



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

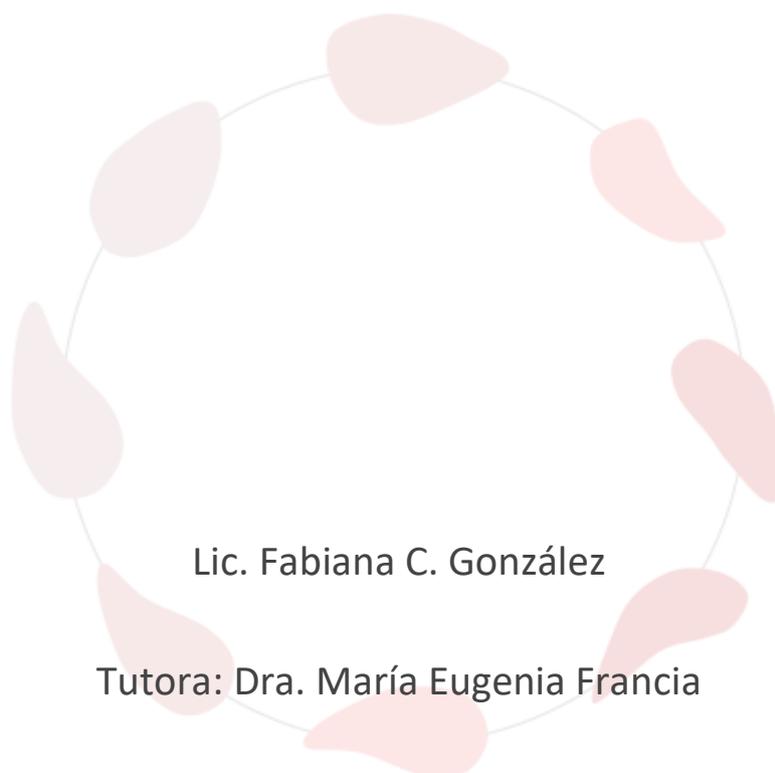


Maestría en Ciencias Biológicas

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología, Subárea Biología Celular y Molecular

Generación de herramientas para el estudio del ciclo celular en *Toxoplasma gondii*



Lic. Fabiana C. González

Tutora: Dra. María Eugenia Francia

Institut Pasteur de Montevideo
Laboratorio de Biología de Apicomplejos

Junio 2023

Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a mi tutora, Eugenia. Fueron muchos años donde nos vimos crecer mutuamente, me siento afortunada por todo el trayecto recorrido. En lo personal, por haberme dado la oportunidad de darme la entrada al Institut cuando empecé la tesina de grado, una de mis mayores aspiraciones. La invaluable formación que me impartió, todo lo que me permite desenvolverme hasta ahora en mi trabajo como profesional, lo aprendí a su lado. En lo colectivo, le agradezco la oportunidad de haber sido parte de toda la evolución y crecimiento del laboratorio, desde el “api group” de UBM hasta el Laboratorio de Biología de Apicomplejos y su consolidación.

Al Laboratorio de Biología de Apicomplejos, laboratorio que ví crecer. Agradezco a todos mis compañeros que me acompañaron en el día a día. Especialmente a quienes fueron desde el inicio del Api Lab, Ramiro y Andrés. Con Ramiro compartimos muchas horas, café, bici y locura, no hay que agregar más nada. Andrés fue como un tutor, siempre me extendió una mano incondicionalmente.

Después quiero agradecer a todos los que permitieron el desarrollo de esta tesis. A la Unidad de Biología Celular, especialmente a Paula Céspedes. Sin su gran disposición y perseverancia para hacer funcionar el sorter, no hubiese sido posible este trabajo. A la Unidad Mixta Pasteur-INIA, liderada por Leticia Zarantonelli, lugar donde me permitieron realizar todo el trabajo de cultivo celular y los ensayos de qPCR. A la Unidad de Bioimagenología Avanzada, por el servicio de microscopía.

Por último, a la gente de siempre, mis compañeros de UBM. Me acompañaron en el inicio de todo, cuando empecé mi tesina de grado en UBM y especialmente en este último tramo del final de la Maestría. Fueron mi segunda referencia (después de mi tutora) cuando necesitaba resolver problemas de la mesada.

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que ha logrado en el curso de su evolución conquistar un gran rango de hospederos. Básicamente, infecta a cualquier animal endotermo lo cual le ha conferido una amplia distribución global. Se estima que la prevalencia de infecciones con *T. gondii* alcanzan a un tercio de la población mundial. Si bien estas infecciones en personas inmunocompetentes no representa una amenaza, en personas inmunocomprometidas pueden conducir al desarrollo de comorbilidades y mortalidad, así como alteraciones del desarrollo fetal en personas gestantes. Por otro lado, las infecciones por *T. gondii* constituye una de las principales causas de aborto en el ganado ovino, generando pérdidas millonarias en el sector. Aún resta mucho por explorar sobre la biología de este parásito. Sobre todo, en aspectos divergentes como lo es su particular división celular, ya que estos mecanismos constituyen excelentes blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos.

