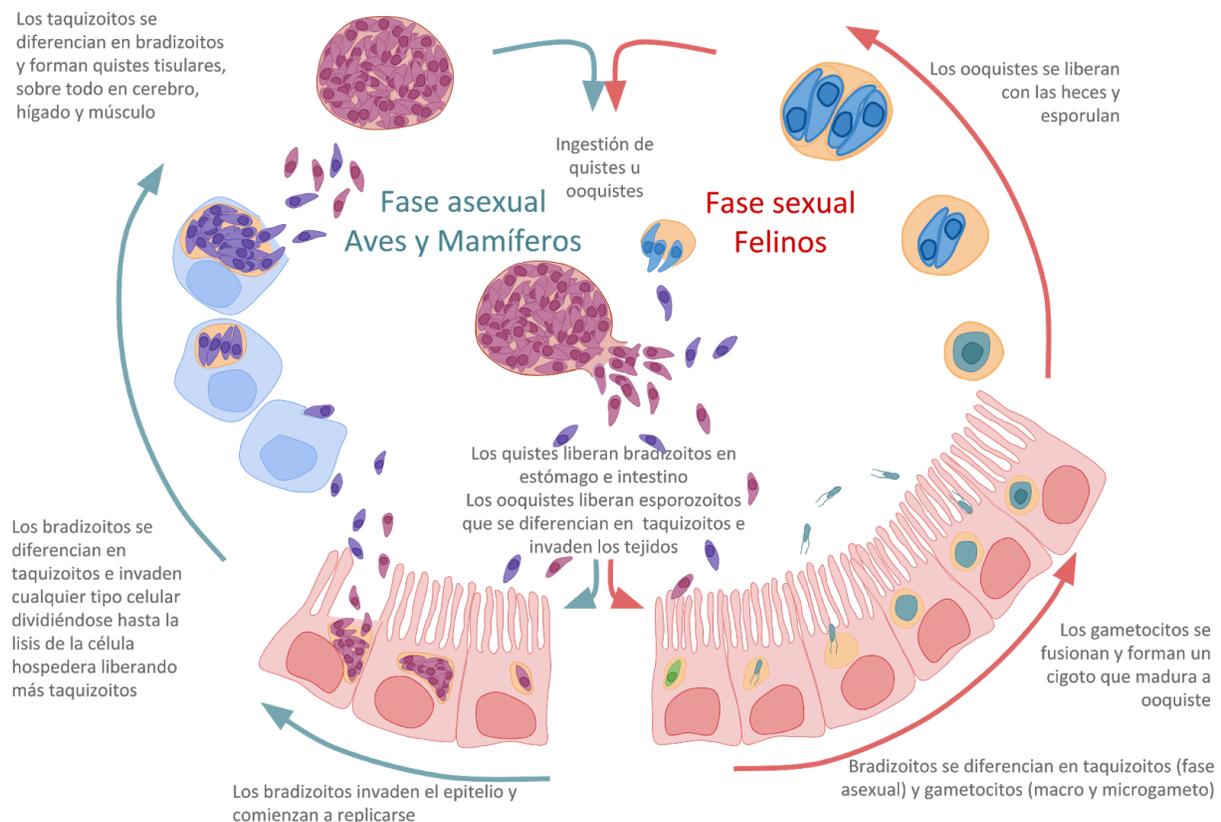


Figura 2. Ciclo de vida de *T. gondii*. En el mismo se pueden distinguir dos fases. Por un lado una fase asexual en donde los parásitos se replican clonalmente en cualquier hospedero endotermo, los bradizoitos liberados de los quistes o esporozoitos de los ooquistes invaden las células del hospedero y se diferencian en taquizoitos para así amplificar su población. Luego los mismos vuelven a diferenciarse en bradizoitos y se enquistan, preferentemente en tejidos del cerebro, hígado y músculo. La fase asexual se completa cuando los quistes tisulares son liberados al medio a través de depredación e ingesta de la carne contaminada. La fase sexual se da exclusivamente en félidos y una vez que los bradizoitos llegan al intestino delgado luego de la ingesta de ooquistes presentes en el ambiente o de carne con quistes, estos se diferencian en taquizoitos o en macro y microgametos. Estos dos últimos son los gametocitos que se van a fecundar para dar lugar a un cigoto que, posteriormente se va a diferenciar en ooquiste. Los mismos son expulsados con las heces del gato y una vez fuera esporulan generando ocho esporozoitos por ooquiste, que una vez que se distribuyen contaminando el ambiente pueden ser consumidos accidentalmente por

cualquier endotermo incluido los félidos y completando una fase sexual o asexual dependiendo del huésped. Ilustración realizada por Mariana Ruiz Villareal.

lugar a ocho esporozoitos, volviéndose de esta forma infeccioso. La esporulación es acompañada de un cambio en la morfología del ooquiste de esférico a ovoide. Finalmente, los ooquistes quedan libres en el ambiente, contaminando el suelo, el agua, plantas, que luego son ingeridos accidentalmente por algún endotermo, para así comenzar con una nueva fase asexual o sexual en el caso de los félidos.

Existe un solapamiento donde se pueden cruzar ambos ciclos, como previamente se había mencionado y se puede observar en la figura 2. Una posibilidad es la recién mencionada, en donde se produce el pasaje de ooquistes desde el hospedador definitivo a un hospedador intermediario diferenciándose los esporozoitos en taquizoitos, penetrando en el organismo a través del intestino y cumpliendo un ciclo asexual. La otra opción es que los quistes tisulares que permanecen en el hospedador intermediario sean ingeridos por un felido a través de la depredación, de esta forma se produce el cruce desde un ciclo asexual con un hospedador intermediario hacia un ciclo sexual con el hospedador definitivo. Los quistes tisulares son reactivados por los fluidos del tracto digestivo del gato y los bradizoitos liberados se alojan y diferencian en el enteroepitelio del gato para continuar con el ciclo (Black & Boothroyd, 2000; Dubey, 2014).

1.3 Ciclo lítico

En la fase asexual del ciclo de vida de *T. gondii* los esporozoitos que se diferenciaron a taquizoitos durante su pasaje por el tracto digestivo de un endotermo, logran colonizar el resto del organismo a través de la invasión de la célula hospedera, replicándose dentro de ésta y el posterior egreso mediante la lisis. De esa forma el taquizoito se va propagando entre las células del hospedero mediante sucesivos ciclos de invasión, replicación y lisis, denominado ciclo lítico. El ciclo lítico y los daños tisulares que genera, son los principales protagonistas en una infección aguda con *T. gondii*.

1.3.1 Invasión

Una vez dentro del hospedador, el parásito es capaz de desplazarse sobre superficies mediante movimientos de deslizamiento. La ejecución del movimiento inicia con la exocitosis de micronemas en el ápice conteniendo moléculas de adhesión las cuales se insertan en la membrana del parásito, a su vez estas proteínas reconocen glucosaminoglicanos de la matriz de las células hospederas. La inserción de estas moléculas en la membrana anclan en la cara citoplasmática filamentos de actina que, propulsados por miosina son deslizados en dirección basal. A medida que el parásito va avanzando a su paso, en su región basal se produce la liberación de las interacciones catalizadas por proteasas rhomboid (Brossier et al, 2005). La invasión es un proceso activo, que depende de distintos componentes celulares siendo realizada por el zoito, forma no replicativa que se encuentra fuera de la célula. Al igual que un taquizoito, es una célula extremadamente polarizada, su extremo apical es el sitio por donde se inicia la invasión. Este contiene el centro organizador de microtúbulos (MTOC) que dirige la dinámica del citoesqueleto, las roptrias y micronemas, y en el extremo más apical se encuentra el conoide formado a partir de un polímero de tubulina que se extiende durante la invasión.

En *T. gondii*, así como en todos los apicomplejos, existen organelos secretores exclusivos para la función invasora. Ellos son: roptrias, micronemas y gránulos densos; son secretados en dicho orden y el

contenido de ellas están involucrados en la adhesión, motilidad y formación de la vacuola parasitófora (Striepen et al, 2007). El primer paso es el reconocimiento de la superficie celular por parte del taquizoito. Este es mediado principalmente por una familia de proteínas ancladas en toda la superficie del taquizoito denominada SAG1. Estas reconocen proteoglicanos sulfatados de la potencial célula hospedera (He et al, 2002), sin embargo SAG1 no es la única proteína implicada ya que cepas mutantes *Sag⁻* conservan la capacidad de adhesión aunque lo hacen de forma menos eficiente. Seguido del reconocimiento inicial, se inicia la formación de interacciones más estrechas mediante la secreción de proteínas contenidas en las micronemas y roptrias en el ápice del parásito, denominadas uniones móviles (moving junction, MJ). A grandes rasgos, las roptrias secretan proteínas llamadas RONS formando un complejo que atraviesa la membrana y se ancla al citoesqueleto del hospedero. Por otro lado las micronemas secretan la proteína AMA1 (Straub et al, 2007; Mital et al, 2005) la cual permanece unida a la superficie del parásito formando una interacción cooperativa con el complejo de RONS para formar la MJ (Kafsack et al, 2007).

Una vez que el parásito establece contacto con la célula hospedera se forma un anillo sobre la membrana de la última por el cual el parásito se transloca. Inmediatamente el parásito comienza a invaginar la membrana de la célula hospedera para internalizarse. Como resultado de esta invaginación se forma una vacuola que contiene al parásito durante su estadía intracelular, denominada vacuola parasitófora, cuya membrana se origina a partir de la membrana plasmática del hospedero. Esta membrana sufre las modificaciones necesarias para la sobrevivencia del parásito. Durante la formación de la vacuola parasitófora las MJ cumplen la función de excluir proteínas transmembrana de la membrana precursora de la vacuola y así evitar el reconocimiento por parte de la maquinaria intracelular involucrada en el tráfico vesicular, que potencialmente podría exocitar la vacuola con los parásitos (Mordue et al, 1999). La membrana que forma la vacuola parasitófora tiene la capacidad de reclutar el retículo endoplasmático y las mitocondrias del hospedero (Prochet-Hennere & Nicolas, 1983; Sinai et al, 1997) cubriendo gran parte de la superficie vacuolar externa y estableciendo una íntima interacción que provee a los parásitos de factores tróficos (Sinai et al, 1997; Trotter & Voelker, 1994).

1.3.2 Egreso

El egreso tiene varias formas de desencadenarse que van a depender de la presencia o no de una respuesta inmunológica y del estado microambiental celular. El daño producido por una respuesta de las células T CD8⁺ citotóxicas sobre la célula huésped conduce a una caída de K⁺ intracelular, lo que desencadena la salida de los taquizoitos (Persson et al, 2007). Por otro lado, existen mecanismos independientes de una respuesta inmune que amenace la integridad de la célula hospedera, que se basan en sensor cambios en la concentración de moléculas del ambiente a medida que el parásito se va replicando. Cuando se llega a determinado umbral de concentración (algo que indica que el parásito se ha dividido lo suficiente) se dispara el mecanismo de egreso mediante lisis celular. Uno de ellos involucra el ácido abscísico (ABA) el cual se va acumulando en la vacuola parasitófora a medida que el parásito se va replicando. Cuando la concentración de ABA supera cierto umbral, los parásitos accionan el egreso. El ácido fosfatídico recientemente se ha encontrado de que también cumple un rol similar al del ABA (Bisio et al, 2019). Se ha propuesto que el mecanismo de señalización que acciona el egreso está mediado por Ca²⁺ y cGMP (Nagamune et al, 2008).

1.4 Polaridad y ultraestructura celular del taquizoito

Debido a su fácil cultivo *in vitro* el taquizoito es una de las formas invasivas de *T. gondii* mejor estudiada. Como ya se mencionó, el taquizoito posee organelos comunes a otros organismos eucariotas como son retículo endoplasmático, ribosomas, un núcleo rodeado por una envoltura nuclear y una única mitocondria de morfología tubular, siendo este último un rasgo particular de estos organismos. Por otro lado, *T. gondii* tiene estructuras u organelos que son característicos de los apicomplejos, dentro de los que se incluyen organelos membranosos como roptrias, micronemas, gránulos densos, el apicoplasto y el películo. El apicoplasto surge como una novedad dentro de los Apicomplejos como producto de una endosimbiosis secundaria, se piensa que este deriva de los cloroplastos de las algas rojas las cuales fueron fagocitadas por el ancestro de los Apicomplejos. A pesar de ser un vestigio de cloroplasto, los apicoplastos no tienen actividad fotosintética; en cambio se cree que participan en la síntesis de ácidos grasos e isoprenoides (Roos et al, 2002). Un conjunto de sacos membranosos denominados individualmente como alvéolos rodea al organismo por debajo de la membrana plasmática, formando con esta última un complejo que se denomina películo, un rasgo común a todos los alveolados. Los alvéolos derivan de vesículas procedentes del sistema retículo endoplasmático-Golgi. Los alvéolos adyacentes se unen para formar un continuo denominado complejo de membrana interna (IMC) que es interrumpido en el extremo apical, por donde sobresale el conoide, y el extremo basal (Ferguson & Dubremetz, 2014).

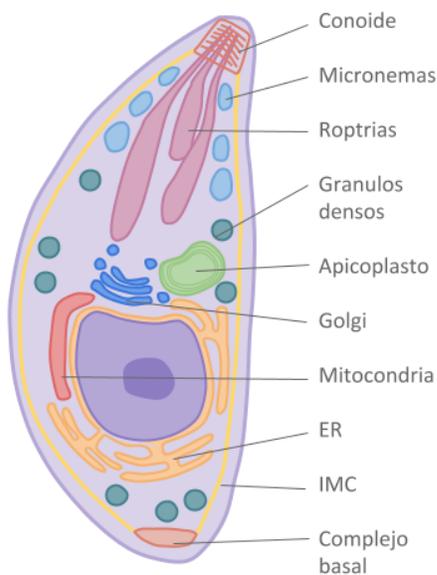


Figura 3. Estructura del taquizoito. En la misma se pueden observar los organelos secretores con función invasora que son las roptrias, micronemas y gránulos densos. Su único apicoplasto, vestigio de un evento de simbiosis con un alga y su única mitocondria; IMC, complejo de membrana interno; Conoide, estructura apical implicada en el proceso activo de invasión. Adaptado de Blader et al, 2015

1.4.1 Dando forma a la polaridad

La forma del taquizoito es arqueada, con un extremo apical agudo y un extremo basal más ancho, determinado por un citoesqueleto de microtúbulos corticales que se encuentra nucleado en el ápice y se extiende hasta dos tercios de la longitud de la célula por debajo del IMC. El complejo apical es una estructura común a los Apicomplejos constituyendo uno de los dos MTOC que posee el taquizoito, conocido como el conoide, clave en el proceso de invasión y proliferación (Morrissette & Sibley, 2002).

El conoide es la estructura central sobre el cual está formado el complejo apical, consiste en un polímero de tubulina en forma de cinta enrollada en forma espiralada. Durante la replicación, el primer indicio de la formación de las células hijas es la aparición de sus conoides y sus complejos apicales, los cuales constituyen el foco por donde se inicia el ensamblaje de sus citoesqueletos (Francia et al, 2012).

1.4.2 Un arsenal exclusivo: micronemas, roptrias y gránulos densos

Además del conoide como principal elemento mecánico durante la invasión, existen en *T. gondii* un juego de organelos membranosos cuyos contenidos están implicados en el proceso de movilidad, invasión y establecimiento de la vacuola parasitófora, como se especificó anteriormente. Las micronemas, roptrias y gránulos densos, son secretados de forma secuencial durante el proceso de invasión (Sibley, 2003).

Las micronemas se ubican más apicalmente por detrás del conoide, almacenan proteínas ligando que una vez secretadas mediante la movilización del Ca^{2+} intracelular, se unen a receptores de la superficie de la célula hospedera. Estas se denominan conjuntamente como MICs (micronemal) (Lovett & Sibley, 2003). Las MIC se pueden observar mediante microscopía electrónica de barrido como vesículas electrón densas.

En dirección más basal, le siguen la roptrias. De forma alargada, se extienden desde el conoide hacia el núcleo. Se puede diferenciar una región bulbosa más ancha hacia el núcleo y una región angosta llamada cuello hacia el conoide. Su contenido también se observa electrón denso, en donde se incluyen proteínas que una vez secretadas, se unen de forma cooperativa a proteínas procedentes de las micronemas (AMAs) para así formar las “moving junctions”, protagonistas del movimiento de deslizamiento (denominado en inglés “gliding”) que desencadena en una invasión de la célula hospedera exitosa (Opitz & Soldati, 2002). Además las proteínas de las roptrias participan en el reclutamiento de membrana del hospedero para la formación de la vacuola parasitófora (Sinai & Joiner, 2001).

Por último, los gránulos densos se ubican más posterior con respecto a las roptrias y micronemas, y a diferencia de estos últimos, se ha observado la presencia y secreción de los mismos de forma continua a lo largo de su desarrollo intracelular, incluso en estadíos no invasivos como el bradizoíto (Dubremetz et al, 1993; Cesbron-Delauw et al, 1996). En base a esto, se ha propuesto que la secreción de los gránulos densos (GRAs proteins) son relevante para el establecimiento del microambiente dentro de la vacuola parasitófora mediante modificaciones de la membrana que contribuyen a la captación de nutrientes y la eliminación de proteínas que dirigen la fusión de los lisosomas (Mercier et al, 2005; Sibley et al, 1995), además otras GRAs se dirigen al citoplasma y al núcleo del huésped, para así reprogramar vías regulatorias en pro de facilitar la supervivencia y desarrollo intracelular del parásito (Hakimi, Olias, & Sibley, 2017). Dentro de las modificaciones que introduce el parásito, se encuentra el reclutamiento de las mitocondrias y del retículo endoplasmático del huésped alrededor de la vesícula parasitófora (Pernas et al, 2014; Sinai et al, 1997).

1.5 Un organismo modelo del filo Apicomplejos

Dentro del filo Apicomplejo, *T. gondii* ha demostrado ser un buen modelo representativo. Es una especie que se puede mantener y aislar en cultivo fácilmente, sin un gran riesgo biológico. Una buena eficiencia en las transfecciones y una dotación cromosómica haploide, así como la secuencia y anotación de su genoma, permitió que manipulaciones genéticas puedan realizarse (Kim & Weiss, 2004). Mediante

transfección es posible introducir secuencias de epítopes tags o genes reporteros adyacentes a la secuencia de una proteína, o la producción de proteínas heterólogas. La introducción de marcaciones con GFP o epítopes tags como HA (hemaglutinina), c-myc o BB2 (Striepen et al., 1998; Bastin et al., 1996) ha permitido el rastreo, localización y estudio de la biogénesis de proteínas y organelos. Sin embargo, al ser parásitos intracelulares obligados existe una limitación en la utilización de marcadores de selección que permitan poner en evidencia a los transfectantes, ya que las drogas empleadas deben lograr atravesar el ambiente intracelular de la célula hospedera. Se encuentran disponibles cloranfenicol acetiltransferasa (cat), dihidrofolato reductasa (DHFR), hipoxantina xantina guanina fosforibosil transferasa (HXGPRT), bleomicina (ble) y triptófano (trp) (Kim & Weiss, 2004).

Se ha logrado generar sistemas heterólogos en los cuales se expresan genes de otras especies de apicomplejos que no se pueden cultivar fácilmente o directamente no se puede hacer, y que además la expresión de tales proteínas no puede darse de forma apropiada en otros organismos como bacterias o levaduras debido a que procesos post traduccionales que determinan su estructura nativa no pueden darse correctamente. Tal es el caso de *Cryptosporidium parvum* que hasta recientemente no había sido posible cultivarlo *in vitro* ni transfectarlo, pero mediante la expresión de algunos de sus genes en *T. gondii* se dió a conocer la funcionalidad y la bioquímica de sus proteínas. *Plasmodium*, el agente etiológico de la malaria, si bien es posible cultivarlo, la generación de sistemas heterólogos en *T. gondii* que expresan proteínas del primero podrían ser potenciales sistemas para la generación de vacunas contra la malaria (Birkholtz et al, 2008; Narayan et al, 2018).

En conclusión, *T. gondii* posee un fenotipo que se presta para la realización de manipulaciones experimentales, siendo un organismo representativo del filo Apicomplexa por su fácil manipulación.

