



Determinación de la localización del homólogo de la proteína centrosomal *SAS4* en *Toxoplasma gondii*

Florencia Paola Ricciuto Benavente

Tutor: Maria Eugenia Francia

Co-orientador: Sofia Horjales

Laboratorio de Biología de Apicomplejos. Institut Pasteur de Montevideo (IPM)

Tesina de grado

Licenciatura en Biología Humana, Facultad de Ciencias UdelaR

Orientación Biología molecular

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario, intracelular obligado, agente causal de la toxoplasmosis. Presenta un ciclo de vida complejo que incluye una fase asexual y una sexual. La fase sexual tiene lugar en felinos, su hospedero definitivo, donde el parásito se replica en el epitelio intestinal. En los hospederos intermediarios, tiene lugar la fase asexual, adonde el parásito puede existir como taquizoito o bradizoito, el primero de replicación rápida con tropismo por el tejido neural y muscular, y el segundo de replicación lenta, el cual persiste por la vida del hospedero en sitios inmunoprivilegiados.

El taquizoíto es el estadio con el cual trabajamos, ya que es fácil de cultivar y propagar, y además es el estadio clínicamente más relevante ya que todas las manifestaciones clínicas asociadas a la toxoplasmosis se encuentran directamente relacionadas a su capacidad proliferativa. Al taquizoíto lo define su alta tasa de replicación, dándose esta en cualquier célula nucleada, dentro de la cual forma una vacuola parasitófora para protegerse de la inmunidad del hospedero.

Los taquizoitos, presentan dos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) diferentes, el centrosoma y el anillo polar apical (APR). El centrosoma nuclea los microtúbulos del huso mitótico, controlando el avance del ciclo celular, proceso fundamental para la patogenicidad. Mientras que el APR nuclea los microtúbulos corticales formando un corset, fundamental para la forma y resistencia mecánica de la célula.

El centrosoma de *T. gondii* está formado por dos centriolos paralelos y pequeños, con microtúbulos simples (singletes) de simetría 9+1, una composición diferente a su contraparte en humanos, la cual está caracterizada por centriolos que en promedio son el triple de largos, y presentan microtúbulos en tripletes. Como se determina el largo de los microtúbulos en el centrosoma de *T. gondii* es desconocido.

SAS-4 es una proteína que se conoce por formar complejos con tubulina, esenciales para la biogénesis del centrosoma, y que controla la elongación de los microtúbulos del centrosoma para determinar, en colaboración con otras proteínas, el largo del centriolo.. Aquí nos proponemos investigar si el homólogo de SAS-4 en *T. gondii* tiene un rol similar, determinando su localización y aproximando su papel en la biogénesis del centrosoma y la elongación de microtúbulos del centriolo, estudiando su localización durante el ciclo celular.

Para ello generamos una cepa transgénica de *T. gondii* mediante tecnología CRISPR/Cas9, en la que SAS-4 se encuentra fusionada a un epítipo para el cual existen anticuerpos comerciales, lo cual nos permitió estudiar, mediante inmunofluorescencia indirecta, su localización durante el ciclo celular.

Índice

Índice.....	3
1. Introducción.....	5
a. Toxoplasma gondii.....	5
b. Ciclo de vida.....	6
c. Toxoplasmosis.....	7
d. Estructura.....	9
e. División Celular.....	11
f. Centrosoma.....	12
g. Centríolos y SAS4 en vertebrados.....	14
2. Objetivos.....	16
a. Planteo del proyecto.....	16
b. Objetivo General.....	16
c. Objetivos Específicos.....	16
3. Materiales y métodos.....	18
a. Identificación del homólogo de SAS4 (TgSAS4) y verificación del soporte de su modelo génico:.....	19
b. Generación de una línea celular transgénica:.....	20
c. Diseño de pLic-SAS4-HA-CAT:.....	24
Clonación del vector pLic:.....	24
Construcción del vector:.....	25
d. Cultivo de parásitos:.....	26
e. Transfección:.....	26
Selección de parásitos transgénicos:.....	26
Evaluación de clones transgénicos:.....	26
f. Generación de líneas clonales por dilución límite:.....	28
g. Inmunofluorescencia indirecta:.....	29
h. Western blot:.....	30
i. Transformación de bacterias competentes DH5 alpha.....	30
Tabla de oligonucleótidos:.....	31
Tabla de combinación de oligonucleótidos:.....	32
4. Resultados.....	34
1- Identificación del homólogo de SAS4 en T. gondii.....	34
2- Generación de parásitos transgénicos TgSAS4-3HA.....	36
Transfección con PCR:.....	39
Transfección con pLic_3HA_CAT_SAS4:.....	45
Identificación de clones:.....	48
Localización subcelular:.....	53

5. Discusión.....	56
6. Bibliografía.....	60

1. Introducción

a. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario unicelular intracelular obligado perteneciente al filo Apicomplexa, descubierto en 1908 como el agente etiológico de la toxoplasmosis por Nicolle y Manceaux en Túnez, y simultáneamente por Splendore en Brasil.

Dentro del filo Apicomplexa encontramos cuatro grupos: los coccidios, los hemosporidios, los piroplasmidos y los gregarines. La clasificación taxonómica más aceptada para *T. gondii*, descrita por Levine en 1980, es la siguiente: filo Apicomplexa (Levine 1970), clase Sporozoa (Leukart 1879), subclase Coccidia (Leukart 1879), orden Eucoccidiida (Léger y Duboscq, 1910), suborden Eimeriina (Léger, 1911), familia Sarcocystidae (Poche, 1913), subfamilia Toxoplasmatinae (Biocca, 1957) y género *Toxoplasma* (Nicolle y Manceau, 1909) en el cual encontramos únicamente una especie, la cual es *Toxoplasma gondii* (Fortier et al, 2000).

Los apicomplejos son organismos parásitos intracelulares obligados de humanos y animales, estrechamente relacionados a nivel evolutivo con algas rojas fotosintéticas de vida libre, dado que evolucionaron de estas como resultado de dos eventos sucesivos de endosimbiosis, los cuales dieron origen no solo a la mitocondria clásicamente encontrada en los eucariotas, sino también a un organelo de origen fotosintético llamado el apicoplasto. A nivel genético, se puede observar que la transición completa hacia un estilo de vida parasitario llevó a reducciones significativas en el contenido genético. Entre las proteínas que se han perdido se encuentran las relacionadas con la biosíntesis de esteroides y aquellas necesarias para la fotosíntesis (Woo et al, 2015). Por otro lado, las proteínas secretoras que permiten la invasión y supervivencia dentro del huésped destacan como funciones adquiridas durante la evolución del filo Apicomplexa (White & Suvorova, 2018). Estas a su vez, se secretan de un set de organelos especializados, conservados en el filo Apicomplexa: las roptrias, micronemas y gránulos densos. Estos constituyen lo que se conoce como el complejo secretor apical, al cual el filo Apicomplejo (complejo-apical) debe su nombre. Además, a nivel estructural, se estima que el apicoplasto, deriva de los cloroplastos de las algas rojas, los cuales perdieron su actividad fotosintética pero adquirieron actividad sintética.

T. gondii es el apicomplejo de mayor distribución a nivel mundial, con una distribución diferencial de sus cepas en las distintas regiones (Walochnik & Duchêne, 2016). Además, dentro de los Apicomplexa, *T. gondii* es el organismo modelo del filo, ya que se logra mantener y aislar en cultivos fácilmente. Si bien presenta un riesgo biológico considerable, puede ser cultivado en condiciones de bioseguridad nivel II, ampliamente

disponibles en nuestro país. A estas ventajas se le suma que es un organismo haploide, cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado y anotado, lo que aumenta la eficiencia en las transfecciones y evaluación genómica.

b. Ciclo de vida

Conocer y comprender el ciclo de vida del parásito *Toxoplasma gondii* es fundamental, ya que su capacidad de diferenciarse en diferentes fases subyacen sus mecanismos de patogénesis y sus modos de transmisión. Este ciclo consta de dos fases: la fase asexual y la fase sexual.

El taquizoíto es el estadio con el cual trabajamos, ya que es fácil de cultivar y propagar. Al taquizoíto lo define su capacidad de proliferación, siendo capaz de generar una infección aguda infectando cualquier célula nucleada, dentro de la cual forma una vacuola parasitófora para protegerse de la inmunidad del huésped. Dentro de esta, se divide de forma asexual hasta que la célula no puede contener la infección y lisa (Dubey, 2014). Este proceso de infección y lisis, conocido como el ciclo lítico, se da de manera repetida, generando así la destrucción del tejido infectado. Esta proliferación desencadena la respuesta inmune del hospedero, la cual limita la proliferación del taquizoíto.

El bradizoíto es el estadio que el parásito adopta luego de lisis las células como estrategia de evasión del sistema inmune, siendo este un estadio semi-quiescente. En esa etapa, forma quistes en los tejidos, principalmente en tejido muscular y nervioso, generando una infección crónica (Sogin & Silberman, 1998). Eventualmente, estos quistes se rompen infectando más células donde se forman nuevos quistes. Estos quistes guardan además el potencial de reactivarse en caso de que la inmunidad decaiga.

La fase sexual tiene lugar en su hospedero definitivo, conformado por los felinos de la familia *Felidae*. Una vez que el gato está expuesto a el parásito, este penetra el epitelio intestinal, comenzando ciclos de reproducción sexual y asexual. Dentro de los enterocitos, durante el ciclo sexual el parásito se replica y produce esquizontes, estadio precursor de los merozoítos, que finalmente se diferencian a gametos masculinos y femeninos llamados microgametos y macrogametos, respectivamente. La fertilización de los gametos da lugar a un cigoto que se divide y forma ooquistes, los cuales son excretados en las heces y son una forma resistente en el ambiente. Los gatos pueden infectarse a partir de ooquistes esporulados del ambiente o consumiendo carne de un animal infectado, cuyos tejidos musculares contienen quistes de bradizoítos. Los gatos generarán nuevos ooquistes, en un periodo de 3 a 10 días posterior a la ingesta de quistes tisulares o mayor a 19 días en caso de la ingesta de ooquistes. Los ooquistes maduran en el medio ambiente luego de unos días y esporulan, dando lugar a 8 esporozoítos, convirtiéndose en infectivos. Cuando otro animal los ingiere, pueden infectarlo mediante la liberación de esporozoítos, convirtiéndolo en hospedero intermediario, comenzando un nuevo ciclo, asexual, o sexual si fuese un felino.

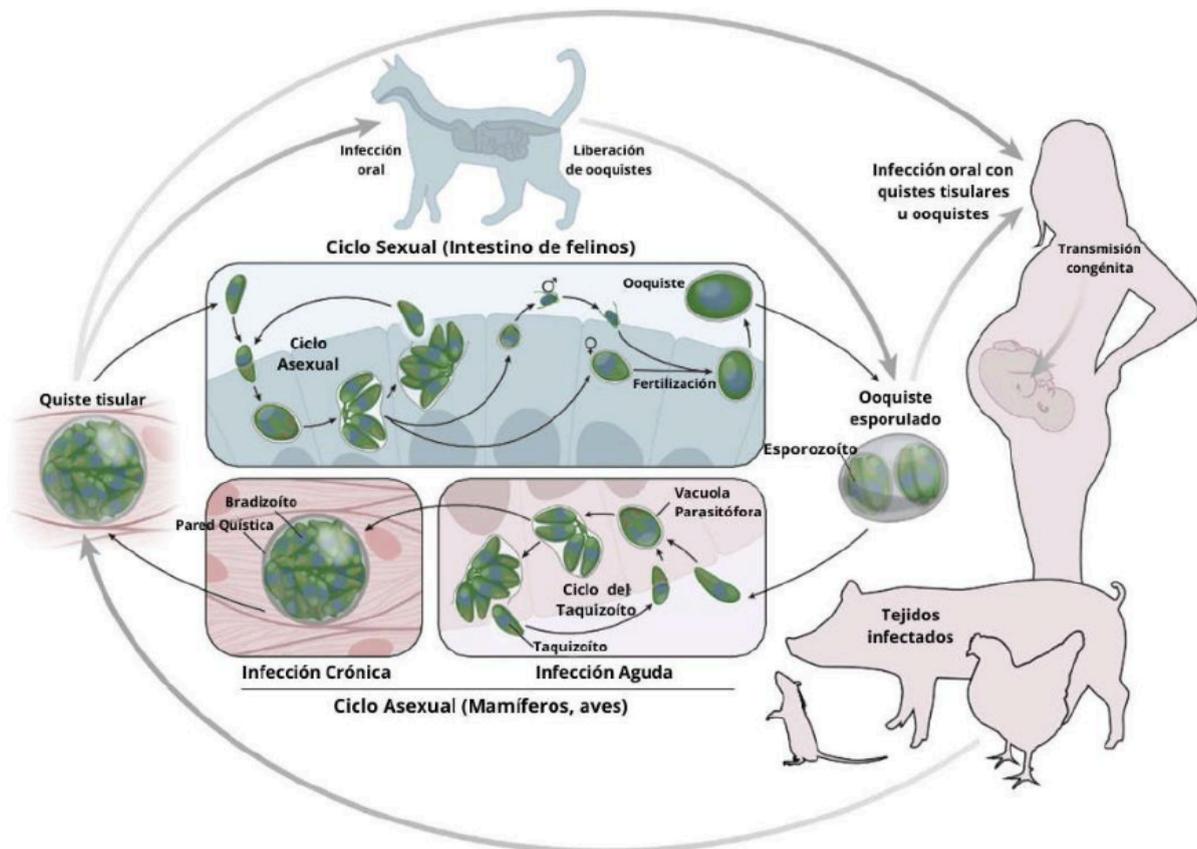


Figura 1. Esquema de los estadios sexuales y asexuales del ciclo de vida de *T. gondii*. Por un lado se observa la fase asexual, etapa en la cual el parásito se replica de forma clonal en su hospedero. Esta fase se completa cuando los quistes son liberados al medio. Por otro lado, la fase sexual es exclusiva en felinos y es aquí donde se da la diferenciación en micro y macro gametos. La fase se completa cuando los ooquistes son expulsados al medio en las heces, donde finalmente esporulan volviéndose infectivos y contaminando el ambiente para continuar con una nueva infección en caso de ser ingeridos. Adaptado de Harding, C. R., 2019.

c. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad, causada por *T. gondii*, que afecta animales endotermos, incluidos los seres humanos. Es además una enfermedad zoonótica, ya que se transmite entre animales y personas, siendo una de las más prevalentes a nivel global (Frenkel, 1988). A nivel mundial se estima que el 30% de la población humana está infectada con este parásito (Tenter et al, 2000).

Como se observa en las **Figuras 1 y 2**, las cuales resumen el ciclo de vida y los modos de transmisión de *T. gondii*, la infección generalmente se produce por carnivorismo, mediante el consumo de tejidos de animales infectados sin una adecuada cocción o si se ingieren aguas contaminadas con ooquistes del parásito provenientes de las heces de felinos infectados (Weinman & Chandler, 1954; Hutchison, 1965). También es posible la transmisión

vertical de la madre al feto por vía transplacentaria si se da una primoinfección materna durante el embarazo.

La infección por ingesta de las formas enquistadas en tejidos, está dada por la degradación de la cubierta de los quistes por enzimas proteolíticas en el aparato digestivo, lo que permite la liberación del parásito en su estadio de bradizoíto, que es capaz de infectar al individuo. Por otro lado, la ingesta de alimentos contaminados con ooquistes, como agua o vegetales, explica la alta prevalencia más allá del carnivorismo.

Este parásito tiene la capacidad de infectar prácticamente cualquier célula nucleada y, una vez dentro, se replica rápidamente, lo que provoca la lisis celular y la propagación de la infección, perpetuada por la liberación de nuevos parásitos infectivos.

En la mayoría de los casos, la infección primaria resultante en individuos inmunocompetentes es asintomática o leve, el hospedero presenta síntomas similares a los de una gripe y la infección evoluciona a un estadio crónico. Sin embargo, en individuos con el sistema inmune debilitado, como pacientes con VIH/SIDA o que estén recibiendo tratamientos inmunosupresores, así como en casos de infección congénita, la toxoplasmosis puede reactivarse, conduciendo a una infección aguda, causando daños en órganos como el cerebro y pudiendo provocar incluso la muerte. Durante el embarazo, la gravedad de los síntomas fetales dependen del huesped y del estadio en el cual la madre se infecta, pero la infección puede llegar a provocar problemas de visión, malformaciones en el feto con una preponderancia de afecciones neuronales como hidrocefalia, macro y microcefalia, parto prematuro, bajo peso al nacer o abortos (Baron, 1996).

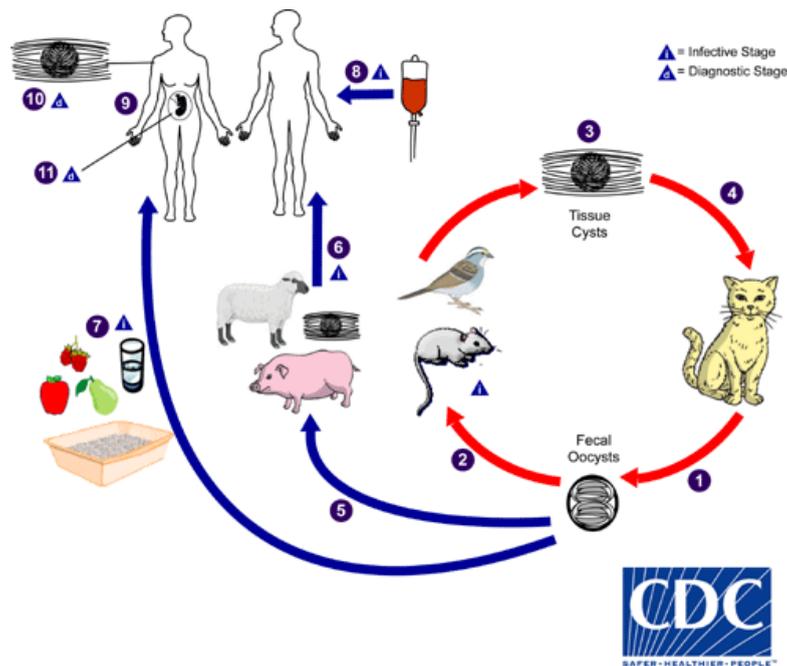


Figura 2. Esquema del ciclo de vida de *T. gondii*. Los únicos huéspedes definitivos conocidos para *Toxoplasma gondii* son miembros de la familia *Felidae*. (1) Los oocistos no esporulados se eliminan en las heces del gato. (2) Los huéspedes intermediarios en la naturaleza (incluidos los pájaros y los roedores) se infectan después de ingerir tierra, agua o material vegetal contaminado con oocistos. (3) Los oocistos se transforman en taquizoítos poco después de la ingestión. Estos taquizoítos se localizan de manera sistémica, pero permanecen preferentemente en el tejido nervioso y muscular diferenciándose a bradizoítos que conforman quistes tisulares. (4) Los gatos se infectan después de consumir huéspedes intermediarios que albergan quistes tisulares. Los gatos también pueden infectarse directamente por la ingestión de oocistos esporulados. (5) Los animales domésticos, aquellos criados para el consumo humano y los silvestres también pueden infectarse con quistes tisulares tras la ingestión de oocistos esporulados presentes en el medio ambiente. (6) Los humanos pueden infectarse por varias vías como la ingesta de carne con quistes tisulares poco cocida u (7) otros alimentos contaminados, (8) por transfusión o trasplante e incluso (11) por vía transplacentaria. Adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html#print>

d. Estructura

Como se mencionó previamente, el taquizoito es el estadio más estudiado y por lo tanto del que más se tiene conocimiento, por lo que las características estructurales del parásito mejor descritas derivan de este estadio. La forma de *T. gondii*, como se observa en la **Figura 3**, se caracteriza por ser lunada con un extremo apical angosto y un extremo basal ancho determinado por los microtúbulos corticales de su citoesqueleto. Su tamaño es de aproximadamente 6x2 μm y en el estadio de oociste maduro llegan a medir 12 μm de diámetro (Baron, 1996).

Según lo estudiado en taquizoitos, también poseen organelos comunes a otros organismos como el retículo endoplásmico, ribosomas, una única mitocondria y un núcleo delimitado por la envoltura nuclear (núcleo vesicular que contiene uno o más nucleolos con ADN). El apicoplasto es un organelo membranoso característico de los Apicomplexa, que, como se mencionó previamente, deriva del cloroplasto de un alga roja, y aunque sin actividad fotosintética, participa en la síntesis de ácidos grasos (Roos et al, 2002). Dado que es producto de dos eventos endosimbióticos, el apicoplasto presenta la particularidad de que posee 4 membranas, dos de origen bacteriano y dos de origen eucariota.

Toxoplasma gondii contiene un genoma nuclear de aproximadamente 65 Mb distribuido en 13 cromosomas (Berná, Marquez et al 2021). Además, posee el genoma mitocondrial, cuya estructura y composición se encuentran bajo estudio (Berná, Marquez et al, 2021; Berná, Rego et al, 2021), y el genoma de su apicoplasto, que es de 35 Kb (Walochnik & Duchêne, 2016).

El complejo apical, participa en el proceso activo de invasión y es una estructura común en los Apicomplexa. Este está compuesto de organelos secretores y elementos del citoesqueleto, anclados en el extremo apical de la célula. En el ápice se encuentran una serie de anillos concéntricos, que conforman una estructura compleja dentro de la cual se aloja una canasta de microtúbulos llamada el conoide. El conoide se extruye durante el proceso de reconocimiento e invasión de la célula hospedera, posibilitando la secreción desde los organelos secretores. Toda la arquitectura de la célula es mantenida por 22 microtúbulos que se extienden a lo largo de tres cuartas partes del cuerpo de la célula, sobre los cuales se disponen una serie de sacos membranosos llamados alvéolos derivados de vesículas provenientes del retículo endoplásmico-Golgi. Los alvéolos adyacentes se unen para formar el complejo de membrana interno (IMC) interrumpido en el extremo apical por el conoide y en el extremo basal por el complejo basal (Ferguson & Dubremetz, 2014). Esta estructura se denomina películo. Finalmente, la membrana plasmática recubre la célula. La estructura del películo es mantenida por un centro organizador de microtúbulos denominado en inglés el *apical polar ring* (APR). El APR constituye uno de los dos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) que *T. gondii* posee. El segundo MTOC es el centrosoma que nuclea los microtúbulos del huso mitótico, involucrados en la organización de la cromatina y segregación nuclear, controlando el avance de la división celular, y se encarga de posicionar físicamente el APR de la descendencia (Suvorova et al, 2015).