La división celular y sus mecanismos de regulación se dan de forma muy particular en esta especie, la cual se encuentra dirigida por estructuras subcelulares físicas y coordinada por el centrosoma. El conocimiento de estos elementos reguladores y su dinámica durante la división celular, actualmente se encuentra obstaculizada debido a que la división celular transcurre en un período de tiempo muy breve. Esto impide que las fases del ciclo celular en el que transcurre la división, se encuentren representadas en una población asincrónica, dificultando de esta forma su estudio. Actualmente, los mecanismos de sincronización en el ciclo celular disponibles para *T. gondii*, son mecanismos farmacológicos que intervienen en la progresión de la replicación de ADN y en la división celular. Por consiguiente, es de relevancia el desarrollo de mecanismos no farmacológicos para la obtención de poblaciones sincronizadas que no afecten los diferentes mecanismos implicados durante la progresión del ciclo celular.

En el presente trabajo, proponemos la generación de un sistema para la obtención de poblaciones enriquecidas en fases del ciclo celular específicas, a través del desarrollo de cepas indicadoras del ciclo celular. Mediante recombinación homóloga fue posible obtener una cepa que expresa una proteína de fusión formada por la ciclina Y y la proteína fluorescente tdTomato. Esta proteína de fusión constituye un reportero del ciclo celular ya que su expresión es dependiente del mismo, y como consecuencia su fluorescencia va a fluctuar en función de la fase. De esta forma es posible explotar esta fluorescencia fluctuante para seleccionar poblaciones por cell sorting, generando las poblaciones enriquecidas en fases específicas del ciclo celular.

La evaluación de la cepa generada como reportera del ciclo celular y del sorting como herramienta de sincronización se llevó a cabo a través de microscopía y RT-qPCR. En los ensayos de microscopía se logró determinar: 1) que no se produce una afectación de la proliferación en el corto plazo provocada por el estrés del sorting, 2) que el alcance temporal de la sincronización es en el corto plazo, posiblemente durante el primer ciclo celular y 3) que la población sorteada con mayor expresión de la proteína de fusión se encuentra sincronizada parcialmente, posiblemente en G1 al momento que sale del sorting. Los resultados obtenidos arrojan la posibilidad de continuar con el desarrollo de esta herramienta como alternativa no farmacológica y menos invasiva con la fisiología del parásito frente a los actuales métodos de sincronización.

Índice de contenido

1	Introducción	1
1.1	Generalidades de <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1	<i>Toxoplasma gondii</i> , un modelo dentro del Phylum Apicomplejo	1
1.1.2	<i>Toxoplasma gondii</i> es el agente etiológico de la Toxoplasmosis	1
1.1.3	Ciclo de vida	2
1.1.4	Ciclo lítico: su rol en la patogenicidad	3
1.1.5	Organización de la división celular	5
1.2	Ciclo celular de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.2.1	Regulación	7
1.2.2	Los anclajes físicos y el centrosoma como centro regulador	8
1.2.3	Factores solubles, un aspecto compartido	8
1.2.4	Crks	9
1.3	Problemas al abordar el ciclo celular en <i>T. gondii</i>	10
1.3.1	El problema de la sincronización	11
1.3.2	Planteo del trabajo	12
1.4	Objetivos	13
1.4.1	Objetivos generales	13
1.4.2	Objetivos específicos	13
2	Materiales y métodos	14
2.1	Generación de las cepas knock-in indicadoras del ciclo celular	14
2.1.1	Clonación de los sgRNA en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgRNA del sistema CRISPR-Cas9	15
2.1.2	Diseño y generación de los constructos	16
2.1.3	Clonación de CAT en pLIC tdTomato DHFR	16
2.2	Cultivo, transfección y clonación	17
2.2.1	Cultivo de los parásitos	17
2.2.2	Protocolo de transfección	17
2.2.3	Enriquecimiento por cell sorting y clonación	18
2.3	Evaluación del sorting como método para realizar enriquecimientos de diferentes fases del ciclo celular	18
2.3.1	Microscopía	19
2.3.2	Inmunofluorescencia indirecta	19
2.3.3	RT-qPCR	20
2.3.4	cDNA	20
2.3.5	Panel de genes ciclo celular específicos	20
2.3.6	qPCR	21
3	Resultados	23
3.1	Generación de las cepas knock-in indicadoras del ciclo celular	23
3.1.1	Generación de las cepas indicadoras	23
3.2	Evaluación del sorting como herramienta para obtener poblaciones enriquecidas en diferentes fases del ciclo celular	26

3.2.1 Citometría de flujo y cell sorting de la cepa CycY_tdTomato	28
3.2.2 Evaluación de las poblaciones sorteadas por microscopía.....	30
3.2.3 Análisis de expresión de marcadores del ciclo celular por RT-qPCR en poblaciones enriquecidas.....	32
4 Discusión	35
4.1 El objetivo de esta tesis	35
4.2 Desarrollo de la herramienta	35
4.3 La incidencia del estrés en la sincronización por cell sorting	37
4.4 Sincronización: un diálogo entre la progresión del ciclo celular y el ciclo lítico.....	37
5 Perspectivas	40
Bibliografía.....	41

1 Introducción

1.1 Generalidades de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un protozoo alveolado que se encuentra comprendido dentro del phylum Apicomplejo (Levine, 1980). Las especies que integran este phylum comparten un conjunto de rasgos en su biología básica que los caracteriza, como un estilo de vida parasitaria intracelular obligada, su organización ultraestructural y una división celular plástica que les permite modular el número de progenie generado permitiéndoles sobrevivir en diferentes entornos celulares. Todos son agentes etiológicos de enfermedades de interés médico y veterinario, como lo son la toxoplasmosis, la malaria, la criptosporidiosis y la neosporosis, que afectan a una buena parte de la población mundial y generan cuantiosas pérdidas en el sector ganadero (Belluco et al, 2016). El éxito de este phylum de parásitos radica en su división celular y en su capacidad de infectar una gran diversidad de hospederos, confiriéndoles una amplia distribución en diferentes ambientes a nivel global. Todos los apicomplejos son intracelulares obligados. Los parásitos invaden las células hospedadoras acaparando recursos y replicándose dentro de estas para luego lisis a su hospedero en un continuo ciclo de invasión, replicación y lisis. La división celular en estos parásitos constituye el principal mecanismo de patogenia.