1.6 Ciclo celular de *Toxoplasma*

La exploración del ciclo celular y de división celular en parásitos Apicomplejos ha sido un punto clave para entender los mecanismos de patogénesis, ya que el aumento del número de parásitos, producto de la división celular, y la consecuente lisis de la célula hospedera constituye el principal mecanismo a través del cual estos organismos causan daño celular y tisular.

El ciclo celular en taquizoitos de *T. gondii* comienza con la fase G1 (gap 1), que en su principio está abocado a la síntesis de proteínas y componentes de los RNAs, seguido de un cambio en la producción hacia componentes necesarios para la síntesis de ADN. Al igual que en otros eucariotas, los cromosomas de *Toxoplasma* son replicados en la fase S. Luego le sigue una presunta muy acotada o ausente G2. De todos modos la carencia de un G2 discernible es algo frecuente en eucariotas unicelulares, incluyendo los apicomplejos. Por último, en la fase M los cromosomas segregan en la mitosis y se forma la progenie celular (Radke et al, 2001; Striepen et al, 2007). En esta última fase es donde existen particularidades en cuanto a la organización nuclear y celular. Existe un mecanismo de mitosis ampliamente usado por la mayoría de los grupos eucariotas unicelulares, incluidos los Apicomplejos, en donde la mayor parte de la envoltura nuclear permanece íntegra a lo largo de toda la mitosis (Speer & Dubey, 1981; Makarova & Oliferenko, 2016). Este mecanismo recibe el nombre de mitosis semi-cerrada, la apertura de la envoltura nuclear se da sobre el huso mitótico, y posteriormente esta se cierra luego de la mitosis. A diferencia de lo que ocurre en citocinesis convencional, en donde la división física de la célula madre es conducida mecánicamente por un anillo contráctil, la citocinesis en organismos Apicomplejos es llevada a cabo por "budding". Este consiste en el ensamblaje de las células hijas dentro del citoplasma o sobre la superficie

de la célula progenitora. En función de cómo se da la reorganización celular al momento de generar las células hijas (budding), se puede distinguir tres mecanismos que se dan en apicomplejos: endodiogenia, endopoligenia y esquizogonia. Los primeros dos mecanismos tienen en común que el ensamblaje de las hijas se da dentro de la célula parental, lo que las diferencia es el número de rondas de replicación del ADN que se da antes de que se individualice la progenie. La endodiogenia, consiste en una ronda de duplicación del ADN y mitosis seguida del ensamblaje de dos células hijas dentro de la célula progenitora y la posterior citocinesis. En la endopoligenia, la célula del parásito pasa por varias rondas de replicación sincrónicas del material genético, formando un núcleo poliploide que posteriormente realizará una última ronda de replicación para así dar lugar a la gemación de los núcleos hijos y al ensamblaje de las células hijas. Por último, en la esquizogonia, la célula del parásito se transforma en un sincitio a través de varias rondas asincrónicas de mitosis y cariocinesis, salvo la última ronda, en donde todos los núcleos se replican al mismo tiempo para luego dar lugar al ensamblaje en simultáneo de todas las células hijas las cuales geman desde el plasmalema de la madre (Ferguson et al, 2008).

Una vez que las células hijas se han formado estas emergen de la vacuola parasitófora lisandola y a la célula que la contiene. Notablemente, una misma especie dentro del filo tiene la capacidad de replicarse por múltiples mecanismos. El mecanismo de "elección" varía según el nicho celular y la forma evolutiva en el que se encuentre el parásito. *Toxoplasma* realiza endodiogenia y endopoligenia, siendo el último el mecanismo utilizado en la mayor parte de sus hospederos y estadios de su ciclo de vida.

Los mecanismos de regulación del ciclo celular en apicomplejos es sujeto de intensa investigación actualmente. Es una incógnita cómo la célula del parásito sortea los mecanismos de las células eucariotas para evitar replicar el ADN más de una vez por ciclo celular. Más aún, en el caso de la esquizogonia, en la cual los núcleos se replican de manera asincrónica dentro de un mismo citosol (con excepción de la última ronda de replicación) sugiere que estos no están sujetos a la regulación de factores citosólicos solubles. Por otro lado, es claro que una de las principales características de la división es la habilidad de posponer la citocinesis para dar lugar a varias rondas de replicación y división nuclear.

Se ha descrito que parte de la regulación del avance del ciclo celular en apicomplejos es dado por el complejo formado por el centrosoma y el huso mitótico, el cual tiene el poder de controlar de forma independiente la cariocinesis y la citocinesis por medio de anclajes físicos. Durante la mitosis los cromosomas no se condensan en cromátidas individualizadas, la forma en que sortean el problema de la segregación es manteniendo de forma permanente durante todo el ciclo celular una unión física entre los cromosomas y el centro organizador de microtúbulos (MTOC)

Este fenómeno permite explicar la capacidad de los apicomplejos de desacoplar o descoordinar de manera programada las diferentes fases de su ciclo celular. A su vez, se han descrito quinasas que se piensa funcionan de manera homóloga a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que en apicomplejos se denominan CRKs (White & Suvorova, 2018). Esta diversidad de mecanismos permiten controlar la escala de proliferación. Además permiten que a partir de una sola célula se pueda producir una progenie numerosa, importante durante la propagación del parásito y la colonización de nuevas células del hospedero. Esta capacidad de colonizar es la que le otorga una amplia distribución ambiental (Fracia & Striepen, 2014).

1.6.1 Regulación

En un ciclo celular convencional, la principal premisa que lo rige es un evento de duplicación del material genético por cada ronda de división celular; para ello consta de puntos de control que básicamente corrobora que funciones como el crecimiento celular, la completa replicación de los cromosomas y el correcto anclaje de los cromosomas al huso mitótico, se hayan dado. Sobre fines de G1, previo al inicio de la replicación los taquizoítos de *T. gondii* pueden decidir seguir por el camino de una replicación del material genético por cada división celular (tal es el caso de la endodiogenia), o realizar varias rondas de replicación para luego generar una progenie múltiple como en el caso de la endopoligenia y la ezquizogonia. Se ha demostrado en taquizoitos que el centrosoma, de estructura bipartita, juega un papel importante en la toma de esta decisión (Suvorova et al, 2015).

Como es bien conocido, las quinasas dependientes de ciclina (Cdk) son enzimas que fosforilan y activan proteínas que ejecutan o regulan distintos eventos del ciclo celular de forma cíclica. La actividad cíclica de las Cdks es regida y activada mediante la formación de un complejo entre la Cdk y distintos tipos de ciclinas. La ciclinas, como su nombre lo indica, son sometidas a ciclos de síntesis y degradación, siendo esta oscilación la que pauta la actividad cíclica de la Cdk. En contraste, los niveles de Cdk permanecen constantes. En función de la clase de ciclina que se asocia con la Cdk, se van a establecer los blancos a fosforilar siendo éstos característicos de cada checkpoint. Un incremento en la actividad Cdk en la transición de G2 a M, aumenta la fosforilación de proteínas en muchas células eucariotas que controlan la condensación de los cromosomas, la ruptura de la envoltura nuclear y el ensamblaje del huso mitótico.

En *Toxoplasma*, el ciclo celular de taquizoitos conserva rasgos topológicos que tradicionalmente existen en otros organismos, aunque no existen los puntos de control que usualmente se observan en células de mamíferos. Los mecanismos de regulación usados por *Toxoplasma* han divergido como producto del recorte genómico seguido por el surgimiento de novedades durante su expansión genómica que ha tenido este filo en el curso de su evolución. Se han encontrado proteínas ortólogas a las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina de mamíferos, pero aún no se conocen con precisión sus funciones (Alvarez & Suvorova, 2017), sin embargo se ha visto que existe un paralelismo en los tipos de señalización que son generadas y reconocidas por ortólogos de eucariotas, conduciendo a su vez a resultados similares (White & Suvorova, 2018). Estudios filogenéticos indican que el ancestro de los apicomplejos poseyó una maquinaria reguladora basada en una quinasa a la cual se le unían distintos tipos de ciclinas A-, B- D- y E-. Los mecanismos exclusivos que aparecen en este grupo se encuentran asociados al centrosoma (Suvorova et al, 2015) y al citoesqueleto (Anderson-White et al, 2012), ambas estructuras vinculadas a la cariocinesis y al budding respectivamente.

1.7 El centrosoma como componente clave en la regulación del ciclo celular: Modelo de centrosoma en apicomplejos

Un componente clave en la regulación del ciclo celular en los apicomplejos es el centrosoma. El centrosoma es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) en las células eucariotas, desarrollando funciones críticas en la división celular, movilidad y señalización. Es una estructura que estuvo presente en el ancestro común de los eucariotas, pero algunos grupos como las plantas vasculares y las levaduras lo perdieron.

1.7.1 El modelo canónico

El modelo canónico de centrosoma es el que se encuentra en las células de mamíferos, siendo este en el que mejor se ha definido su estructura y función. Están formados por un par de centriolos dispuestos ortogonalmente uno respecto al otro, rodeados por una compleja nube molecular denominada matriz pericentriolar (PCM), la cual nuclea y organiza los microtúbulos que conforman el citoesqueleto y, en algunos tipos celulares, los cilios y flagelos. Cada centriolo está compuesto por nueve triplete de microtúbulos que se disponen simétricamente formando un cilindro. Cada triplete está formado por tres microtúbulos que desde el centro hacia la periferia se denominan A, B y C, siendo el microtúbulo A el único que está completo (formado por trece protofilamentos). A su vez los tripletes adyacentes se conectan a través de un enlace entre el microtúbulo A y el C del siguiente. Se suele distinguir una región proximal y otra distal, ambas con distintas propiedades. La simetría radial surge durante la biogénesis del centriolo a partir de una estructura proximal denominada cartwheel (Gönczy, 2012). Se ha visto que el cartwheel es una estructura conservada a lo largo de diversos taxones. Una sección transversal de la región proximal del centriolo revela un tubo central del cual emanan nueve radios que conectan con los microtúbulos A. Criotomografías han revelado la presencia de anillos apilados sobre un eje central de 22nm de diámetro aproximadamente y espaciado verticalmente por 8.5nm. Cada anillo acomoda nueve homodímeros de la proteína SAS-6, la cual es necesaria para el ensamblaje del cartwheel. SAS-6 posee un dominio N-terminal globular seguido por una extensión en coiled-coil y un C-terminal sin estructura definida. SAS-6 homodimeriza a través de sus coiled-coil y oligomeriza mediante interacciones entre los dominios N-terminal para formar el anillo de nueve ejes (Azimzadeh & Marshall 2010). Existen varias razones para postular la idea de que el cartwheel es la estructura en la cual comienza el ensamblaje de un nuevo centriolo; se ha observado este al inicio del ensamblaje centriolar sin microtúbulos. Además los mutantes que carecen de proteínas del cartwheel no son capaces de ensamblar centriolos, o si lo hacen, su simetría es alterada.

Así como se puede describir un ciclo celular en donde se producen cambios secuenciales en distintos componentes celulares, implícito dentro de éste se puede distinguir un ciclo centrosomal que se da en paralelo (Figura 4). En este se generan los centriolos hijos a partir de los centriolos parentales a través del reclutamiento secuencial de distintos componentes vinculados al ensamblaje del centriolo naciente, encontrándose en íntima coordinación y regulación con el ciclo celular. Esto es un rasgo muy conservado en la cual existen varias proteínas homólogas que cumplen las mismas funciones entre las distintas especies. La duplicación de los centriolos parte de la generación de un centriolo hijo tomando como punto de génesis a un centriolo parental pre-existente. Como resultado, se obtienen dos pares de centriolos sobre fines de G2, que durante M se separará cada nuevo par por separado para dar lugar a la formación del huso mitótico. La replicación semiconservadora del centrosoma le atribuye distintas propiedades al componente progenitor y al componente sucesor. Aún quedan por ser determinados los mecanismos que establecen que se dé un evento de replicación por ciclo celular. El núcleo de la maquinaria necesaria para la biogénesis centriolar aparentemente recae sobre un pequeño número de proteínas. Dentro de las más relevantes, en células eucariotas superiores, están la PLK4 (*Polo like kinase 4*) y SAS-6, siendo crítico los niveles de ellas para el ensamblaje (Bettencourt-Dias, 2005; Kratz et al, 2015).

El ciclo comienza en la transición de G1 a S con la formación de un procentriolo adyacente a cada uno de los centriolos parentales. Este evento es disparado por la PLK4. Como resultado de la actividad se logra estabilizar y reclutar a SAS-6 en el sitio precursor del futuro centrosoma. Una vez estabilizado SAS-6, se

dispara la duplicación. SAS-6 forma el andamiaje del cartwheel, esencial para el inicio de la formación de los procentriolos el cual es acompañado del reclutamientos de Cep135 y Centrina (Ohta et al, 2002). Centrina es una proteína que se encuentra en el lumen de los centrosomas (Gonczy, 2012). La elongación de los túbulos centriolares se da en paralelo a la formación del cartwheel mediante la polimerización de γ -tubulina alrededor del andamio del cartwheel en la región proximal del procentriolo. La incorporación de los dímeros de tubulina en el extremo + del centriolo es dada y estabilizada por CPAP/SAS4 y Centrobina; mientras que, el control de la longitud del centriolo es el resultado de moléculas con funciones antagónicas (Gudi et al, 2011). La eliminación de CP110 perjudica el control de la longitud resultando en centriolos más grandes, por otro lado, la sobreexpresión de Kif24 rescata los efectos producidos por la delección de CP110 actuando como despolimerizador de microtúbulos (Kobayashi et al, 2011). También se ha encontrado que los niveles de POC1 se correlacionan con la longitud centriolar (Azimzadeh et al, 2009). La elongación final se da sobre G2 y M, la proteínas que participan son CPAP, POC5 y Odf1.

Los procentriolos se convierten en centriolos hijas después de haber pasado por la mitosis. Luego las hijas se diferencian en centriolos madres adquiriendo apéndices distales y subdistales, alcanzando la madurez en el siguiente ciclo. Los apéndices distales están involucrados en el reclutamiento de los cuerpos basales en la membrana durante la ciclogénesis. Los apéndices subdistales están implicados en el anclaje y nucleación de los microtúbulos (Kodani et al., 2013).

Algo que es importante mencionar, es que a lo largo del ciclo de duplicación se forman y rompen conexiones entre los centriolos, sea entre centriolos progenitores o entre progenitor y procentriolo, importantes para la correcta segregación de los mismos en la mitosis y para la estabilidad del citoesqueleto. El G1-G2 linker se encuentra formado por tres proteínas: C-Nap1 (aka CEP250) (Fry et al., 1998), rootletin (Bahe et al, 2005) y LLRC45 (He et al., 2013). La dinámica del linker está mediada por la fosforilación y desfosforilación de CEP250 por parte de Nek2 y PP1 respectivamente. La fosforilación de CEP250 desencadena su disociación del linker permitiendo la separación de los centrosomas mientras que la actividad antagónica de PP1 la desfosforila (Fry et al., 1998; Mayor et al, 2002; Mi et al, 2007).

1.7.2 Hacia un modelo de centrosoma en *T. gondii*

En los taquizoitos se pueden diferenciar dos MTOC, el primero es el formado por el complejo apical en el conoide, mientras que el centrosoma constituye el segundo. Los centrosomas de *T. gondii* al igual que los canónicos, están formados por un par de centríolos y su duplicación se da sobre la transición de G1 a S. Por otro lado, los centrosomas en apicomplejos difieren en su estructura ya que el par de centríolos que conforma el centrosoma adquieren una orientación paralela. Así mismo, cada centriolo está formado por singletes de microtúbulos en un arreglo de 9 dispuestos simétricamente en un cilindro bastante más corto comparado con los canónicos, 250 nm en *T. gondii* contra 700 nm en una célula eucariota tipo. Es responsable de la organización del huso mitótico, y es el punto de inicio del ensamblaje de las células hijas.

Actualmente se conoce la localización de siete proteínas no microtubulares que forman el complejo del huso mitótico de taquizoitos: CEP250, CEP250-L1, CEP530, ECR1, Crk5, MORN1, y EB1 (Suvorova et al, 2015; Courjol & Gissot, 2018). MORN1, se localiza solamente en la membrana que forma el centrocono; pero aún resta por saber cómo se determina y diferencia esta porción de membrana (Suvorova et al, 2015). La adición de un epítopo tag a CenH3 (una variante de la histona H3 que se encuentra en los centrómeros) ha permitido el seguimiento de los cromosomas a lo largo de la mitosis, revelando un

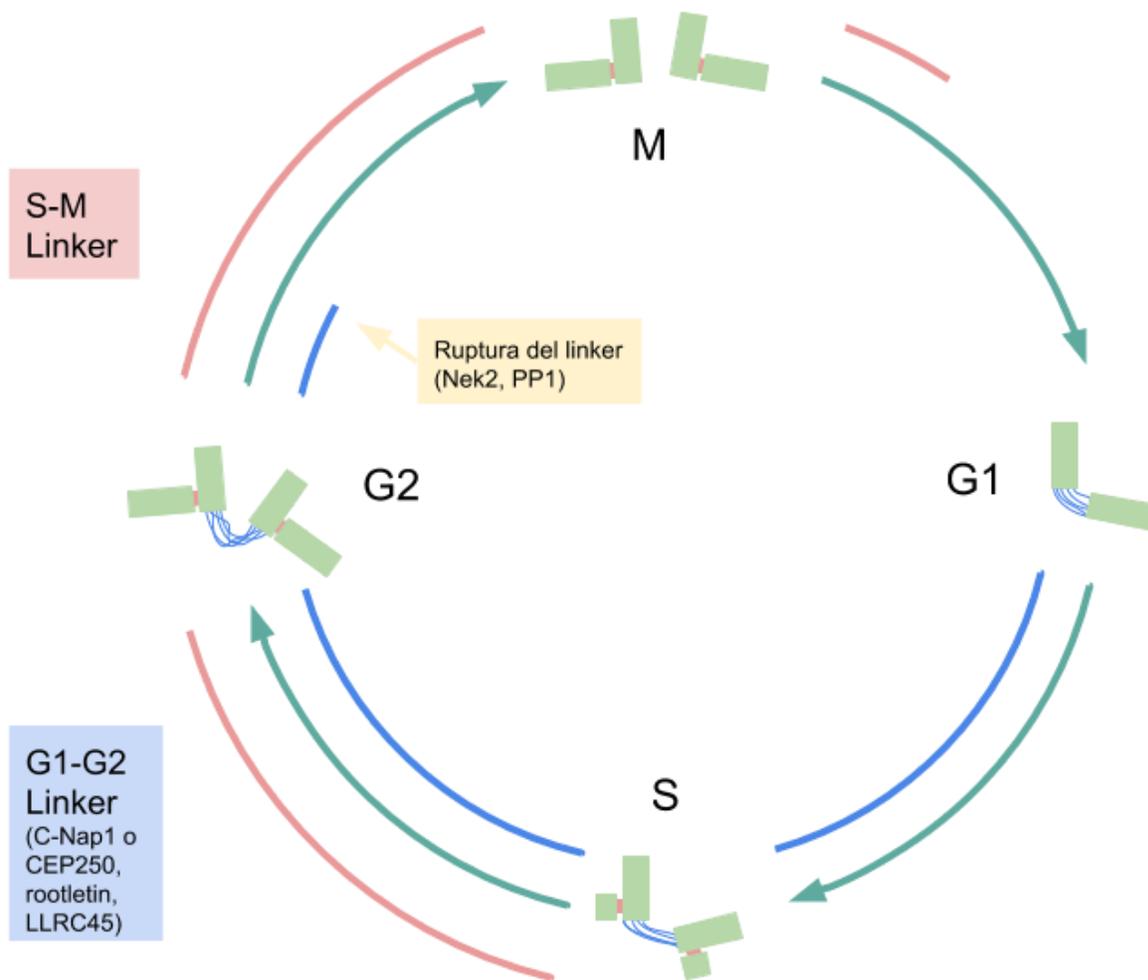


Figura 4. El ciclo de replicación centrosomal ocurre en paralelo al ciclo celular. El G1-G2 linker (azul) mantiene los centríolos parentales unidos a medida que se sintetizan los centríolos hijos durante la fase S, de esta forma evitándose que los mismos se separen prematuramente antes de la fase M. La disolución de la unión durante la transición entre G2 y M permite la formación de polos nucleadores de los husos mitóticos. Adaptado de Nigg y Stearns, 2011.

punto en la periferia del núcleo donde nuclean todos los centrómeros. No solo durante la mitosis este punto de nucleación existe, sino que persiste a lo largo del ciclo celular, y su localización se da cerca del centrosoma. Puede ser que en esta región del núcleo, la replicación y condensación de los centrómeros sea diferencialmente regulada del resto de la cromatina debido a la proximidad a factores regulatorios que están asociados al centrosoma. (White & Suvorova, 2018).