T. gondii, al igual que todos los apicomplejos, contiene organelos secretores que participan en la invasión del parásito a la célula mediante la adhesión, motilidad y formación de la vacuola parasitófora. Los parásitos apicomplejos han desarrollado sistemas de secreción que transportan moléculas efectoras con diversas funciones a la célula hospedera. Los Apicomplejos no tienen estructuras externas para su movimiento; este se da por la exocitosis de las micronemas que contienen moléculas de adhesión que se insertan en la membrana del parásito para reconocer proteínas de la superficie de las células hospederas. Esto permite el anclaje y posterior avance mediante los microtúbulos subpeliculares (la

película es la estructura que recubre al parásito dándole forma y resistencia). Una vez el parásito logra posicionarse en la célula hospedera, este comienza a invaginar la membrada de la célula para su internalización, obteniendo como resultado la formación de la vacuola, denominada vacuola parasitófora la cual contendrá al parásito durante todo su desarrollo intracelular (Mordue et al, 1999).

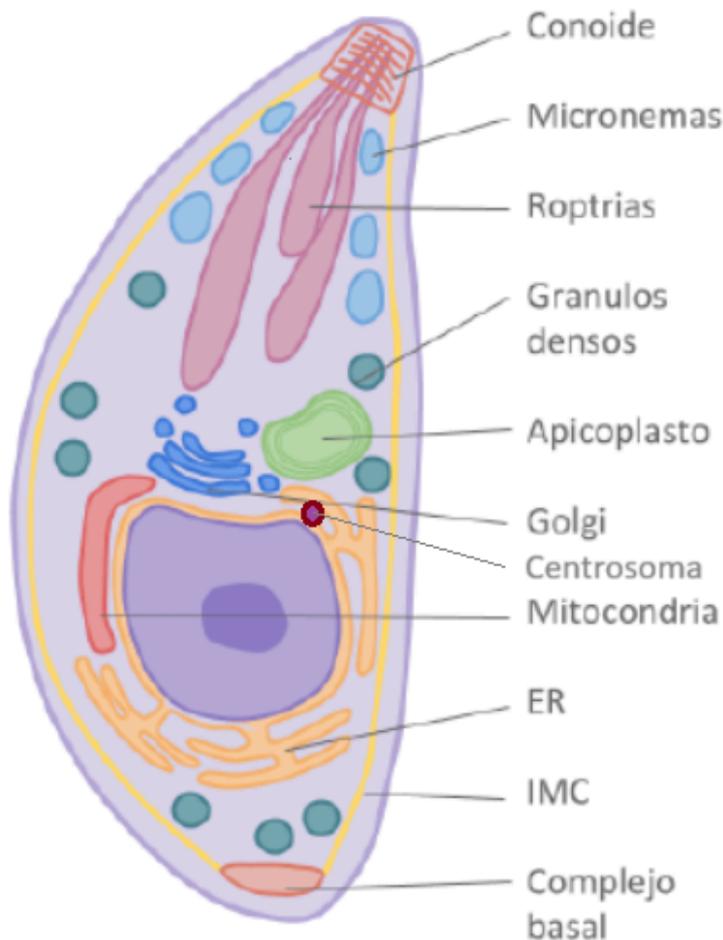


Figura 3. Estructura del taquizoíto. Adaptado de Blader et al, 2015.

e. División Celular

Dentro de los hospederos intermediarios, que incluyen a todos los animales endotermos como roedores, aves y seres humanos, tiene lugar la fase asexual del ciclo de vida del parásito. Durante esta fase, el parásito se convierte en taquizoíto luego de la ingesta de ooquistes; posteriormente, se desarrollan quistes de bradizoítos, los cuales pueden permanecer latentes durante años en el organismo del huésped sin causar síntomas. Sin embargo, en individuos con el sistema inmune debilitado, estos quistes pueden reactivarse, generando síntomas. Cuando estos quistes son ingeridos, son degradados y los bradizoítos pasan nuevamente a un estado de taquizoíto, generando nuevamente una infección aguda

propagándose por los tejidos y completando la fase asexual del ciclo. La reiteración de la reproducción asexual de *T. gondii* dentro de un hospedero es responsable de la infección aguda y los síntomas que causa la infección. Aunque la reactivación de los quistes de bradizoitos es una etapa clínicamente relevante en el ciclo de vida de *T. gondii*, y que puede llevar a la muerte del paciente si no se trata, la gran mayoría de los síntomas son causados por la lisis celular producto de la rápida división celular del taquizoíto (Dubey, 2014).

Los parásitos Apicomplexa pueden utilizar tres mecanismos de división asexual: endopoligenia, endodiogenia y esquizogonia. *T. gondii* utiliza estos tres mecanismos en diferentes hospederos a lo largo de su ciclo de vida para adaptarse a su entorno. En la endopoligenia, los cromosomas se replican varias veces de forma sincrónica formando un núcleo poliplóide antes de que el núcleo sufra mitosis y se formen las células hijas. Este mecanismo se observa en el desarrollo pre-sexual dentro del hospedero definitivo. En la endodiogenia, forma de división asexual exclusiva dentro de los hospederos intermediarios, luego de cada ciclo de división nuclear, se da la formación de dos células hijas que se forman internamente en la célula madre y se produce citocinesis. En la esquizogonia, los núcleos experimentan síntesis de ADN y mitosis asincrónicas, seguido por una mitosis sincronizada acompañada de formación interna de nuevos zoítos (Tomasina et al, 2021).

La división celular en apicomplejos es particularmente relevante debido a la rapidez con la que estos organismos se multiplican, lo que implica una alta demanda de precisión en los mecanismos de división. El avance del ciclo celular en apicomplejos está regulado por factores solubles, pero también, y en un sentido muy particular, por el centrosoma. Durante la división celular, los centrosomas organizan los microtúbulos que forman el huso, lo que permite la correcta alineación y separación de los cromosomas, los cuales, en la particular mitosis cerrada de *T. gondii*, no se condensan. Además, los centrosomas son claves para mantener la organización del material genético, no solo durante la división celular, sino también durante la interfase, ya que mantienen un vínculo físico (de características aún desconocidas) con los cromosomas durante todo el ciclo celular (Brooks et al, 2011; Francia, Bhavsar et al, 2020). Así mismo, el centrosoma nuclea y coordina la formación de las células hijas, vinculando en tiempo y espacio la mitosis nuclear con la formación de nuevos parásitos (Francia, Jordan et al, 2012; Francia & Striepen, 2014).

f. Centrosoma

En general, el avance del ciclo celular está regulado en gran medida por el centrosoma teniendo un rol fundamental es mantener su unión a los cromosomas durante todo el ciclo para su correcta segregación en las células hijas. Adicionalmente, cumple funciones relativas a movilidad y señalización, entre otras.

Los centrosomas son organelos celulares conservados, y el modelo canónico es el de las células de mamífero ya que es el mejor estudiado. Estos están formados por un par de

centriolos perpendiculares entre sí, con simetría radial de 9 tripletes de microtúbulos y un tamaño de 700 nm de largo por 250 nm de ancho. A su vez están rodeados por la matriz pericentriolar (PCM) compuesta por proteínas que cumplen la función de nuclear y organizar microtúbulos (Gopalakrishnan et al, 2011).

Sin embargo, en *T. gondii*, el centrosoma se ubica en cercanía de una estructura especializada de la envoltura nuclear llamada centrocono y está formado por dos centriolos paralelos entre sí (Francia et al, 2015) de aproximadamente 250 nm de largo y ancho, con microtúbulos simples de simetría 9+1, más pequeños que en sus contrapartes animales y sin la presencia de PCM (Tomasina et al, 2021). Así mismo, los centrosomas en *T. gondii* están organizados en dos dominios funcionales independientes, que se distinguen en composición y coordinan aspectos funcionalmente distintos en la división celular. El dominio interno (inner core) mira hacia la envoltura nuclear y coordina la segregación cromosómica, mientras que el dominio externo (outer core) se ubica distal al núcleo y coordina el ensamblaje de nuevas células hijas. Esta organización en dominios determina una dualidad funcional en el centrosoma, exclusivo de *T. gondii*. El inner core regula el ensamblaje del huso *mitótico*, y la *segregación* de los cromosomas (Tomasina, et al, 2022). Sin embargo, el outer core regula la *segregación* del apicoplasto (Striepen, et al, 2000) y el ensamblaje de una estructura que *físicamente* posiciona el MTOC que da origen a las nuevas *células* hijas (Francia et. al, 2012). Estos procesos, la mitosis por un lado y la formación de nuevas células internas a la célula madre, por otro, pueden desacoplarse temporalmente interfiriendo con los anclajes físicos que los vinculan al centrosoma. Es así, que tanto mitosis como formación de células hijas pueden darse de manera desacoplada, estando vinculados en tiempo y espacio, únicamente, por sus vínculos mutuos al centrosoma en un momento dado.

Así como las células tienen un ciclo celular, el centrosoma tiene un ciclo propio, coordinado con el ciclo celular, mediante el cual se generan centriolos hijos a partir de los centriolos parentales. Este ciclo es muy conservado entre diferentes especies, por lo que existen varias proteínas homólogas que cumplen las mismas funciones. Si bien la composición de los centrosomas canónicos es bien conocida, y se han caracterizado cientos de proteínas en cuanto a sus roles estructurales y funcionales, la lista de proteínas asociadas al centrosoma de los apicomplexa es corta. La identificación de proteínas centrosomales en estos parásitos se ha basado principalmente en la búsqueda de homólogos conservados.

SAS-4 es una de las proteínas reguladoras que se encuentra asociada al centrosoma. Si bien no se ha estudiado en *T. gondii*, se sabe que en organismos como *Drosophila* y su ortólogo en humanos (CPAP), forman complejos con tubulina, esenciales para la biogénesis del centrosoma controlando la elongación de los microtúbulos centriolares (Hu & Li, 2015). El control del largo de los centriolos es uno de los aspectos más interesantes desde el punto de vista biológico, ya que resulta del balance de dos actividades contrapuestas: la polimerización de los microtúbulos y la despolimerización. En humanos, estas actividades están controladas por el balance en nivel de expresión y actividad de dos proteínas con funciones antagónicas llamadas, CPAP y CP110, respectivamente. El mantenimiento del largo exacto de los centriolos se da de manera sistemática en cada ciclo celular. Alteraciones en

este fino balance se asocian con procesos desregulados que se observan en procesos patológicos, como por ejemplo, en cáncer (Marteil et al, 2018). Por ejemplo, se sabe que centríolos demasiado largos pueden literalmente quebrarse, creando MTOCs ectópicos que generan la nucleación de microtúbulos desde lugares aberrantes o la nucleación no simétrica de MTs desde un centríolo largo, ambas situaciones generando aneuploidía. En otro organismo apicomplejo como es *Plasmodium*, agente causal de la malaria, se sabe que la eliminación del gen SAS4 no produce ningún fenotipo, mostrando que no es esencial ni para la formación de gametos masculinos ni para la transmisión del parásito (Zeeshan et al, 2022). Sin embargo, *Plasmodium* no presenta centríolos en sus estadios asexuados, lo cual motiva la pregunta de cuál es la relevancia funcional de la conservación de esta proteína en esta especie, y en los Apicomplejos en general. En particular, en *T. gondii* se desconocen los mecanismos por los cuales los centríolos mantienen su largo característico. Sin embargo, nuestra hipótesis de trabajo postula que el mantenimiento de este parámetro es fundamental para la coordinación de las actividades vinculadas al ciclo celular que regula.

g. Centríolos y SAS4 en vertebrados

El modelo considerado de centríolo “canónico” y mejor caracterizado es el que encontramos en vertebrados, el cual se observa en la **Figura 4**. Aquí cada centríolo está compuesto por nueve tripletes de microtúbulos que forman un cilindro. Cada triplete está conformado por 3 microtúbulos denominados A, B y C. Su simetría es radial y surge de la estructura denominada cartwheel. Esta es formada de manera espontánea (aunque su formación es altamente regulada y coordinada con el ciclo celular) por la proteína SAS6, en conjunción con otras proteínas. SAS6 polimeriza formando el cartwheel en una estructura radial con 9 aristas, sobre las cuales se extenderán de manera perpendicular los microtúbulos de un nuevo centríolo durante su biogénesis, la cual es semiconservativa (Morlon-Guyot et al, 2017).

Durante el ciclo centrosomal, se observa el reclutamiento de distintos componentes para la formación del nuevo centríolo, que en la mayoría de las especies es catalizado por proteínas quinasas de la familia de las *polo*. Estas actúan de manera coordinada con las quinasas y fosfatasas que regulan el avance del ciclo celular, como las CDKs, coordinando cascadas de fosforilación y desfosforilación que desencadenan el reclutamiento de SAS6 y otras proteínas como SAS5/STIL, CPAP, CP110, CEP135, entre otras, para formar el nuevo centríolo. Sin embargo, aún se desconocen en su totalidad los mecanismos que permiten un único evento de replicación por ciclo celular. Esto es especialmente cierto en organismos no modelos o que presentan rutas biosintéticas potencialmente divergentes, dado que no se encuentran en sus genomas genes homólogos codificantes de las proteínas que participan del proceso en los sistemas mejor caracterizados (ej. humanos, *Drosophila*, *C. elegans*, etc.) .

Brevemente, se conoce que el ciclo comienza con la formación de un procentríolo adyacente a cada uno de los centríolos parentales. Una vez estabilizada la estructura se

recluta centrina, proteína localizada en el lumen de los centrosomas (Gonczy, 2012) y marcador *bona fide* de los centriolos. La elongación se da por la polimerización de microtúbulos, desencadenada por la actividad concertada de gamma-tubulina y sus proteínas asociadas (ej. gamma-tubulin ring complex (γ -TuRC)) alrededor del cartwheel. Esta estructura actúa como base estructural desde la cual se desarrollan los nuevos centriolos. La incorporación de los dímeros de tubulina está dada y estabilizada por CPAP/SAS4. Como resultado, al final de la fase G₂ del ciclo celular se obtienen dos pares de centriolos. Durante la fase M estos nuevos pares de centriolos se separan para formar el huso mitótico. Finalmente, los procentriolos se convierten en centriolos hijos una vez finalizada la mitosis celular.

La longitud de los centriolos varía entre los organismos. Sin embargo, cada tipo celular en cada organismo regula de manera estricta la longitud de sus centriolos mediante una serie de mecanismos poco comprendidos. La disfunción en la regulación de la longitud de los centriolos está asociada a diversas enfermedades en mamíferos, como la infertilidad y el cáncer (Morlon-Guyot et al, 2017).

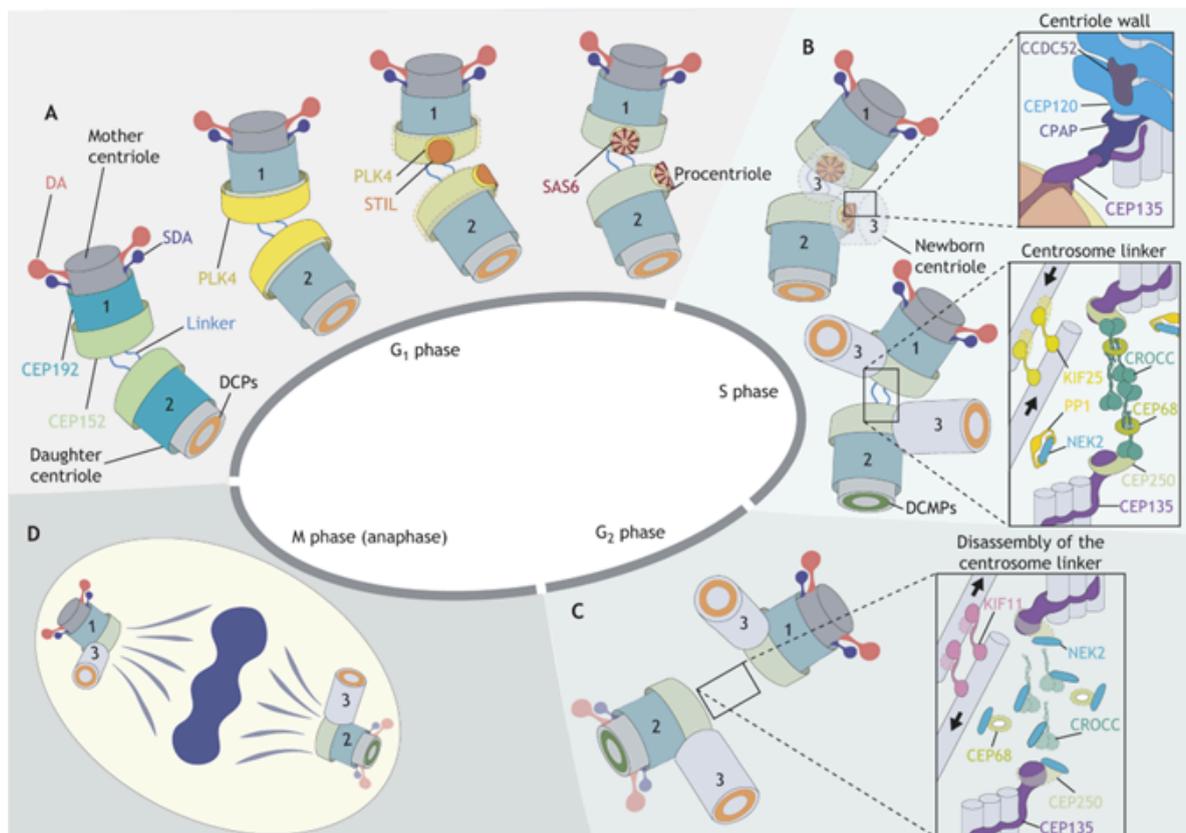


Figura 4. Ciclo de replicación y mantenimiento de centrosomas canónicos. Este proceso ocurre en paralelo al ciclo celular. Los centriolos parentales se mantienen unidos a lo largo de la síntesis de los centriolos hijos, hasta la fase M, donde se da la formación de los polos nucleadores del huso mitótico. Adaptado de Blanco-Ameijeiras, J., 2022.

2. Objetivos

a. Planteo del proyecto

Como fué mencionado anteriormente, se sabe que la división es el mecanismo de patogénesis de *T. gondii* y que los mecanismos de división difieren a los utilizados por las células animales. Se sabe también que el centrosoma en *T. gondii* está formado por centriolos de estructura divergente, particularmente más cortos que sus contrapartes en células de mamífero. Estos, cumplen un rol funcional esencial en el control de la división celular. En particular, la ruta de biogénesis de los centriolos en *T. gondii*, y específicamente la determinación del largo de los microtúbulos que los conforman, se desconocen.

Estas diferencias son relevantes ya que le aportan a la división celular del parásito y a su centrosoma características divergentes con respecto a los organismos que parasitan, siendo estos posibles blancos para atacar la proliferación del parásito.

En base a esto, este proyecto plantea como hipótesis que proteínas homólogas a SAS4 podrían jugar un rol en la biogénesis y particularmente controlar la elongación de los centriolos. Para contrastar esta hipótesis, en este trabajo proponemos la identificación del homólogo de SAS4 en *T. gondii*, su marcado con un tag de hemaglutinina (HA) que permitirá identificar su localización mediante inmunofluorescencia.

Además de contribuir información básica sobre la ruta de biogénesis de una estructura crítica para la vida de las células eucariotas, esta información podría ser útil para el diseño de estrategias terapéuticas eficaces contra el parásito.

b. Objetivo General

Identificar el homólogo de SAS4 y estudiar la dinámica de expresión y localización del mismo a lo largo del ciclo celular en el parásito *Toxoplasma gondii*.

c. Objetivos Específicos

- I. Identificar el homólogo de SAS4 (TgSAS4) y verificar el soporte para la anotación de su modelo génico.
- II. Diseñar una estrategia de mutagénesis para la inserción de un epítipo en el marco de lectura abierto codificante para la proteína.
- III. Generar una línea celular que exprese TgSAS4-3HA desde su promotor endógeno

- IV. Determinar la localización de TgSAS4 con respecto a marcadores de estructuras subcelulares de *T. gondii*
- V. Determinar el momento de expresión de TgSAS4 durante la división celular del parásito y en relación a la biogénesis del centrosoma.

3. Materiales y métodos

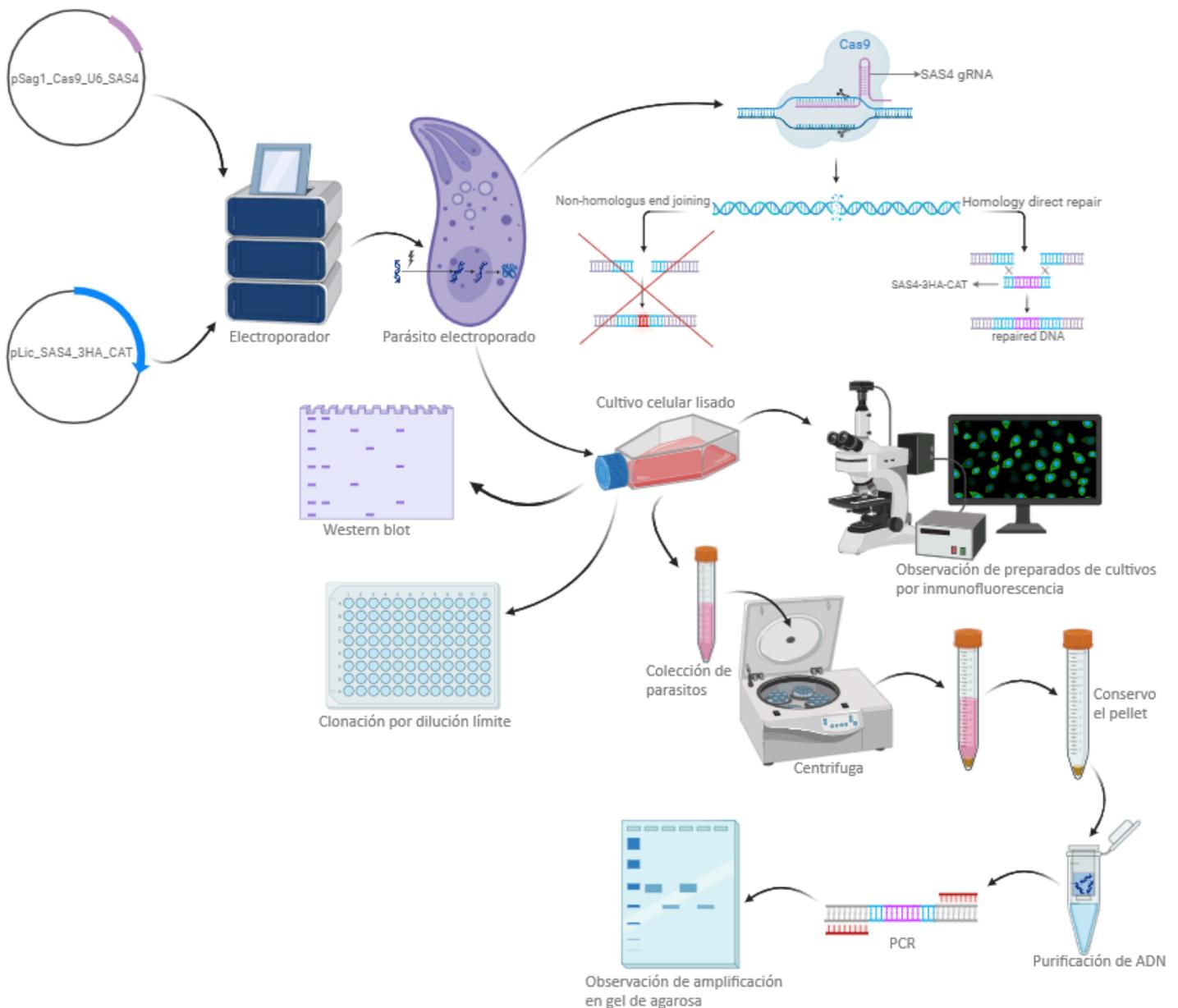


Figura 5. Esquema general de la metodología para la generación de una cepa transgénica en *Toxoplasma gondii*. Se generan dos plásmidos los cuales se utilizan para la transfección de parásitos. Los parásitos utilizados son de la cepa RH Δ Ku80, los cuales carecen de la capacidad de realizar recombinación no homóloga por lo que utilizan los plásmidos introducidos tanto para generar el daño sitio dirigido como para repararlo. Al cultivo se lo selecciona mediante agregado de cloranfenicol y posteriormente se generan cepas clonales, los cuales una vez lisados se colectan muestras para analizar por PCR la inserción del cassette en el sitio deseado. Estas muestras a su vez se utilizan para el análisis por western blot y se infectan cubreobjetos para analizar por microscopía de fluorescencia.

a. Identificación del homólogo de SAS4 (TgSAS4) y verificación del soporte de su modelo génico:

En primer lugar, se identificó el gen que codifica para el homólogo de SAS4 en *T. gondii*. Para ello, se utilizaron tres estrategias. Primero, realizamos un blast de la secuencia de hsSAS4 en la base de datos genómicos de *T. gondii*, conocida como toxodb (ToxoDB.org). Recíprocamente, el mejor “hit” obtenido en toxodb fue analizado a nivel bioinformático, comparando su secuencia contra el genoma humano, del cual se conoce el modelo centrosomal, con la herramienta BLAST del NCBI a partir de la información obtenida del GenBank. Por otro lado, se realizó una búsqueda de términos en ToxoDB, en la cual se buscó “SAS4” en los términos de anotación de los genes de *T. gondii*. Así mismo, se realizó una revisión de la literatura en la cual TgSAS4 había sido teóricamente identificada (Morlon-Guyot et al, 2017). Todas las estrategias, arrojaron como resultado al gen TgME49_258710 como el potencialmente codificante de un homólogo de SAS4. Cabe destacar que *T. gondii* es haploide y que generalmente no presenta copias múltiples de sus genes.