1.1.1 *Toxoplasma gondii*, un modelo dentro del Phylum Apicomplejo

T. gondii, es un organismo que se ha utilizado como modelo del phylum por su capacidad de mantenerse en cultivo *in vitro* y su permisividad para las manipulaciones genéticas, permitiendo la exploración de muchos aspectos de la biología básica del phylum. El estadio proliferativo de interés clínico, denominado taquizoito puede ser aislado y mantenido fácilmente en cultivo sin mayor riesgo biológico dado que es un estadio no infectivo. Como su nombre lo define, taqui- quiere decir que es la forma más activa del parásito con una alta tasa proliferativa. Este es capaz de invadir cualquier célula nucleada de un endotermo mediante un proceso activo y una vez dentro de ella se aloja en una vacuola denominada vacuola parasitófora donde queda protegido de ser atacado por las defensas de la célula (Dubey, 2014). Posee forma alargada y arqueada, con un extremo anterior más agudo. El taquizoito posee varios organelos comunes a otros tipos celulares como mitocondrias, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi y un núcleo central. Además posee organelos específicos de este grupo como el apicoplasto, roptrias, micronemas y gránulos densos, los tres últimos implicados en el proceso de invasión de la célula hospedera (Figura 1).

Su dotación cromosómica haploide hace que la mayoría de las manipulaciones genéticas sean accesibles y rápidas de lograr. Sin embargo, al ser parásitos intracelulares que se encuentran dentro de una célula hospedera también eucariota, esto ha limitado el número de drogas y marcadores de selección que se pueden emplear para seleccionar mutantes, lo que limita el número de manipulaciones sobre una misma cepa (Kim & Weiss, 2004).

1.1.2 *Toxoplasma gondii* es el agente etiológico de la Toxoplasmosis

La infección causada por este protozoo se conoce como toxoplasmosis, siendo una de las zoonosis más comunes globalmente que afecta a endotermos (Frenkel, 1988). Se estima que un tercio de la población mundial ha sido infectada por este parásito (Tenter et al 2000). Los cambios

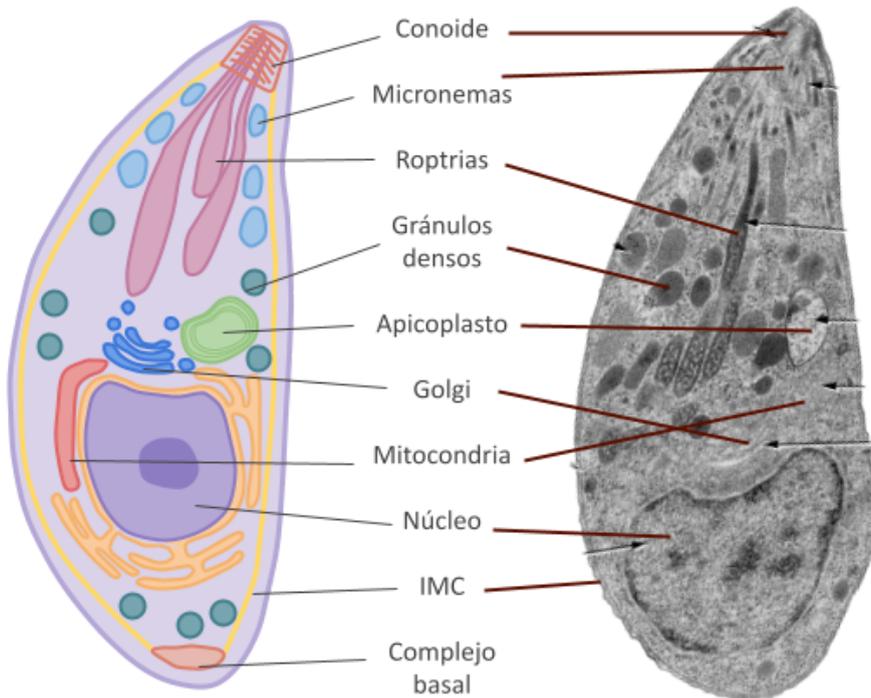


Figura 1. Ultraestructura del taquizoíto. El estadio de taquizoíto presenta una estructura polarizada, en la que su parte apical concentra los organelos implicados en la invasión de la célula hospedera (conoide, micronemas, roptrias, gránulos densos). Además presenta un apicoplasto, órgano vestigial de su pasado endosimbionte con las algas, y el complejo de membrana interno (IMC). Modificados de Blader et al., 2015.

ambientales producidos por el calentamiento global y el desplazamiento de especies, la rápida urbanización y aumento de la densidad poblacional junto con condiciones sanitarias encarecidas, propician la transmisión de enfermedades parasitarias incluida la toxoplasmosis (Patz et al, 2000).