1.7.3 Eje centrocono-centrosoma-cinetocoro

Dentro de la organización intracelular particular de *T. gondii* se encuentra el centrocono, una estructura ligada al núcleo formada por el centrosoma y una porción diferenciada de la envoltura nuclear. Durante la mitosis el huso mitótico atraviesa la envoltura nuclear a través de poros especializados y enlaza los

cinetocoros al centrosoma. La envoltura nuclear del centrocono hasta ahora es posible diferenciarla por la localización exclusiva de MORN1, aunque aún resta por saber cómo se determina y diferencia esta porción de envoltura (Suvorova et al, 2015). A su vez, durante la mitosis del taquizoíto, los centrosomas duplicados en S mantienen contacto físico con los conoides de las células hijas emergentes al comienzo de sus ensamblajes (la estructura apical de la célula) a través de fibras, que se conocen como fibras “estriadas” (Francia et al., 2012). Las fibras están compuestas por proteínas que colectivamente se conocen como SFAs (striated fiber assemblins). Este anclaje físico durante la mitosis conecta el centrosoma al conoide de las células hijas emergentes a través de las fibras estriadas, y el centrosoma a los cromosomas (centrómeros) mediante los husos mitóticos, permaneciendo a lo largo de todo el ciclo celular. Estos enlaces son importantes para la célula, ya que no condensa sus cromosomas durante la profase. Los centrómeros se agrupan en una región periférica del núcleo cercana al centrocono durante todo el ciclo celular, aunque aún no se conoce su naturaleza, se especula de la existencia de alguna interacción con la envoltura nuclear más que de un huso de microtúbulos (Brooks et al, 2011; Francia & Striepen, 2014). Por tanto este mecanismo le permitiría mantener un conteo de los cromosomas y una correcta segregación de los mismos, sobre todo en estadios poliploides. Se ha demostrado que la disrupción de las fibras estriadas impide que la célula realice citocinesis pero no la mitosis. Esto revela la importancia de los anclajes físicos de los cromosomas ante la ausencia de check points (Francia et al., 2012).

1.7.4 Aspectos regulatorios del centrosoma

Desde un aspecto regulatorio, se ha sugerido que los centrosomas de *T. gondii* están organizados en dos dominios, un dominio interno y un dominio externo, los cuales estarían involucrados en la regulación de la mitosis y el inicio de la citocinesis, respectivamente (Suvorova et al., 2015). Ambos dominios se encontrarían en los extremos opuestos de los centríolos con entidades moleculares distintas, estando el dominio interno orientado hacia el núcleo celular y el dominio externo hacia el citosol. Esta organización le permitiría al parásito controlar separadamente los eventos de mitosis y citocinesis, permitiéndole determinar cuál mecanismo de replicación va a utilizar (Francia & Striepen, 2014; Suvorova et al., 2015). Los distintos componentes moleculares de los dominios y el rol que cumplen cada uno de ellos a lo largo del ciclo celular aún no se conocen completamente.

1.7.5 Diseccionando la ultraestructura

En una publicación de Morlon-Guyot y colaboradores en 2017 se propone un modelo de centrosoma para *T. gondii* en donde, basados en la identificación *in silico*, se describe la localización de potenciales proteínas ortólogas con respecto a las de mamíferos en distintas localizaciones centriolares como son, el lumen, los microtúbulos, los apéndices, los conectores y la matriz pericentriolar. A nivel del lumen, se ha identificado ortólogos de SAS-6, TgSAS-6 (de Leon et al., 2013; Hodges et al., 2010; Suvorova et al., 2015) y de Centrina 1, 2 y 3 (Hu, 2008; Hu et al., 2006), importantes para la génesis centriolar. En lo que respecta a los microtúbulos, existe un alto nivel de similitud de las secuencias de tubulinas de protozoarios y vertebrados, sin embargo en el taquizoíto la tubulina exhibe modificaciones postraduccionales que no se encuentran en otros organismos. Estas particularidades sugieren que las mismas coordinen interacciones críticas para estructuras especializadas como el conoide (Morlon-Guyot et al., 2017). En tanto a los apéndices que se adquieren durante la maduración, como se mencionó previamente se pueden distinguir apéndices distales y subdistales con funciones diferenciadas. En el

genoma de *T. gondii* se ha identificado ortólogos de apéndices subdistales de centriolin, CEP170, Kif24, y EB1 (Morlon-Guyot et al., 2017), cuyas funciones presuntamente están involucradas en el anclaje de los microtúbulos. Mientras que para los apéndices distales, se encontró solamente un ortólogo: CEP164, para el cual se ha propuesto que es necesario para el ensamblaje del apéndice distal y el anclaje del cuerpo basal (Morrissette, 2015). Por último, en la conexión G1-G2 linker que existe entre los centriolos madre e hija de mamíferos, se encontró efectivamente un ortólogo para CEP250 y un juego de proteínas “CEP250-like” de localización centrosomal pero de funciones aún no definidas (Suvorova et al., 2015). Además el genoma parece codificar para Nek2 y PP1, cuyas funciones en la modulación de la polimerización del G1-G2 linker en mamíferos, son antagónicas.

Aún resta mucho por saber acerca de quiénes son los actores que componen y llevan a cabo la dinámica centrosomal, es posible que muchas de las funciones que quedan por resolverse estén siendo llevadas a cabo por mecanismos divergentes, proteínas no homólogas filogenéticamente que sí adquirieron homología funcional respecto a las proteínas centrosomales de mamíferos. De hecho, en el trabajo de Morlon-Guyot y colaboradores, sostienen que cerca del 60% de las proteínas expresadas por parásitos apicomplejos son denominadas como hipotéticas debido a que carecen de una clara homología con proteínas de función conocida.

1.8 Planteo del trabajo

En conclusión, se sabe que la división es un mecanismo de patogénesis, que es divergente mecanísticamente, y que su regulación se basa en mecanismos diferentes a los utilizados por las células animales. Se sabe además que el centrosoma se encuentra al centro de estos procesos por tanto es relevante su caracterización desde aspectos genéticos, funcionales y estructurales. A partir de la secuencia del genoma de *T. gondii* se ha identificado una colección de secuencias que tienen cierto nivel de homología con genes centrosomales humanos, por lo que se especula que estas codifican para proteínas ortólogas que cumplen la misma función pero que difieren en sus secuencias nucleotídicas que las codifican. Estas diferencias adquieren relevancia ya que le aportan al centrosoma y a la división celular de *T. gondii* el carácter de divergente con respecto a otros organismos no apicomplejos, siendo posibles blancos para atacar la reproducción del parásito.

En el modelo propuesto por Morlon-Guyot y colaboradores se enlistan una serie de proteínas ortólogas y su potencial ubicación y función en el centrosoma de *T. gondii* basado en el análisis bioinformático de datos provenientes de secuenciación. Mediante estrategia de genética reversa, en este trabajo se propone el marcado de los potenciales ortólogos con un epítopo tag que permitirá identificar la localización de algunas de las proteínas de este modelo por inmunofluorescencia. Se le proporcionará a células de *T. gondii* un fragmento del extremo 3' del potencial ortólogo (inserto) el cual tiene fusionado el epítopo tag, esperándose de esta forma que se incorpore en el genoma (*knock-in*) mediante recombinación homóloga. Para llevar a cabo esto, se emplearán cepas de *T. gondii* carentes del sistema de reparación del ADN por recombinación no homóloga (NHEJ, Non-homologous end joining) y la tecnología de CRISPR-Cas que va a permitir mejorar la eficiencia de recombinación. Se ligará el inserto en vectores LIC (Ligation independent cloning), el cual proporciona el epítopo tag, y su co-transfección con el vector de CRISPR en cepas de *T. gondii* sensibles al cloranfenicol, permitirán seleccionar a los transfectantes. Se espera que los transfectantes incorporen en su genoma el inserto con el tag y

expresen la proteína tagueada, de esta forma es posible visualizarlas empleando inmunofluorescencia y así determinar si su localización es centrosomal u otra.

1.8.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo se enmarca en la validación del modelo de centrosoma propuesto y más específicamente, en lograr una aproximación a la localización y dinámica a lo largo del ciclo celular de determinadas proteínas ortólogas potenciales. Partiendo de la hipótesis de que los ortólogos de genes humanos que se encontraron en el genoma de *T. gondii* sí codifican para proteínas centrosomales o al menos estén implicadas en la dinámica centrosomal.

1.8.2 Objetivos específicos

- Clonar el fragmento 3' de la secuencia codificante de los genes ortólogos de PP1 y Poc1 en el vector LIC (del inglés ligation independent cloning).
- Generar los vectores de CRISPR con las respectivas guías para PP1 y Poc1 por mutagénesis.
- Producir parásitos transgénicos que por recombinación homóloga incorporen el inserto con el epítopo tag proporcionado por el vector LIC.
- Determinar la localización y dinámica de expresión durante el ciclo celular del PP1 y Poc1 por ensayos de inmunofluorescencia.

2 Materiales y métodos

2.1 Clonación en el vector pLIC_3HA_CAT

La primera estrategia llevada a cabo consistió en la clonación de fragmentos de la región 3' de los genes homólogos de PP1 y POC1 en el vector pLIC_3HA_CAT (Figura 5). Tal como se muestra en la Figura 5A los insertos fueron amplificados a partir de ADN genómico y ligados al vector pLIC_3HA_CAT a través de la generación de extremos cohesivos creados por la actividad exonucleasa de la enzima T4 DNA Polimerasa. La estrategia de clonación independiente de ligación (LIC) permite la incorporación de un inserto, en este caso el fragmento 3' de los homólogos de PP1 y POC1, en un vector sin la necesidad de emplear ligasa para el cierre de las mellas, en cambio se utiliza los mecanismos intrínsecos de las bacterias donde se transforma el vector luego de haber hibridado el inserto al mismo. El vector pLIC_3HA_CAT posee un sitio de inicio de replicación para *E. coli* el cual es empleado para replicar el vector dentro de la bacteria, donde las subsiguientes copias generadas del mismo poseen la mella cerrada por defecto. Si bien el cierre de las mellas se da dentro de las bacterias, la hibridación del inserto al vector se da a través de extremos cohesivos generados por la actividad exonucleasa de la enzima T4 DNA Polimerasa sobre los fragmentos LIC. Dichos fragmentos son incorporados en el inserto durante el paso de amplificación por PCR a través de primers que poseen en su secuencia tal fragmento. Los fragmentos LIC del inserto no poseen residuos de guanina en la hebra complementaria. La incorporación de dCTP en una mezcla de reacción con el inserto limita la actividad exonucleasa al primer residuo de guanina complementario, donde la actividad de polimerización y exonucleasa de la enzima se equilibran (Figura 5A). El vector pLIC_3HA_CAT posee en su secuencia fragmentos LIC que son complementarios a los del inserto y entre medio de ambos se tiene un sitio de restricción para PaeI el cual es usado para linealizar el vector previo al tratamiento con la T4. Para el tratamiento del vector es análogo pero de forma opuesta: el empleo de dGTP en la mezcla hace que las actividades se equilibren cuando la enzima se topa con el primer residuo de citosina complementario.

De esa forma se obtienen un inserto y un vector con fragmentos LIC cohesivos que hibridan, los fragmentos hibridados poseen cuatro mellas que son reparadas luego de la transformación en *E. coli* (parte C, figura 5). Luego de la transformación las bacterias son puestas en cultivo y se seleccionan las colonias que incorporaron el vector con el inserto a través de colony PCR (parte D, figura 5).

2.1.1 Amplificación por PCR de los insertos

Para la obtención de los insertos de TgPP1 y de TgPoc1 los mismos se amplificaron con los primers LIC_PP1_forward y LIC_PP1_revese para TgPP1 y LIC_Poc1_forward y LIC_Poc1_reverse para TgPoc1 (Tabla 1) generados a partir de las secuencias de los genes obtenidas en la base de datos Toxodb. La amplificación se realizó con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las temperaturas de annealing para TgPP1 y de TgPoc1 fueron 67 y 68°C para cada par respectivamente y la extensión de 30s. Se corrieron los productos de PCR en gel de agarosa 1% a 75V durante 45 minutos. La extracción de los insertos del gel se realizó con Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las indicaciones del producto.

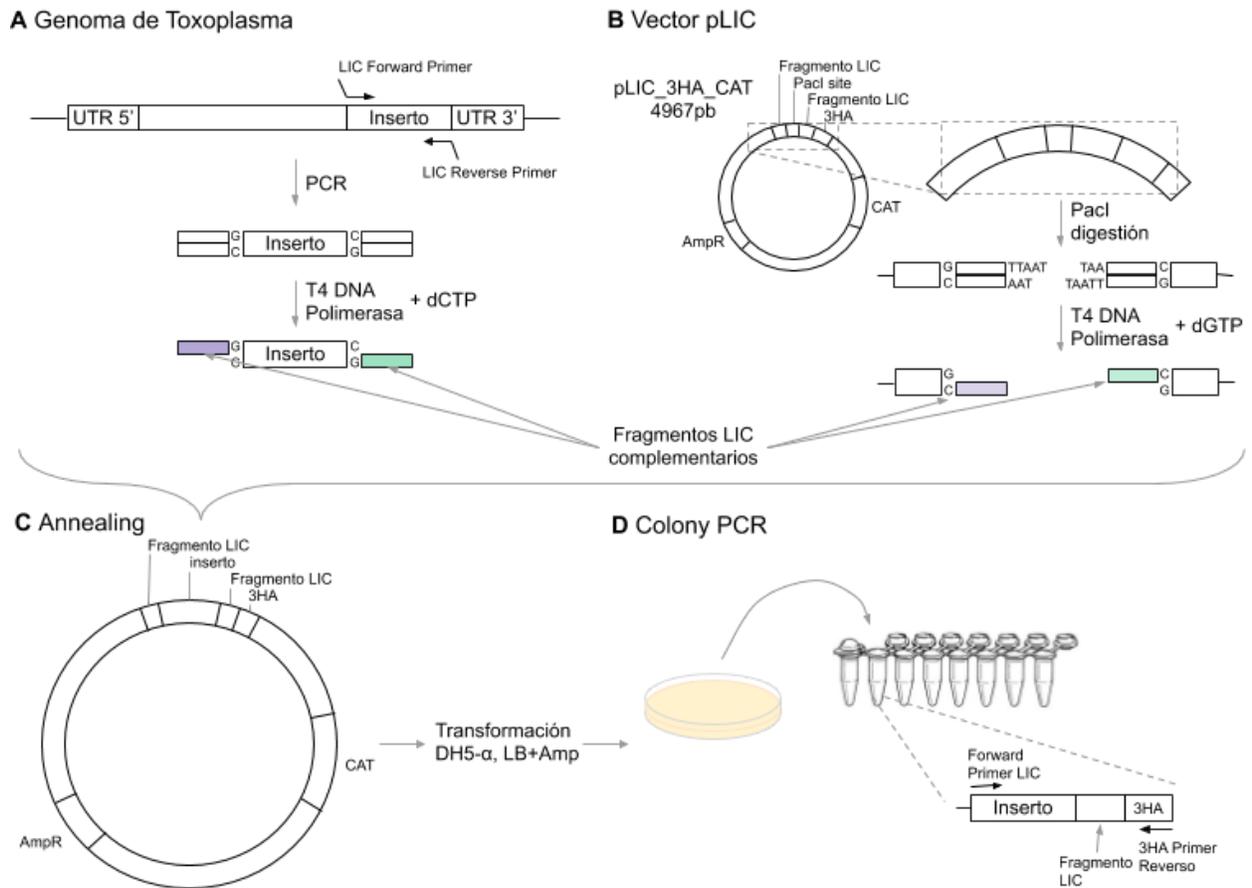


Figura 5. Estrategia LIC para la clonación de segmentos de los genes homólogos de PP1 y POC1 en *T. gondii*. En la figura se indica como “inserto” al segmento de gen el cual una vez amplificado por PCR con los primers LIC Reverse y LIC Forward queda flanqueado por los fragmentos LIC, necesarios para esta estrategia de clonado.

2.1.2 Construcción de los vectores pLIC_PP1 y pLIC_POC1

A los insertos extraídos se les realizó una digestión con T4 DNA polimerasa (Thermo, USA) la cual mediante su actividad 3' → 5' exonucleasa crea extremos solapantes en presencia de dCTP. Se montaron reacciones en hielo de 20µL con 2µL de buffer 10x, 1µL de DTT, 0.8µL de dCTP 100mM, 0.5µL de T4 DNA polimerasa, 10.7µL de agua y 5µL de inserto. La reacción se llevó a cabo en un termociclador en un ciclo de 30 minutos a 22°C, 20 minutos a 75°C y por último se mantuvo a 4°C.

Al vector pLIC_3HA_CAT (Huynh & Carruthers, 2009) se lo linearizó con PaclI (New England Biolabs, USA) en un volumen de reacción de 200µL: 1µL de PaclI, 20µL de buffer 10x, vector LIC csp una concentración en reacción de 880ng/µL y agua csp 200µL. Se incubó ON a 37°C. Siguiendo, se realizó la extracción del vector en fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (Sigma, USA) precipitándose en etanol absoluto (Dorwil, Argentina) y acetato de sodio 0.3M pH5. La digestión de los extremos se realizó en iguales condiciones que para los insertos, salvo que el volumen de reacción es el triple y se usan dGTP en vez de dCTP. Para el annealing se mezcló en hielo 1µL de vector tratado con 2µL de inserto y se lo incubó a 22°C durante 10 minutos, luego se le añadió 1µL de EDTA 25mM incubándose por 5 minutos más.

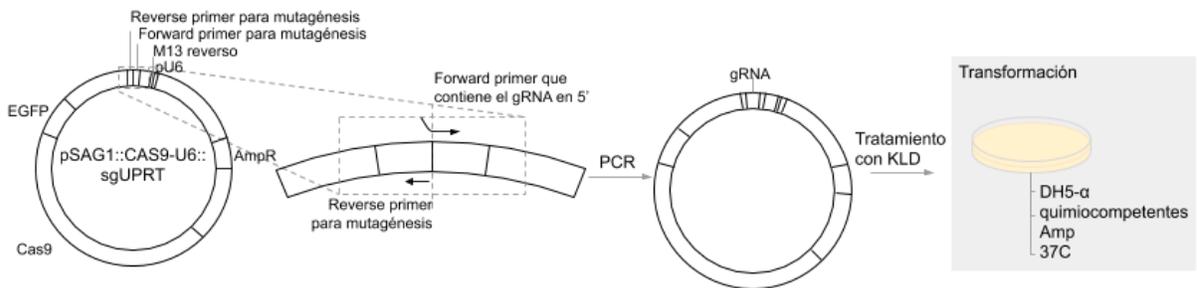
Al vector ligado se lo transformó en bacterias quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5- α y se seleccionó las colonias con ampicilina 100 μ g/mL (Sigma, USA). Las colonias transformantes se seleccionaron por colony PCR (Figura 5D) utilizando los primers forward de cada inserto y el HA_reverse (que corresponde al epítipo tag HA codificado en el vector; Tabla 1) en MangoMix (Bioline, UK) siguiendo las condiciones de reacción establecidas por el fabricante.

2.2 Mutagénesis del vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT

2.2.1 Introducción de las guías en los vectores de CRISPR por mutagénesis

La inserción de las secuencias de gRNA para PP1 y Poc1 en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT (Brown & Sibley, 2014; Addgene: #54467) se realizó utilizando Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Figura 6A). Para la inserción de la guía de PP1 se usó el primer sg_PP1_forward, para POC1 sg_Poc1_forward y el primer reverso genérico U6 en ambos casos (Tabla 1). En el diseño de las guías se utilizó la herramienta Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool disponible en la web (Peng & Tarleton, 2015) y se seleccionaron las guías con mejor score. La temperatura de annealing fue de 60°C para ambos casos y una extensión de 5 minutos. El producto de PCR se lo digirió con nucleasa KLD durante 5 minutos a RT y se transformó 5 μ L en *E. coli* DH5- α quimiocompetentes en placas de agar-LB en selección con ampicilina 0.1 μ g/ μ L (Sigma, USA).