TgME49_258710 se encuentra en el cromosoma VIIIb, tiene una longitud total de 10,977 pb y está compuesto por 9 exones y 8 intrones. Su transcripto único abarca 7,370 pb, de las cuales 5,226 pb corresponden a la región codificante.

La estrategia de mutagénesis implementada consistió en insertar una etiqueta (tag) en el extremo C-terminal de la proteína, junto con un marcador de resistencia a antibióticos, utilizando el sistema de edición génica CRISPR-Cas9. Este enfoque se diseñó para inducir un corte dirigido en el extremo 3' del gen, a una distancia máxima de 100 pb del codón de parada (STOP), asegurando que la inserción ocurriera dentro del marco de lectura abierto (ORF) sin afectar la funcionalidad de la proteína.

Para lograr esta mutagénesis dirigida, se diseñó una guía específica para la región de interés, permitiendo que la endonucleasa Cas9 reconociera y generara un corte en el sitio deseado del ADN. La reparación de este corte se llevó a cabo mediante recombinación homóloga con un molde de ADN diseñado específicamente, que contenía secuencias homólogas a las regiones flanqueantes del sitio de corte y, además, incluía la secuencia de la etiqueta y el marcador de resistencia. Además, este proceso se ve favorecido por la utilización de una cepa que no puede utilizar el mecanismo de reparación NHEJ (Non-Homologous End Joining) (Huynh & Carruthers, 2009).

El diseño de la estrategia fue realizado mediante el uso del software de análisis de secuencias ApE (a plasmid editor). En este identificamos en la secuencia genómica las regiones de interés anteriormente mencionadas y generamos los oligonucleótidos necesarios, siguiendo los lineamientos adecuados como ser que la relación G-C no supere el 60%, que el largo de estos se encuentre entre 20 y 25 nucleótidos y que las temperaturas de desnaturalización (Tm) de los pares no difieran entre sí en más de 5 grados.

b. Generación de una línea celular transgénica:

Para la generación de una línea celular que exprese TgSAS4-3HA, se realizó el diseño de la guía de ARN de SAS4 y de un cassette de transfección, con regiones de homología cercanas al sitio codificante del codón stop de SAS4, con la etiqueta 3HA (hemaglutinina) y con un gen que codifica al cloranfenicol acetil transferasa (CAT), como se muestra en la **Figura 15**, que permite la selección de parásitos resistentes a cloranfenicol (chlor). Para esto se plantearon 2 estrategias, una se basa en utilizar el vector denominado “pLic” (dado que se modifica por *ligation independent cloning*) con 767 pares de bases de homología a la región 3’ del gen TgME49_258710, en marco con la secuencia codificante para 3HA y el marcador de resistencia CAT. Este vector se linealiza previo a su integración en los parásitos, de manera que la región de homología dirija su inserción específica en el locus de interés sustituyendo toda la región 3’ del gen, en su locus endógeno. Este protocolo se basa en la optimización llevada a cabo por Hyunh y colaboradores (Hyunh & Carruthers, 2009). La otra estrategia se basa en la utilización de un producto de PCR que contiene los mismos elementos antes mencionados (3HA y CAT) “flanqueados” por dos pequeñas regiones de homología, de 35 pares de bases, que corresponden a las secuencias que circundan el triplete que codifica para el codón STOP de TgSAS4. Ambas estrategias, representadas en la **Figura 5**, se complementan con el uso simultáneo de un guía de ARN, la cual fue diseñada, y clonada en el vector pSAG_Cas9_pU6_sgRNA (Sidik et al, 2018).

La obtención del plásmido pLic con homología a SAS4 requiere de un proceso de clonado de la región en cuestión mientras que la estrategia del producto de PCR es más simple pero usa una región de homología más corta y generalmente presenta menor eficiencia. Se planteó el uso secuencial, evaluando la transfección de parásitos con PCR específica y pSAG-SAS4 y eventualmente utilizar la estrategia de transfección utilizando pSAG-SAS4 y pLic-SAS43HA.

El diseño de la guía se realizó en el servidor ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Se partió de la región genómica de SAS4 cercana a la región codificante del codón STOP (100 pb río arriba y río abajo) dado que nos interesa insertar la etiqueta 3HA, en el C-terminal de la proteína. Se utilizó el ajuste de knock-in. Según los resultados obtenidos (ver resultados) se seleccionó la guía con el mejor score de eficiencia y el menor score de *off targets*, como se muestra en la **Figura 6**.

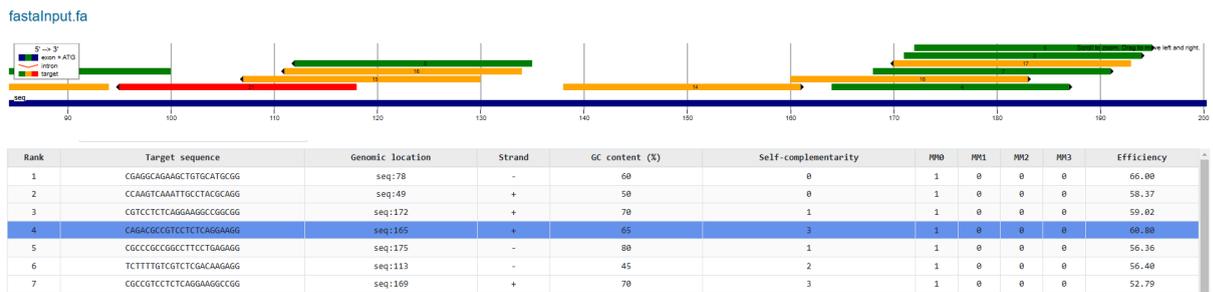


Figura 6. Guías posibles a utilizar según la configuración planteado en ChopChop.

Para la generación del vector pSAG-SAS4 la estrategia consistió en la inserción de la secuencia de gRNA para SAS4 en el vector pSag1_Cas9_U6_gRNA (Shen et al, 2014), que contiene a Cas9 bajo un promotor de expresión constitutiva, y un promotor que dirige la expresión de una guía de ARN para dirigir a la Cas9 a su sitio de corte, como se observa en la **Figura 7**. Para insertar la secuencia de la guía de SAS4 en el vector se realizó una reacción de mutagénesis utilizando el kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs). Para esto se realizó una PCR según las indicaciones del fabricante, utilizando el oligonucleótido 1 (que tiene en su secuencia codificado el gRNA) y el oligonucleótido reverso (oligo 4) que se hibrida río arriba del sitio de inserción de la sgRNA SAS4. El ciclado utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 30 seg a 98°C, posteriormente se realizaron 25 ciclos de desnaturalización a 98°C, 20 seg de hibridación a 58°C y extensión a 72°C por aproximadamente 3 minutos, ya que son 20-30 seg por Kb, y finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 2 min.

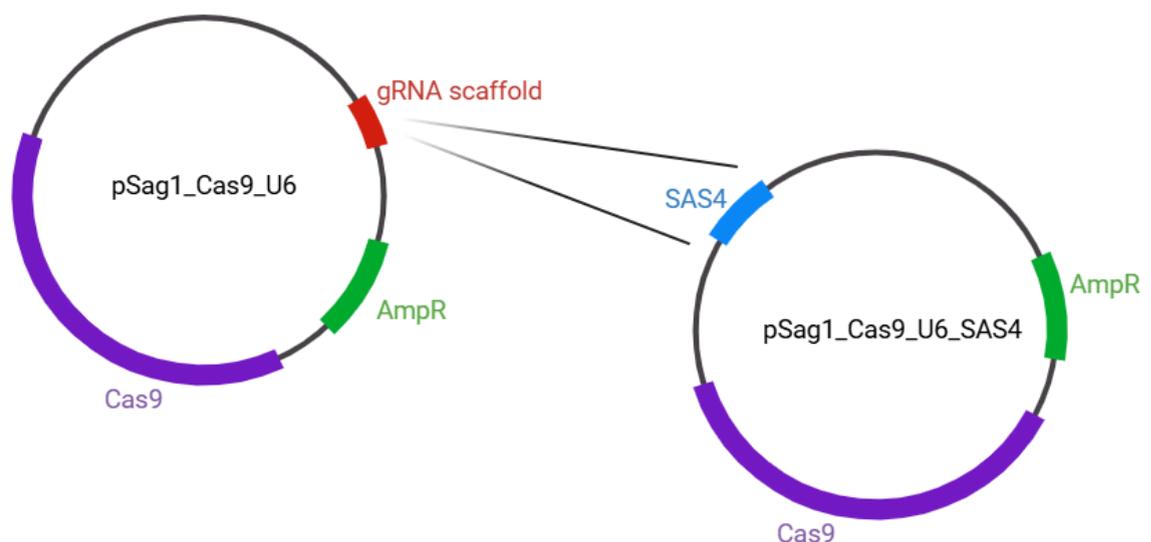


Figura 7. Esquema del plasmido pSag1_Cas9_U6. Mediante PCR se utilizó el sitio de gRNA scaffold, que se encuentra río arriba del sitio de inserción de la sgRNA específica, para la introducción de la secuencia guía de SAS4 que determina el sitio de corte en el ADN genómico por parte de la SpCas9. El vector contiene un marcador de resistencia a ampicilina, además de la secuencia codificante completa de SpCas9.

Se incubó el producto de PCR con DpnI en el buffer CutSmart 10X durante 1 hora a 37°C para generar la degradación del ADN metilado proveniente del molde y no de la PCR. Luego se lo purificó con kit de QIAGEN "QIAquick PCR Purification kit" según las indicaciones del fabricante. Se realizó la fosforilación y ligación secuencial del producto de PCR tratado con DpnI. La reacción de 20 µl consistió en 2 µl de buffer 10X, 2 µl de ATP, 1 µl de T4 PNK y 15 µl de producto de PCR puro. Se incubó 40 min a 37°C y 20 min a 65°C. Posteriormente se agregó 0,5 µl de ligasa y se incubó 30 min más a temperatura ambiente. Para evaluar los clones obtenidos, se transformaron mediante shock térmico bacterias *E. coli* DH5-α quimiocompetentes. Las bacterias transformadas se seleccionaron en placas de agar-LB-ampicilina 0,1 µg/µl.

Para el análisis de los clones obtenidos, se realizó una miniprep para extracción de ADN con el kit de Invitrogen "PureLink HiPure Plasmid Miniprep kit" utilizando el protocolo de "miniprep plasmid isolation" a partir de cultivos líquidos de 3 ml de LB-amp y luego de una incubación ON. Como se muestra en la **Figura 8**, se secuenció el vector obtenido por método Sanger con el oligonucleótido M13 R cuya secuencia se encuentra río abajo del sitio de clonación del sgRNA en el vector, para poder seleccionar de manera definitiva el transformante adecuado. Una vez obtenida la secuencia se realizó un alineamiento con la secuencia del plásmido molde y se analizó la secuencia de la guía, con el fin de seleccionar la colonia que contenga la guía correcta transformada en el sitio correcto.

Nuevamente se transforman bacterias con el vector conteniendo la guía seleccionada previamente para posteriormente realizar una maxiprep siguiendo el protocolo de "PureLink HiPure Plasmid filter DNA purification kit" de Invitrogen, con el fin de obtener cantidad suficiente de ADN para la transfección.

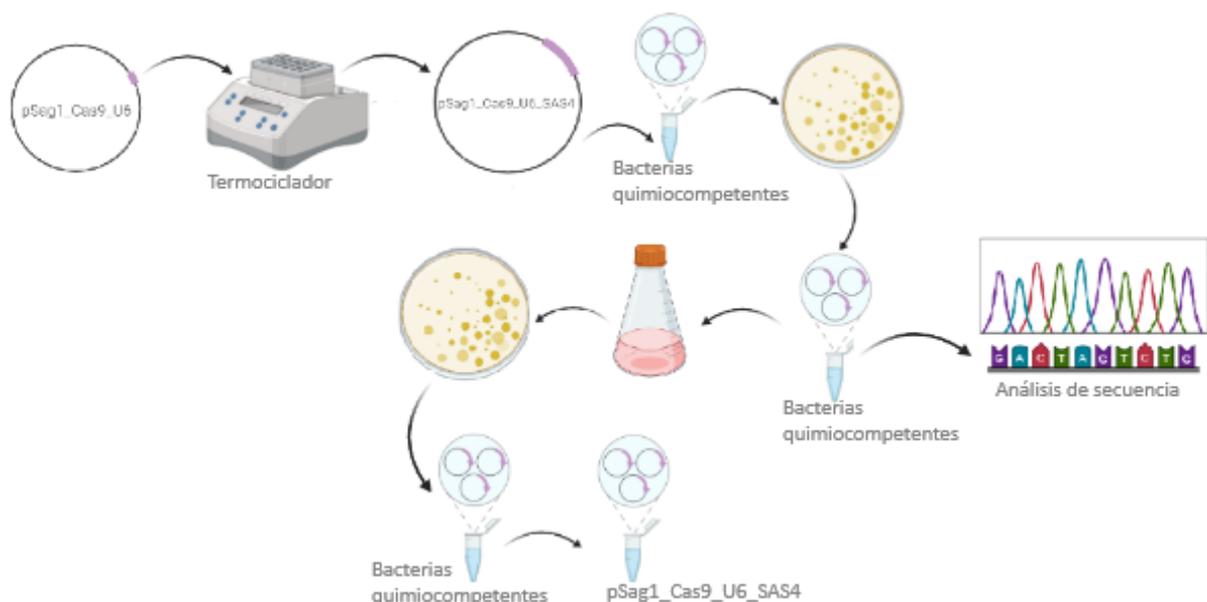


Figura 8. Esquema de los ensayos realizados para la generación de vector que contenga el sgRNA. A partir del plasmido pSag1_Cas9_U6, mediante mutagénesis por PCR se genera el nuevo plasmido pSag1_Cas9_U6_SAS4. El vector es amplificado en bacterias. El plásmido obtenido a partir de las colonias se secuencian, y escala el producto para su posterior uso.

Para la amplificación del producto de PCR “donador” de homología para la reparación del locus de TgSAS4 con 3HA-CAT, como se muestra en la **Figura 9**, se realizó una PCR, utilizando como molde un PCR previamente generado en el laboratorio (Cep164-3HA-CAT) que contiene las regiones de interés para su amplificación, con los oligonucleótidos 1 y 2. Mediante este proceso se sustituyen las regiones de homología para TgCep164 (vector previamente disponible en el laboratorio) por las regiones de homología de SAS4. El ciclado comenzó con 1 min inicial de desnaturalización a 98°C, posteriormente se realizaron 10 ciclos de 10 segundos a 98°C seguidos por 4 min con una temperatura de annealing de 57°C, posteriormente se realizaron 20 ciclos de 10 segundos a 98°C y 4 min de extensión a 65°C y finalmente se concluyó con 10 min a 4°C. El producto de PCR se analizó por gel de agarosa 1%, se lo transformó en bacterias competentes y se lo purificó mediante “PureLink HiPure plasmid filter DNA purification kit” de Thermo Fisher Scientific según las indicaciones. El ADN obtenido se utilizó como molde para una PCR y el producto de esta PCR se usó como molde para una nueva PCR realizada con una mastermix de volumen final 250 µl para obtener cantidad suficiente de ADN para la transfección. Previo a la misma, con el fin de concentrar el ADN para poder trabajar en las concentraciones y volúmenes deseados, se precipita. Para esto se agregó 2 vol de etanol absoluto y 1/10 vol de acetato de sodio 3 M pH 5,5, se lo incubó a -20°C toda la noche, se lo centrifugó a velocidad máxima por 15 minutos a 4°C, y luego se dejó en etanol 70% hasta su utilización.

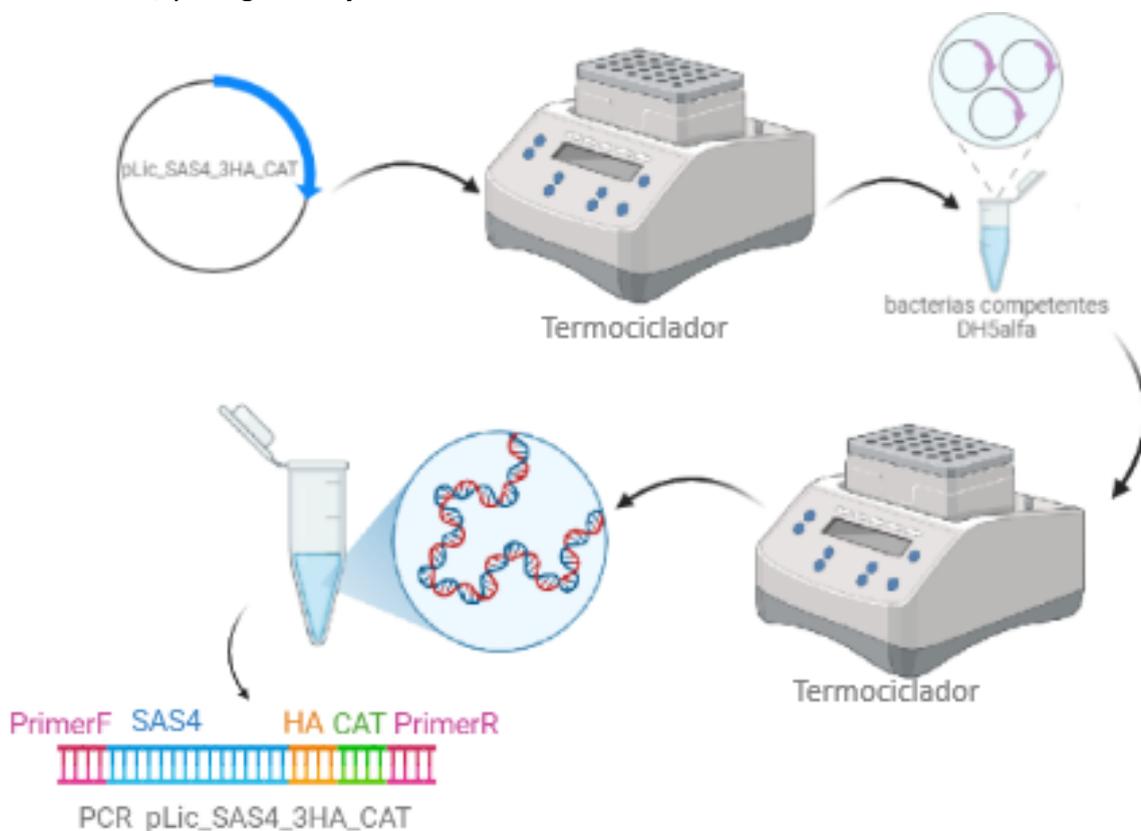


Figura 9. Esquema de la generación del producto de PCR “donador” de homología para la modificación del locus de TgSAS4. El producto de PCR 3HA-CAT se amplifica previo a su transfección.

c. Diseño de pLic-SAS4-HA-CAT:

La estrategia de clonación independiente de ligación (LIC) permite la incorporación de un inserto en un vector de expresión sin la necesidad de utilizar ligasa. En este trabajo se utiliza el pLic_3HA_CAT, como se observa en la **Figura 10**, que posee un sitio de inicio de replicación para *E. coli* que le permite su replicación dentro de estas cuando son transformadas.

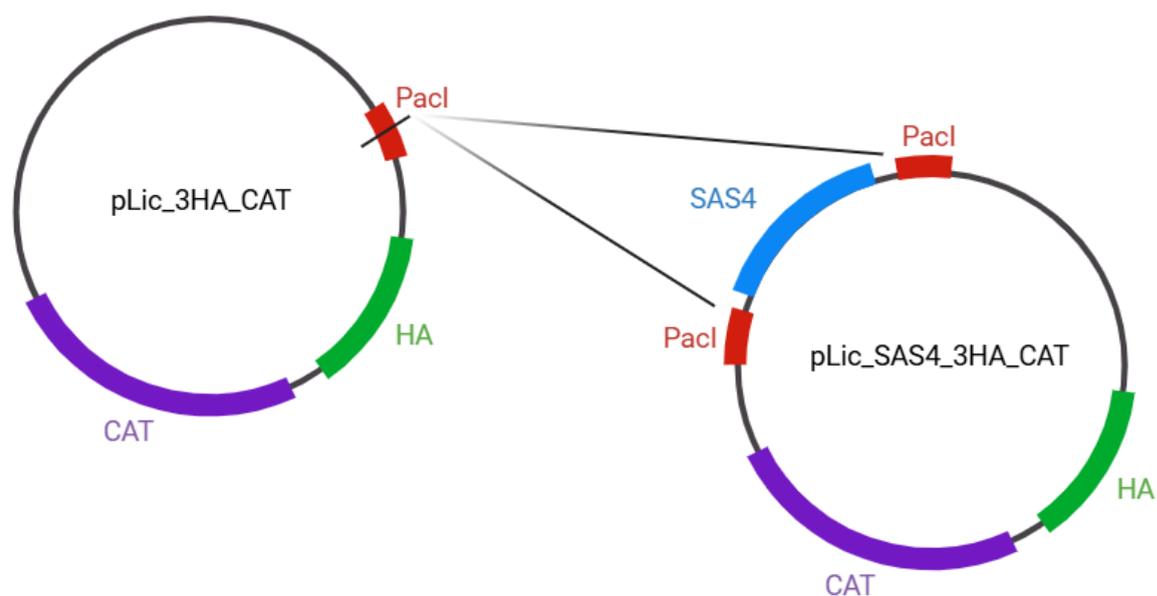


Figura 10. Esquema del plásmido pLic. Partimos de un plásmido con un sitio de corte con Pacl el cual se utilizó para introducir en el mismo la secuencia de SAS4. El plásmido original ya contaba con el tag de HA y la resistencia a cloranfenicol deseadas.