La transmisión de la toxoplasmosis adquirida se da por la ingesta accidental de carne infectada con las formas latentes del parásito (denominado bradizoito) o de alimentos contaminados con ooquistes provenientes de las heces de felinos infectados (Weinman & Chandler, 1954; Hutchison, 1965). Además se puede transmitir de manera vertical por vía transplacentaria luego de una infección materna durante el embarazo (Sabin, 1942), y en menor frecuencia a través del trasplante de órganos (Ryning et al, 1979). En organismos inmunocompetentes, una primoinfección ocurre de forma asintomática evolucionando a una forma crónica latente. En cambio, en pacientes inmunocomprometidos esta última puede ser de gran riesgo, ya que puede reactivarse y conducir a una infección aguda produciendo morbilidad y mortalidad (Porter & Sande, 1992; Luft & Remington, 1983).

1.1.3 Ciclo de vida

El entendimiento del ciclo de vida de cualquier parásito es indispensable para conocer la dinámica de infección y su alcance a nivel de organismos, poblaciones y ecosistémico. El ciclo de vida de *T. gondii* a grandes rasgos se puede interpretar como dos ciclos interconectados: uno sexual y otro asexual, donde puede prescindir de una u otra etapa para su transmisión y además posee un rango de hospederos muy amplia (Figura 2). El hospedero definitivo, que es donde ocurre por definición la fase sexual, son los félidos. Mientras que el hospedero intermediario, donde ocurre la fase asexual,

puede ser cualquier célula nucleada de un animal endotermo (mamíferos y aves) incluidos los mismos félidos.

La fase sexual que se da exclusivamente en los félidos, comienza cuando un gato consume carne o vísceras de un animal infectado con quistes tisulares o es expuesto en un ambiente contaminado con ooquistes eliminados por otro felido infectado. Los bradizoitos, la forma enquistada y de replicación asexual lenta del parásito, contenidos en los quistes tisulares o los esporozoitos contenidos en los ooquistes son liberados por acción de proteasas presentes en el estómago e intestino delgado. Estos son capaces de resistir el pasaje por el tracto digestivo hasta llegar al intestino delgado, donde penetran en el enteroepitelio e inician ciclos de reproducción sexual. Aquí se da lugar a la diferenciación de gametos femeninos y masculinos (macro y microgameto respectivamente) y a la fecundación, terminando con la formación del cigoto (Dubey & Frenkel, 1972). Posteriormente se forma una pared alrededor del cigoto para dar lugar a la formación de ooquistes, estructuras de resistencia que son liberadas al lumen del intestino del gato y de ahí hacia el exterior. Finalmente, los ooquistes quedan libres contaminando el ambiente. Luego son ingeridos accidentalmente por algún endotermo, para así comenzar con una nueva fase asexual o sexual dependiendo del hospedador infectado.

La fase asexual comienza cuando un hospedador intermediario consume ooquistes maduros del ambiente o carne infectada con quistes. Los esporozoitos contenidos en ooquistes o los bradizoitos contenidos en quistes, se diferencian a taquizoitos durante su pasaje por el tracto digestivo, logrando colonizar el resto del organismo a través de la invasión activa de las células hospedera y replicándose dentro de esta para posteriormente egresar mediante la lisis celular. De esa forma el taquizoito se va propagando entre las células del hospedero mediante sucesivos ciclos de invasión, replicación y lisis, denominado ciclo lítico. El ciclo lítico y los daños tisulares que genera, son los principales protagonistas en una infección aguda con *T. gondii*. Esta proliferación dispara una respuesta inmune produciendo una infección aguda en el hospedero la cual expone al parásito a un ataque por parte del sistema inmune. La forma en que el parásito evita ser descubierto, es diferenciándose en “bradizoitos” y formando quistes tisulares, siendo el estrés generado por la respuesta inmune la desencadenante de esta diferenciación. El bradizoíto se encuentra dentro de quistes tisulares mayormente en el tejido muscular y en tejidos inmunoprivilegiados del sistema nervioso del hospedero, como el cerebro y el ojo, constituyendo una infección crónica. Asimismo, los quistes tisulares pueden ser ingeridos por algún depredador del hospedero, estableciendo una nueva infección aguda y cerrando la fase asexual del ciclo o comenzando una sexual en el caso de que la ingesta sea llevada a cabo por un félido.

1.1.4 Ciclo lítico: su rol en la patogenicidad

Durante la fase asexual del ciclo de vida de *T. gondii*, los bradizoitos una vez que invaden el epitelio intestinal se diferencian en taquizoitos. Este estadio se caracteriza por ser la forma más proliferativa del parásito, el cual se propaga a través de los tejidos y órganos en un ciclo de invasión de las células, división dentro de las mismas y el posterior egreso a través de la lisis celular, denominado ciclo lítico. El ciclo lítico es protagonista de la fase aguda de la infección a través de una marcada proliferación de los parásitos, dejando tras su paso una destrucción de los tejidos provocado por la lisis celular que causan los mismos al momento del egreso.