A Mutagénesis



B Colony PCR

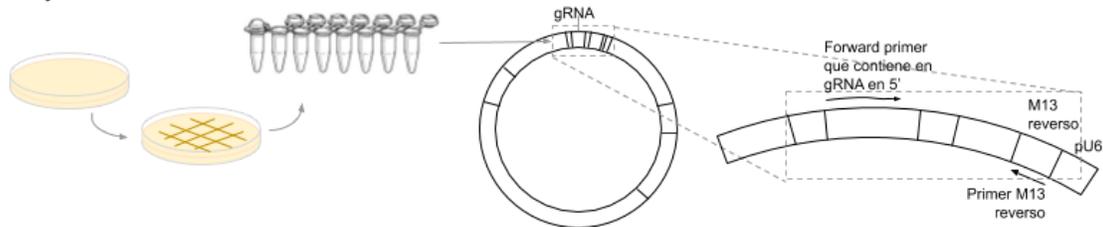


Figura 6. (A) Generación del vector pSAG1::Cas9-U6::sgPP1 y pSAG1::Cas9-U6::sgPOC1 mediante inserción de las secuencias codificantes de ARNg por PCR. (B) Evaluación de las colonias transformantes por colony PCR. En la misma se intenta corroborar que las colonias examinadas tengan incorporado la secuencia de la guía (que se proporcionó en el primer forward) a través de una PCR donde se incluyen el primer forward anteriormente usado en la mutagénesis y el primer M13 reverse, el cual hibrida en una secuencia río abajo del sitio de inserción de la guía en el vector.

La selección definitiva de los transformantes se realizó por colony PCR en MangoMix (Figura 5B). Los primers sg_PP1_forward sg_POC1_forward y M13_reverse (Tabla 1) fueron empleados para detectar la inserción de las secuencias de los gRNA en pSAG.

2.2.2 Secuenciación de pSAG1::Cas9-U6::sgPP1 y pSAG1::Cas9-U6::sgPOC1

Se enviaron a secuenciar en la plataforma tecnológica de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur las regiones de los gRNA en pSAG a partir de minipreparaciones (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit Invitrogen, USA) por método de Sanger (Applied Biosystems, USA) empleando el primer M13_reverse cuya secuencia se encuentra río abajo del sitio de clonación del ARN guía en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT.

2.3 Transfección, cultivo y microscopía

2.3.1 Cultivo de los parásitos

La cepa Δ ku80-HXG (Huynh & Carruthers, 2009) fue cultivada por pasajes seriales en la línea celular VERO mantenidas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con penicilina-estreptomicina y complementado con 5% de suero fetal bovino y L-glutamina 0.5 mM (Gibco, USA) a 37°C y 5% de CO₂.

2.3.2 Transfección y cultivo

Para la obtención de cantidades suficientes de ADN para la transfecciones, se realizaron maxipreps de los vectores. Los vectores pLIC_PP1_3HA, pLIC_Poc1_3HA y sus correspondientes pSAG1::Cas9-U6::sg fueron transformados en *E. coli* DH5- α y cultivados ON a 37°C en 100 mL de LB con ampicilina 0.1 μ g/ μ L (Sigma, USA) y posteriormente fueron purificados los vectores empleando PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Previo a la transfección, 100 μ g de cada vector LIC fue linealizado con EcoRV (Roche, Suiza) en incubación a 37°C ON, posteriormente se precipitaron con etanol absoluto y 1:10 de acetato de sodio 3M, pH5. Se dejó en etanol 70% hasta su utilización y se resuspendió en citomix (2 mM EDTA, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂; pH 7.6) al momento de transfectar.

Los parásitos fueron colectados, filtrados, centrifugados, lavados y resuspendidos en citomix buffer. Posteriormente los parásitos fueron contabilizados usando una cámara de Neubauer (números de parásitos en la cámara: promedio de parásitos contados por cuadrante x 10⁴ x factor de dilución), y llevados a una concentración de entre 5x10⁷ y 1x10⁸ parásitos cada 700 μ L de citomix. 100 μ g/100 μ L de DNA (partes iguales de pLIC-PP1 y pSAG-PP1 o pLIC-Poc1 y pSAG-Poc1) fueron electroporados en 700 μ L de parásitos empleando un electroporador BTX Electro Cell Manipulator 600 (2.5 A, 24 ohm, 2.0 kV), luego fueron colocados en cultivo ON sin selección. Al día siguiente, a los transformantes se les cambió el medio por uno con cloranfenicol 1:5000. Las líneas de parásitos fueron mantenidas por pasajes en la línea celular VERO.

Se chequeó por PCR la inserción de los insertos con el tag en el genoma. Para ello, se usaron los primers HA reverse, PP1 screen forward, y Poc1 screen forward (Tm 52.5°C, extensión 2 min) (tabla 1).

2.3.3 Identificación de la localización de PPI y POC1 por inmunofluorescencia y cuantificación

Los parásitos recién transfectados fueron inoculados en células VERO sobre cubreobjetos colocados en el fondo de placas de 24 pocillos. Se dejaron en cultivo y se fijaron en formol 4% en PBS 1x (20 min, RT) luego de 24, 48 y 72 horas post transfección. El bloqueo se realizó con BSA 3% (Sigma) en PBS (15 min, RT) y la permeabilización con BSA 3% en PBS y Tritón 0.02% (Sigma) (20 min RT). Para la inmunomarcación se emplearon los anticuerpos primarios: ratón anti-centrina 1:1000 (Millipore), ratón anti-IMC-1 1:500 obsequio de Gary Ward, University of Vermont (Mann, & Beckers, 2001), conejo anti-MORN1 1:100 obsequio de Boris Striepen, University of Pennsylvania (Kono, 2013), en preparaciones por separado en conjunto con ratón anti-HA 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) o conejo anti-HA (1:200, Cell Signaling Technology) de tal forma de que cada pareja de anticuerpos no tengan la misma procedencia. Seguido de los anticuerpos secundarios: Alexa488 conjugado a cabra anti-conejo (1:1000, Invitrogen) y Cy3 conjugado a conejo anti-ratón (1:1000, Invitrogen). 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) es incluido en el medio de montaje (Fluoroshield™ with DAPI, Sigma), el cual una vez montado en el portaobjetos, permite visualizar los núcleos.

Las adquisiciones de imágenes se realizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 880, el objetivo usado fue Plan Apochromat 63x/1.4 Oil y los canales empleados fueron: Alexa488 excitación 488 nm, emisión 526 nm, Cy3 excitación 561 nm, emisión 624 nm, DAPI excitación 405 nm, emisión 459 nm.

La cuantificación de las células marcadas se realizó en base al total de adquisiciones que se obtuvieron por microscopía confocal. Se contabilizaron el número de parásitos marcados con anti-HA y totales por vacuola, la localización de la marcación con respecto a la co-marcación y a DAPI, así como el número de parásitos por vacuola y sus números de centrosomas por parásito para cultivos de la cepa salvaje. Para la co-marcación con centrina se contabilizó si la señal de HA se superponía con la de centrina y el número de centrosomas (una o dos señales de centrina por parásito). Los datos se graficaron en Microsoft Excel (Microsoft, USA).

2.4 Clonación del cDNA de PP1 y POC1 en pGEM-T

2.4.1 Obtención de ARNs de parásitos con Trizol

La extracción de RNAs se realizó a partir de una botella T25 con parásitos extracelulares cultivados en células VERO, utilizando para ello TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.4.2 Generación de los ADNc por tratamiento con transcriptasa reversa

Para la generación de cDNAs a partir del ARN obtenido de la extracción con Trizol, se realizó la transcripción reversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. En la síntesis de la primera hebra se utilizaron oligo dT 500µg/mL, y para la reacción de PCR se emplearon los pares de primers PP1_cDNA_PstI_forward y PP1_cDNA_PacI_reverse para PP1 Y POC1_cDNA_PstI_forward y POC1_cDNA_PacI_reverse para POC1, en donde las bases subrayadas indican los sitios de restricción para PstI y PacI necesarios para la clonación en pMyc (tabla 1). Para la PCR se usó GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA). La temperatura de annealing fue de 55°C y la extensión de 1 min.

2.4.3 Clonación en pGEM

Los cDNA de PP1 y de POC1 obtenidos por PCR se clonaron en el vector pGEM-T (Promega, USA) para así secuenciar los insertos. Para la ligación se incubó durante una hora a RT en reacciones de 5 μ L para respectivo inserto: 0.5 μ L de pGEM vector (Promega, USA), 1.5 μ L de producto de PCR, 0.5 μ L de T4 DNA Ligase, 2.5 μ L de Buffer T4 DNA Ligase 2x (Thermo, USA). A los productos de la ligación se lo transformó en células de *E. coli* DH5- α quimiocompetentes se inoculó en placas de agar-LB en selección con ampicilina 0.1 μ g/ μ L (Sigma, USA) y selección blanco-azul Xgal e IPTG. Se seleccionaron colonias blancas y se inocularon en LB para realizar minipreparaciones (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit Invitrogen, USA). Posteriormente, se enviaron a secuenciar las distintas poblaciones y se seleccionaron las que conservaban las secuencias de cDNA intactas. Con las mismas se inocularon cultivos de *E. coli* DH5- α quimiocompetentes en 100 mL de LB en selección con ampicilina 0.1 μ g/ μ L y se incubaron ON a 37°C con agitación, para realizar maxipreparaciones (PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit, Invitrogen, USA) de las distintas poblaciones.

En paralelo se realizó la transformación y la maxi preparación del vector pMyc en las mismas condiciones que las usadas para los vectores de pGEM.

Se realizó la digestión de pGEM_PP1 y de pGEM_POC1 con PaeI y PstI para posteriormente subclonarlo en pMyc. Se montaron reacciones de 50 μ L con 1 μ L de PaeI, 1 μ L de PstI, 5 μ L de buffer Cut Smart (NEB, US) y 1 μ g de plásmido, se incubó 1 hs a 37°C. Luego se corrieron los productos de digestión en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio durante 20 min a 100 V.

Tabla 1. Secuencias de los primers usados. En minúscula se representa las regiones de los primers LIC que se complementan con el sitio de clonado del vector. Las bases subrayadas indican sitios de restricción.

Primer	Secuencia	Tm °C
LIC_PP1_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaCACAGAGGCTGAGATTCG	64
LIC_PP1_revese	tcctccacttccaatttagcTTTGCCATGCCTTCTTC	65.9
LIC_POC1_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaCAATTgatatcgctgacccag	65.6
LIC_POC1_reverse	tcctccacttccaatttagcCGCGGTCACTTGCTCTGAAG	68.2
LIC_SAS6_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaCTCTGATGAGAACATCTCTCGAAGAAGG	65
LIC_SAS6_reverse	tcctccacttccaatttagcACGCGGCTGTCGCGCCGCCGAGCTC	74.4
LIC_CEP250L1_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaGAGAGACCGAAGGAATACAGATATCTGG	64.7
LIC_CEP250L1_reverse	tcctccacttccaatttagcTCGCCCGAAAGCGACTTTCCC	70.6
LIC_Kif24_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaCAGCAATTGATCGAAGGGACACATGC	66.4
LIC_Kif24_reverse	tcctccacttccaatttagcCGCAGAAATCCCGCTCTCT	68.1
LIC_CEP120_forward	tacttccaatccaatttaaatgcaCAATTGTGTTGCACCTACAGAACG	64.9

LIC_CEP120_reverse	tcctccactccaatttagcAAGGCTCTCTGCCGACGATT	67.9
LIC_Ninein_forward	tactccaatccaatttaatgcaCATTGTTCTGCAGCAGCGGCACA	67.9
LIC_Ninein_reverse	tcctccactccaatttagcGCCTCCGCTGCTGCTGAAAAGAT	69.5
LIC_CEP170_forward	tactccaatccaatttaatgcaCATTGCAGTTCTGCAGTTTCGACG	65.8
LIC_CEP170_reverse	tcctccactccaatttagcGTCCTCTGTGCGACTGCCCT	68.8
HA_reverse	TTAGGCATAATCTGGAACATCG	52.5
sg_PP1_forward	GGCACTCTCCGTCGTTTATTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	62.9
sg_POC1_forward	GTCGACTGGCGCCGACTTACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	66.7
U6	AACTTGACATCCCCATTTAC	50.2
M13_reverse	CAGGAAACAGCTATGACCATG	
PP1 screen forward	CTG GTG TCC GCA TTG TAT CA	55
POC1_screen forward	TGC AGG TGT GTC CTG TCA AT	56.8
PP1_cDNA_PstI_forward	<u>CTG CAG</u> AAA TGG TGT CAT TAG ACG TCG A	60.3
PP1_cDNA_PaCI_reverse	<u>TTA ATT AAT</u> TAT TTG GCC ATG CCT TTC T	54.2
POC1_cDNA_PstI_forward	<u>CTG CAG</u> AAA TGT CGG GTG AAT CTC CCC	63.6
POC1_cDNA_PaCI_reverse	<u>TTA ATT AAT</u> TAC GCG GTC ACT TGC TCT	57.4

3 Resultados

3.1 Generación de los *knock-in* en parásitos

El presente trabajo se propuso generar un *knock-in* en poblaciones de parásitos de *T. gondii* para que expresen las proteínas ortólogas PP1 y POC1 marcadas con un epítopo tag y así poder determinar su localización por inmunofluorescencia. Estas proteínas y su hipotética localización centrosomal surgen del análisis bioinformático donde se comparó secuencias del genoma de *T. gondii* contra el genoma humano del cual se propuso un modelo centrosomal para el mencionado parásito en donde están incluidas las proteínas involucradas en este trabajo. Para la generación de los *knock-in* en los parásitos se utilizó la herramienta de edición génica CRISPR-Cas, la cual permite aumentar la eficiencia de recombinación homóloga en el proceso de reparación del ADN. La endonucleasa Cas9 de este sistema cliva en determinada secuencia que reconoce con la ayuda de un ARN guía (ARNg) que tiene incorporado en la holoenzima. Este corte generado en una secuencia de interés, en este caso en la región 3' de los genes ortólogos, va a permitir que se dé la reparación por recombinación homóloga al proporcionarle al organismo una secuencia del mismo gen. Esta estrategia también es posible gracias a la cepa empleada de *T. gondii*, la cual tiene depletado el gen para la proteína ku80, responsable del mecanismo de reparación del ADN independiente de secuencias homólogas (NHEJ). Por lo tanto la cepa $\Delta ku80$ no va a ser capaz de reparar su ADN por mecanismos independientes de la recombinación homóloga, siendo este último el mecanismo empleado para hacer los *knock-in*.

Tabla 2. Resumen de los genes ortólogos a ser taggeados con sus respectivos números de identificación del ToxoDB. Dichas secuencias corresponden a la cepa ME46 de *T. gondii*.

Número de identificación	Nombre del homólogo	Tamaño del inserto (pb)
TGME49_297210	Ninein	1376
TGME49_287160	Kif24	1853
TGME49_290620	CEP250L1	1744
TGME49_201790	CEP170	1749
TGME49_310700	PP1	1387
TGME49_306430	SAS6	1239
TGME49_285210	CEP120	1422
TGME49_216880	POC1	2222

3.1.1 Construcción de los vectores pLIC_PP1 y pLIC_POC1

Se partió de una lista de ortólogos a ser taggeados (Tabla 2), originalmente identificados por análisis *in silico* por Morlon-Guyot y colaboradores. El objetivo original era amplificar por PCR las regiones 3' de dichos genes. De estos, se lograron amplificar las regiones 3' (insertos) de PP1, CEP120, SAS6, CEP250, CEP170, y POC1 con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase luego de optimizar individualmente las condiciones de ciclado (Figura 7.A). La Figura 7 muestra los productos de PCR obtenidos, todos los tamaños de las bandas observadas se corresponden con los tamaños esperados. Posteriormente se logró levantar a Ninein con Taq Polimerasa (MangoMix y RangerMix) y Kif24 con Platinum SuperFi, una polimerasa de alta fidelidad (Figura 7.B).

Los insertos fueron recuperados del gel y en paralelo se realizó la digestión del vector pLIC_3HA_CAT con PacI para linealizarlo. Una vez obtenido los insertos y el vector linealizado, se procedió a realizar la

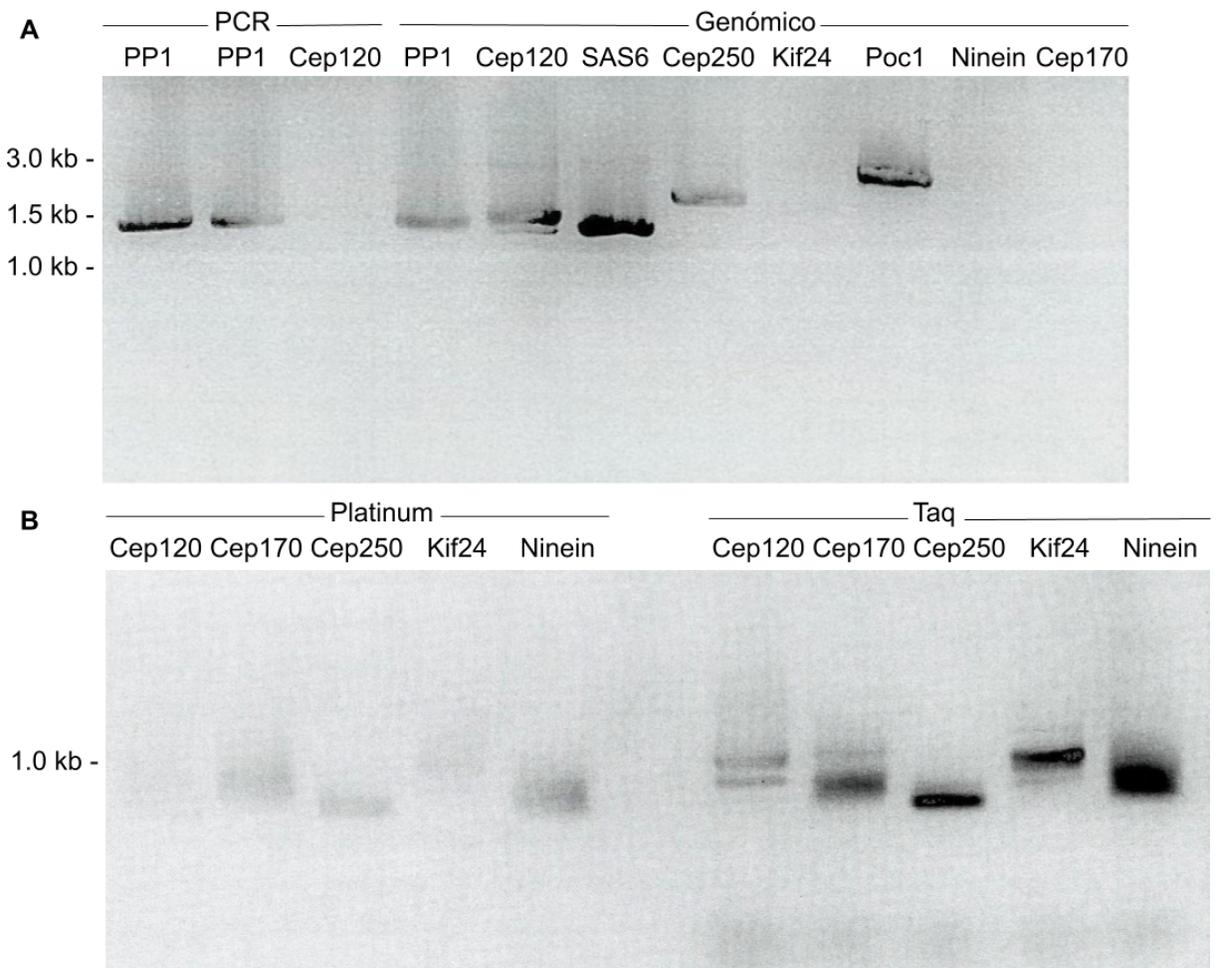


Figura 7. Insertos amplificados por PCR. En A, las tres primeras calles indicadas como PCR, se empleó como molde productos de PCR amplificados previamente. En las restantes calles, indicadas como Genómico, se usó ADN genómico como molde. En todos los casos se amplificó con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. En B se obtuvo la amplificación de Ninein y Kif24 tanto con Platinum SuperFi como con Taq polimerasa, las amplificaciones de CEP120, CEP170 y CEP250 se repitieron luego de haber fallado su clonación en pLIC con los insertos de A. Todos estos ensayos fueron a partir de productos de PCR previamente obtenidos.

digestión con T4 DNA Polimerasa para generar extremos cohesivos entre el inserto y el vector gracias a la actividad exonucleasa 3'→5'. La incorporación de dGTP en la reacción del vector y de dCTP en la del inserto, limita el procesamiento de la exonucleasa al primer residuo C o G complementario, dando lugar a que las actividades de polimerización y exonucleasa de la T4 DNA Polimerasa se “equilibren”. De esta forma se generan extremos cohesivos entre el vector y el inserto (fragmentos LIC). Posteriormente se hibridan los fragmentos LIC del inserto con los del vector para dar lugar a un vector circular con el inserto incorporado al cual le quedan cuatro mellas (dos a cada lado del inserto) que son reparadas una vez que el vector es transformado en *E. coli* DH5 α . Por último se seleccionan los clones transformantes que efectivamente incorporaron al vector con el inserto por colony PCR. Para el mismo se procedió a realizar una reacción de PCR en donde se inoculó a la mezcla de reacción con bacterias procedentes de una colonia, se montan tantas reacciones como colonias que se quieran evaluar. Se tomaron cuatro colonias para el screening y se emplearon primers LIC forward iniciales que se usaron para levantar los insertos del genoma y el primer HA reverse, el cual hibrida sobre la secuencia del epítipo tag 3HA que se encuentra en el vector, río abajo del inserto. Por lo tanto los tamaños aproximados de productos de PCR esperados fueron la suma del tamaño de cada inserto (Tabla 2) más 87pb del tag 3HA. En la Figura 8 se muestran los resultados del colony PCR donde se evaluaron colonias con insertos de SAS6 y PP1. Si bien se logró levantar todos los insertos por PCR, salvo para SAS6, POCI y PPI, no se logró la ligación de los restantes en pLIC luego de repetidos ensayos. Se tomaron los tres clones positivos del colony PCR y se inocularon maxipreps de cara a la transfección.