Clonación del vector pLic:

10 ug del vector se digieren con la enzima Pacl (NEB), en Buffer CutSmart (NEB) 10X en un volumen final de 200 μ l, para lograr su linealización. Se incubó la digestión toda la noche a 37°C. Luego purificó el vector linealizado con el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, y se precipitó en etanol absoluto y acetato de sodio 0,3 M pH 5.

El inserto se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos 8 y 9. El ciclado utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 30 seg a 98°C, posteriormente se realizaron 30 ciclos de desnaturalización a 98°C, 10 seg de hibridación a 66°C y extensión a 72°C por 1 min, y finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 5 min.

El vector linealizado y el producto de PCR se ligaron con T4 DNA polimerasa. Para esta ligación se montó una reacción en hielo de vf=60 μ l con 6 μ l de buffer 10X r2.1 NEB, 3 μ l de DTT 100 mM, 2,4 μ l de dGTP 100 mM, 1,5 μ l de T4 DNA polimerasa Novagen LIC qualified, 41,1 μ l de H₂Oup (ultrapura) y 6 μ l de vector. En un termociclador se generó un ciclo de 1 hora a 12°C, 20 min a 75°C (donde se agrega 1 μ l de EDTA 25 mM) y por último se conservó a 4°C.

Construcción del vector:

Luego, a los insertos obtenidos se les realiza una digestión con T4 DNA polimerasa para crear extremos solapantes a los del vector. Para esto se realizó en iguales condiciones que para el vector, a diferencia que el volumen de reacción es $\frac{1}{3}$ y se usa dCTP en lugar de dGTP.

Para la hibridización se mezcló en hielo 1 μ l del vector tratado y 2 μ l del inserto tratado y se lo incubó por 10 min a 22°C. Luego se añadió 1 μ l de EDTA 25 mM y se incubó 5 minutos más a 22°C. Finalmente se lo mantuvo en hielo hasta su uso.

Del vector ligado se lo utilizó 2 μ l para transformar bacterias quimiocompetentes y se hizo un control negativo transformando con 1 μ l de vector tratado con T4. En el c- no se deberían ver colonias ya que el vector debería estar abierto y en las bacterias no replicará por lo que no tendrían la resistencia.

Las colonias transformantes se seleccionaron por colony PCR utilizando los oligonucleótidos 8 y 9, con un ciclado que consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, posteriormente se realizaron 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, 30 seg de hibridización a 58°C y extensión a 72°C por 1 min, y finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 min..

Las colonias positivas se pasaron a cultivo líquido de 5 ml de LB + amp en falcon de 15 ml y se las dejó en agitación a 37°C toda la noche. Posteriormente se purificaron siguiendo el protocolo de miniprep “plasmid DNA purification” de Macherey-Nagel, según las indicaciones del fabricante.

Se realiza una digestión para cada miniprep, el de las colonias y del pLic (como c- de plásmido vacío), utilizando 5 μ l de cada miniprep, 2 μ l de buffer 10X rCutSmart, 1 μ l de la enzima MluI-HF, 1 μ l de la enzima NotI-HF y 11 μ l de H₂Oup, incubando 1 hora a 37°C.

Según los resultados obtenidos se arma un cultivo líquido de 100 ml con LB+amp en matraz de 500 ml, con muestra tomada de la colonia 1. Lo dejo en agitación a 37°C toda la noche, tapado con el tapón de gasa + papel y cinta.

Paso el cultivo del matraz a 2 falcon de 50 ml y los centrifugó por 10 min a 5000 rpm.

Sigo protocolo de “purelink HiPure plasmid filter maxiprep kit” (midiprep) y luego precipito el ADN obtenido agregando 0,7 vol de isopropanol, dejándolo a -20°C toda la noche.

Se realiza una linealización del vector mediante la digestión con 1 μ l de buffer rCutSmart 10X, 1 μ l de HindIII, 4 μ l del vector y 1 μ l de H₂Oup (vf=10 μ l). Dejo toda la noche a 37°C con parafilm.

Lo precipito y lo centrifugo a 4°C por 30 min a 12000 xg. Lo lavo con 500 μ l de etanol 70% y lo centrifugo a 12000 xg por 15 min. Lo llevo a la campana de extracción para secar el pellet y luego resuspender en 1 μ l de guía y 20 μ l de buffer.

d. Cultivo de parásitos:

Para llevar a cabo los experimentos, se utilizó la cepa RH Δ ku80 la cual fue mantenida por pasaje serial en la línea celular VERO (fibroblastos derivados de riñón de mono), ambos mantenidos en medio Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, gibco) suplementado con penicilina-estreptomicina y 5% suero fetal bovino (SFB) y L-glutamina 0,5 mM, a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂.

e. Transfección:

Con el fin de obtener un cultivo de parásitos homogéneo, libre de restos celulares, se partió de un cultivo lisado (es decir, mecánicamente extraído de las células VERO mediante el pasaje de las mismas por una jeringa 26G), que se filtró utilizando un filtro de policarbonato de 3 micras de forma de aislar los parásitos de las células hospederas. Se realizó el recuento de parásitos usando una cámara de Neubauer. A 6.5×10^7 parásitos/ml se le agregó ADN y los buffers correspondientes según la metodología de transfección utilizada.

Para la transfección con el PCR donador de homología y pSag_Cas9_SAS4, 100 μ l de ADN compuesto por 50 μ l de PCR + 100 μ l de guía en dilución 1/100 (concentración=192,9 ng/ml) resuspendidos en citomix (compuesto por EDTA 2 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 25 mM, MgCl₂ 5 mM a pH 7,6) al momento de transfectar. Para la transfección se utilizó un volumen de 700 μ l en un electroporador BTX Electro Cell Manipulator 600, seteado a 2,5 A, 24 Ohm y 2,0 kV.

Para la transfección con pLic_SAS4 y pSag_Cas9_SAS4, se uso 5 μ g de cada vector y 100 μ l de buffer preparado en el momento mezclando 82 μ l de buffer P3 y 18 μ l de suplemento 1. 80 μ l se usaron para resuspender el pellet de parásitos previamente centrifugados a 400 rpm por 5 min. A los 20 μ l de buffer restante le agregue 1 μ l de la guía y 1 μ l del vector. Luego se mezclan ambas preparaciones y se pasan a cubeta. Se transformó en cubeta con el programa EA100 2 veces del nucleofector "4D-Nucleofector" de Lonza.

En ambos casos, representados en la **Figura 11 y 12**, se pasaron los parásitos a una botella T25 con células VERO y DMEM. Luego de 24 horas se cambia el medio a DMEM + chlor (1 μ l de chlor cada 5 ml de DMEM)

Selección de parásitos transgénicos:

La selección de los parásitos transfectados se realizó con cloranfenicol. Para esto el antibiótico se adiciona al medio de cultivo una proporción 1/5000 a partir de un stock inicial de 34 mg/ml. La selección de parásitos transfectados se mantuvo hasta el momento de la clonación por dilución límite.

Evaluación de clones transgénicos SAS4-3HA:

Se realizó la extracción de ADN de parásitos seleccionados y mantenidos en cultivo durante 10 pasajes utilizando el kit comercial Quick DNA miniprep Plus kit (ZymoResearch). Para confirmar la inserción del cassette de mutagénesis en el locus correcto, se realizó una

PCR con los oligonucleótidos 5 y 7. Además realizamos en paralelo otra PCR utilizando Mangomix con los oligonucleótidos 5 y 6 screening específicos para control de extracción. Los ciclados utilizados consistieron en una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, posteriormente se realizaron 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, 30 seg de hibridación a 58°C y extensión a 72°C por 1 min, y finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 min.

Por otro lado, a los parásitos transfectados con el vector pLic_SAS4, se les realiza un PCR para control de integración del plásmido, con los oligonucleótidos 7 y 8, con el mismo ciclo descrito previamente. Para mayor información sobre los sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en este estudio, referirse a la **Figura 15**.

Al producto de PCR se lo corre en gel de agarosa 1% para control y se manda a secuenciar el producto de PCR a Macrogen.

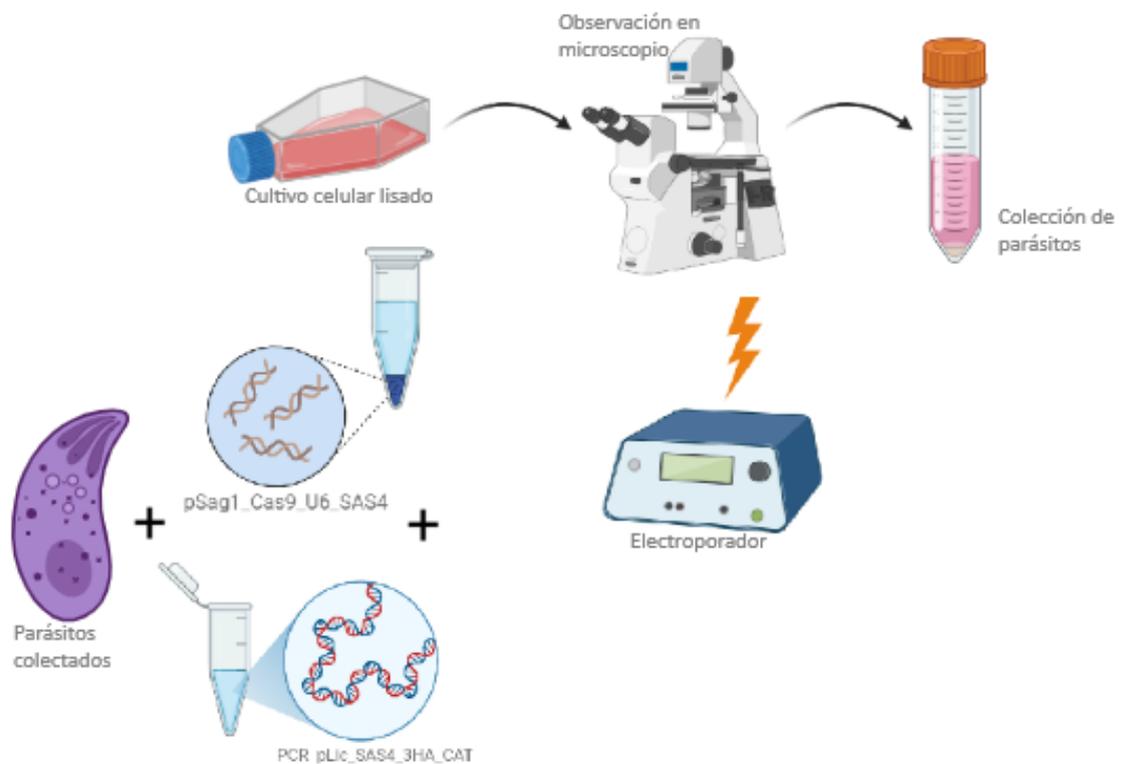


Figura 11. Esquema de la transfección de parásitos utilizando un electroporador BTX. El cultivo parental del cual se partió, se observó por microscopía. Una vez determinado que la cantidad de parásitos obtenidos era el deseado se centrifugó para separar los parásitos del medio de cultivo. Al pellet se lo electroporó junto con la guía y el vector o PCR generados previamente.

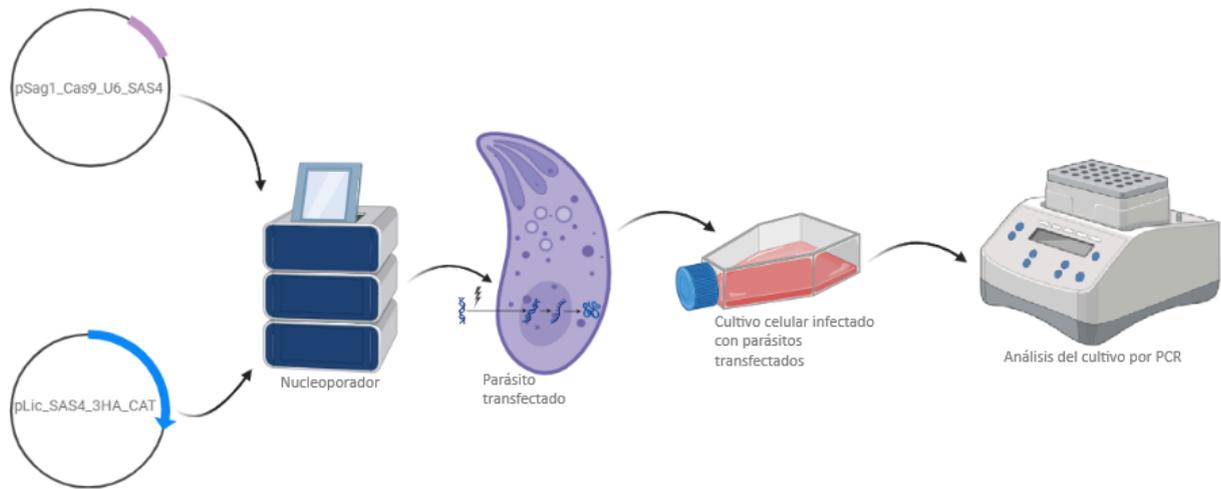


Figura 12. Esquema de transfección utilizando un Nucleofector 4D (Amaxa). Los vectores pLic_SAS4 y pSag_Cas9_sgRNASAS4 generados fueron nucleoporados en los parásitos parentales. Estos se seleccionaron en cultivo y fueron periódicamente controlados mediante PCR.

f. Generación de líneas clonales por dilución límite:

Una vez corroborada la inserción del 3HA en el locus de interés por PCR y secuenciación se procede a generar líneas clonales. Para ellos, primero se preparan placas de 96 pocillos conteniendo células hospederas confluentes. En paralelo se cultivan los parásitos, los cuales serán purificados (es decir, separados de las células hospederas en las que se encuentran) para ser separados individualmente, un parásito por pocillo. Para ello, con rastrillo se levanta la monocapa infectada con la línea policlonal seleccionada. Se pasa por jeringa el medio aprox 10 veces y se filtra. Se cuentan los parásitos y se calcula la dilución correspondiente para depositar un promedio de 1,5 parásitos por pocillo. Las placas se incuban por una semana en la estufa de cultivo, con mínimo movimiento. Los pocillos fueron evaluados individualmente seleccionando aquellos en los que se detecta una única placa de lisis y se escalan.

Los clones fueron evaluados individualmente por PCR (como se describió anteriormente) para identificar aquellos en los que TgSAS4 se encontrará “etiquetada”. A los clones positivos obtenidos, una vez fueron escalados en cultivo se los congeló. Para esto se levantaron los cultivos con tripsina y se pasó 900 µl de cada cultivo a un criotubo con 100 µl de DMSO. A cada clon se lo congeló en triplicados a -80°C.

g. Inmunofluorescencia indirecta:

Para evaluar la expresión y localización de la proteína codificada por TgSAS4 realizamos inmunofluorescencia indirecta, como se muestra en la **Figura 13**. Para este procedimiento se cultivaron células RPE en cubreobjetos colocados en una placa de 24 pocillos. Se dejaron en cultivo con medio DMEM completo hasta su confluencia. Luego, se inocularon con parásitos y se dejaron en cultivo 24 horas. Luego, se lavó con PBS 1X a temperatura ambiente para que no se despeguen las células y se fijó con 500 µl de metanol por 5 min. Se realizó el bloqueo con BSA 3% en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunomarcación se utilizaron como anticuerpos primarios mouse anti-HA 1:1000 (Cell Signaling) y rabbit anti-H2Bz 1:3000 (Bogado et al, 2014), rabbit anti-HA 1:1000 (Cell Signaling) y mouse anti-IMC1 1:500 (amablemente proporcionado por Gary Ward, Universidad de Vermont), en ensayos por separado. Se dejan incubando 1 hora y luego se realizan 5 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno previo a la incubación de los anticuerpos secundarios. Para estos se utilizó anti-Ms 488 y anti-Rb 594 o anti-Rb 488 y anti-Ms 594 (todos de cabra, de Invitrogen) según corresponda a cada ensayo, incubandolos 1 hora, todos en dilución 1:1000. El último lavado de los anticuerpos secundarios se realiza a diferencia de los otros con PBS 1X con DAPI 1:1000, para aumentar la definición del núcleo ya que el medio de montaje Fluoroshield contiene *NucBlue*.

Para su observación y obtención de imágenes se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 880, mediante los canales de excitación: Alexa488 con excitación 488nm con emisión de 526nm, DAPI con excitación 405 nm con emisión 459nm y Cy3 con excitación 561nm con emisión 624nm, utilizando el aumento 63x/1.4 Oil.

Las imágenes obtenidas fueron deconvolucionadas en Huygens y procesadas en el programa ImageJ.

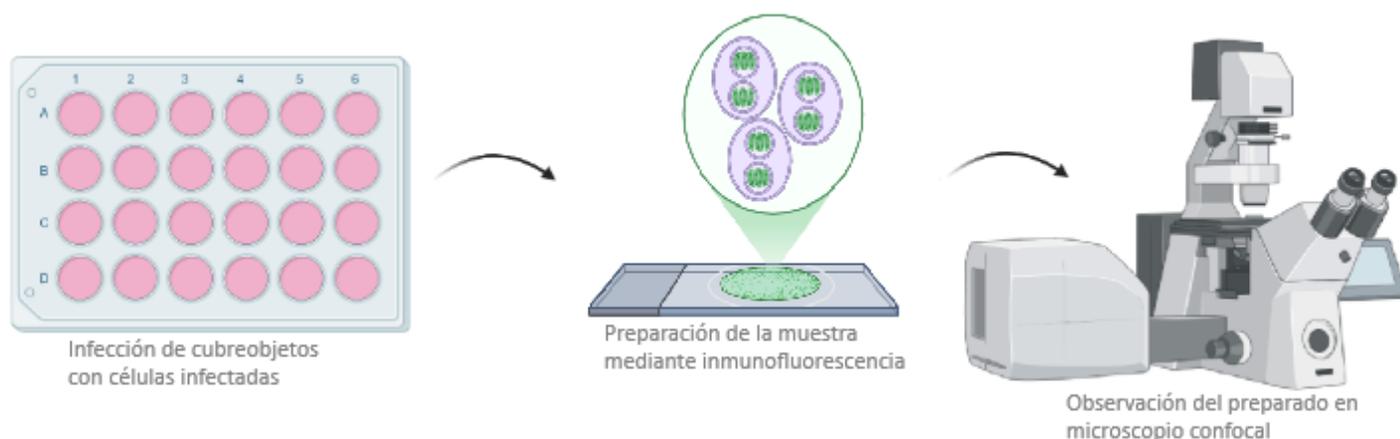


Figura 13. Esquema del ensayo de inmunofluorescencia indirecta. En placas de 24 pocillos se colocaron cubreobjetos en los cuales se cultivaron células infectadas. A estas se les realizó una marcación por inmunofluorescencia indirecta para finalmente ser observados en un microscopio confocal.

h. Western blot:

Con el fin de corroborar la identidad de la proteína etiquetada, se procedió a realizar un western blot. Se preparó un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Las muestras (pellets colectados de parásitos de cultivos lisados), se incubaron con buffer de lisis (compuesto por Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Tritón X-100 0,5%, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, glicerol 5%, DTT 0,5 mM) y se homogeneizó. Las muestras lisadas se incubaron con Laemmli buffer a 100°C por 5 min.

Los geles se corrieron a 70 V y una vez que las muestras llegan al gel de separación se cambia la configuración a 120 V continuando con el amperaje libre, hasta que las muestras recorren la totalidad del gel. El contenido del gel es transferido a una membrana de nitrocelulosa en un sistema de transferencia húmedo BioRad. La transferencia se realiza a 30 V a 4°C toda la noche.

La membrana se bloqueó con leche descremada en polvo en PBS 1X al 5% , por al menos una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se pasa a la incubación del anticuerpo primario rabbit anti-HA (Cell Signaling), diluido en solución de bloqueo 1/500. Luego de incubar mínimo 1 hora a temperatura ambiente, se procede al lavado de la membrana con PBS Tween 0.5%, repitiendo el proceso 5 veces, cada uno con una duración de 5 minutos. Luego, se realiza la incubación con el anticuerpo secundario, anti rabbit fusionado a HRP, el cual se incuba por 1 hora a temperatura ambiente. Se repite el lavado con PBS-Tw previamente mencionado. Para el revelado de la membrana se utilizan los reactivos peróxido y Luminex (Super Signal West pico PLUS Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific), en cantidades iguales para cubrir la membrana. Esto se analiza en el equipo ImageQuant 800 en modo automático para obtener la imagen resultante y luego se varían los tiempos de exposición para mejorar la visualización.

i. Transformación de bacterias competentes DH5 alpha

Todas las transformaciones implicadas en la generación de vectores anteriormente descritos fueron realizadas de la siguiente manera (representado en la **Figura 14**): bacterias competentes DH5- α , con hasta 200 ng de plásmido, incubando en hielo por 30 min, heat-shock a 42°C por 30 seg y dejamos en hielo por 5 min. Plaqueamos 200 μ l y lo dejamos toda la noche a 37°C. Se levantan 2 colonias las cuales se hacen cultivo líquido en 5 ml de LB +amp, dejándolo en agitación toda la noche. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y al pellet obtenido se le realiza el protocolo de purificación de miniprep del kit de nzytech.

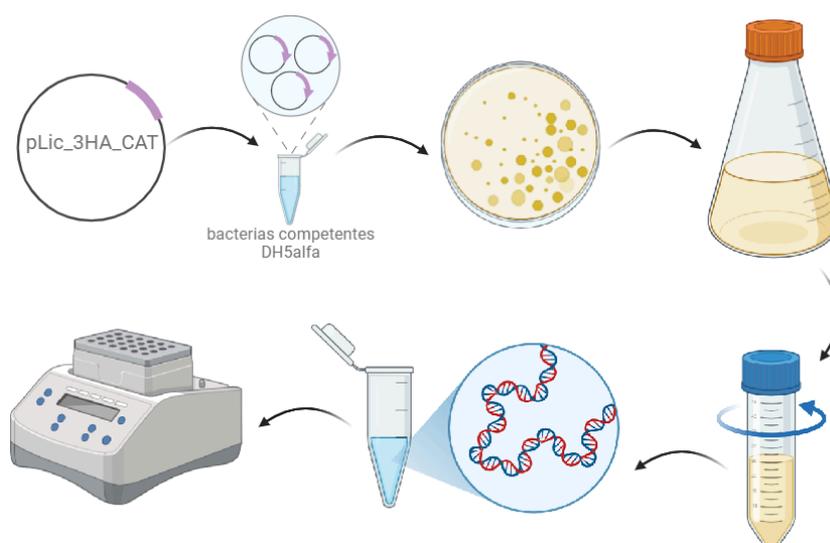


Figura 14. Esquema del proceso de transformación. A partir de una colonia se escala en un cultivo líquido el cual es posteriormente centrifugado y utilizado para la extracción del ADN correspondiente.