La motilidad, el reconocimiento e invasión de la célula hospedera por parte del parásito, es un proceso activo que dependen de distintos componentes celulares sobre todo de un complejo de membranas particular, denominado complejo de membranas interna (IMC por su sigla en inglés

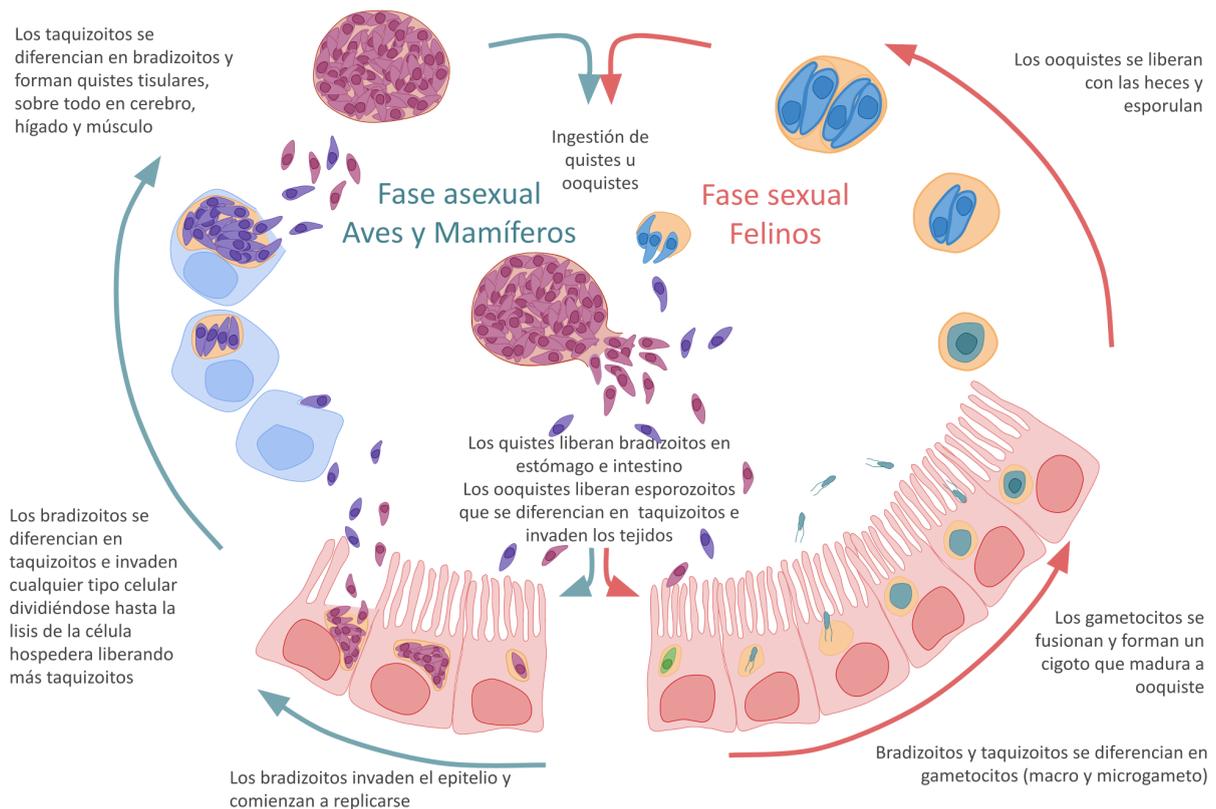


Figura 2. Ciclo de vida de *T. gondii*. A la izquierda, fase asexual que ocurre en endotermos se caracteriza por el ciclo lítico y su daño celular que conducen a una infección aguda, y la diferenciación al estadio latente de bradizoito ya en una fase crónica de infección. Mientras que a la derecha, en la fase sexual se da la diferenciación en macro y microgametos que dan lugar a la variabilidad genética a través de la fecundación. Ambos ciclos comienzan con la ingesta de quistes presentes en los tejidos de presas u ooquistes que contaminan el agua y el suelo. Adaptado de Ruiz-Villareal.

y de un complejo de organelos que se localizan en el ápice de la célula, denominado complejo apical. Estos componentes son rasgos característicos que comparten todos los apicomplejos y comprenden: un sistema de vesículas secretoras formadas por: gránulos densos, roptrias y micronemas; un centro organizador de microtúbulos que dirige la dinámica del citoesqueleto; y un conoide ubicado en el extremo más apical, que consiste en un polímero de tubulina que se extiende durante la invasión. Durante la internalización del parásito, este arrastra consigo la membrana de la célula hospedera para formar la vacuola parasitófora. Dentro de esta vacuola el parásito interactúa con la célula hospedera, a través del reclutamiento del retículo endoplasmático y mitocondrias, y evadiendo al sistema inmune para poder dividirse dentro de esta (Prochet-Hennere & Nicolas, 1983; Sinai et al, 1997).

Una vez que el parásito ha proliferado a través de sucesivas rondas de división, un quorum sensing dispara el mecanismo de egreso por parte de los parásitos (Bisio et al, 2019). El mecanismo de quorum sensing involucra la acumulación del ácido abscísico que se da a medida que los parásitos se van replicando dentro de la vacuola (Nagamune et al, 2008). También el egreso puede ser desencadenado por la respuesta inmune del hospedero (Persson et al, 2007).

1.1.5 Organización de la división celular

La división celular en estos parásitos es muy plástica, adaptándose a diferentes entornos celulares para lograr una infección exitosa. La misma se encuentra gobernada por una organización ultraestructural particular. La plasticidad de la división radica en la citocinesis y en todo lo que conlleva la reorganización celular al momento del ensamblaje de dos células hijas internas a la madre. La citocinesis en Apicomplejos consiste en el egreso de dos nuevos parásitos desde dentro de la célula madre. Esta es acompañada en simultáneo por un mecanismo de mitosis ampliamente usado por eucariotas unicelulares en donde la mayor parte de la envoltura nuclear permanece íntegra a lo largo de toda la mitosis, denominado mitosis semi-cerrada (Speer & Dubey, 1981; Makarova & Oliferenko, 2016). Además, los cromosomas no se condensan en cromátidas individuales, tal como suele ocurrir en otros eucariotas. La forma que tienen de resolver el problema de la segregación es manteniendo a lo largo del todo el ciclo celular la unión física entre los cromosomas y el centro organizador de microtúbulos (el centrosoma) (Brooks et al, 2011).