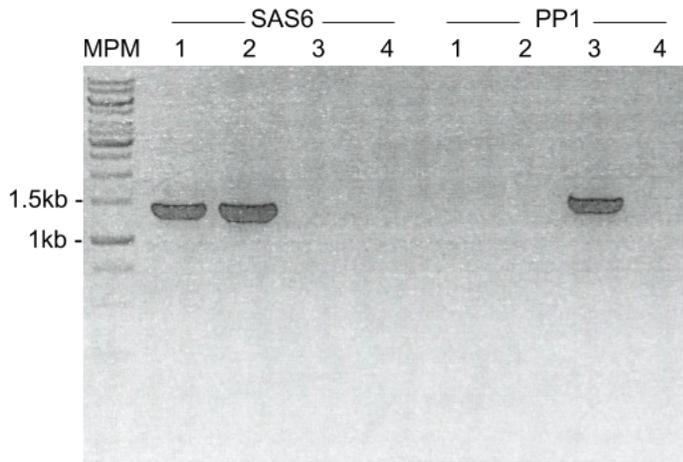


Figura 8. Colony PCR de las colonias transformadas con pLIC. Arriba se indica como SAS6 a cuatro colonias transformadas con el vector pLIC conteniendo el inserto para SAS6. Ídem para PP1. En las colonias 1 y 2 para SAS6 se muestra el producto de PCR de unas 1326pb que se corresponde al fragmento LIC más el tag 3HA. Para PP1 se observa una colonia positiva con un producto de 1474pb.

3.1.2 Inserción de las secuencias de los ARN guía en el vector *pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT*

El vector *pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT* (Figura 9) una vez transfectado en parásitos se expresa como episoma dando lugar a expresión de la endonucleasa Cas9 que posee codificada en su secuencia bajo el control del promotor de SAG1, una proteína de *T. gondii* de expresión constitutiva. La Cas9 necesita para su actividad endonucleasa específica de secuencia, a una molécula de ARN guía la cual se inserta en el mismo vector por mutagénesis por PCR. Para la inserción de la guía se diseñó un primer forward específico para PP1 y otro para POC1 el cual en su secuencia se encuentra codificado la ARNg, y como primer reverso se usó el primer genérico U6 que hibrida en la secuencia del promotor U6. Dicho promotor se le une la polimerasa I, necesario para la expresión de la ARNg. Lo particular que tiene esta reacción de PCR es que, además de incorporar una nueva secuencia en el vector mediante su inserción

en los primers, la reacción de polimerización es llevada a cabo a lo largo de todo el vector. Es decir el primer forward que posee la secuencia a insertar se hibrida corriente abajo enseguida del sitio de hibridación del primer reverse, por lo tanto la polimerasa va a recorrer todo el vector desde el primer forward hasta que se acabe ya que los primers se encuentran “mirando” hacia direcciones opuestas, algo análogo sucede si se toma el primer reverse como punto de partida (Figura 6A).

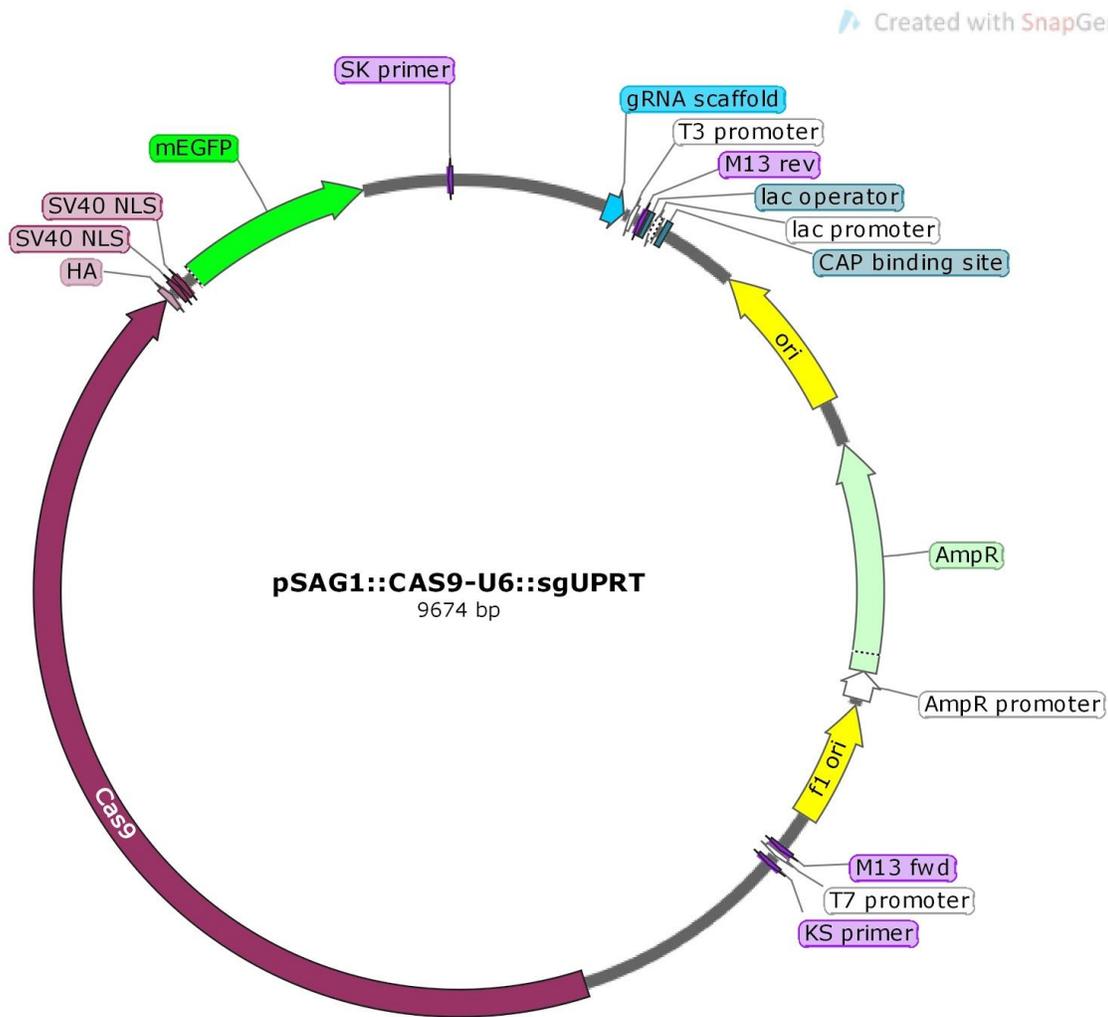


Figura 9. Mapa del vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT. En su secuencia se encuentra codificada la enzima Cas9 junto con el tag HA, señales de localización nuclear y GFP en un mismo ORF que se expresa bajo control del promotor de la proteína SAG1, una proteína de expresión constitutiva. El gRNA scaffold codifica la secuencia del ARNg, adyacente a esta secuencia se introduce por mutagénesis la secuencia espaciadora. Ambas se expresan como fusión, bajo el control del promotor U6. Fuente: Addgene.

Tal como se muestra en la Figura 6A la estrategia que fue usada involucró la mutagénesis por PCR del vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT para la inserción de los ARNg específicos de PP1 y POC1 respectivamente, luego los vectores se transformaron en *E. coli* DH5 α previo tratamiento con KLD nucleasa para eliminar el vector metilado original. Posteriormente se seleccionaron las colonias con el

vector mutagenizado por colony PCR (Figura 6B). Del ensayo donde se logró observar crecimiento bacteriano, se seleccionaron ocho colonias para el screening de las guías por colony PCR dando todas positivo (Figura 10A). A partir de estas colonias positivas se seleccionaron al azar cuatro de cada una y se realizaron minipreps, para así ser secuenciadas y poder chequear la integridad de las guías. Los resultados de secuenciación se muestran en la Figura 10B. A partir de la comparación de las secuencias originales de las guías con las de las miniprep se logró identificar qué clon conservó la secuencia guía, siendo las correctas los números 4, 6 y 7 para PP1 y 3, 4 y 7 para POC1. Se decidió continuar trabajando con los clones Nro 7 para la guía de PP1 y el Nro 4 para POC1.

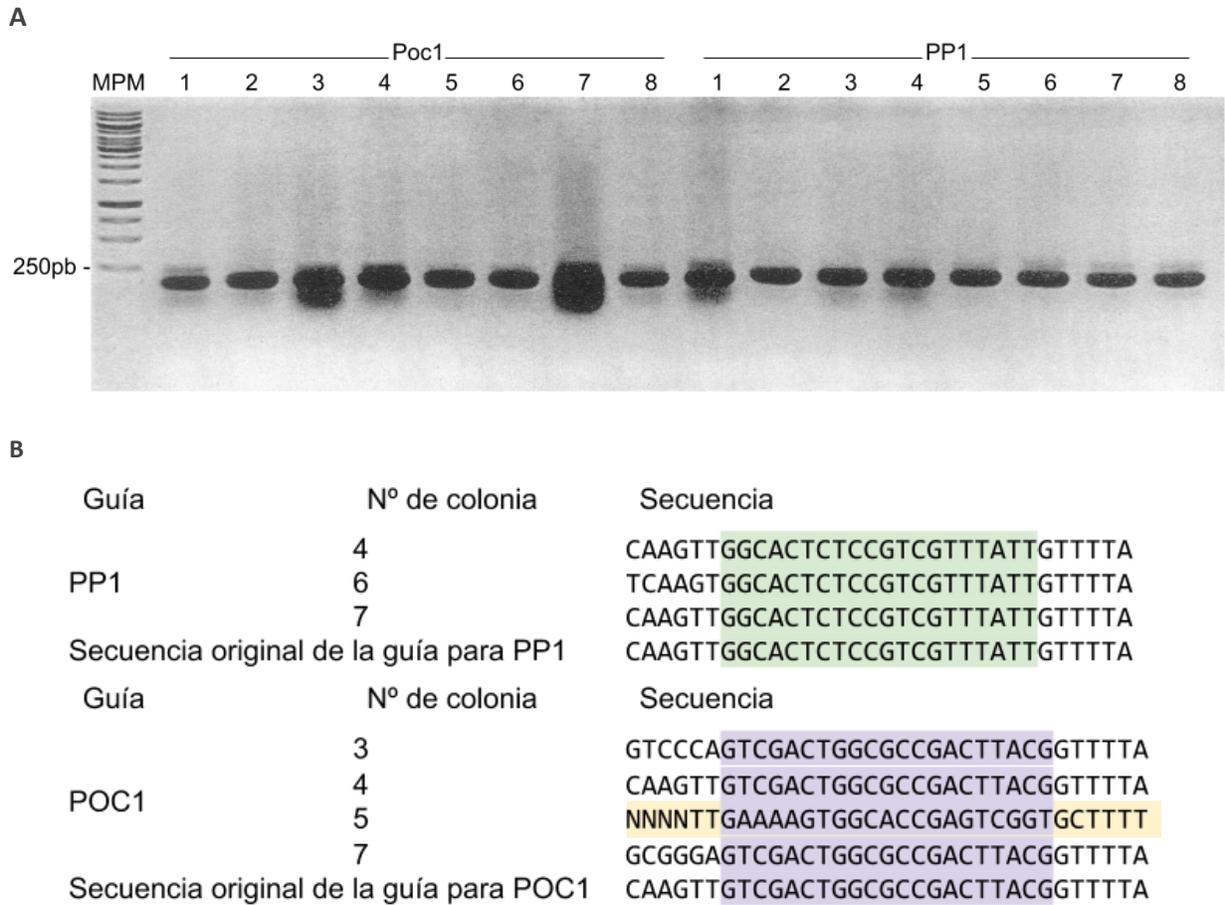


Figura 10. (A) Colony PCR de colonias transformadas con pSAG1::Cas9-U6::sg. Arriba se indica como “POC1” a ocho colonias transformadas con el vector pSAG1::Cas9-U6::sg conteniendo la guía para POC1. Ídem para PP1. En dicho ensayo se observa que las ocho colonias testeadas para cada guía amplifican el producto de PCR esperado. Los tamaños esperados de los productos fueron 177pb para POC1 y 176pb para PP1. (B) Resultados de secuenciación de las secuencias de ARNg introducidas por mutagénesis.

3.1.3 Detección del knock-in en parásitos por PCR

Se co-transfectaron los vectores pLIC_3HA_CAT y pSAG1::Cas9-U6::sg tanto de PP1 como de POC1 en la cepa parental RH Δ ku80. Luego de cinco días post-transfección se colectaron parásitos para realizar la extracción de ADN genómico y testear la inserción del inserto con el tag 3HA en el sitio de homología en el genoma. Para eso, se emplearon “screen forward” primers que hibridan en un sitio del genoma

corriente arriba de la región de homología del inserto, junto con el primer reverso que hibrida en la secuencia triple HA. De esta forma lo que se intentó hacer fue amplificar una región del ADN genómico comprendido por un segmento del gen (PP1 o POC1) adyacente al extremo 5' del inserto, el inserto mismo y el tag 3HA. En total se realizaron cuatro ensayos con distintos fines y con los siguientes moldes y primers:

- 1) ADNg de la cepa parental Δ ku80 con screen forward y HA reverso. Un control donde se espera un resultado negativo ya que el primer HA reverso no debería de tener donde hibridar en el genoma de parásitos sin transfectar.
- 2) ADNg de la cepa parental Δ ku80 con screen forward y LIC reverso. En este control se espera que los primers amplifiquen una región del genoma comprendido por un segmento del gen (PP1 o POC1) adyacente al extremo 5' del inserto (donde hibrida el screen forward) y el inserto mismo (donde hibrida el LIC reverso). Con este control se evalúa la funcionalidad de los primers screen forward.
- 3) ADNg de parásitos transfectados con screen forward y HA reverso. Este ensayo es la prueba en sí.
- 4) ADNg de parásitos transfectados con screen forward y LIC reverso. Este control evalúa que el primer screen forward hibrida en el genoma independientemente de si se produjo la recombinación.

La Figura 11 muestra la corrida de los productos de PCR. Como se observa, los controles que tuvieron como molde ADN de parásitos RH Δ ku80 sin transfectar resultaron en los patrones de amplificación de productos de PCR esperados; las reacciones que tuvieron los primers HA reverso (HA r) junto con el screen forward de PP1 o de POC1 no amplificaron, mientras que las reacciones que tuvieron a los primers reverso LIC PP1 r o LIC POC1 r junto con sus respectivos screen forward primers sí amplificaron. Por otro lado, los ensayos que tuvieron como molde ADN de parásitos transfectados (indicados en la figura como PP1 y POC1) también amplificaron: los controles realizados con los primers LIC reverso y los screen forward resultaron en la amplificación de correspondientes productos de 1618 pb para PP1 y 2437 kb para POC1. Por último, la prueba en sí (indicada como HA r) consistió en utilizar los pares screen forward para PP1 y para POC1 junto con el HA reverso, amplificaron productos de 1705 kb y 2524 kb respectivamente, correspondientes a la suma de los tamaños del fragmento LIC, la región corriente arriba del mismo y el tag 3HA.

3.2 Identificación de la localización de las proteínas por inmunofluorescencia y cuantificación

Una vez transfectados los parásitos con los vectores pLIC_3HA_CAT y pSAG1::Cas9-U6::sg para PP1 y para POC1 respectivamente, se inocularon los mismos en cubreobjetos cultivados con la línea celular Vero. Este ensayo fue un evento de transfección posterior al realizado en la detección del *knock-in* por PCR (Figura 11). Si bien los resultados de los PCR fueron positivos, no se logró establecer una línea estable debido a la pérdida de las poblaciones. Se optó por volver a realizar las transfecciones para evaluar la localización en una población recién transfectada por inmunofluorescencia. En esa última etapa se montaron tres series

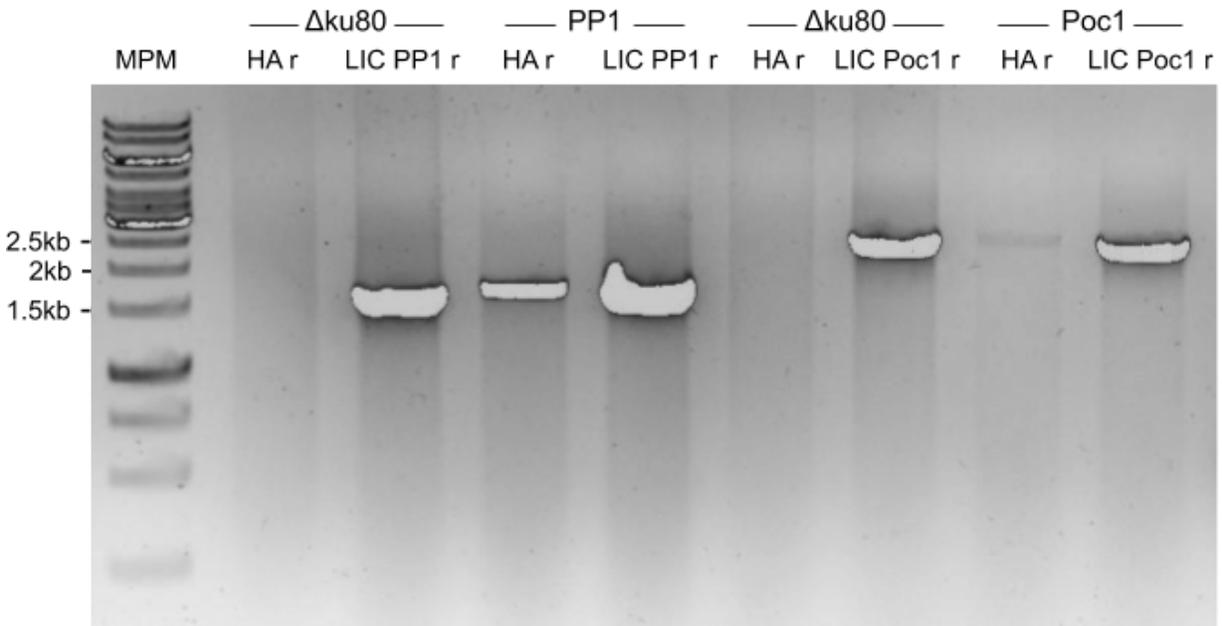


Figura 11. Evaluación de las poblaciones transfectantes. Arriba indicado como $\Delta ku80$ son ensayos para los que se usó como molde ADN de parásitos sin transfectar, en los indicados como PP1 y POC1 se usó ADN de parásitos knock in para PP1 y POC1, respectivamente. En todos los ensayos se empleó el primer screen forward y los primers reversos son indicados en la cabeza de cada calle.

de cubres donde en cada una se incubó con juegos de anticuerpos diferentes para así visualizar y determinar la localización de PP1 y POC1 con respecto a otras proteínas de localización celular conocida. Los juegos de anticuerpos primarios para cada serie fueron:

- ratón anti-centrina con conejo anti-HA
- conejo anti-MORN1 con ratón anti-HA
- ratón anti-IMC-1 con conejo anti-HA

La co-marcaación con centrina es decisiva, ya que centrina es una proteína centrosomal y una superposición de las señales de ambos anticuerpos indicaría una localización centrosomal de PP1 o POC1. MORN1 es una proteína que se localiza en la membrana del centrocono, una estructura nuclear propia de los parásitos coccidios que marca el lugar físico en el que se ensambla el huso mitótico y en la membrana citoplasmática del extremo más basal del parásito, es un marcador de mitosis temprana ya que se localiza también en el extremo basal de las células nacientes. Su localización en el centrocono es importante ya que este último se encuentra adyacente al centrosoma. IMC1 es una proteína del complejo de membrana interna, se encuentra tanto en la membrana de células madres como en la de los parásitos hijos que se ensamblan durante la división celular. Es un marcador de mitosis al igual que MORN1, pero más tardío que este. Por lo tanto todos estos marcadores son relevantes para la determinación del estadio del ciclo celular que se está observando. Para maximizar la oportunidad de observar la expresión y localización diferencial de POC1 y PP1, para cada serie se fijaron parásitos a las 48 y 72 hs post transfección. En total se inocularon seis ensayos distintos por duplicado y para cada proteína interrogada.