Tabla de oligonucleótidos:

NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DEL PRIMER	Tm (°C)
Oligo 1 (SAS4_TaggingR)	CTT CGT CTC TTT CGC GCT GCT CTG CTG TCT CTC TTC GAA TTG GAG CTC CAC CGC	71,9
Oligo 2 (SAS4_TaggingF)	CGC AGG CCG GAA CCG CAT GCA CAG CTT CTG CCT CGA AAA TTG GAA GTG GAG GAC GG	74,2
Oligo 3 (SAS4_GuideF)	CAG ACG CCG TCC TCT CAG GAG TTT TAG AGC TAG AAA TAG C	65,4
Oligo 4 (Q5Mut_sg_CasGFP_R)	AAC TTG ACA TCC CCA TTT AC	50,2
Oligo 5 (SAS4_ScreeningF)	ATC TAC CAT TTC GCC GAG CA	56,6
Oligo 6 (SAS4_ScreeningR)	CTG AGA GGA CGG CGT CTG C	60,5
Oligo 7 (HA_R)	TTA GGC ATA ATC TGG AAC ATC G	52,5
Oligo 8 (SAS4_LIC_F)	TAC TTC CAA TCC AAT TTA ATT AAA AGC TTC GTC	65,0

	TCT CCT CTC TCC AGC TC	
Oligo 9 (SAS4_LIC_R)	TCC TCC ACT TCC AAT TTT ACG AGG CAG AAG CTG TGC ATG	66,7
Oligo 10 (SAS4_Screening_Fw)	GGA TGG AAC TTT GTT CTC TTC GTC A	57,0
Oligo 11 (SAS4_Screening_Rv)	AGG TTA TCT CTT CGG CTT TGT TCG T	58,3

Tabla de combinación de oligonucleótidos:

COMBINACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO ESPERADO DE AMPLIFICACIÓN (pb)	FUNCIÓN
Oligonucleótidos 10 + 11	941	Control de amplificación de ADN genómico
Oligonucleótidos 10 + 7	1335	Detección de la inserción en el locus correcto del 3HA
Oligonucleótidos 5 + 6	935	Control de amplificación de ADN genómico
Oligonucleótidos 5 + 7	1003	Detección de la inserción en el locus correcto del 3HA
Oligonucleótidos 8 + 9	796	Control de amplificación de ADN genómico y para observar la presencia del plásmido
Oligonucleótidos 8 + 7	917	Detección de la inserción en el locus correcto del 3HA

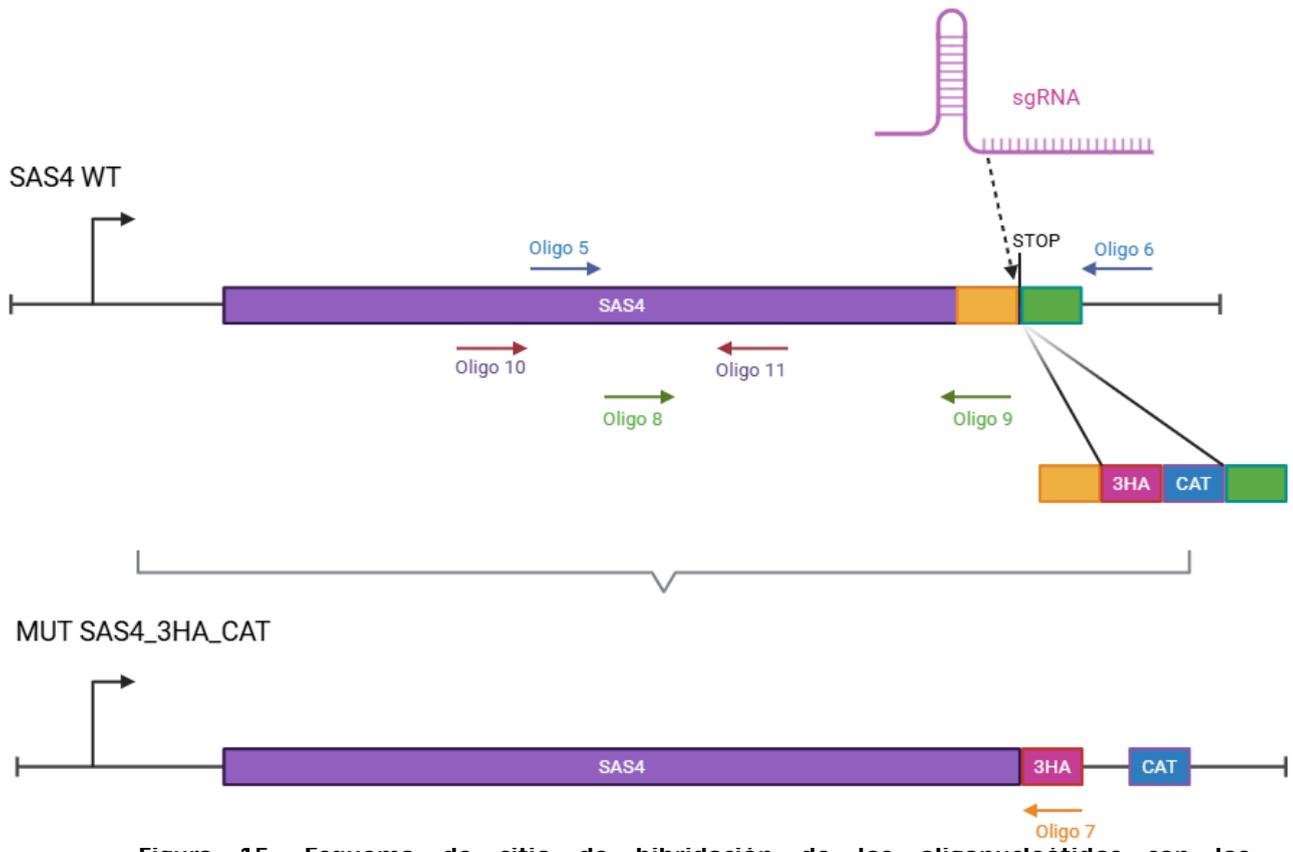


Figura 15. Esquema de sitio de hibridación de los oligonucleótidos con los correspondientes tamaños de los fragmentos obtenidos según el par de oligonucleótidos utilizados.

4. Resultados

1- Identificación del homólogo de SAS4 en *T. gondii*

En este proyecto se propuso determinar si existe en *T. gondii* un homólogo funcional de la proteína SAS4, responsable por el control del largo de los centriolos en otras especies. Para esto se generó una línea mutante en poblaciones de parásitos *T. gondii* para que expresen la proteína de interés SAS4 marcadas con un tag (HA) y así determinar si la proteína se expresa y su localización celular por microscopía de inmunofluorescencia. La elección de esta proteína y su hipotética localización centrosomal surgen del interés de la caracterización del centrosoma. Para identificar el homólogo de SAS4 en *T. gondii* se realizó en una primera instancia un análisis bioinformático, tal cual se detalla en los materiales y métodos. En base a este análisis, donde se comparó la secuencia de proteínas homólogas, humana (CPAP) y de otras especies, contra el genoma de *T. gondii*, se identificó TgME49_258710 como el potencialmente codificante de un homólogo de SAS4. Posteriormente, se comparó a nivel aminoacídico la secuencia codificante de TgME49_258710 con homólogos de SAS4 tanto de humanos (CPAP) como de otras especies, incluidos otros apicomplejos. Se observa una identidad del 46% con la proteína SAS4 del apicomplejo *Neospora caninum*, y una similitud del 54%, como se muestra en la **Figura 16**. Al mismo tiempo, cuando observamos otro Apicomplexa como *Plasmodium*, vemos que contrario a lo esperado, no se encuentran agrupados en clados con alto grado de identidad, lo que nos permite plantear que incluso dentro de la misma familia, esta proteína no es tan conservada como se suponía a nivel de secuencia. Esta observación es coherente con el hecho de que las especies del género *Plasmodium* carecen de centriolos. Por otro lado, vemos que el homólogo en *T. gondii* dista de la SAS4 humana, lo que nos permite continuar con la premisa que diverge lo suficiente de la proteína encontrada en sus hospederos, por lo que sigue siendo un blanco importante de estudio.

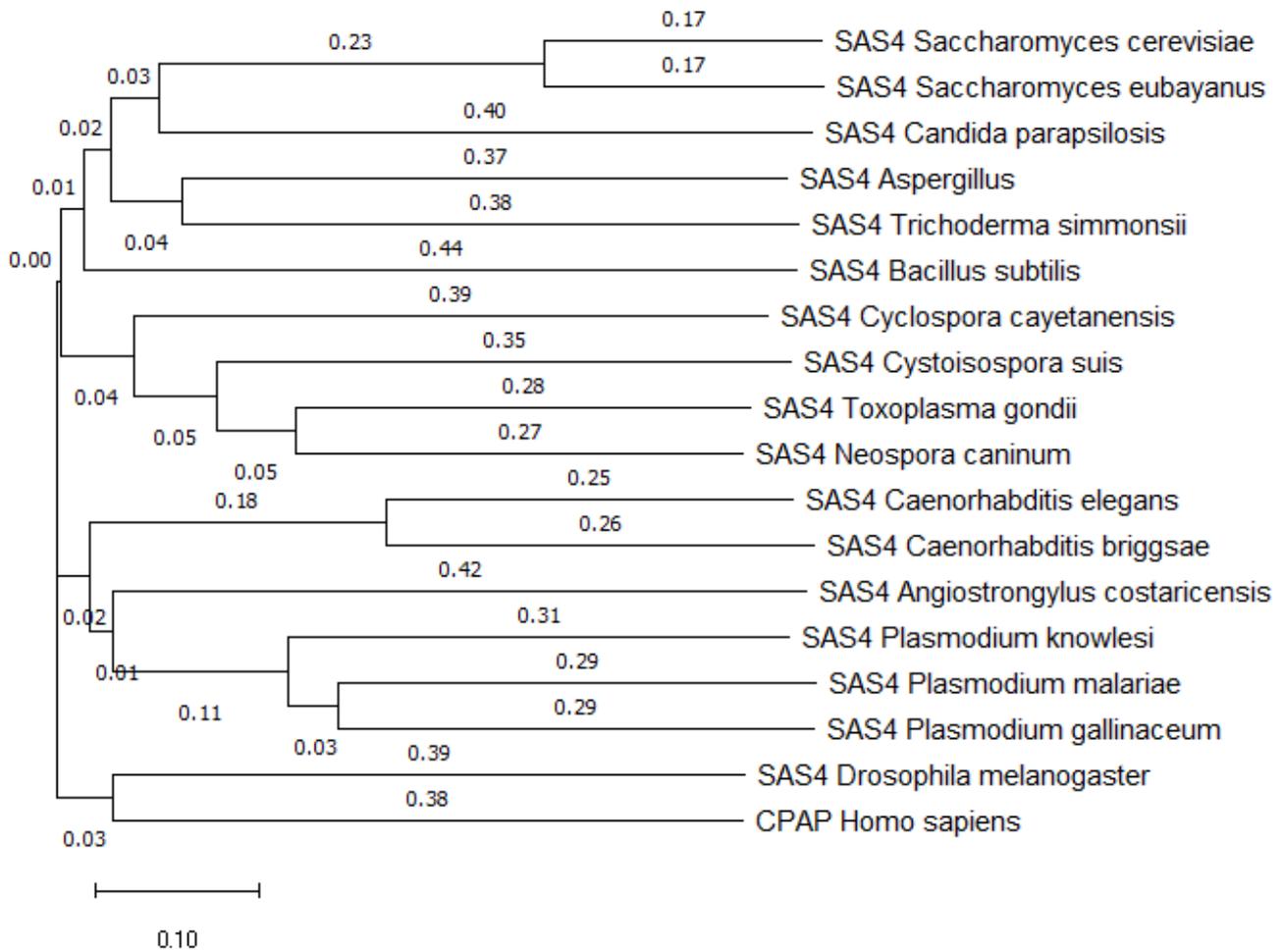


Figura 16. Árbol filogenético de SAS4. Esta construcción se realizó mediante el alineamiento de las diferentes secuencias proteicas de SAS4 en diversas especies con el software MEGA11.

2- Generación de parásitos transgénicos TgSAS4-3HA

Para evaluar la cinética de expresión y la localización del homólogo de SAS4 en *T. gondii*, nos planteamos la generación de una línea celular de parásitos que exprese TgSAS4-3HA. Para esto, se utilizó la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9, la cual permite aumentar la eficiencia de recombinación homóloga en el proceso de reparación del ADN de manera dirigida. SpCas9, es una endonucleasa que corta la secuencia nucleotídica en una región determinada, la cual reconoce mediante un ARN guía (sgRNA) que incorpora cuando esta se expresa simultáneamente. Este mecanismo permite generar un corte en la región de interés. En nuestro caso, la generación de la cepa que expresa TgSAS4-3HA se genera mediante la modificación del extremo 3' de nuestro gen de interés, en el cual se inserta la secuencia codificante para una triple HA en el marco de lectura abierto del gen. Es decir, antes del codón STOP. Esta inserción sucede luego de la reparación por recombinación homóloga, mediante la secuencia proporcionada al parásito, lo cual además se ve favorecido por la utilización de una cepa que tiene depletado el gen de la proteína ku80, el cual es responsable de reparar el ADN de manera no-homóloga (es decir, esta cepa, no puede utilizar el mecanismo de reparación NHEJ).

Para obtener una guía específica para SAS4, se modificó el vector pSAG_Cas9_pU6_sgRNA mediante PCR, tal como se describe en los materiales y métodos. Brevemente, se realiza una mutagénesis por PCR del vector en la que se integra la secuencia de la sgRNA mediante su inclusión en un oligonucleótido. El producto de PCR obtenido fue corrido en un gel, correspondiente a una concentración de 1042,9 ng/μl. Se obtuvo un producto del peso molecular esperado y no se observó degradación de la misma como se muestra en la **Figura 17**. De las colonias resultantes de la transformación del vector mutagenizado se seleccionaron 6 para realizar miniprep y secuenciar. Para ello se utilizó el primer 2, que hibrida río arriba del sitio de clonación de la sgRNA. Finalmente, luego de alinear las secuencias obtenidas, el clon con la secuencia guía correcta era el 6, como se muestra en la **Figura 18**.

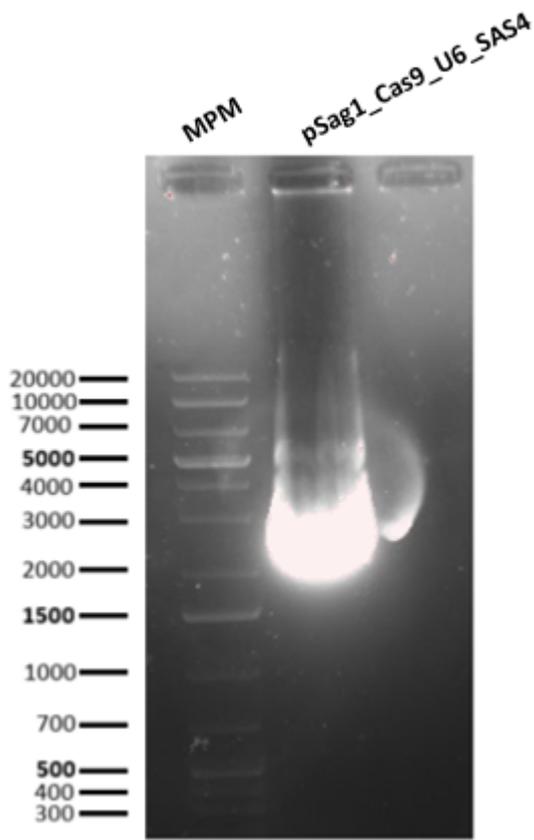


Figura 17. Gel realizado para el control de calidad del vector pSAG_Cas9_pU6_sgrRNA-SAS4 obtenido post-mutagénesis. MPM: marcador de peso molecular.

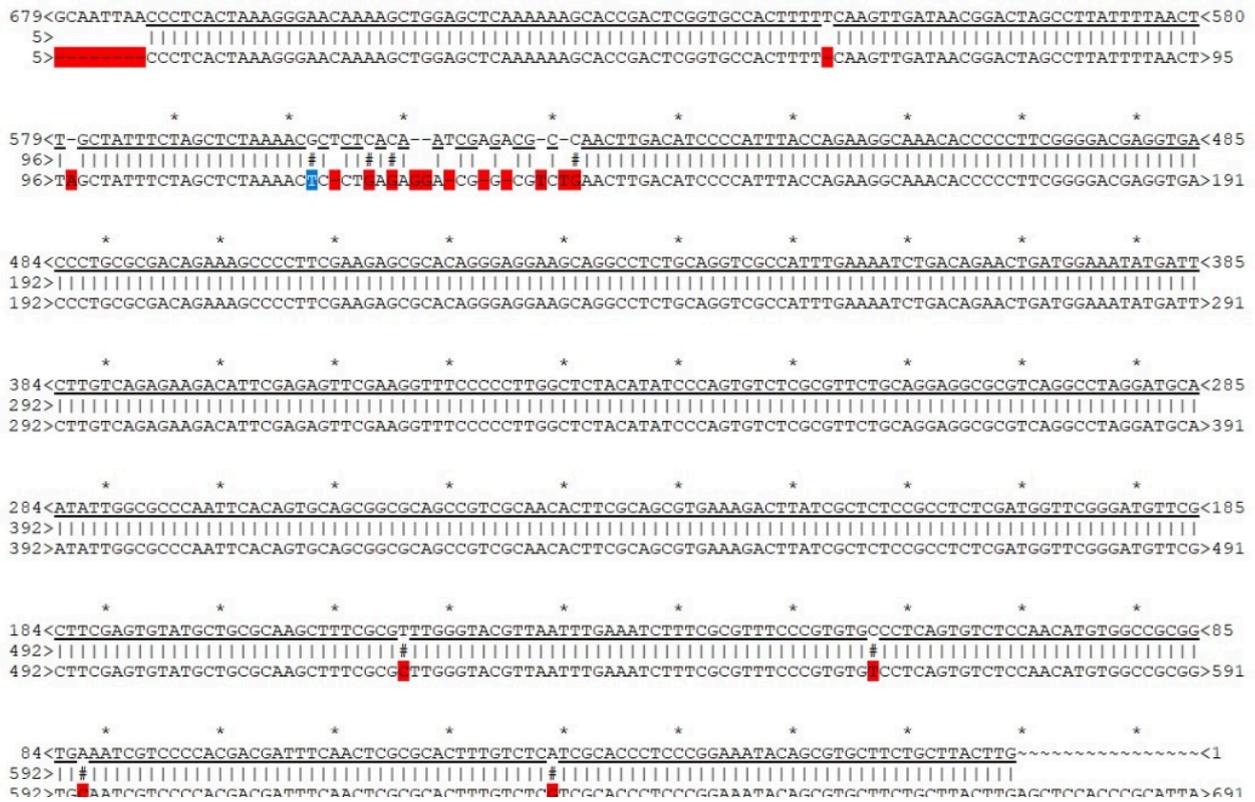


Figura 18. Alineamiento de la secuenciación del vector pSAG_Cas9_pU6_sgRNA-SAS4 guía obtenida en el clon 6 con la secuencia del vector pSAG_Cas9_pU6_sgRNA-UPRT. Para esto, se utilizó la herramienta de alineamiento de dos secuencias del programa ApE (A Plasmid Editor).

Por otro lado, se generó la molécula de ADN donadora de homología para la transfección, mediante PCR. En este caso se obtuvo un amplicón de aproximadamente 2000 pares de bases, como se observa en la **Figura 19**, en una concentración de 1169,602 ng/μl .

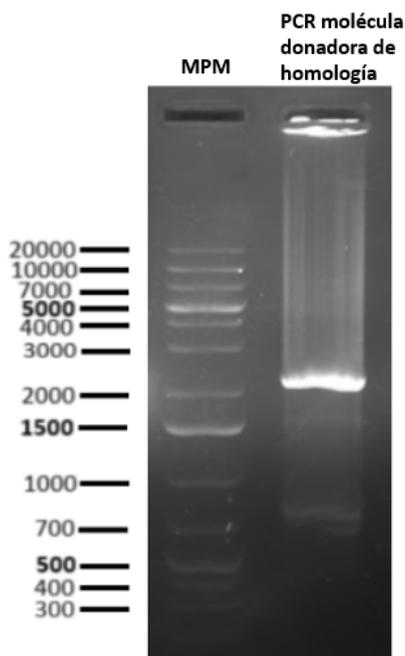


Figura 19. Amplificación por PCR de la molécula donadora de homología conteniendo la secuencia 3HA-CAT . Gel de agarosa 1%. MPM: marcador de peso molecular. La banda observada coincide con el tamaño del amplicón esperado (2 kb aproximadamente).

Transfección con PCR:

Se llevó a cabo la transfección del vector con la guía y el ADN donador, ambos previamente precipitados y concentrados, en la cepa parental RH Δ ku80. Luego del período de selección de parásitos resistentes, se colectaron los parásitos para realizar la extracción de ADN y evaluar si se observaba inserción de 3HA-CAT, utilizando para ello un PCR diseñado para tal fin. Para esto se utilizó un oligonucleótido reverso que hibrida en la secuencia codificante del 3HA y un oligonucleótido de screening F (oligo 10) el cual se hibrida en el genoma río arriba del sitio de inserción. Además se realizó control de la extracción del ADN, con el oligonucleótido screening F y el screening R (oligo 11) que hibrida antes del sitio de inserción, y debería de amplificar siempre que el ADN se haya extraído de manera íntegra y en suficiente cantidad.