En una citocinesis convencional la división de la célula madre es conducida mecánicamente por un anillo contráctil y centros organizadores de microtúbulos en polos opuestos. En *T. gondii* esta organización es totalmente diferente (Figura 3). La generación de las células hijas se da a través del ensamblaje de las mismas *de novo* dentro de la célula progenitora. *T. gondii* puede ensamblar hijas por tres mecanismos diferentes denominados endodiogenia, endopoligenia y esquizogonia. La endodiogenia es el más sencillo; el ADN se duplica una sola vez por ciclo y se segrega por mitosis cerrada entre dos células hijas que se ensamblan dentro de la progenitora. En la endopoligenia el parásito genera un núcleo poliploide a través de varias rondas de replicación, en la última ronda de replicación se produce la formación de los núcleos por gemación y el ensamblaje de las células hijas. Durante la esquizogonia, el parásito replica varias veces de forma asincrónica su ADN y además realiza la cariocinesis, convirtiéndose en un sincitio. La última ronda de replicación se da de forma sincronizada para dar lugar a la formación de las células hijas en simultáneo (Francia & Striepen, 2014).

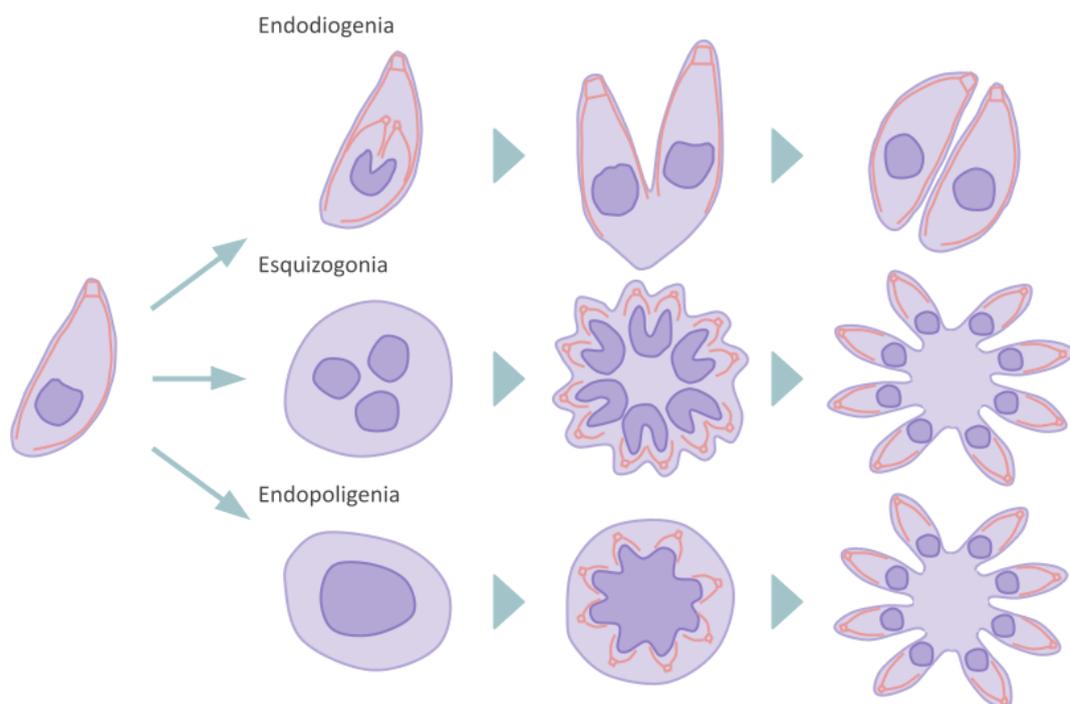


Figura 3. Diferentes modos de división celular presentes en el ciclo de vida de *T. gondii*. La endodiogenia se caracteriza por el ensamblaje de dos células hijas dentro de su progenitora. Tanto en la esquizogonia como en la endopoligenia, se genera una progenie múltiple. En la primera, esta progenie se forma a partir de un sincitio, mientras que en la segunda se forma a partir de una célula con un núcleo poliploide.

Esta conexión de las células en formación con su centrosoma es de gran importancia, ya que es el centrosoma el responsable de dirigir una correcta segregación de los núcleos con sus cromosomas así como del resto de los organelos entre las células hijas en formación. Continuando con el eje, el centrosoma se conecta a los cromosomas a través de un corto huso mitótico. Este tramo del eje tiene sus particularidades, el huso mitótico permanece durante la mitosis manteniendo anclado los cromosomas por sus cinetocoros. Estos últimos se encuentran nucleados en una porción de la envoltura nuclear cercana al centrosoma (Brooks et al, 2011; Francia & Striepen, 2014). Esto es importante para el parásito, ya que no condensa sus cromosomas durante la profase. Por tanto este mecanismo permite mantener un conteo de los cromosomas y una correcta segregación de los mismos, sobre todo en estadios poliploides. Junto con el ensamblaje de la fibra estriada, conforman anclajes físicos que regulan una correcta segregación y citocinesis. La disrupción de la fibra estriada impide que se de la citocinesis pero no la mitosis, demostrando que ambos eventos se encuentran coordinados espacio-temporalmente por vínculos físicos, pero no a través de reguladores solubles (Francia et al., 2012).