3.2.1 Identificación de POC1

La proteína POC1 marcada con el tag 3HA se visualizó con anticuerpos primarios anti HA y secundarios conjugados a Cy3 y Alexa 488 (Figura 12).

En la Figura 12A se muestra la marcación de POC1-3HA con anticuerpo primario conejo anti HA y secundario anti conejo conjugado a Cy3, junto con la marcación de centrina con anticuerpo primario ratón anti centrina y secundario anti ratón conjugado a Alexa488.

En la Figura 12B se muestra la marcación de Poc1-3HA con anticuerpo primario ratón anti HA y secundario anti ratón conjugado a Alexa488, junto con la marcación con anticuerpo primario anti MORN-1 de conejo y secundario anti conejo conjugado a Cy3.

En C se muestra la marcación de Poc1-3HA con anticuerpo primario conejo anti HA y secundario anti conejo conjugado a Cy3, junto con la marcación de IMC-1 con anticuerpo primario ratón anti IMC-1 y secundario anti ratón conjugado a Alexa488. Todos ellos realizados a las 48 hs post-transfección.

En todos los casos se puede observar que POC1 se localiza en el núcleo y nunca se logró observar una co-localización con centrina ni con MORN-1. Dentro de su localización nuclear se pudo distinguir que esta adquiere dos patrones de distribución: uno discreto el cual se observa una mancha sobre el núcleo que en algunos casos se superpone con el nucleolo (mancha oscuro sobre el núcleo en tinción con DAPI), y otro lobular que se observa como varias manchas sobre el núcleo. En una observación más detenida, se pudo hacer una aproximación de la distribución de POC1 a lo largo del ciclo celular con respecto a los marcadores usados. Para la co-marcación con centrina, la localización discreta nuclear de POC1 se observa junto con un solo centrosoma (fase G1) por célula el cual se observa como una sola “mancha” de la señal del anticuerpo anti-centrina. Mientras que, cuando se observan dos centrosomas por célula (fase M-S) la distribución sobre el núcleo de POC1 es más general.

Con MORN1 sucede algo similar, cuando la célula está en la fase M temprana se puede ver la duplicación del centrocono en el núcleo y en una fase M más avanzada se observan los anillos basales de las células hijas. A POC1 se lo observó con el fenotipo de localización discreta nuclear cuando solamente se lograba distinguir un solo centrocono por célula, es decir que se encontraba en fase G1. Cuando adquiere una distribución nuclear general esta va acompañada de dos centroconos por célula.

Con respecto a IMC1, este marcador se observa con una distribución uniforme por toda la membrana citoplasmática durante G1 y cuando comienza el ensamblaje de las células hijas se observa las membranas de las mismas dentro de su madre como pequeños ápices que se van proyectando en dirección apical-basal. Para esta co-marcación, POC1 se lo observó con una localización nuclear discreta cuando IMC1 se distribuía uniformemente por toda la membrana del parásito, cuando éste posiblemente se encontraba en G1. Mientras que cuando POC1 adquiere la conformación nuclear general se observó que dentro del parásito se estaban formando células hijas, por lo que se encontraba en fase M.

Estas observaciones son congruentes entre ellas, pudiéndose decir que POC1 adquiere una distribución nuclear general durante S-M y una localización nuclear discreta, posiblemente sobre el nucleolo, durante G1.

La misma IFI realizada a las 72 hs post-transfección muestra la extinción de la señal de POC1^{3HA}.

Como no se observó en ningún momento una localización centrosomal para POC1 no se siguió con un análisis más detallado de la proteína.

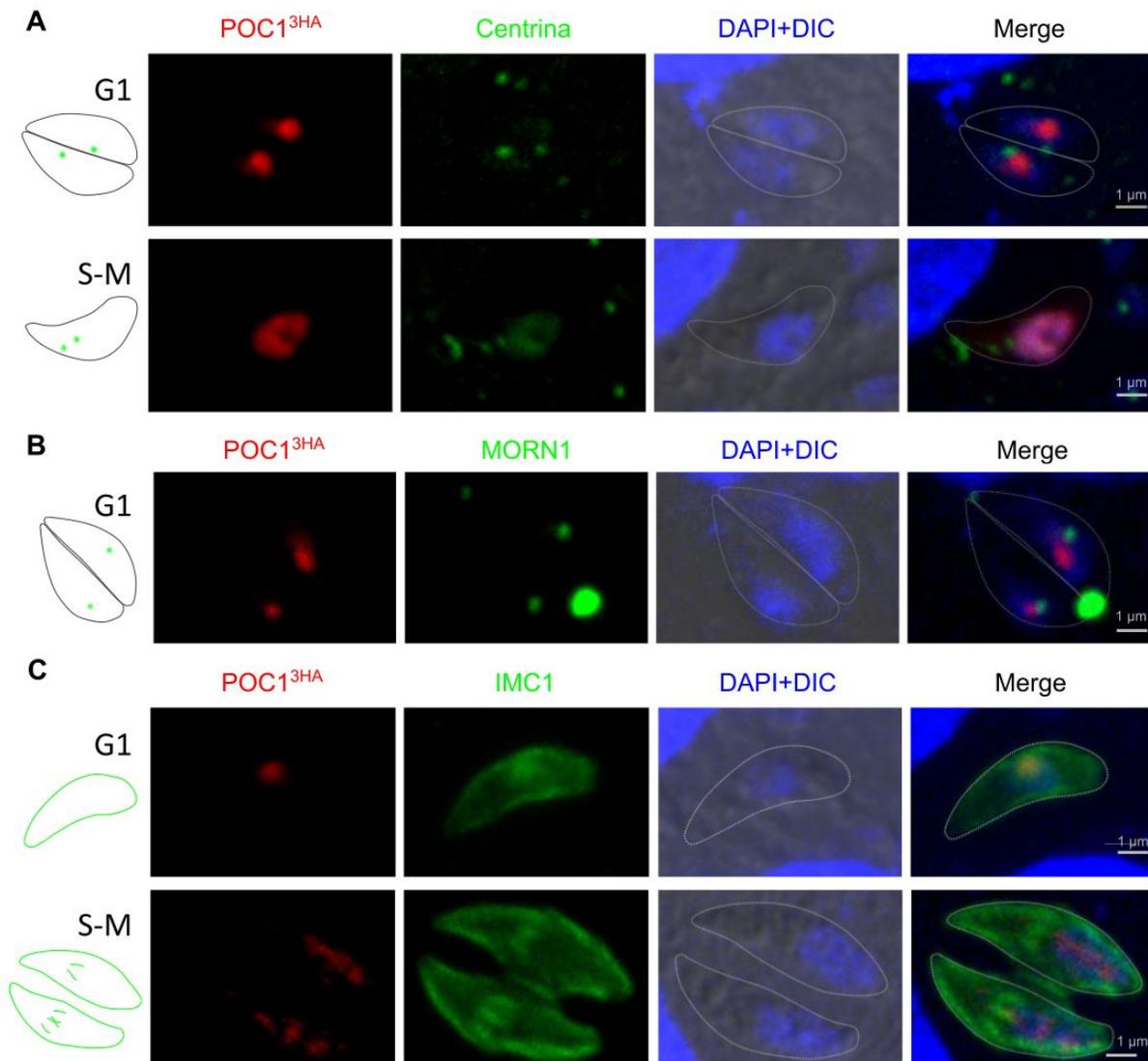


Figura 12. Localización de POC1 por inmunofluorescencia. La determinación de la localización se realizó con respecto a distintos marcadores del ciclo celular: Centrina (A), MORN1 (B) e IMC1 (C). En cada sección A, B y C se muestran las distribuciones nucleares puntual y general observadas para POC1.

3.2.2 Identificación de la localización de PP1

Al igual que para POC1, se procedió experimentalmente de la misma forma para establecer la localización de PP1. A partir de las observaciones realizadas sobre las poblaciones transfectadas a través de microscopía láser confocal, fue posible bosquejar un patrón de localización dinámica de PP1 a lo largo del ciclo celular. La interpretación del momento del ciclo celular en el que se encontraban los parásitos se basó en: el número de centrosomas, la distancia que hay entre centrosomas en el caso de que sean dos y la forma de los núcleos. El criterio usado para establecer que solamente se está observando un solo centrosoma es que la señal se observe en no más de cuatro cuadros siendo la distancia entre ellos a lo largo del eje z de 200 nm. Si la señal persiste en más de cuatro, a más de 600 nm, se está observando

dos centrosomas muy juntos y dispuestos a lo largo del eje z. Esto se basa en las dimensiones de los centrosomas de *Toxoplasma* que es de 250 nm de diámetro, en la distancia entre cuadros a la que se configuró las adquisiciones de los z-stack (200 nm) y en que la señal que se observa abarca un radio mayor que el radio efectivo que ocupan los centrosomas (por eso se tomaron cuatro cuadros y no dos). En la Figura 13 se muestra como PP1 adquiere una localización que evoluciona desde centrosomal hacia nuclear durante la progresión del ciclo celular. En A (Figura 13) la señal del anticuerpo anti-HA co-localiza con la de centrina, la cual se observa como un único punto que no supera los 400 nm a lo largo del eje z. A partir de esto se puede decir que PP1 tiene una localización centrosomal y se da cuando la célula posee un solo centrosoma, cuando se encuentra en la fase G1. Aún resta por saber si se da durante todo G1 o sólo en parte. Para determinar que realmente se co-localizan las señales se generaron las proyecciones en los ejes x, y, z del z-stack (Figura 14). Posteriormente, en B, C y D se muestra cómo PP1 adquiere una localización nuclear una vez que los centrosomas se han duplicado. En B los centrosomas duplicados se muestran claramente separados, posiblemente en una fase S avanzada o comienzo de M, la señal PP1_3HA se observa en el núcleo sin rastros del mismo en los centrosomas. En C ya se observa a las células en fase M con los centrosomas muy separados donde los núcleos adquirieron una forma bilobular, característico de la mitosis en estos parásitos y la localización de PP1_3HA continúa siendo nuclear. Si bien en la figura se puede observar una aparente superposición de las señales de centrina y PP1_3HA no podemos afirmar que se colocalizan debido a que en las restantes adquisiciones observadas no se observó tal superposición (ver *Cuantificación y aproximación al*

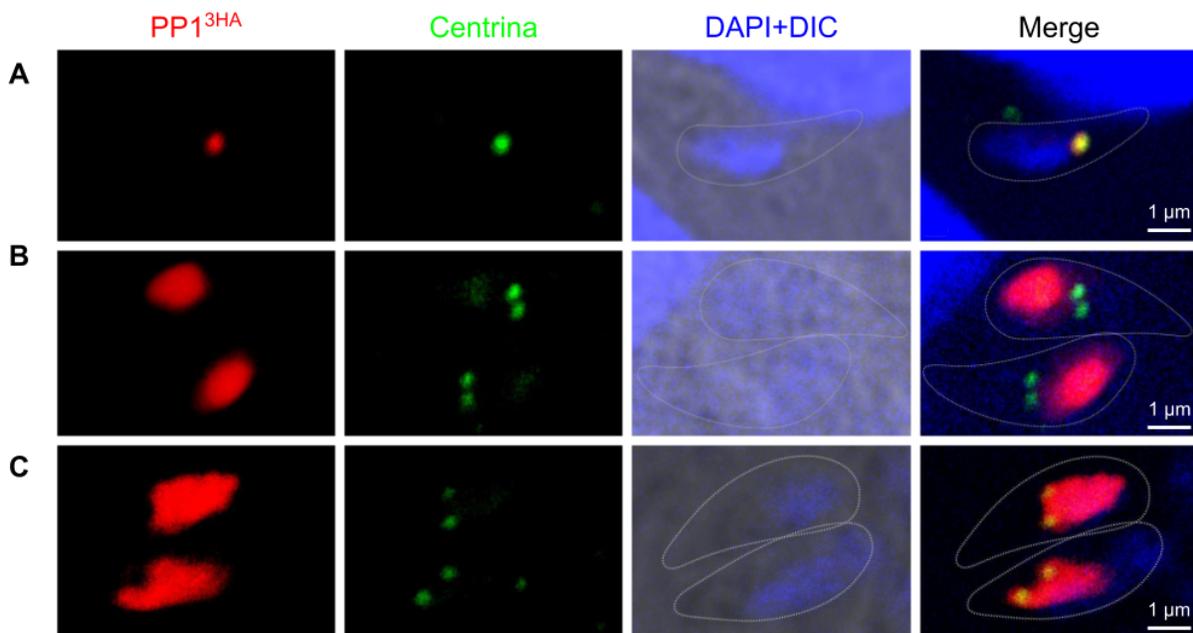


Figura 13. Localización de PP1_3HA (rojo) a lo largo de diferentes momentos del ciclo celular con respecto a centrina (verde) y el núcleo (DAPI con DIC, en azul). En la primera fila (A) se muestra una localización centrosomal de PP1_3HA con la superposición de la señal con centrina donde se puede distinguir un solo centrosoma característico de la fase G1. En las siguientes tres filas B y C se muestran células con sus centrosomas duplicados en diferentes momentos del ciclo celular y cómo PP1_3HA va adquiriendo una localización nuclear a medida que se avanza desde la fase S hacia M. En D se puede observar el núcleo bilobulado característico de la mitosis cerrada de

apicomplejos y cómo esta localización nuclear permanece durante la misma.

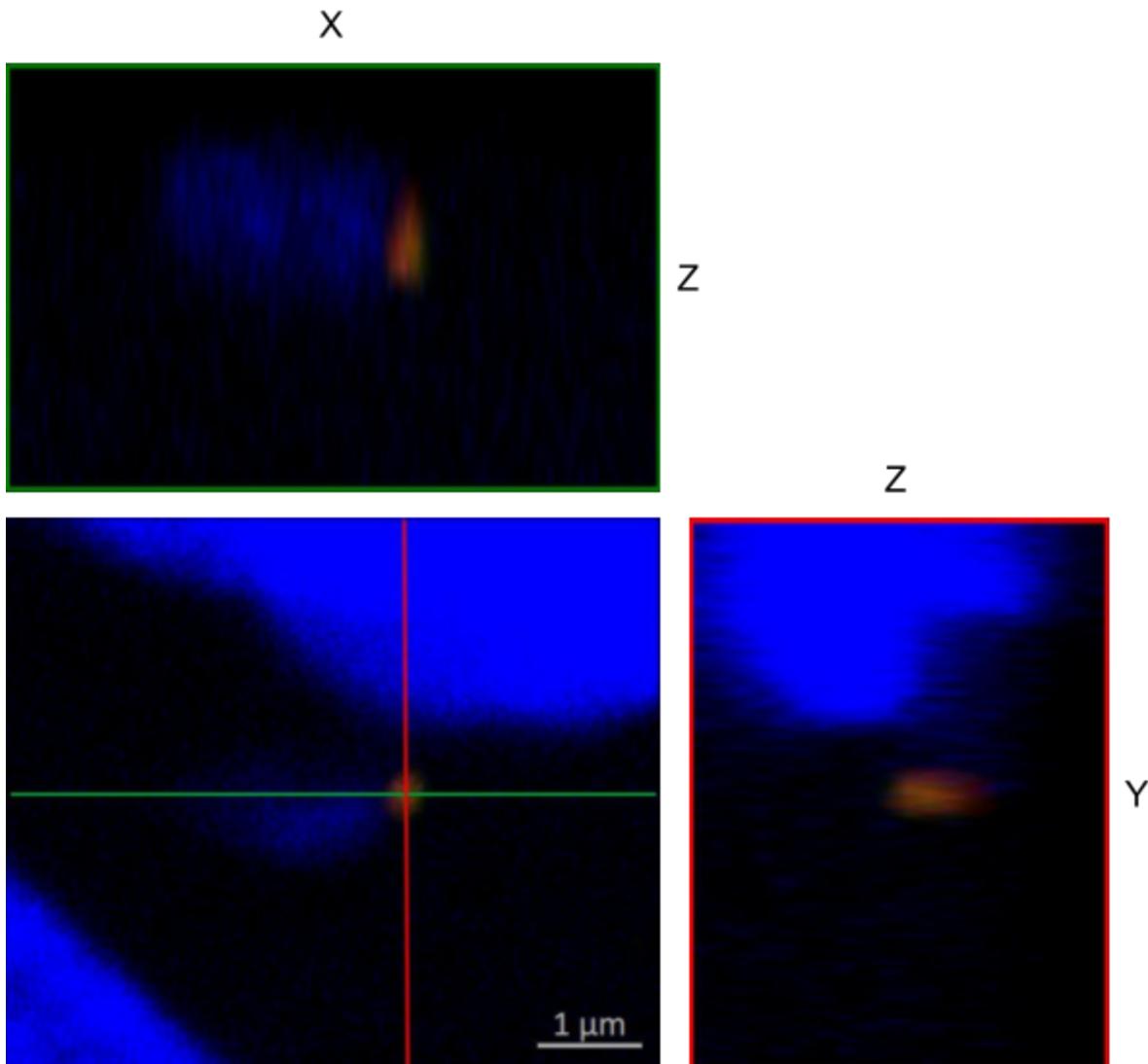


Figura 14. La señal de PP1_3HA se colocaliza con centrina en los diferentes planos comprendidos entre los ejes x, y, z del z-stack.

ciclo celular). La elección de esta adquisición se basó en la claridad con la que se puede observar el núcleo bilobular en un plano que favorece la observación del mismo junto con los centrosomas. Si bien se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con los marcadores del ciclo celular MORN1 e IMC1 eventualmente no se logró hacer una reconstrucción con los distintos marcadores y determinar una congruencia entre los mismos a causa de que estos marcadores, por su localización celular, pueden ser difíciles de resolver en las adquisiciones obtenidas con un microscopio confocal.

3.2.3 Cuantificación y aproximación al ciclo celular

Las observaciones de la población donde se hizo el knock-in en PP1 arrojaron un patrón de localización que alterna entre centrosomal y nuclear, así como un posible arresto entre las fases S y M debido a un predominio en la población de células con dos centrosomas. Para evaluar estas hipótesis, se realizaron cuantificaciones a partir de adquisiciones en z-stack realizadas en microscopio confocal, tanto en poblaciones de la cepa parental como de la transfectada luego de 48hs de la transfección e inoculación en células hospederas. En las mismas se contabilizó el número de parásitos por vacuola, el número de centrosomas en cada célula y la localización de la marcación con el anticuerpo anti-HA en el caso de la población transfectada.