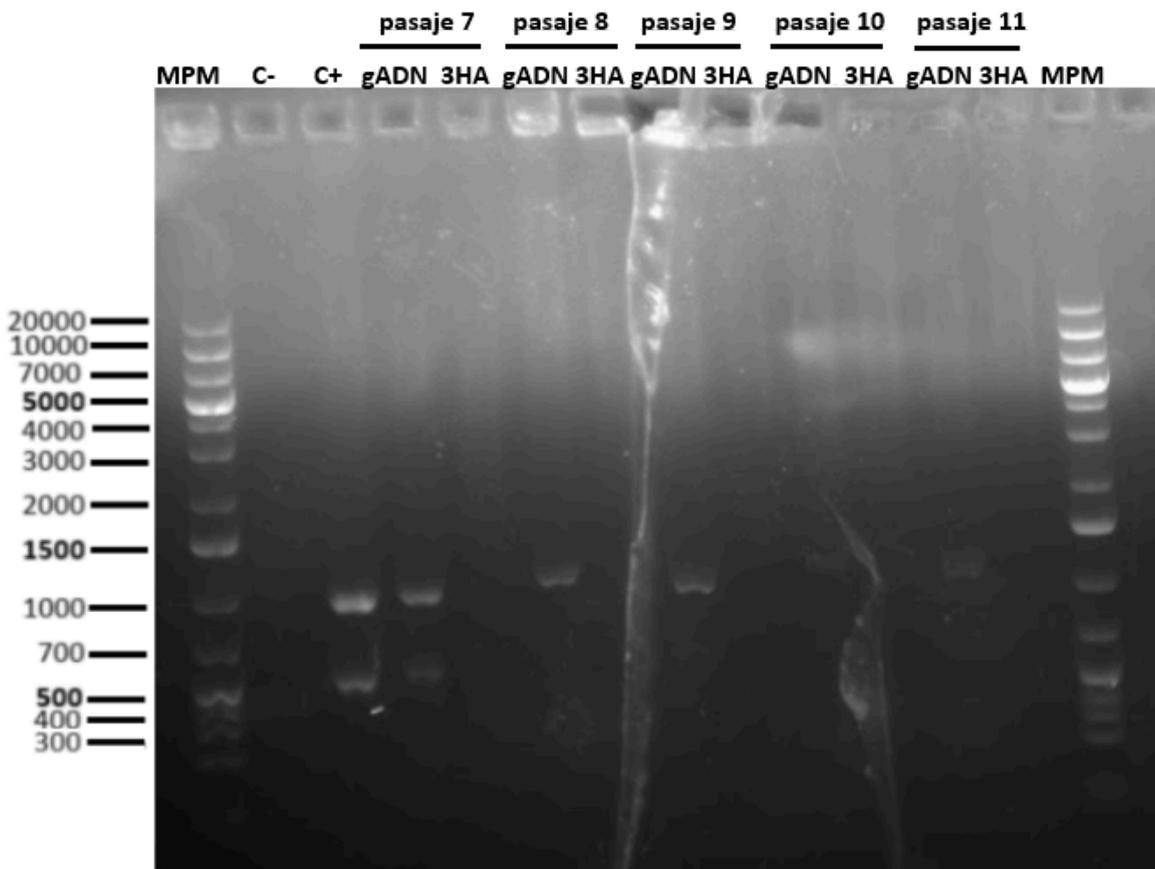


Figura 20. Evaluación de los parásitos resistentes a cloranfenicol obtenidos por transfección con ADN donador obtenido por PCR. Como molde se utilizó ADN purificado de los parásitos transfectados. Los productos de amplificación esperados, utilizando los oligonucleótidos 10 y 7, que detectan la inserción en el locus correcto del 3HA es 1335 pb, mientras que el par de oligonucleótidos utilizados para control de amplificación de ADN genómico resulta en una banda de 941 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo; carril 4: amplificación genómico pasaje 7; carril 5: control de inserción del pasaje 7; carril 6: amplificación genómico pasaje 8; carril 7: control de inserción del pasaje 8; carril 8: ADN genómico pasaje 9; carril 9: control de inserción del pasaje 9; carril 10: amplificación genómico pasaje 10; carril 11: control de inserción del pasaje 10; carril 12: amplificación genómico pasaje 11; carril 13: control de inserción del pasaje 11.

Luego de 3 intentos de transfección, uno con electroporador y dos con nucleofector, no se obtuvieron transfectantes que integran el 3HA en el locus genómico de interés (**Figura 20**). Como estrategia alternativa, procedimos a generar un ADN donador de homología que dirigiera más efectivamente la inserción en el locus. Para ello, se clonó una región del extremo 3' del gen de TgSAS4 en el vector pLic_3HA_CAT.

El vector pLic_SAS4_3HA_CAT se generó a partir del vector pLic_3HA_CAT, amplificando la región 3' del gen por PCR (**Figuras 21 y 22**) e insertando este producto de amplificación en el vector mediante clonación independiente de ligación (lic). Para ello, el vector se linealizó con la enzima PaeI (**Figura 23**), y se incluyeron en los oligonucleótidos con los cuales se amplifica la región 3' del gen, extremos libres complementarios a las secuencias que se exponen luego de la digestión del vector. Luego de incubar el vector linealizado y el

producto de PCR, ambos conteniendo extremos libres complementarios, se los transformó, purificó y amplificó.

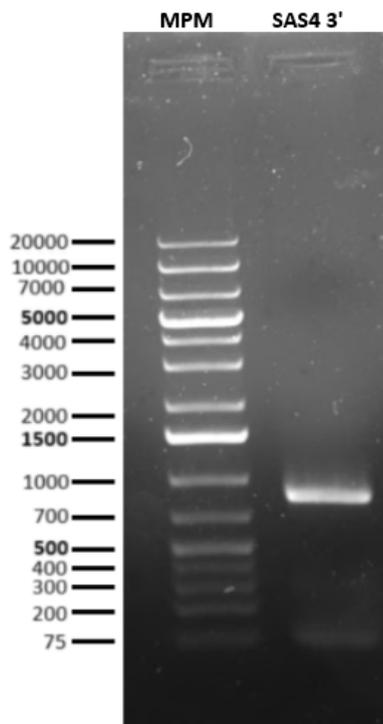


Figura 21. Amplificación de la región 3' de SAS-4 con PCR. El tamaño esperado es de 767pb. MPM: marcador de peso molecular.

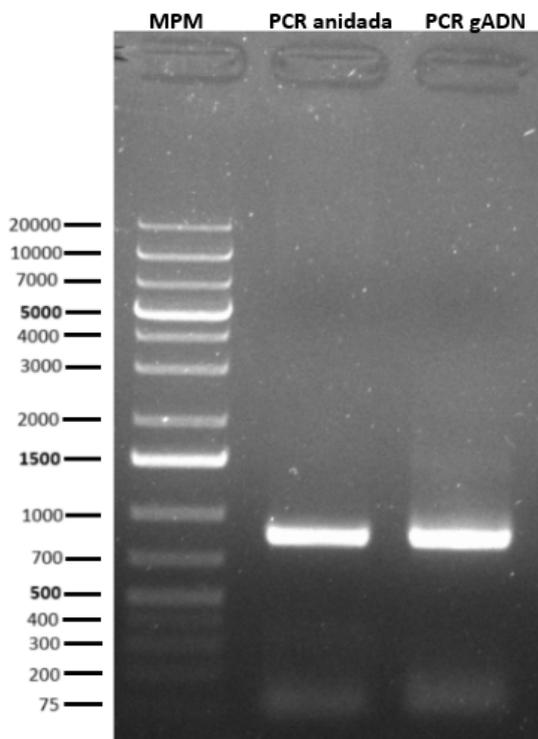


Figura 22. Amplificación del producto de PCR del extremo 3' de SAS-4 utilizando como molde el producto de PCR mostrado en la Figura 21. MPM: marcador de peso molecular; carril 2: PCR anidada; carril 3: PCR de genómico.

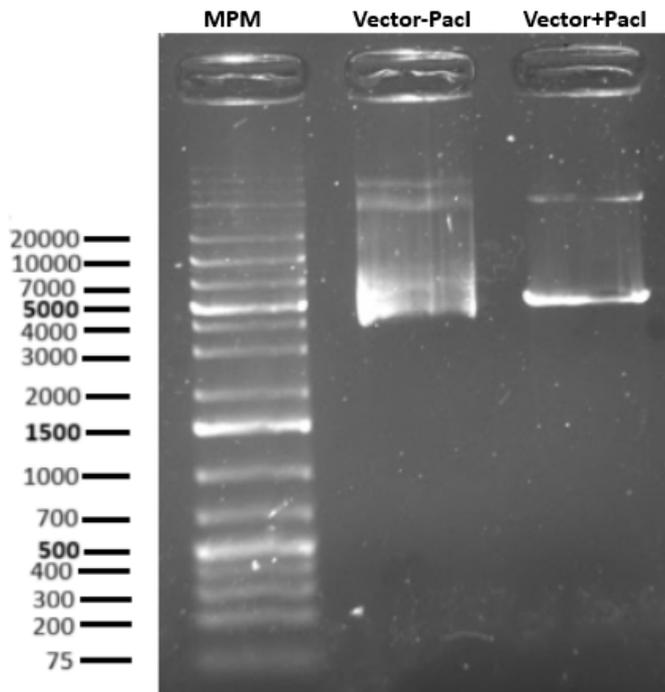


Figura 23. Digestión del plásmido pLic-3HA-CAT con Pacl. MPM: marcador de peso molecular; carril 2: vector sin Pacl; carril 3: vector con Pacl.

Una vez conseguimos el vector circularizado con el inserto incorporado, este fue transformado en bacterias *E. coli* DH5- α quimiocompetentes, de los cuales se seleccionaron 10 colonias transformantes para realizar una PCR de colonias, para la cual se utilizaron los oligonucleótidos Lic F y HA R (oligonucleótidos 8 y 7 respectivamente), siendo este último el cual hibrida sobre la secuencia de la etiqueta HA ubicado dentro del vector, downstream del inserto.

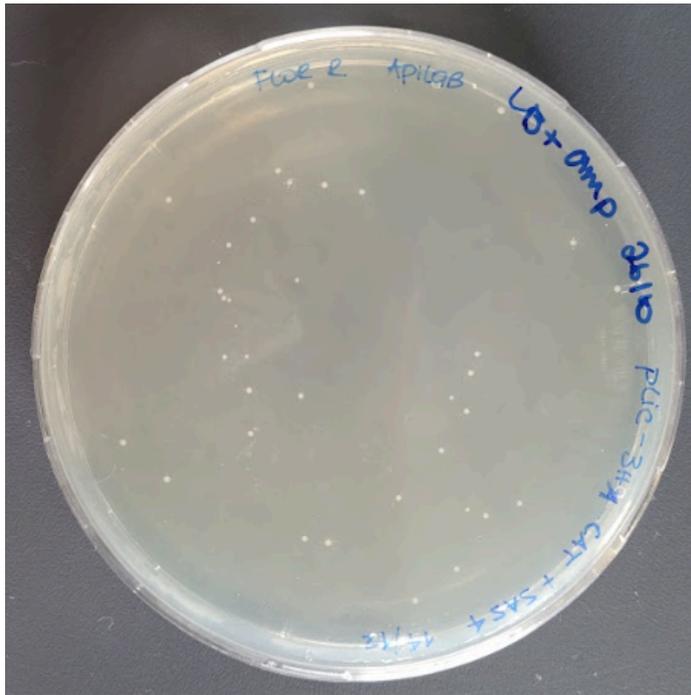


Figura 24. Placa con las colonias resultantes de la transformación con pLic-3HA-CAT + SAS4.

El tamaño esperado si la inserción de la región 3' de SAS4 fue exitosa era de 917 pb. Se obtuvieron varias colonias como se observa en la **Figura 24**, de las cuales se seleccionaron 10, se seleccionaron 4 con resultado positivo (las colonias 1, 2, 8 y 10), se purificó el plásmido mediante miniprep, y posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción MluI-HF y NotI-HF para control de inserción adecuada. Los tamaños esperados eran un fragmento de 3581 pb y otro de 2153 pb, lo que se corresponde con los resultados observados (**Figura 26**).

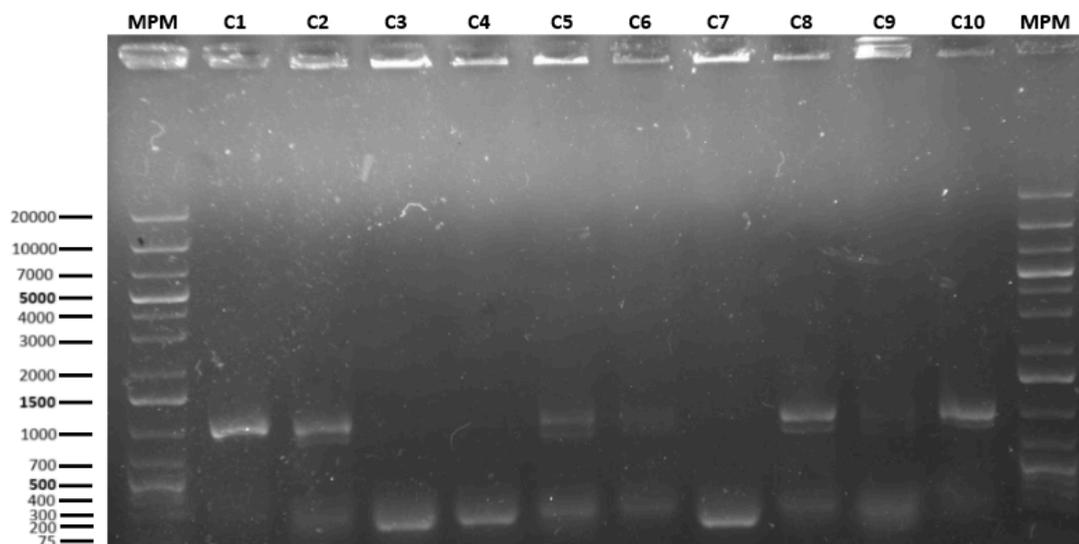


Figura 25. Colony PCR de las colonias seleccionadas de la transformación con pLic_3HA_CAT_SAS4. MPM: marcador de peso molecular; C1: colonia 1; C2: colonia 2; C3: colonia 3; C4: colonia 4; C5: colonia 5; C6: colonia 6; C7: colonia 7; C8: colonia 8; C9: colonia 9; C10: colonia 10.

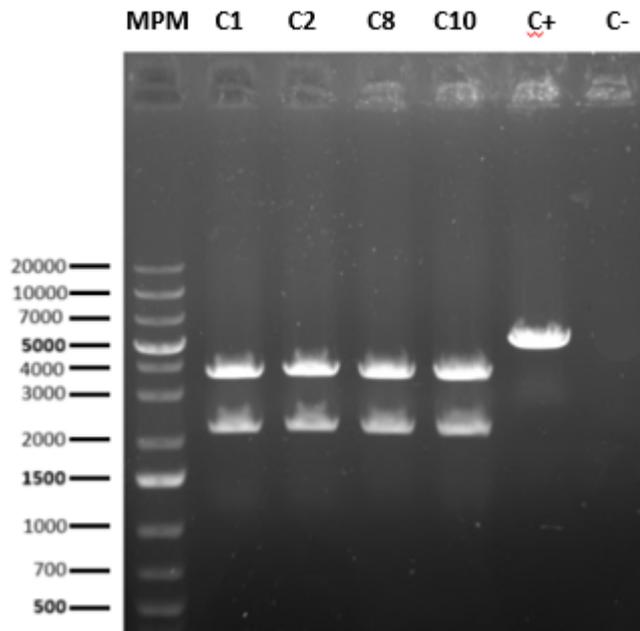


Figura 26. Control de digestión de pLic-SAS4-3HA-CAT con las enzimas de restricción MluI + NotI. MPM: marcador de peso molecular; C1: colonia 1; C2: colonia 2; C8: colonia 8; C10: colonia 10; C+: control positivo; C-: control negativo con pLic-3HA-CAT.

Una vez realizados todos los controles (**Figuras 25 y 26**) se seleccionó la colonia 1 para escalar en cultivo líquido y purificar una cantidad suficiente de ADN para transfectar, mediante maxiprep. Al resultado se lo digirió con la enzima HindIII de corte único para linealizar el vector previo a la transfección. Sin embargo, esta digestión no arrojó el resultado esperado dado que se esperaba una linearización de banda única y no dos bandas, como se observa (**Figura 27**).

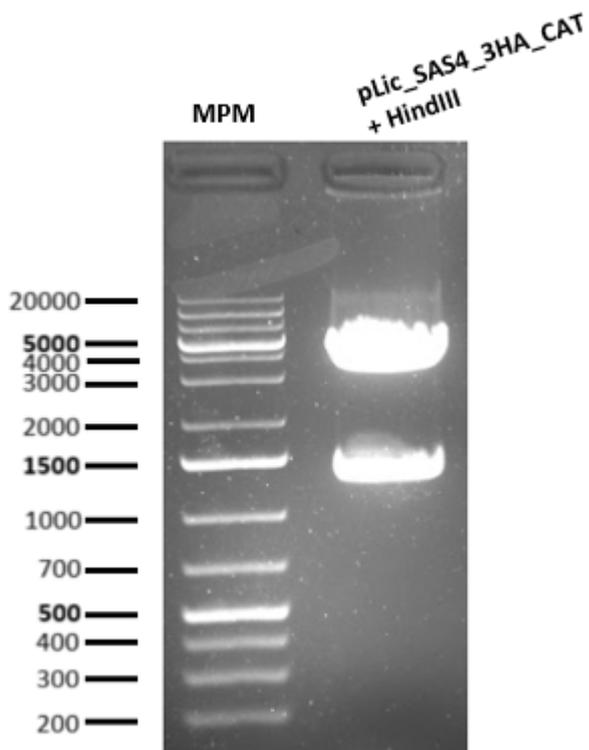


Figura 27. Digestión de de pLic-SAS4-3HA-CAT luego del tratamiento con la enzima HindIII.
MPM: marcador de peso molecular.

Transfección con pLic_3HA_CAT_SAS4:

Para la transfección se decide utilizar el vector pLic_SAS4_3HA_CAT sin digerir, lo cual disminuye la eficacia de inserción, junto con el vector pSag_Cas9_sgRNA-SAS4 .

Luego de veinte días post-transfección, y selección en cloranfenicol se colectaron parásitos a los que se les realizó una extracción de ADN genómico y una PCR para evaluar la inserción del tag 3HA en el locus de interés. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 8 y 7, siendo el oligonucleótido 7 específico para la etiqueta HA como se describió anteriormente. Como control se utilizó ADN genómico extraído de la cepa parental, y los oligonucleótidos screening F (oligo 10) y screening R (oligo 11) como control positivo de PCR y con los oligonucleótidos 10 y 5 en conjunto con el oligonucleótido 7 como control negativo de amplificación inespecífica en el genoma. A todas las extracciones se les realizó un control de extracción con los oligonucleótidos 10 y 11. Como se observa en la **Figura 28**, estos controles amplificaron de manera esperada, sin embargo aún no se observa amplificación específica en el PCR que evalúa la inserción del 3HA en el locus de SAS4.

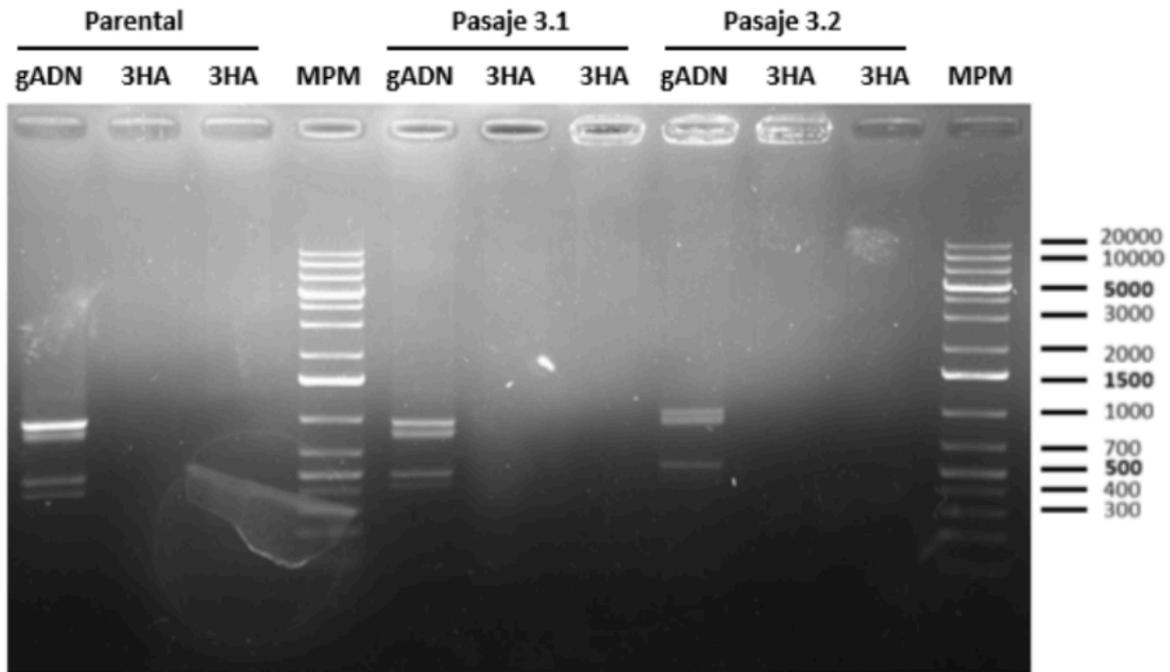


Figura 28. Amplificación de ADN genómico y control de inserción del tag 3HA en el locus de SAS4 20 días post-transfección. Tamaños esperados para los amplicones obtenidos usando los pares de oligonucleótidos 10 y 11= 941 pb, oligonucleótidos 10 y 7= 1335 pb, oligonucleótidos 5 y 7= 1003 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 1: ADN parental con oligonucleótidos 10 y 11; carril 2: ADN parental con oligonucleótidos 10 y 7; carril 3: ADN parental con oligonucleótidos 5 y 7; carril 4: ADN pasaje 3.1 (botella 1) con oligonucleótidos 10 y 11; carril 5: ADN pasaje 3.1 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 6: ADN pasaje 3.1 con oligonucleótidos 5 y 7; carril 7: ADN pasaje 3.2 (botella 2) con oligonucleótidos 10 y 11; carril 8: ADN pasaje 3.2 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 9: ADN pasaje 3.2 con oligonucleótidos 5 y 7.

En paralelo, se realizó una puesta a punto del PCR con los oligonucleótidos 5 y 6, oligonucleótidos 5 y 7, oligonucleótidos 10 y 11 y oligonucleótidos 10 y 7, en un gradiente de temperatura de 54°C a 60°C, según el análisis de las temperaturas de desnaturalización teóricas de dichos oligonucleótidos. Si bien en ningún caso se logró obtener una amplificación específica de banda única, en todos los casos se logra una amplificación óptima con la temperatura de annealing 58°C, con la banda más predominante siendo la de interés con el tamaño esperado.

Luego de optimizadas todas las reacciones de PCR, se procede a realizar con los mismos ADN extraídos del pasaje 3, una PCR que incluye controles con el oligonucleótido Lic F y oligonucleótido HA (oligonucleótidos 8 y 7), para observar la presencia del plásmido, ya que con esta metodología no se puede determinar su incorporación y definir si esta fue exitosa. Con los resultados obtenidos, mostrados en la **Figura 29**, se continúan las colecciones de pasajes en cultivos para más pruebas.