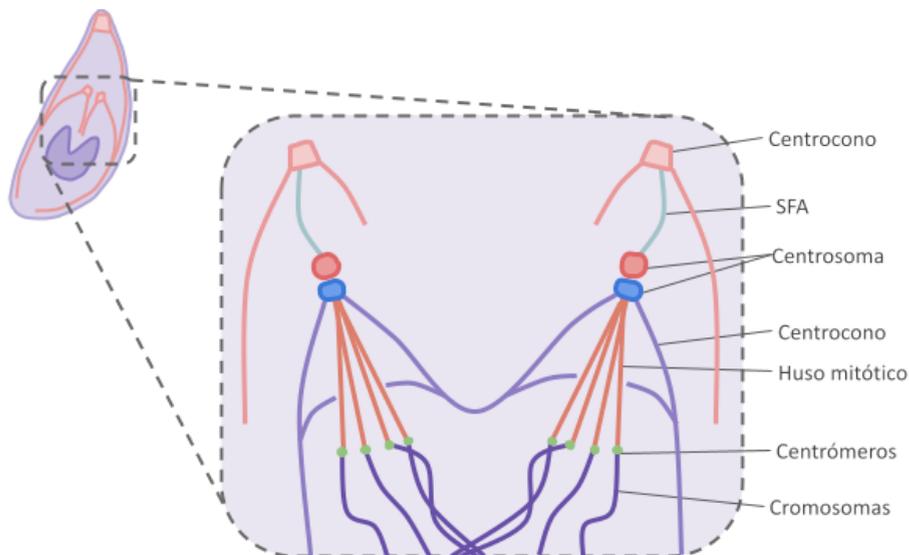


Figura 4. Esquema de las conexiones físicas entre las células hijas en formación y sus cromosomas. La conexión se inicia en el centrocono, la parte más apical de las células hijas, la cual a través de la SFA se conecta al centrosoma. Este último se conecta a los cromosomas a través del huso mitótico. El centrosoma posee la capacidad de coordinar de forma independiente la mitosis de la citocinesis, confiriendo a *Toxoplasma* la capacidad de optar por diferentes modos de división. Adaptado de Morlon-Guyot et al., 2016.

1.2 Ciclo celular de *Toxoplasma gondii*

La progresión del ciclo celular en eucariotas se encuentra pautada por acontecimientos que ocurren de forma secuencial y que se repiten en cada ciclo. En el estadio de taquizoito, *T. gondii* se

divide por endodiogenia, su mecanismo de división más sencillo y mejor comprendido, en el cual se generan dos células hijas a partir de la progenitora. Su ciclo comienza en la fase G1 donde tempranamente se caracteriza por la síntesis proteica. Luego le sigue una etapa de G1 tardía donde predomina la producción de los componentes necesarios para la replicación del ADN y a continuación de esta comienza la fase S donde se concreta la replicación. La duplicación del centrosoma marca el límite entre G1 y el comienzo de la fase S. A diferencia de lo que globalmente se conoce para los eucariotas, la fase G2 en *T. gondii* es sumamente acotada a tal punto de que no es posible diferenciarla. Prácticamente estos organismos pasan de la fase S a la M de inmediato. Por último, en la fase M se producen la mitosis y la citocinesis acopladas (Radke et al, 2001; Striepen et al, 2007) (Figura 5).

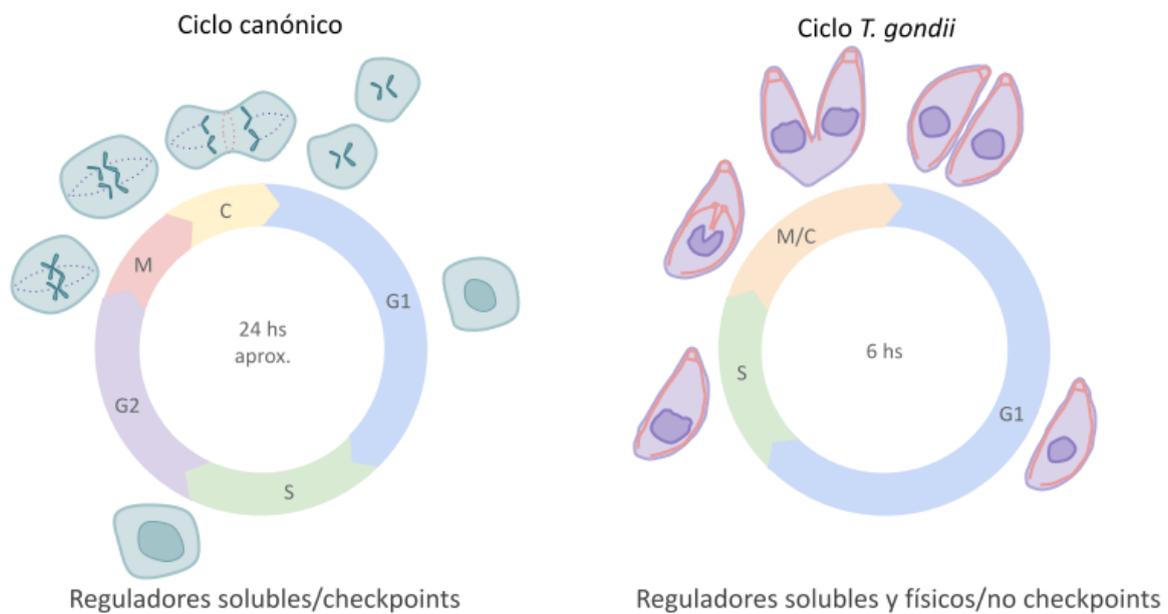


Figura 5. Comparativa entre un ciclo celular canónico de una célula de mamífero promedio con el ciclo celular de *T. gondii*. A grandes rasgos, el ciclo celular de *T. gondii* posee una duración de 6 hs, no posee una fase G2 y las fases M y C se encuentran unificadas dado que la mitosis y la citocinesis ocurren en simultáneo.