En una primera instancia se evaluó en la población transfectante el número de centrosomas en función de la localización de la señal de PP1 marcado. Asumiendo que cuando una célula tiene un solo centrosoma (que se observa como un solo punto de señal del anticuerpo anti-centrina) se encuentra en fase G1 y cuando tiene dos centrosomas está en S o M, este criterio permitió establecer una aproximación del momento del ciclo celular en el que PP1 se localiza en el centrosoma y cuándo en el núcleo. Como se observa en el gráfico A de la Figura 15, cuando PP1 se localiza en el centrosoma siempre se da cuando este aún no se ha duplicado, en la fase G1, mientras que la localización nuclear predomina luego de que el parásito ha duplicado sus centrosomas. Sin embargo, existe un proporción de la población con un solo centrosoma cuando PP1 se observa en el núcleo.

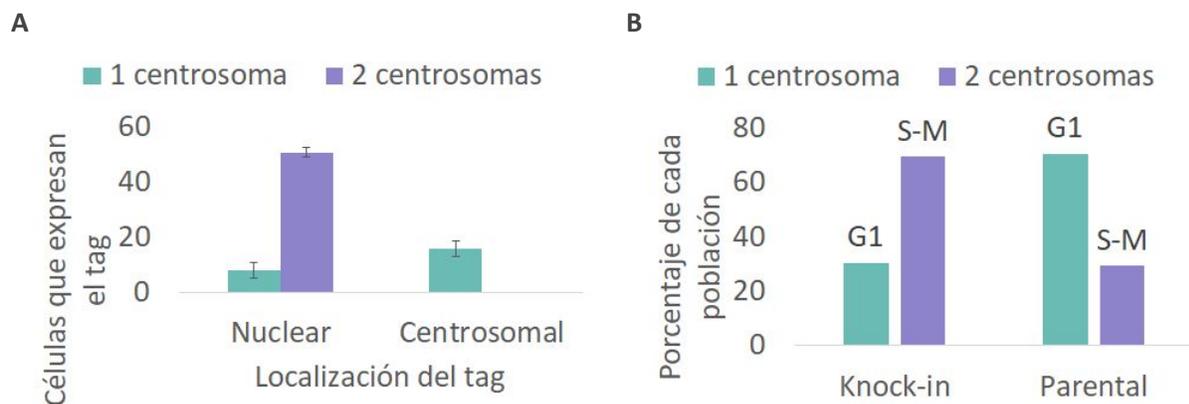


Figura 15. Cuantificación de diferentes poblaciones celulares en función del número de centrosomas. (A) Análisis del número de células que expresan PP1_3HA en función de la localización de la señal de PP1_3HA y del número de centrosomas. En dicho gráfico se observa un claro predominio de una localización nuclear del tag cuando las células poseen dos centrosomas, mientras que siempre que se registra una localización centrosomal esta sólo se da en presencia de un solo centrosoma o cuando aún no se ha duplicado. En B se buscó establecer si existe un cambio en la progresión del ciclo celular en células transfectantes versus en la cepa parental. Para el mismo se representó el porcentaje de las poblaciones de células con el *Knock-in* y de la cepa parental separadas a su vez por el número de centrosomas, observándose un aumento en la población *knock-in* de células en fases S-M comparado con las condiciones salvajes de la cepa parental donde existe un predominio de células en G1.

Por otro lado, se notó un predominio de células con dos centrosomas, es decir que se encontraban en fases S o M. Además en base a ensayos de transfección anteriores se sabía que no se podía establecer una población de transfectantes y aislar clones ya que los mismos no eran viables por mucho tiempo. De hecho se intentó aislar sin éxito clones de parásitos con *knock-in* para PP1 y POC1. Por consiguiente se

evaluó el porcentaje de la población con *knock-in* y de la cepa parental en función del número de centrosomas (Figura 15B), de esta forma se pudo comparar las proporciones de células en G1 y S-M entre la población transfectante y la parental. Asumiendo que las células pasan un 75% del tiempo de su ciclo en G1 y que el 25% restante están en S y M, es posible inferir que estos porcentajes se reflejan directamente sobre las poblaciones de parásitos. Es decir, en una población salvaje (o parental) se tendría aproximadamente un 75% de células en G1 y un 25% en S-M. De esta forma se determinó que existe una acumulación de células en las fases S y M en parásitos transfectantes, con un 69.6% de células con dos centrosomas y un 30.4% con un centrosoma versus un 29.4% con dos y 70.6% con un centrosoma en la población parental que posiblemente sea por un arresto entre esas fases del ciclo.

3.3 Clonación en pGEM de los ADNc de PP1 y POC1

La finalidad de este experimento consistió en intentar clonar los ADNc de PP1 y POC1 en el vector de expresión pMyc a través de una previa subclonación en pGEM. La clonación de los ADNc en pGEM permitió secuenciar los insertos para verificar su integridad y también conservar los mismos en un vector de fácil manipulación para usos posteriores.

Los productos obtenidos luego de las digestiones con PaeI y PstI de pGEM_PP1 y pGEM_POC1 mostraron al vector de 3015 pb y a los insertos de ADNc para PP1 y POC1 de unos 921 pb y 966 pb respectivamente. Además se secuenciaron los insertos con el primer M13 reverso corroborando exitosamente la inserción de las secuencias de los ADNc de PP1 y POC1 en pGEM.

Aún queda pendiente clonar estos ADNc en el vector de expresión pTUB_mycGFP_Myo_A_Tail_Ty_HX para así sobreexpresar estas proteínas en *T. gondii* e idealmente taggear las mismas con GFP en el extremo N-terminal. De esta forma se espera observar el fenotipo y determinar si la introducción del tag en otra posición distinta a la del extremo C no afecta la viabilidad de los parásitos. Queda pendiente en las perspectivas la concreción de este experimento.

4 Discusión

4.1 POC1, una eventual divergencia evolutiva en los Apicomplexa

Hodges y colaboradores realizaron un extenso trabajo donde analizaron la distribución de distintas proteínas centriolares y centrosomales entre los eucariotas, en el mismo identificaron 14 proteínas centriolares que posiblemente se encontraban en el ancestro de los eucariotas y que este conjunto cumple funciones conservadas. POC1 es una de ellas, encontrándose ampliamente distribuida en grupos de eucariotas, sin embargo los apicomplejos aparentemente no contarían con un gen que codifica para la misma (Hodges et al, 2010). POC1 pertenece a una familia de proteínas conocidas como Pix proteins. La estructura de estas se caracteriza por dos sub-estructuras conservadas: una región N-terminal que contiene siete repeticiones del motivo WD40 al cual denominan dominio WD40 y una pequeña región coiled-coil cerca de C-terminal (Hames, et al, 2008) en donde Hodges y colaboradores lograron establecer una secuencia consenso con los últimos 50 aminoácidos para POC1. El dominio WD40 se pliega en una estructura β -hélice que provee de una superficie para interacciones entre proteínas y ADN. En centriolos maduros, POC1 se localiza a lo largo de las paredes externas e internas de la estructura microtubular de los mismos, salvo en el lumen. Su patrón de localización da indicios de que puede estar involucrado en el establecimiento y mantenimiento de estructuras microtubulares sobre todo en estadios tempranos de la duplicación centriolar, jugando un papel en el control de su longitud y en el anclaje de los cuerpos basales a través de múltiples sistemas de fibras (Keller et al, 2009). Se ha observado que POC1 se encuentra en los centriolos madre e hija tanto en *Chlamydomonas* como en células humanas HeLa y U2OS (Keller et al, 2009).

Análisis más globales de proteínas centrosomales proponen que la función ancestral de los centriolos es construir cilios y flagelos móviles y que posteriormente devino la integración progresiva de los centriolos en aspectos de la división celular. La estrecha vinculación de la replicación centriolar al ciclo celular habría conducido al centriolo a convertirse en una plataforma para las moléculas que regulan el ciclo y para el agregado de proteínas nucleadoras de microtúbulos (Woodland & Fry, 2008). Para una célula flagelada ancestral, sería ventajoso evolutivamente acoplar los cuerpos basales, los precursores de los centriolos, a la función organizadora de microtúbulos y regulatoria del ciclo celular como un medio de garantizar la fidelidad en la herencia equitativa de cilios o flagelos hacia las células hijas (Bornens & Azimzadeh, 2007).

Los resultados obtenidos de la observación por inmunofluorescencia de los knock in de POC1 en *T. gondii* arrojaron una localización exclusivamente nuclear, que alterna entre una distribución discreta en la fase G1, y una más general durante S-M presentando regiones de mayor intensidad sobre la cromatina, sobre todo en una región cuya morfología al microscopio es compatible con la del nucleolo. Estos resultados no son congruentes con la hipótesis propuesta donde se infería una localización centrosomal de acuerdo con los análisis bioinformáticos (Morlon-Guyot et al, 2017).

En caso de que dicha proteína sea de hecho el homólogo funcional de POC1 y se localice en el centrosoma en cepas salvajes, una posible explicación es que la introducción del tag 3HA en el extremo C-terminal haya interferido o bloqueado alguna región de la proteína involucrada en su reclutamiento hacia el centrosoma. Sin embargo, varios autores han logrado en humano y en *Chlamydomonas* taggear a POC1 exitosamente observando una localización exclusivamente centrosomal. Construcciones de

POC1 fusionado a GFP en C-terminal ayudaron a determinar cuál región de la proteína es relevante para su reclutamiento en el centrosoma. Descubrieron que sólo el dominio WD40 del extremo N-terminal es suficiente para dirigir su localización en células humanas. Los fragmentos parciales del dominio WD40 así como la región de la secuencia consenso en C-terminal no son suficientes para la correcta localización (Keller et al, 2009).

Por otro lado, desde una perspectiva evolutiva, se ha propuesto que la función clave a lo largo de la evolución de las proteínas Pix es la construcción de cilios y flagelos que poseen movilidad. Las mismas sólo se encuentran en coexistencia con el sistema de transporte intraflagelar (IFT), siendo este sistema necesario para la construcción de cilios. Existe una divergencia de las proteínas Pix que se correlaciona con una disminución del papel de los cilios y flagelos, acompañado con una simplificación de los centríolos tal como sucede en *C. elegans*. POC1 es una proteína conservada evolutivamente en los organismos eucariotas con centríolos formados por tripletes de microtúbulos y cilias (Keller et al, 2009). Sin embargo está ausente en *C. elegans*, al igual que otras proteínas como centrina y ϵ - y δ -tubulina con sus centríolos simplificados, cortos, formados por singletes, siendo muy divergentes. *C. elegans* también carece de una cilia móvil, sugiriendo que posiblemente POC1 se asocie con la movilidad (Keller et al, 2009). Análisis de RNAseq realizados sobre muestras de enteroepitelios de gatos infectados a diferentes tiempos post infección muestran un claro incremento en el nivel de expresión de genes putativos implicados en la formación de flagelos como lo son genes del sistema de transporte intraflagelar. En este ensayo se parte de la idea de que durante la infección en el enteroepitelio de gatos se da el desarrollo de gametos flagelados, la intención de este trabajo fue determinar la expresión diferencial que existe entre taquizoítos y gametocitos. De estos datos de transcriptómica surge que el nivel de expresión del gen hipotético para POC1, TGME49_216880, se da claramente incrementada acompañando la tendencia de los demás genes implicados en la formación de flagelos (Ramakrishnan et al, 2019).

Por consiguiente la presencia de POC1 (y otros genes Pix) en organismos eucariotas se correlaciona con determinado nivel de complejidad centriolar que posibilita la movilidad ciliar o flagelar y que implica la presencia del sistema IFT. Los Apicomplejos desafían esta correlación. Estos protistas poseen flagelos en algún estadio de su ciclo de vida pero aparentemente carecen de genes Pix. *Plasmodium*, posee flagelos que parecen ser más simples que los de otros eucariotas, además sus genomas carecen de genes para el sistema IFT (Woodland & Fry, 2008). Entonces, es posible que POC1 en *T. gondii* durante el curso de su evolución desde el ancestro de los flagelados, haya sufrido una divergencia adquiriendo otras funciones posiblemente vinculadas al ciclo celular, ya que se observó un comportamiento dependiente del estadio del ciclo, pero sin un reclutamiento en el centrosoma, al menos en el estadio de taquizoíto donde no se encuentran flagelos y cilias móviles. Un incremento en el nivel de expresión del gen hipotético para POC1 en gametos sugiere que POC1 posiblemente cumpla alguna función conservada en la formación de los flagelos. La explicación más parsimoniosa es que esta divergencia se dió acompañada o como consecuencia del encarecimiento de la complejidad centriolar y de la pérdida del sistema IFT, más allá de que es posible que aún conserve su función ancestral flagelar que se manifiesta en los gametos.

4.2 El homólogo de PP1, una posible localización centrosomal

La proteína fosfatasa 1 (PP1) es una enzima cuya secuencia se ha conservado a lo largo de la evolución y se encuentra involucrada en un amplio espectro de procesos celulares como el metabolismo de

glucógeno, la síntesis proteica, la división celular y la apoptosis (Ceulemans & Bollen, 2004). Se estima que PP1 junto con PP2A poseen más del 90% de la actividad fosfatasa en células eucariotas y cerca de un tercio de todas las proteínas son desfosforiladas por PP1 (Bollen et al, 2010).

Las fosfatasas se dividen en tres grandes categorías según el aminoácido que desfosforila: las serina/treonina fosfatasas, tirosina fosfatasas y las fosfatasas que actúan sobre los tres residuos. Las serina/treonina fosfatasas están conformadas por tres familias, las fosfoproteínas fosfatasas (PPPs), las fosfatasas dependiente de Mg^{2+} y Mn^{2+} (PPMs) y fosfatasas basadas en aspartato (Shi, 2009). PP1 se encuentra dentro de la primera familia junto con otras PPPs como PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7.

La holoenzima de PP1 está formada por una subunidad catalítica altamente conservada llamada subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c) la cual forma un complejo con varias subunidades reguladoras variables, las cuales interaccionan con la subunidad catalítica a través de motivos de unión de PP1. La diversidad de subunidades regulatorias que modulan la actividad de PP1 es tal que se ha propuesto un código de unión a PP1, donde las distintas combinaciones de los diferentes tipos de moléculas que se unen a PP1 dirigen su actividad fosfatasa, creando de esta forma holoenzimas con propiedades únicas (Heroes et al, 2012). De hecho, la mayor parte de la superficie de PP1 son interfases de interacción con otras proteínas lo cual limita la velocidad de evolución, haciendo que PP1 se conservara a lo largo de la evolución y mantuviese un grado de homología elevado entre los distintos linajes eucarióticos (Bhattacharya et al, 2009). La estructura cristalina de la subunidad catalítica de mamíferos reveló que PP1 es una metaloenzima con dos iones metálicos divalentes de Fe^{2+} y Zn^{2+} en el centro del sitio catalítico (Wozniak et al, 2000). Además de las subunidades reguladoras, PP1 posee numerosos sitios de unión a otras proteínas. Dichas proteínas de unión a PP1 modulan su actividad tanto inhibiendo su actividad catalítica como especificando sustratos (Bollen et al, 2010).

En un trabajo realizado por Daher y colaboradores, examinaron la secuencia nucleotídica del genoma de *T. gondii* en busca de un marco abierto de lectura (ORF) para PP1, hicieron una predicción de un ORF de 921 pb compuesto por cinco exones interrumpidos por cuatro intrones que codifican 306 aminoácidos, logrando confirmar dicho marco por RT-PCR y secuenciación (Daher et al., 2007). A su vez compararon la secuencia aminoacídica con la de *P. falciparum* y *H. sapiens* arrojando un 90% y un 89% de identidad, respectivamente. Además PP1 en humanos posee 23 aminoácidos más en el extremo C-terminal que su homólogo en *T. gondii*. A su vez demostraron *in-vitro* su actividad fosfatasa a través de la expresión heteróloga de TgPP1 y del empleo de p-nitrofenil fosfato como sustrato.

El homólogo de PP1 en *T. gondii* adquiere localizaciones nucleocitoplasmáticas, tanto en taquizoítos como en bradizoítos, mediante la transfección de su secuencia codificante fusionada con el epitope tag cMyc (Daher et al., 2007). Si bien PP1 se expresa de forma constitutiva, la baja en las tasas de replicación y de metabolismo que se da en el cambio del estadio de taquizoito hacia el bradizoíto se correlacionan con un cambio en la localización de PP1 posiblemente vinculada a la actividad regulatoria post-traducciona como lo es la fosforilación y desfosforilación. En los bradizoítos, TgPP1 se encontró principalmente en el citoplasma, sin excluir la posibilidad de que una pequeña cantidad también pueda estar presente en el núcleo. La señal nuclear de TgPP1 es más fuerte en los taquizoítos que la encontrada en los bradizoítos.

En los ensayos de knock-in realizados en el presente trabajo sobre TgPP1 se observó consistentemente que siempre que los taquizoítos poseían dos centrosomas, eran acompañados por una clara señal en el núcleo, es decir que las células se encontraban en fases S-M cuando TgPP1 se encontraba en el núcleo. Trabajos realizados en células de mamíferos, se correlacionan con las observaciones anteriores, donde

se detectó grandes cantidades de PP1 en el núcleo cuando las células ingresan en mitosis (Fernandez et al, 1992). Acerca del rol que puede llegar a tener TgPP1 en el núcleo de *T. gondii* aún continúa sin una explicación precisa. Daher y colaboradores realizaron varios ensayos donde demuestran su localización nuclear y proponen que la proteína TgLRR1, que se localiza exclusivamente en el núcleo, interacciona con TgPP1 inhibiendo su actividad fosfatasa. TgLRR1 posee una expresión diferencial entre bradizoitos y taquizoitos con un mayor nivel en taquizoitos. En el mismo trabajo sugieren que la inhibición nuclear de TgPP1 por TgLRR1 está involucrada en la progresión del ciclo celular en base a experimentos realizados en *Xenopus* donde se demostró el rol de la inhibición de PP1 por parte de TgLRR1 necesario para iniciar un nuevo ciclo celular (Daher et al, 2007). Por otro lado, en un trabajo realizado por Deveuve y colaboradores encontraron un homólogo del Inhibidor-2 (Hsl2) el cual se sabe que es un regulador de PP1 en varios organismos. En la secuencia del inhibidor encontraron tres motivos de unión a PP1, los cuales son similares a los que se encuentran en el inhibidor-2 de humanos (Bollen et al., 2010), dos de los mismos ya habían sido identificadas en el inhibidor-2 de *Plasmodium falciparum* (Fréville et al., 2013). En dicho trabajo evaluaron *in vitro* la especificidad y la inhibición de Tgl2 hacia la actividad fosfatasa de TgPP1 y la capacidad que posee cada motivo de unión para unirse e inhibir a TgPP1 a través de la mutagénesis de los distintos motivos (Deveuve et al, 2019). También encontraron que Tgl2 se localiza de igual forma que TgPP1 tal como lo describió Daher y colaboradores en 2007, adquiriendo localizaciones nucleares y citoplasmáticas sugiriendo que ambas proteínas pueden estar interactuando en esos lugares. Sin embargo encontraron un motivo PxTP que está conservado en Tgl2, dicho motivo en el Hsl2 se encuentra fosforilado durante la mitosis el cual conduce a un incremento de la localización del inhibidor en el centrosoma (Leach et al., 2003).

Trabajos realizados sobre células humanas sugieren un papel de PP1 en la disyunción de los centrosomas y en la progresión del ciclo celular, ya en parte discutida para su localización nuclear. En nuestro trabajo, esquematizado en las figuras 9 y 10, se puede observar una señal de PP1 que se co-localiza con un único punto de centrina, lo cual sugiere que PP1 se localiza en el único centrosoma del parásito durante G1. Trabajos anteriores donde se analiza la localización de TgPP1 en *T. gondii* reportaron una localización nuclear y citoplasmática pero sin indicar ninguna localización específica sobre algún otro organelo (Daher et al., 2007). Sin embargo, estas observaciones se basaron en resultados experimentales obtenidos a partir de la sobre-expresión de la proteína.