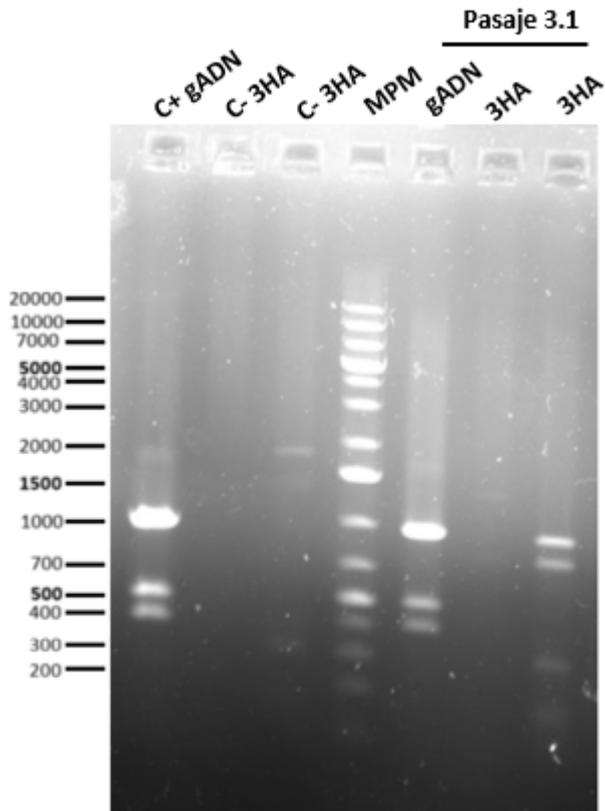


Figura 29. Evaluación de extracción genómica y funcionamiento de la PCR. Tamaños esperados para los pares de oligonucleótidos utilizados: oligonucleótidos 10 y 11= 941 pb, oligonucleótidos 10 y 7= 1335 pb, oligonucleótidos 8 y 7= 917 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 1: control positivo para oligonucleótidos 10 y 11; carril 2: control negativo para oligonucleótidos 10 y 7; carril 3: control negativo para oligonucleótidos 8 y 7; carril 5: ADN pasaje 3.1 con oligonucleótidos 10 y 11; carril 6: ADN pasaje 3.1 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 7: ADN pasaje 3.1 con oligonucleótidos 8 y 7.

Una vez confirmada la presencia del vector, se pasa a realizar controles de inserción por PCR con los oligonucleótidos 10 y 7. En los pasajes 5, 6 y 7 se observa la amplificación de la banda esperada (**Figura 30**). Además se hace un control de extracción de ADN.

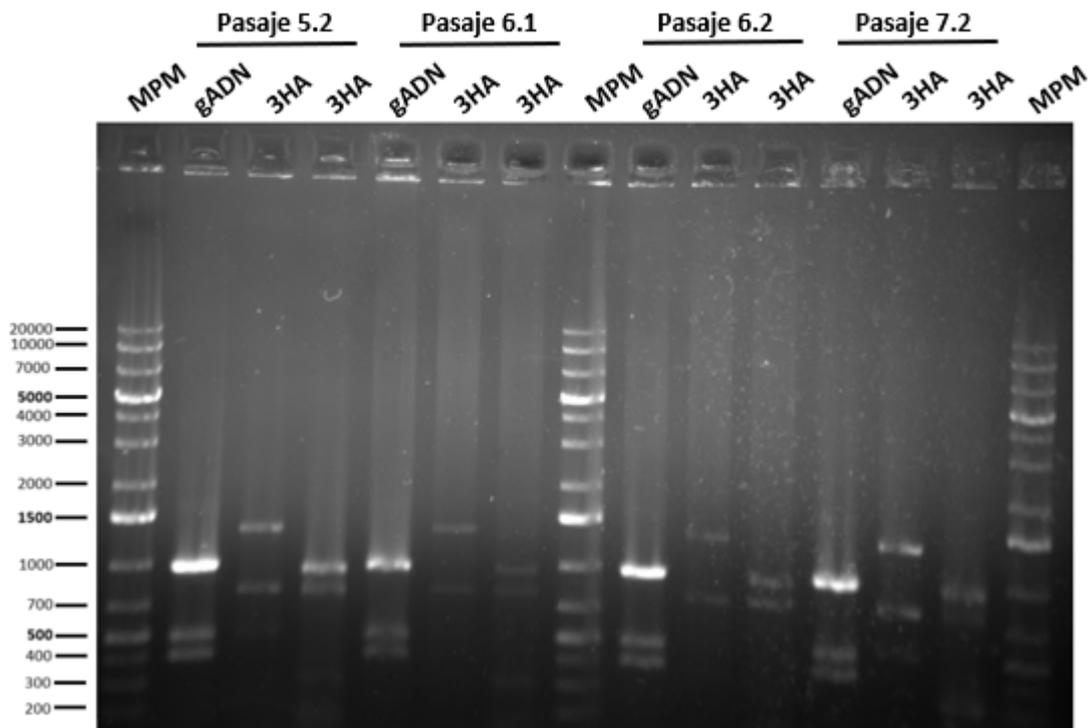


Figura 30. Control de incorporación del inserto en los pasajes 5, 6 y 7 post-transfección.

Tamaños moleculares esperados para los amplicones a obtenerse usando los pares de oligonucleótidos: oligonucleótidos 10 y 11= 941 pb, oligonucleótidos 10 y 7= 1335 pb, oligonucleótidos 8 y 7= 917 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 1: ADN pasaje 5.2 con oligonucleótidos 10 y 11; carril 2: ADN pasaje 5.2 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 3: ADN pasaje 5.2 con oligonucleótidos 8 y 7; carril 4: ADN pasaje 6.1 con oligonucleótidos 10 y 11; carril 5: ADN pasaje 6.1 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 6: ADN pasaje 6.1 con oligonucleótidos 8 y 7; carril 7: ADN pasaje 6.2 con oligonucleótidos 10 y 11; carril 8: ADN pasaje 6.2 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 9: ADN pasaje 6.2 con oligonucleótidos 8 y 7; carril 10: ADN pasaje 7.2 con oligonucleótidos 10 y 11; carril 11: ADN pasaje 7.2 con oligonucleótidos 10 y 7; carril 12: ADN pasaje 7.2 con oligonucleótidos 8 y 7

Identificación de clones:

Una vez confirmada la inserción de la secuencia en el locus correcto procedimos a la obtención de poblaciones clonales por dilución límite, obteniendo 24 poblaciones clonales. A estas se las colecta y se les realiza extracción de ADN para evaluar por PCR, tanto de control de extracción (**Figura 31**) como de control de inserto con los oligonucleótidos 10 y 7, los cuales evalúan la inserción de la secuencia de interés (codificante para la 3HA) en el locus de TgSAS4. Se observa que el clon 4 es positivo para la inserción (**Figura 32**).

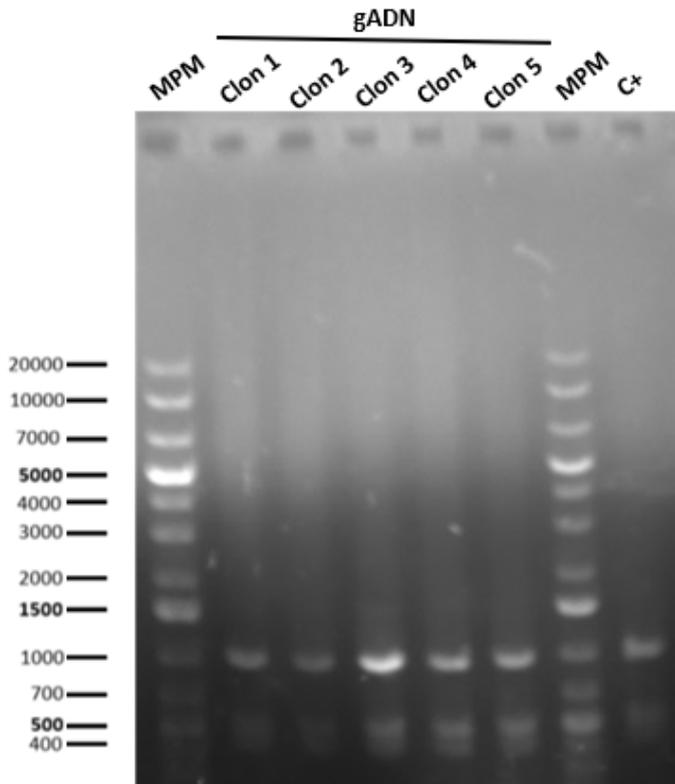


Figura 31. Control de extracción de ADN genómico en clones 2, 3, 4 y 5. Tamaño esperado: 941 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 8: control positivo.

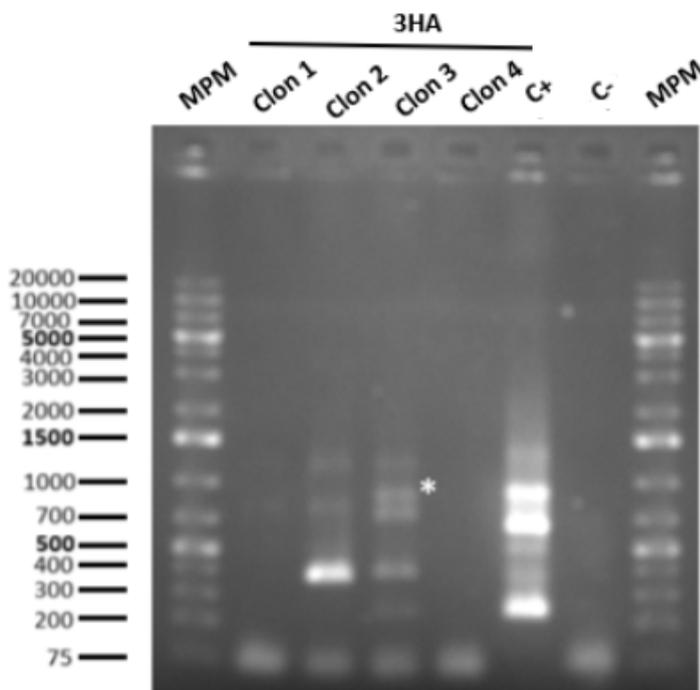


Figura 32. Evaluación de amplificación del inserto en los clones 2, 3, 4 y 5. Tamaño esperado de amplificación: 1335 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 6: control positivo con pasaje 7.2; carril 7: control negativo.

Luego de observar que el clon 4 evidencia mediante PCR la inserción deseada, se continúa trabajando únicamente con este clon, al cual se le realiza una PCR con oligonucleótidos 5 y 6 y oligonucleótidos 5 y 7. Estos oligonucleótidos screening tienen la característica de que el primer R hibrida luego del STOP, por lo que el fragmento amplificado como se observa (**Figura 33**), resulta ser de un tamaño poco mayor al del control parental.

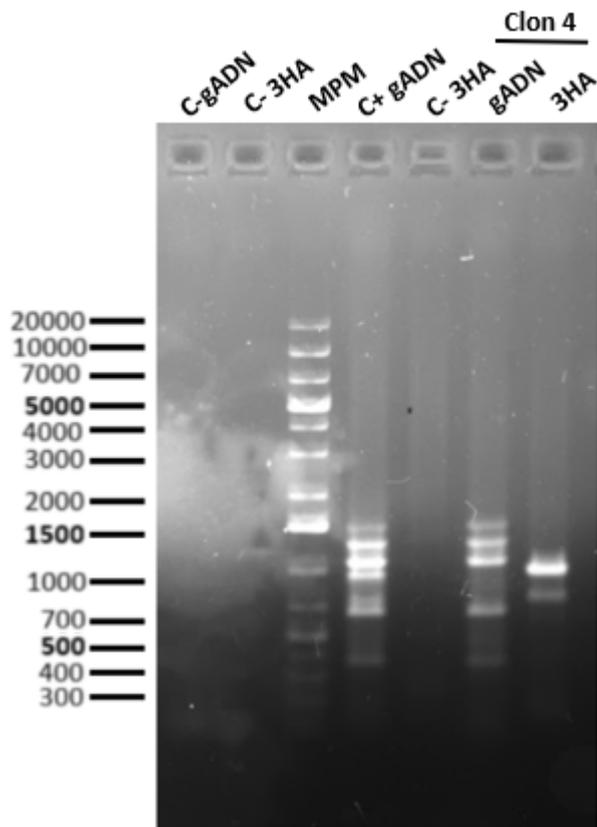


Figura 33. Amplificación de la inserción en el clon 4. Tamaños esperados de las amplificaciones para los oligonucleótidos utilizados: oligonucleótidos 5 y 6= 935 pb, oligonucleótidos 5 y 7= 1003 pb. MPM: marcador de peso molecular; carril 1: control negativo para oligonucleótidos 5 y 6; carril 2: control negativo para oligonucleótidos 5 y 7; carril 3: control positivo con ADN parental y oligonucleótidos 5 y 6; carril 4: control negativo para oligonucleótidos 5 y 7 con ADN parental; carril 5: clon 4 con oligonucleótidos 5 y 6; carril 6: clon 4 con oligonucleótidos 5 y 7.

Dada la multiplicidad de bandas amplificadas en el PCR, para corroborar el resultado, se envió a secuenciar la muestra del clon 4 a la empresa Macrogen, donde el amplicón fue secuenciado por tecnología Sanger utilizando el oligonucleótido que hibrida específicamente en la secuencia codificante para la etiqueta 3HA para este fin. El alineamiento de las secuencias obtenidas con el gen de SAS4 fue dificultoso por la calidad de las secuencias obtenidas. De todas formas se logró identificar la porción del gen de SAS4 marcada con la etiqueta HA, *blasteando* la secuencia obtenida en el NCBI (**Figura 34**).

Toxoplasma gondii ME49 T-complex protein 10 C-terminus protein partial mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_002365044.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XM_002365044 5394 bp mRNA linear INV 20-OCT-2016
DEFINITION Toxoplasma gondii ME49 T-complex protein 10 C-terminus protein
partial mRNA.
ACCESSION XM_002365044
VERSION XM_002365044.1
DBLINK BioProject: [PRJNA32719](#)
BioSample: [SAMN00255192](#)
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Toxoplasma gondii ME49
ORGANISM [Toxoplasma gondii ME49](#)
Eukaryota; Sar; Alveolata; Apicomplexa; Conoidasida; Coccidia;
Eucoccidiorida; Eimeriorina; Sarcocystidae; Toxoplasma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5394)
CONSTRM NCBI Genome Project
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-OCT-2016) National Center for Biotechnology
Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
REFERENCE 2 (bases 1 to 5394)
AUTHORS Sibley,D., Venepally,P., Karamycheva,S., Hadjithomas,M., Khan,A.,
Brunk,B., Roos,D., Caler,E. and Lorenzi,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2013) J. Craig Venter Institute, 9704 Medical
Center Dr, Rockville, MD 20850, USA
REMARK ABPA02000001 and ABPA02000002 sequences updated by submitter
REFERENCE 3 (bases 1 to 5394)
AUTHORS Sibley,D., Venepally,P., Karamycheva,S., Hadjithomas,M., Khan,A.,
Brunk,B., Roos,D., Caler,E. and Lorenzi,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (31-JUL-2012) J. Craig Venter Institute, 9704 Medical
Center Dr, Rockville, MD 20850, USA

COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final
NCBI review. This record is derived from an annotated genomic
sequence (NC_031475).
COMPLETENESS: incomplete on the 5' end.

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..5394
/organism="Toxoplasma gondii ME49"
/mol_type="mRNA"
/strain="ME49"
/db_xref="taxon:[508771](#)"
/chromosome="VIIb"
[gene](#) <1..5394
/locus_tag="TGME49_258710"
/old_locus_tag="TGME49_058710"
/db_xref="GeneID:[7894765](#)"
[CDS](#) 1..5226
/locus_tag="TGME49_258710"
/old_locus_tag="TGME49_058710"
/inference="protein motif:PFAM:PF07202"
/note="encoded by transcript TGME49_258710"
/codon_start=1
/product="T-complex protein 10 C-terminus protein"
/protein_id="XP_002365085.1"
/db_xref="GeneID:[7894765](#)"

Figura 34. Resultado del blast con la secuencia del amplicón obtenido por Sanger a partir del ADN del clon 4 en la base de datos de NCBI.

Para corroborar que la inserción de la etiqueta 3HA fue única, se realizó un western blot para detectar la etiqueta 3HA, y confirmar que la única proteína de fusión con 3HA que se expresa es la codificada por TgSAS4.

La proteína SAS-4 está codificada en un gen de 10977 pb de largo, correspondiente a 1741 aminoácidos, con un peso molecular de 190, KDa. Nuestro control positivo, TgMORC, un represor transcripcional de la trayectoria del desarrollo sexual (Farhat et al, 2020), expresado en parásitos transgénicos también fusionada con HA tiene un peso molecular de 207 KDa.

En la **Figura 35** se observan bandas específicas anti-HA tanto en el control positivo como en la muestra y ausencia de banda en el control negativo para el cual se utilizó una muestra de cepa salvaje de *T. gondii*.

La banda correspondiente a Morc-HA y SAS4 HA corresponden al tamaño esperado. No se observan bandas adicionales de marcación inespecífica.

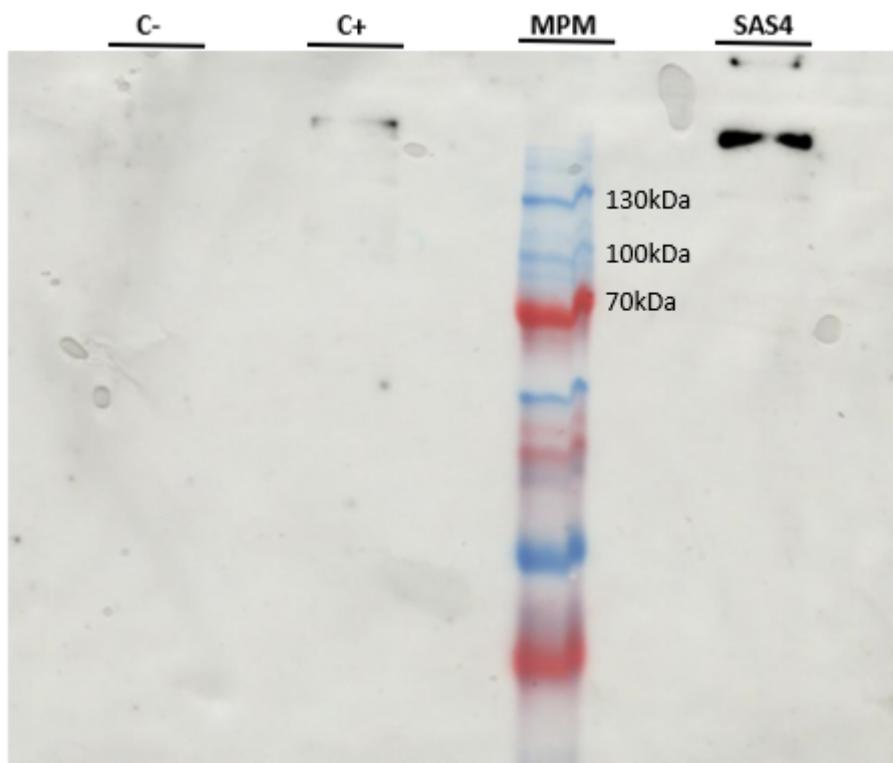


Figura 35. Western blot para evaluar la expresión de SAS4 en parásitos transgénicos clonados. MPM: marcador de peso molecular; carril 1: control negativo con cepa salvaje; carril 2: control positivo con MORC-HA; carril 3: marcador de peso molecular; carril 4: muestra.

Localización subcelular:

Para determinar la localización subcelular de la proteína codificada por TgSAS4, se inoculan cubreobjetos cultivados con la línea celular VERO con el clon 4 para posteriormente ser fijados, e incubados con un set de anticuerpos específicos que permiten la visualización de SAS4 y de su localización subcelular. Dado que nuestra hipótesis de trabajo sostiene que TgSAS4 es una proteína centrosomal, se seleccionó como proteína de referencia de la estructura la proteína Centrina 1, residente en el centrosoma. La marcación de centrina es fundamental ya que se espera observar señales co-localizadas o próximas entre centrina 1 y HA, lo que confirmaría la localización centrosomal de TgSAS4. Así mismo, se utilizó H2Bz, una histona variante específica de *T. gondii* como marcador nuclear e IMC1, una proteína de membrana que marca las células hijas en formación. Ambos marcadores pueden ser informativos en cuanto al estadio del ciclo celular en el que se encuentra el parásito observado, lo que podría darnos información sobre una posible expresión diferencial de la proteína durante el ciclo celular.

Utilizando los marcadores de estructuras genéricas del parásito (núcleo y membrana) se observó una marcación difusa, que por momentos parecía tener una marcación más localizada en un foco específico en la proximidad del núcleo, y en ocasiones parecía localizarse en la membrana celular (**Figura 36**). Por otro lado, no se observó una marcación diferencial o con un patrón destacable utilizando como marcador el anticuerpo anti-IMC1, ni en parásitos en interfase ni parásitos en diferentes etapas de la división celular, habiéndose registrado dos etapas, una más temprana y una más tardía, de la formación de células hijas (**Figuras 37**). Dados estos resultados, no se muestran los resultados obtenidos utilizando el marcador anti-centrina1 ya que éste análisis no resultó informativo.