En humanos, C-Nap1 o también conocida como CEP250, es necesaria para la cohesión entre centríolos durante la interfase. La quinasa Nek2A fosforila a C-Nap1 promoviendo la separación durante la transición G2/M para formar un huso bipolar en las células humanas. Para contrarrestar la actividad de Nek2A, está PP1. Este mecanismo está mediado por la Polo like kinase 1 (Plk1) la cual fosforila a Mst2. El estado de fosforilación de Mst2 controla el equilibrio entre Nek2A y PP1 para fosforilar C-Nap1 ya que la fosforilación de Mst2 por Plk1 evita la unión de PP1 a Mst2-Nek2A, eso permite que la actividad de Nek2A fosforile a C-Nap1 y promueva la disyunción del centrosoma. En contraste, ante la ausencia de fosforilación de Mst2, el mismo promueve el ensamblaje de los complejos Nek2A-PP1-Mst2, en donde PP1 contrarresta la actividad de la quinasa Nek2A.

De hecho, se ha demostrado la existencia de los homólogos humanos de C-Nap1 y de Nek2A en *T. gondii*, TgCEP250 y TgNek1 (Suvorova et al, 2014; Chen & Gubbels, 2013, 2019). Por consiguiente, es posible que en estos organismos exista un mecanismo homólogo, donde se podría hipotetizar que durante G1 una localización centrosomal de PP1 antagonice a TgNek1 evitando la fosforilación de TgCEP250 y eventualmente una disyunción de los centríolos de forma prematura. En el ingreso a la fase

M, un mecanismo de exclusión de PP1 en el centrosoma, como lo es la fosforilación de Mst2 por Plk1 en mamíferos, evitaría que la actividad fosfatasa de PP1 antagonice a TgNek1 permitiendo así la fosforilación de TgCEP250 por TgNek1 conduciendo así a la separación de los centriolos. Aún resta por identificar cuál sería el mecanismo de exclusión de PP1 ya que se sabe que en *T. gondii* no posee PLKs como la PLK1 anteriormente mencionada. Este último enunciado podría ser una posible explicación a la ausencia observada de TgPP1 en centrosomas durante las fases S-M.

Por medio de este trabajo se demostró una posible localización dinámica de PP1 a lo largo del ciclo celular con una localización centrosomal durante G1, posiblemente vinculada a evitar la disyunción prematura de los centrosomas, y una vez que se alcanza las fases S y M PP1 adquiere una localización nuclear donde podría realizar funciones vinculadas a la regulación post-transcripcional y a la progresión del ciclo celular.

5 Perspectivas

La presencia del motivo WD40 le permite a POC1 interactuar con proteínas como con ADN, las localizaciones nucleares observadas sería un indicio de que posea un rol como componente de la cromatina. Ensayos como el CHIP permitirían determinar si TgPOC1 se une a determinados tipos de secuencias e inferir en base a esta información la función que cumple en el núcleo. Por otro lado, en lo que se refiere a la expresión diferencial en diferentes estadíos del parásito, sería interesante evaluar la localización de TgPOC1 en el microgameto, estadío en donde se da el desarrollo flagelar, con la finalidad de que ante una posible divergencia en la funcionalidad de TgPOC1, evaluar si aún conserva funciones ancestrales de formación de flagelos y del control en la elongación de polímeros de MTs en estadíos flagelares. Aunque aún la diferenciación en gametos *in vitro* es técnicamente limitante, se ha logrado inducirla a través del agregado de ácido linoleico al cultivo.

En tanto, para PP1 la diversidad de interactores que modulan su actividad fosfatasa es un tema que ha sido estudiado intensamente en varios organismos, para nosotros sería interesante profundizar sobre este código de interactores en *T. gondii*, ya que cabe la posibilidad de que existan divergencias con respecto a otros organismos, relevante en la búsqueda de blancos moleculares contra este parásito.

En nuestro trabajo, aún queda pendiente lograr taguear en el extremo N-terminal de la proteína y sobreexpresarla como alternativa a la expresión endógena y al tag en C-terminal. Para así determinar si todo esto no altera la funcionalidad a tal punto de producir la muerte celular. De esta forma intentar lograr poblaciones estables que permitan el clonado y la realización de ensayos sobre poblaciones clonales como ensayos de co-inmunoprecipitación y espectrometría de masa. Estos eventuales ensayos serían necesarios para validar la localización dinámica observada. Sobreexpresar a PP1 en una cepa que a su vez tenga marcada a CEP250 permitiría observar si existe una interacción entre ambas a través de un posible complejo análogo al Nek2A-PP1-Mst2, en qué momento del ciclo celular se dá y si las mismas se reclutan en el centrosoma. Debido a que la marcación en C-terminal con 3HA no resultó ser viable a largo plazo como para desarrollar poblaciones estable. Una opción sería expresar a TgPP1 en algún sistema heterólogo para la realización de ensayos de pull down o de co-inmunoprecipitación y así determinar interacciones con otras proteínas, sobre todo con posibles reguladores de la disyunción centrosomal que actúen de forma dependiente del ciclo celular. También sería interesante desarrollar anticuerpos contra TgPP1 a partir de su sobreexpresión en sistemas de expresión de proteínas. Estos anticuerpos permitirían la realización de los ensayos mencionados sin recurrir a la introducción de tags en la secuencia peptídica.

Bibliografía

Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., ... & Kolisko, M. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*, 56(4), 684-689.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... & James, T. Y. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.

Alvarez, C. A., & Suvorova, E. S. (2017). Checkpoints of apicomplexan cell division identified in *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 13(7), e1006483.

Anderson-White, B., Beck, J. R., Chen, C. T., Meissner, M., Bradley, P. J., & Gubbels, M. J. (2012). Cytoskeleton assembly in *Toxoplasma gondii* cell division. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 298, pp. 1-31). Academic Press.

Azimzadeh, J., & Marshall, W. F. (2010). Building the centriole. *Current Biology*, 20(18), R816-R825.

Azimzadeh, J., Hergert, P., Delouvee, A., Euteneuer, U., Formstecher, E., ... Khodjakov, A. (2009). hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *Journal of Cell Biology*, 185, 101–114.

Bahe, S., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J., Leiss, F., & Nigg, E. A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *The Journal of cell biology*, 171(1), 27-33.

Bastin, P., Bagherzadeh, A., Matthews, K. R., & Gull, K. (1996). A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 77(2), 235-239.

Belluco, S., Mancin, M., Conficoni, D., Simonato, G., Pietrobelli, M., & Ricci, A. (2016). Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: a systematic review and meta-regression. *PloS one*, 11(4).

Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M. K., ... & Glover, D. M. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Current Biology*, 15(24), 2199-2207.

Birkholtz LM, Blatch G, Coetzer TL, Hoppe HC, Human E, Morris EJ, Ngcete Z, Oldfield L, Roth R, Shonhai A et al. (2008) Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malar J* 7, 197.

Bisio, H., Lunghi, M., Brochet, M., & Soldati-Favre, D. (2019). Phosphatidic acid governs natural egress in *Toxoplasma gondii* via a guanylate cyclase receptor platform. *Nature microbiology*, 4(3), 420-428.

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J., & Beullens, M. (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences*, 35(8), 450-458.

Boris Striepen, Carly N. Jordan, Sarah Reiff, Giel G. van Dooren (2007) Building the perfect parasite: Cell division in Apicomplexa. *PLoS Pathog* 3(6): e78.

- Bornens, M. and Azimzadeh, J. (2007). Origin and evolution of the centrosome. In *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution* (ed. G. Jékely), pp. 119-129. Austin, TX: Landes Bioscience.
- Brooks, C. F., Francia, M. E., Gissot, M., Croken, M. M., Kim, K., & Striepen, B. (2011). *Toxoplasma gondii* sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(9), 3767-3772.
- Brossier, F., Jewett, T. J., Sibley, L. D., & Urban, S. (2005). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(11), 4146-4151.
- Cesbron-Delauw, M. F., Lecordier, L., & Mercier, C. (1996). Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. In *Toxoplasma gondii* (pp. 59-65). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ceulemans, H., & Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews*, *84*(1), 1-39.
- Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2013). The *Toxoplasma gondii* centrosome is the platform for internal daughter budding as revealed by a Nek1 kinase mutant. *Journal of cell science*, *126*(15), 3344-3355.
- Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2019). TgCep250 is dynamically processed through the division cycle and is essential for structural integrity of the *Toxoplasma* centrosome. *Molecular biology of the cell*, *30*(10), 1160-1169.
- Courjol, F., & Gissot, M. (2018). A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*, *20*(6), e12832.
- Daher, W., Oria, G., Fauquenoy, S., Cailliau, K., Browaeys, E., Tomavo, S., & Khalife, J. (2007). A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryotic cell*, *6*(9), 1606-1617.
- de Leon, J. C., Scheumann, N., Beatty, W., Beck, J. R., Tran, J. Q., Yau, C., . . . Bradley, P. J. (2013). A SAS-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryotic Cell*, *12*, 1009-1019.
- Deveuve, Q., Lesage, K., Mouveaux, T., & Gissot, M. (2017). The *Toxoplasma gondii* inhibitor-2 regulates protein phosphatase 1 activity through multiple motifs. *Parasitology research*, *116*(9), 2417-2426.
- Dubey, J. P. (2014). The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (pp. 1-17). Academic Press.
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., & Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitology research*, *79*(5), 402-408.
- Duo Peng and Rick Tarleton. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial Genomics*. 2015. doi: 10.1099/mgen.0.000033

- Ferguson, D. J., & Dubremetz, J. F. (2014). The ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (pp. 19-59). Academic Press.
- Fernandez, A., Brautigan, D. L., & Lamb, N. J. (1992). Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *The Journal of cell biology*, *116*(6), 1421-1430.
- Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(2), 125.
- Francia, M. E., Jordan, C. N., Patel, J. D., Sheiner, L., Demerly, J. L., Fellows, J. D., ... & Striepen, B. (2012). Cell division in Apicomplexan parasites is organized by a homolog of the striated rootlet fiber of algal flagella. *PLoS biology*, *10*(12).
- Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, et al. (2012) Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLoS Biol* *10*(12): e1001444. doi:10.1371/journal.pbio.1001444
- Frenkel, J. K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitology Today*, *4*(10), 273-278.
- Fréville, A., Cailliau-Maggio, K., Pierrot, C., Tellier, G., Kalamou, H., Lafitte, S., ... & Khalife, J. (2013). *Plasmodium falciparum* encodes a conserved active inhibitor-2 for Protein Phosphatase type 1: perspectives for novel anti-plasmodial therapy. *BMC biology*, *11*(1), 80.
- Freyre, A., Bonino, J., Falcon, J., Castells, D., Correa, O., & Casaretto, A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary parasitology*, *81*(1), 85-88.
- Fry, A. M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., & Nigg, E. A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *The Journal of cell biology*, *141*(7), 1563-1574.
- Gonczy, P. (2012). Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nature Review & Molecular Cell Biology*, *13*, 425-435.
- Gudi, R., Zou, C., Li, J., & Gao, Q. (2011). Centrobin-tubulin interaction is required for centriole elongation and stability. *Journal of Cell Biology*, *193*:711-25.
- Hames RS, Hames R, Prosser SL, Euteneuer U, Lopes CAM, et al. (2008) Pix1 and Pix2 are novel WD40 microtubule-associated proteins that colocalize with mitochondria in *Xenopus* germ plasm and centrosomes in human cells. *Experimental Cell Research* *314*: 574-589.
- He, R., Huang, N., Bao, Y., Zhou, H., Teng, J., & Chen, J. (2013). LRRC45 is a centrosome linker component required for centrosome cohesion. *Cell Reports*, *4*, 1100-1107.
- He, X. L., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., & Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nature structural biology*, *9*(8), 606-611.
- Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., & Bollen, M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *The FEBS journal*, *280*(2), 584-595.

- Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (1995). Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 155-188.
- Hodges, M. E., Scheumann, N., Wickstead, B., Langdale, J. A., & Gull, K. (2010). Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *Journal of Cell Science*, 123, 1407–1413.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., Di Lullo, C., . . . Yates, J. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine —The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogenesis*, 2, e13.
- Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology*, 156(6), 1039-1050.
- Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogenesis*, 4, e10.
- Hutchison, W.M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206, 961e962.
- Huynh, M. H., & Carruthers, V. B. (2009). Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryotic cell*, 8(4), 530-539.
- Kafsack, B. F., Carruthers, V. B., & Pineda, F. J. (2007). Kinetic modeling of *Toxoplasma gondii* invasion. *Journal of theoretical biology*, 249(4), 817-825.
- Keller, L. C., Geimer, S., Romijn, E., Yates III, J., Zamora, I., & Marshall, W. F. (2009). Molecular architecture of the centriole proteome: the conserved WD40 domain protein POC1 is required for centriole duplication and length control. *Molecular biology of the cell*, 20(4), 1150-1166.
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International journal for parasitology*, 34(3), 423–432. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.009.
- Kobayashi, T., Tsang, W. Y., Li, J., Lane, W., & Dynlacht, B. D. (2011). Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell*, 145(6), 914-925.
- Kodani, A., Salome Sierrol-Piquer, M., Seol, A., Garcia-Verdugo, J. M., & Reiter, J. F. (2013). Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages. *EMBO Journal*, 32, 597–607.
- Kono, M., Prusty, D., Parkinson, J., & Gilberger, T. W. (2013). The apicomplexan inner membrane complex. *Frontiers in Bioscience*, 18, 982-992.
- Kratz, A. S., Bärenz, F., Richter, K. T., & Hoffmann, I. (2015). Plk4-dependent phosphorylation of STIL is required for centriole duplication. *Biology open*, 4(3), 370-377.
- Leach, C., Shenolikar, S., & Brautigan, D. L. (2003). Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 26015-26020.
- Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of parasitology*, 830-834.

- Lovett, J. L., & Sibley, L. D. (2003). Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *Journal of cell science*, *116*(14), 3009-3016.
- Luft, B., Conley, F., Remington, J., Laverdiere, M., Levine, J., Strandberg, D., Wagner, K.F., Craven, P.C., Strandberg, D.A., File, T.M., Rice, N., Meunier-Carpenter, F. (1983). Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *The Lancet*, *321*(8328), 781-784.
- Mahen, R., & Venkitaraman, A. R. (2012). Pattern formation in centrosome assembly. *Currents Opinion in Cell Biology*, *24*, 14–23.
- Makarova, M., & Oliferenko, S. (2016). Mixing and matching nuclear envelope remodeling and spindle assembly strategies in the evolution of mitosis. *Current opinion in cell biology*, *41*, 43-50.
- Mann, T., & Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, *115*(2), 257-268.
- Manna B, Bhattacharya T, Kahali B & Ghosh TC (2009) Evolutionary constraints on hub and non-hub proteins in human protein interaction network: insight from protein connectivity and intrinsic disorder. *Gene* *434*, 50–55.
- Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y. D., & Nigg, E. A. (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *Journal of Cell Science*, *115*, 3275–3284.
- Mercier, C., Adjogble, K. D., & Däubener, W. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *International journal for parasitology*, *35*(8), 829-849.
- Mi, J., Guo, C., Brautigan, D. L., & Larner, J. M. (2007). Protein phosphatase-1 α regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Research*, *67*, 1082–1089.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., & Ward, G. E. (2005). Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Molecular biology of the cell*, *16*(9), 4341-4349.
- Mordue, D. G., Håkansson, S., Niesman, I., & Sibley, L. D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental parasitology*, *92*(2), 87-99.
- Morlon-Guyot, J., Francia, M. E., Dubremetz, J. F., & Daher, W. (2017). Towards a molecular architecture of the centrosome in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton*, *74*(2), 55-71.
- Morrison, D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa: where are we now?. *Trends in parasitology*, *25*(8), 375-382.
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *66*(1), 21-38.
- Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N., & Sibley, L. D. (2008). Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature*, *451*(7175), 207-210.
- Nagamune, K., Moreno, S. N., Chini, E. N., & Sibley, L. D. (2008). Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. In *Molecular mechanisms of parasite invasion* (pp. 70-81). Springer, New York, NY.

- Narayan, A., Mastud, P., Thakur, V., Rathod, P. K., Mohmmmed, A., & Patankar, S. (2018). Heterologous expression in *Toxoplasma gondii* reveals a topogenic signal anchor in a *Plasmodium* apicoplast protein. *FEBS open bio*, 8(11), 1746-1762.
- Ohta, T., Essner, R., Ryu, J. H., Palazzo, R. E., Uetake, Y., & Kuriyama, R. (2002). Characterization of Cep135, a novel coiled-coil centrosomal protein involved in microtubule organization in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 156(1), 87-100.
- Opitz, C., & Soldati, D. (2002). 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, 45(3), 597-604.
- Patz, J. A., Graczyk, T. K., Geller, N., & Vittor, A. Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1395-1405.
- Pernas, L., Adomako-Ankomah, Y., Shastri, A. J., Ewald, S. E., Treeck, M., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2014). *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. *PLoS biology*, 12(4).
- Persson, E. K., Agnarson, A. M., Lambert, H., Hitziger, N., Yagita, H., Chambers, B. J., ... & Grandien, A. (2007). Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8357-8365.
- Porter, S. B., & Sande, M. A. (1992). Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine*, 327(23), 1643-1648.
- Prochet-Hennere, E., & G. Nicolas. (1983). Are rhoptries of *Coccidia* really extrusomes? *J. Ultrastruct. Res.* 84:194–203.
- Radke, J. R., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 115(2), 165-175.
- Ramakrishnan, C., Maier, S., Walker, R. A., Rehrauer, H., Joekel, D. E., Winiger, R. R., ... & Smith, N. C. (2019). An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of *Toxoplasma gondii* by cats. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G., Fraunholz, M., Harb, O. S., He, C. Y., ... & Striepen, B. (2002). Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1417), 35-46.
- Ryning, F. W., McLeod, R. I. M. A., Maddox, J. C., Hunt, S., & Remington, J. S. (1979). Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Annals of internal medicine*, 90(1), 47-49.
- Sabin, A. B. (1942). Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. *Adv Pediatr*, 1, 1-53.
- Shen, B., Brown, K. M., Lee, T. D., & Sibley, L. D. (2014). Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. *MBio*, 5(3), e01114-14.
- Shi, Y.G. (2009) Serine/threonine phosphatases: Mechanism through structure. *Cell* 139: 468–484.
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*, 4(9), 581-586.

- Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology*, 154(1), 95-108.
- Sinai, A. P., Webster, P., & Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of cell science*, 110(17), 2117-2128.
- Sogin, M. L., & Silberman, J. D. (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International journal for parasitology*, 28(1), 11-20.
- Speer, C. A., & Dubey, J. P. (1981). An Ultrastructural Study of First-and Second-Generation Merogony in the Coccidian *Sarcocystis tenella* 1. *The Journal of protozoology*, 28(4), 424-431.
- Straub, K. W., Peng, E. D., Hajagos, B. E., Tyler, J. S., & Bradley, P. J. (2011). The moving junction protein RON8 facilitates firm attachment and host cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 7(3).
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., & Roos, D. S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 92(2), 325-338.
- Striepen, B., Jordan, C. N., Reiff, S., & Van Dooren, G. G. (2007). Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS pathogens*, 3(6).
- Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW (2015) A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLoS Biol* 13(3): e1002093. doi:10.1371/journal.pbio.1002093
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
- Trotter, P. J., and D. R. Voelker. (1994). Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1213:241-262.
- Weinman, D., & Chandler, A. H. (1954). Toxoplasmosis in Swine and Rodents. Reciprocal Oral Infection and Potential Human Hazard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87(1), 211-216.
- White, M. W., & Suvorova, E. S. (2018). Apicomplexa cell cycles: Something old, borrowed, lost, and new. *Trends in parasitology*, 34(9), 759-771.
- Woo, Y. H., Ansari, H., Otto, T. D., Klinger, C. M., Kolisko, M., Michálek, J., ... & Ali, S. (2015). Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *elife*, 4, e06974.
- Woodland, H. R., & Fry, A. M. (2008). Pix proteins and the evolution of centrioles. *PLoS One*, 3(11), e3778.
- Wozniak, E., Ołdziej, S., & Ciarkowski, J. (2000). Molecular modeling of the catalytic domain of serine/threonine phosphatase-1 with the Zn²⁺ and Mn²⁺ di-nuclear ion centers in the active site. *Computers & chemistry*, 24(3-4), 381-390