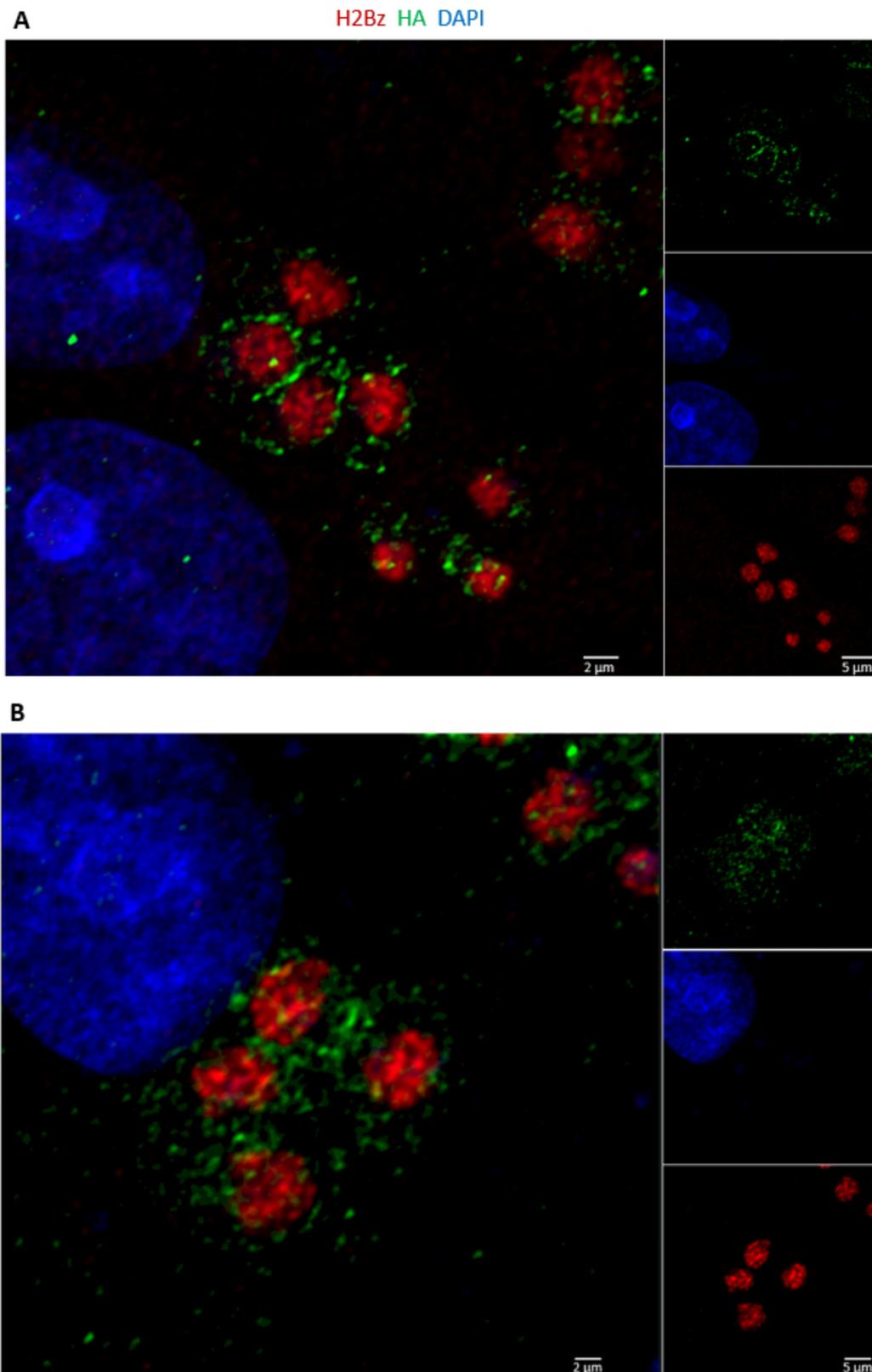


Figura 36. Localización de SAS4 por inmunofluorescencia. La determinación de la localización se realizó respecto al marcador nuclear H2Bz (rojo), anti-HA (verde) y DAPI (núcleo, azul). (A) Puede observarse en la región central de la imagen una vacuola conteniendo cuatro parásitos, mientras que la vacuola en el cuadrante inferior derecho contiene tres. (B) Puede observarse en esta figura una vacuola conteniendo cuatro parásitos.

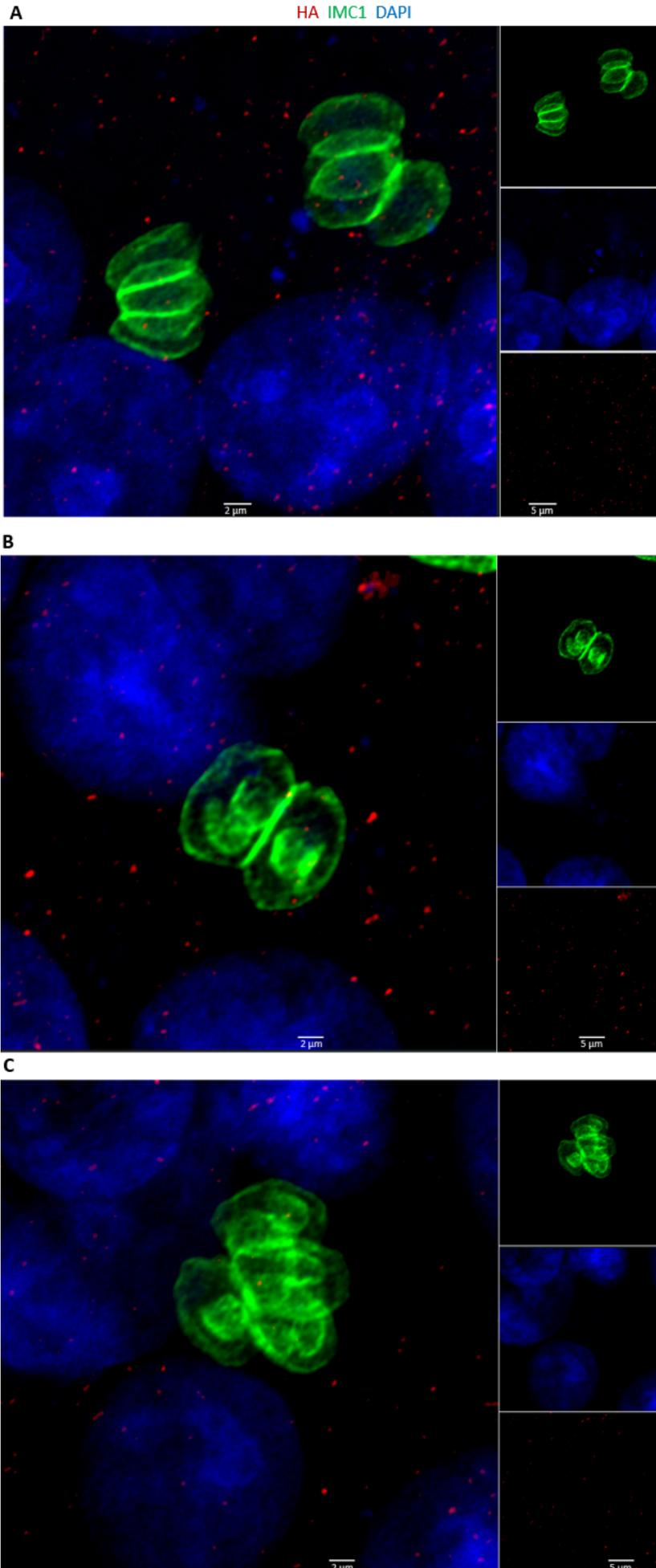


Figura 37. Localización de SAS4 por inmunofluorescencia. La determinación de la localización se realizó respecto al marcador del ciclo celular IMC1, que delinea la célula madre y las células hijas, siendo informativo del estadio del ciclo celular. (A) Para dos vacuolas, cada una conteniendo cuatro parásitos, se puede observar que el patrón de marcación corresponde a la membrana de células en interfase (es decir, no en división) dado que no presentan ningún patrón interno observable de formación de células hijas. (B) Para esta vacuola que contiene dos parásitos, se puede observar el patrón interno de formación de células hijas, lo que corresponde a una etapa tardía en la división celular. (C) Para esta vacuola que contiene cuatro parásitos, se puede observar el patrón interno de formación de células hijas, lo que corresponde a una etapa temprana de la división celular.

5. Discusión

En este trabajo se planteó la hipótesis de trabajo que postula que un homólogo de SAS4, proteína de conocida participación en la determinación del largo de centriolos en mamíferos, podía tener un rol similar en *Toxoplasma gondii*. Para explorar esta hipótesis, nos planteamos como primer desafío determinar si el genoma de *T. gondii* codificaba para homólogos de SAS4. Una vez identificado el gen que codifica para la proteína con mayor homología, propusimos generar una población mutante que exprese la proteína fusionada a una etiqueta HA posicionandola dentro del marco de lectura de la parte C terminal de la posible proteína TgSAS4, junto con la inserción de un gen de resistencia a cloranfenicol. Esto se logró implementando la estrategia CRISPR/Cas9. Para esto se generó una guía con homología en el extremo 3' del gen TgSAS4 que es reconocida por la proteína Cas9, para la cual se buscó una región de corte que esté aproximadamente 100 pb río arriba o río abajo de la secuencia que codifica para el codón STOP ya que se conoce que en ese rango es donde la recombinación se da con mayor eficiencia. Esto se logró exitosamente por lo que se pasó a generar también con éxito un ADN donador de homología de manera de favorecer la reparación del locus de interés por medio de recombinación homóloga, en un principio mediante PCR. Sin embargo, luego de varios intentos de transfección con estos productos, no se pudo lograr una población mutante, ya que estas no lograban generar la resistencia o no se lograba detectar la inserción de la secuencia codificante de la 3HA, mediante control por PCR. En principio, esto pudo deberse a la inestabilidad del fragmento de PCR dentro del parásito, en combinación con la baja eficiencia de la transfección. Si bien la eficiencia de transfección no fue sistemáticamente cuantificada, se sabe que utilizando un electroporador se obtienen eficiencias de transfección menores al 10%. Así mismo, el producto de PCR utilizado como ADN donador de homología contaba solamente con 35 pares de bases homólogas al gen TgSAS4. Si bien se ha demostrado que esta homología es suficiente para permitir la recombinación, y en nuestro laboratorio ha sido utilizado con éxito para la generación de varios mutantes, en el caso de TgSAS4 puede no haber sido suficiente. Con esto en mente, se planteó realizar el mismo experimento, pero cambiando el molde de reparación, pasando a utilizar un plásmido, en el cual la región de homología para la reparación se extendió a cientos de pares de bases. A su vez, transfectamos utilizando un nucleofector con el cual se obtienen eficiencias de transfección sensiblemente mayores (hasta 50% en nuestras manos), sumado a que se electropora directamente el núcleo.

Una vez se cambió la estrategia, los resultados obtenidos fueron los esperados. Se logró en el primer intento tener una población con resistencia, en la cual, luego de pocos pasajes, podía detectarse de manera estable por PCR el inserto. Entendemos que esta diferencia deriva de la diferencia entre el tamaño de la región de homología presente en el producto de PCR inicial, versus la presente en el plásmido. Y notamos que esta eficiencia

podría haber sido aún mayor de haberse podido linearizar el plásmido previo a la transformación, lo cual hubiese - al menos en la teoría- favorecido aún más la inserción en el sitio diana.

La amplificación por PCR tanto para el control genético como para el control de inserción, fueron puestos a punto, realizando ensayos a diferentes temperaturas de melt (T_m), pero nunca se logró una amplificación de banda única; siempre se observaron amplificaciones inespecíficas. Se trabajó en rangos amplios de temperatura, incluso llegando a T_m s donde no se observaba amplificación, por lo que se decidió trabajar con la T_m que mostraba mejor eficiencia en la amplificación de la banda de interés. Esto puede deberse a que los oligonucleótidos interactúan de alguna manera inespecífica con otras regiones del genoma, por ejemplo, o entre sí, por lo cual logra amplificarlas con menor especificidad que la región de interés.

Al lograr una población policlonal mutante, se realizó mediante dilución de la población, la separación de los distintos clones presentes. Este protocolo se basa en la premisa de tener 1,5 parásitos por pocillo a infectar, por lo que si bien en algunos se observará una sola placa de lisis generada por un solo parásito, en otras no se observará ninguna y en otras 2 o incluso más placas. Incluso podría pasar que al observar una placa esta no derivase de un solo parásito, por eso se seleccionan varios clones que hayan formado una única placa y se trabaja en paralelo con varios de ellos, para observar los diferentes resultados en diferentes ensayos. En este caso se logró obtener 24 clones totales, de los cuales se trabajó en paralelo con los primeros 5 clones seleccionados para facilitar la manipulación. El clon 1 no se logró mantener en cultivo, por lo cual se continuó trabajando con los 4 clones restantes.

Luego de escalar los cultivos de las placas de pocillos a botellas y una vez transcurridos algunos pasajes, a estos clones se los analizó mediante PCR, esperando observar amplificación del inserto. En el caso del clon 5 no pudo observarse, por lo que se descartó y se continuó trabajando con los clones 2, 3 y 4.

Teniendo en cuenta que en la amplificación se observan fragmentos inespecíficos, se plantea una purificación de las bandas de interés, con el fin de mandarlas a secuenciar y determinar si la banda de peso esperado es resultado de la amplificación de nuestra región de interés. Esto no se logró ya que se pierde mucha muestra en el proceso, por lo que se decidió mandar a secuenciar el producto de PCR. Al analizar los resultados, se tuvo que tener presente que se iba a observar tanto la secuencia del fragmento de interés como los fragmentos inespecíficos, por lo que iba a ser una secuenciación ambigua y con errores. De todas maneras, de los resultados obtenidos se pudo observar mediante BLAST un alineamiento con el gen codificante de TgSAS4, únicamente en el clon 4. Por los motivos descritos previamente, no se descarta que la amplificación de los clones 2 y 3 contengan el fragmento específico, pero se continúa el proyecto únicamente con el clon 4. Si bien sería interesante lograr el diseño de oligonucleótidos más específicos, utilizando los diseñados en este trabajo se logró identificar por secuenciación un clon que presentaba la inserción de interés. Con este clon se realizan los ensayos de inmunofluorescencia y western blot.

En primera instancia, para realizar el western blot, se utilizó el anticuerpo rabbit anti-HA para el ensayo con el cual se logró determinar que la proteína que estamos observando con la etiqueta HA, es una proteína de tamaño esperado, por lo que se puede inferir que sea SAS4. Así mismo, y pese a la amplificación inespecífica observada por PCR a partir del genoma del clon 4, no se detecta ninguna otra proteína fusionada a la etiqueta 3HA. Esto es muy importante, dado que el PCR analiza únicamente el locus de interés mientras que el western blot analiza sin sesgo todas las posibles proteínas de fusión generadas en el mutante. Habiendo observado una única especie marcada con 3HA, podemos proceder a la inmunofluorescencia con certeza de que lo observado por microscopia corresponderá únicamente a la proteína de fusión TgSAS4-3HA.

Al momento de analizar las imágenes obtenidas al microscopio, se observó una diferencia notoria en la marcación de los diferentes anticuerpos anti-HA, lo que plantea la incertidumbre sobre el rendimiento de estos para este ensayo. Con el anticuerpo de conejo anti-HA no se logró observar ningún tipo de marcación específica, aunque se observa marcación tenue únicamente donde hay parásitos, y no fuera, lo que indicaría que la marcación observada no es del todo inespecífica. Incluso, se logra observar una marcación puntillosa en la proximidad al núcleo, que por momentos aparenta estar duplicada. Este patrón de marcación es similar al que se observa para el centrosoma, y para aquellos parásitos que han duplicado el centrosoma, respectivamente, utilizando anticuerpos específicos para esta estructura. Por otro lado, con el anticuerpo de ratón se logró visualizar una marcación en el parásito. Si bien la marcación no fue localizada como se esperaba, se logra observar a nivel citoplasmático e incluso con algún tipo de asociación a la membrana del parásito. Esto no descarta que la marcación sea específica, una posibilidad es que la localización de la proteína SAS4 sea dependiente del ciclo celular, por lo que en diferentes estadios se observa en diferentes localizaciones, punto que no se pudo confirmar dado que el marcador de ciclo celular IMC1 nos obliga a trabajar con el anticuerpo de conejo anti-HA con el cual no se obtuvieron tampoco resultados claros. También cabe plantear que el patrón difícilmente observable de localización de TgSAS4, puede deberse a la baja expresión de la proteína. Asimismo, si TgSAS4 participa únicamente durante la definición del largo de nuevos centriolos, en un momento dado, esto representa una fracción ínfima de parásitos, que difícilmente puedan observarse en una población asincrónica. Del total de parásitos en un cultivo asincrónico, solamente el 25% se estarán dividiendo en un momento dado. De estos, solo una fracción se encontrará en la fase temprana y media de la fase S, momento en el cual ocurre la duplicación del centrosoma y la determinación del largo de los nuevos centriolos. Lamentablemente, no existen tecnologías aún que permitan sincronizar el avance del ciclo celular en *T. gondii*. Asimismo, sumado al límite de detección por baja señal, es posible que la localización de TgSAS4 se limite a un foco por debajo del poder de resolución de los microscopios de fluorescencia convencionales, ya que el centriolo se encuentra en el límite de la resolución óptica (200 nm aprox.). Para sobrepasar estos problemas se podrían utilizar otras técnicas como la microscopía de expansión ultraestructural combinada con fluoróforos brillantes como los quantum dots, o la sobreexpresión de la proteína mediante la

clonación de su cDNA. Esto último sin embargo, resultaría desafiante ya que se trata de un gen largo, que difícilmente pueda clonarse por tecnologías tradicionales. Por otro lado, este trabajo demuestra que el locus genómico de TgSAS4 es ameno a la modificación genética, pudiéndose emplear diversos enfoques adicionales de modificación, como por ejemplo, y utilizando una estrategia similar a la aquí descrita, la inserción de una secuencia que dirija a TgSAS4 a la degradación por el proteosoma. De esta manera podría, aún sin definirse exactamente su localización, estudiar su función y contrastar la hipótesis de que su presencia en algún momento del ciclo celular es requerida para la homeostasis y mantenimiento del centrosoma en *T. gondii*. Este trabajo constituye un primer acercamiento a TgSAS4, generando herramientas y la puesta a punto de diversos ensayos, abriendo las puertas para el análisis más profundo y detallado tanto de su localización como de su función en futuros trabajos.

6. Bibliografía

Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>

Berná, L., Marquez, P., Cabrera, A., Greif, G., Francia, M. E., & Robello, C. (2021). *Reevaluation of the Toxoplasma gondii and Neospora caninum genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements*. *Genome research*, 31(5), 823–833. <https://doi.org/10.1101/gr.262832.120>

Berná, L., Rego, N., & Francia, M. E. (2021). *The Elusive Mitochondrial Genomes of Apicomplexa: Where Are We Now?*. *Frontiers in microbiology*, 12, 751775. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751775>

Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2015). *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii: 15 Years Later*. *Annual review of microbiology*, 69, 463–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

Blanco-Ameijeiras, J., Lozano-Fernández, P., & Martí, E. (2022). *Centrosome maturation - in tune with the cell cycle*. *Journal of cell science*, 135(2), jcs259395. <https://doi.org/10.1242/jcs.259395>

Bogado, S. S., Dalmasso, M. C., Ganuza, A., Kim, K., Sullivan, W. J., Jr, Angel, S. O., & Vanagas, L. (2014). *Canonical histone H2Ba and H2A.X dimerize in an opposite genomic localization to H2A.Z/H2B.Z dimers in Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 197(1-2), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.09.009>

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 of the United States of America*, 108(9), 3767–3772. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006741108>

Centers for Disease Control and Prevention. (2022). *CDC - DPDx - Toxoplasmosis*. (s. f.). <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html#print>

Dubey, J. P. (2009). *History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877-882. . <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>

Dubey, J. P. (2014). *The history and life cycle of Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (pp. 1-17). Academic Press.

Farhat, D.C., Swale, C., Dard, C. et al. *A MORC-driven transcriptional switch controls Toxoplasma developmental trajectories and sexual commitment*. *Nat Microbiol* 5, 570–583 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0674-4>

Ferguson, D. J., & Dubremetz, J. F. (2014). *The ultrastructure of Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (pp. 19-59). Academic Press.

Fortier, B., Dao, A., & Ajana, F. (2000). *Toxoplasma y toxoplasmosis*. *EMC - Pediatría*, 35(3), 1-12. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(00\)72014-2](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(00)72014-2)

Francia, M. E., Bhavsar, S., Ting, L. M., Croken, M. M., Kim, K., Dubremetz, J. F., & Striepen, B. (2020). *A Homolog of Structural Maintenance of Chromosome 1 Is a Persistent Centromeric Protein Which Associates With Nuclear Pore Components in Toxoplasma gondii*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 295. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00295>

Francia, M.E., Dubremetz, JF. & Morrissette, N.S. *Basal body structure and composition in the apicomplexans Toxoplasma and Plasmodium*. *Cilia* 5, 3 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0025-5>

Francia, M. E., Jordan, C. N., Patel, J. D., Sheiner, L., Demerly, J. L., Fellows, J. D., de Leon, J. C., Morrissette, N. S., Dubremetz, J. F., & 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), e1001444. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001444>

Francia, M., Striepen, B. *Cell division in apicomplexan parasites*. *Nat Rev Microbiol* 12, 125–136 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3184>

Frenkel, J. K. (1988). *Pathophysiology of toxoplasmosis*. *Parasitology Today*, 4(10), 273-278.

Gonczy, P. (2012). *Towards a molecular architecture of centriole assembly*. *Nature Review & Molecular Cell Biology*, 13, 425-435.

Gopalakrishnan, J., Mennella, V., Blachon, S. et al. *Sas-4 provides a scaffold for cytoplasmic complexes and tethers them in a centrosome*. *Nat Commun* 2, 359 (2011). <https://doi.org/10.1038/ncomms1367>

Harding, C. R., Gow, M., Kang, J. H., Shortt, E., Manalis, S. R., Meissner, M., & Lourido, S. (2019). *Alveolar proteins stabilize cortical microtubules in Toxoplasma gondii*. *Nature communications*, 10(1), 401. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08318-7>

Hu, H., Zhou, Q., & Li, Z. *SAS-4 Protein in Trypanosoma brucei Controls Life Cycle Transitions by Modulating the Length of the Flagellum Attachment Zone Filament*. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 11 (2015). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694109>

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. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-08>
- Martel, G., Guerrero, A., Vieira, A. F., de Almeida, B. P., Machado, P., Mendonça, S., Mesquita, M., Villarreal, B., Fonseca, I., Francia, M. E., Dores, K., Martins, N. P., Jana, S. C., Tranfield, E. M., Barbosa-Morais, N. L., Paredes, J., Pellman, D., Godinho, S. A., & Bettencourt-Dias, M. (2018). *Over-elongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation*. *Nature communications*, 9(1), 1258. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03641-x>
- 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 ME, Dubremetz JF, Daher W. (2017). *Towards a molecular architecture of the centrosome in Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton*. <http://doi.org/10.1002/cm.21353>
- Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G., Fraunholz, M., Harbs, 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.
- 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. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>
- Sidik, S. M., Huet, D., & Lourido, S. (2018). *CRISPR-Cas9-based genome-wide screening of Toxoplasma gondii*. *Nature protocols*, 13(1), 307–323. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.131>
- 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.
- Striepen, B., Crawford, M. J., Shaw, M. K., Tilney, L. G., Seeber, F., & Roos, D. S. (2000). *The plastid of Toxoplasma gondii is divided by association with the centrosomes*. *The Journal of cell biology*, 151(7), 1423–1434. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1423>
- Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW (2015) *A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle*. *PLoS Biol* 13(3): e1002093. <https://doi.org/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(12-12), 1217-1258.
- Tomasina, R.; González, F.C.; Francia, M.E. *Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of Toxoplasma gondii and Plasmodium spp.* *Microorganisms* 2021, 9, 2503. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122503>

Tomasina et al. *Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in Toxoplasma gondii*. American Society for Microbiology, 13, 17 (2022). <https://doi.org/10.1128/mbio.01859-22>

Walochnik J, Duchêne M, editors. *Molecular Parasitology: Protozoan Parasites and their Molecules*. Cham (CH): Springer; 2016 Oct. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556350/>

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., & Souvorova, E. S. (2018). *Apicomplexa cell cycles: Something old, borrowed, lost and new*. Trends in parasitology, 34(9), 759-771.

Woo Y. H., Ansari H., T. D. Otto, Klinger C. M., Kolisko M., Michálek J., Ali S. (2015). *Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites*. <https://doi.org/10.7554/eLife.06974>

Zeeshan, M., Brady, D., Markus, R., Vaughan, S., Ferguson, D., Holder, A. A., & Tewari, R. (2022). *Plasmodium SAS4: basal body component of male cell which is dispensable for parasite transmission*. Life science alliance, 5(9), e202101329. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101329>