1.2.1 Regulación

El control del ciclo celular, en *T. gondii* es llevado a cabo por elementos estructurales y no solamente por factores solubles como se acostumbra a ver con las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. En el ciclo celular de taquizoitos no existen los puntos de control que usualmente se observan en células de mamíferos (*checkpoints*). Sin embargo, existen reguladores solubles que actúan a diferentes niveles desencadenando procesos necesarios para la progresión del ciclo celular. Los mecanismos de regulación usados por *Toxoplasma* se han diversificado como producto de un recorte genómico seguido por una expansión genómica que ha tenido este filo en el curso de su evolución. Dentro de estos reguladores, se encuentran factores solubles que presentan homología a los que tradicionalmente se conocen: las quinasas y sus ciclinas y diferentes factores de transcripción. Mientras que por otro lado, existen reguladores novedosos que se encuentran asociados al control de la biología del centrosoma (Suvorova et al, 2015).

En gran medida, estos mecanismos de regulación en apicomplejos continúan siendo una incógnita. Sobre todo en cómo el parásito coordina la replicación del material genético en función

del tipo de división celular (endodiogenia, esquizogonia o endopoligenia), y en cómo pospone la citocinesis para dar lugar a varias rondas de replicación del ADN cuando va a realizar esquizogonia o endopoligenia.

1.2.2 *Los anclajes físicos y el centrosoma como centro regulador*

El centrosoma, uno de los organizadores de microtúbulos de la célula, juega un rol fundamental en la regulación del ciclo celular y en la toma de decisión de cuántas veces “copiar” el ADN por ciclo, lo cual le permite modular las rondas de replicación para luego generar progenie múltiple como en el caso de la endopoligenia y la esquizogonia (Francia y Striepen, 2014; Suvorova et al, 2015). Este poder de decisión se da gracias a la organización bipartita del centrosoma el cual le confiere la flexibilidad necesaria para lograr diferentes modos de replicación. Esta estructura bipartita está organizada en dos dominios, uno denominado interno y otro externo. Los centriolos, barriles de microtúbulos que constituyen la característica estructural esencial del centrosoma, se localizan en el dominio externo. El dominio interno alberga proteínas con funciones en la nucleación del huso mitótico. Cada uno cumple funciones regulatorias en la cariocinesis y citocinesis, respectivamente. Esto se correlaciona espacialmente, ya que el dominio externo del centrosoma se asocia a la célula hija en formación mientras que el dominio interno se asocia al núcleo. El dominio interno se asocia al núcleo a través de un complejo proteico que se encuentra en una porción diferenciada de la envoltura nuclear denominado centrocono (Gubbels et al, 2006). Sobre esta región del núcleo, el huso mitótico recluta los centrómeros durante la mitosis. Sin embargo, los cromosomas se mantienen unidos a la envoltura nuclear durante todo el ciclo (Francia et al, 2020). Esta unión le permite mantener un conteo de los cromosomas ante la ausencia de checkpoints y una correcta segregación de los mismos en la mitosis (Francia y Striepen, 2014). Se ha demostrado que la ruptura de este contacto, sea tanto por degradación farmacológica del huso como por la ablación de componentes centrosomales, conducen a una replicación del núcleo anormal (Morrissette y Sibley, 2002; Francia et al, 2020). Por otro lado, en el dominio externo del centrosoma y luego de su duplicación emerge lo que se conoce como fibra estriada, la cual posiciona al complejo apical de la célula hija en formación. Esta conexión entre el dominio externo del centrosoma y el complejo apical desaparece una vez que la célula hija ha madurado. La disrupción de esta fibra trae consigo la ausencia del ensamblaje de las células hijas (Francia et al, 2012).

En Suvorova et al, 2015 los autores proponen que estas conexiones físicas mediadas por el centrosoma bipartito, sean puntos de control del ciclo celular que le permiten al parásito coordinar de forma independiente la cariocinesis de la citocinesis por cada ronda de división. De esta forma le permite suspender la citocinesis, logrando la flexibilidad regulatoria requerida para que estos parásitos se adapten a múltiples ciclos de vida permitiéndoles adaptarse a nichos específicos dentro del hospedero.

1.2.3 *Factores solubles, un aspecto compartido*

La progresión del ciclo celular de *T. gondii* es gobernada por un diálogo entre diferentes factores físicos y solubles, conservados y novedosos, que son producto de su historia evolutiva desde un simbiote hasta llegar a ser un parásito. *T. gondii* comparte rasgos regulatorios conservados con células eucariotas en general y rasgos particulares de células vegetales, producto de su origen evolutivo en las algas. Dentro de esto, se encuentran un sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, análogas a las de mamíferos, y de factores de transcripción conocidos como Apetala2, de

origen vegetal. Estudios filogenéticos indican que el ancestro de los eucariotas poseía una maquinaria reguladora basada en una quinasa a la cual se le unían distintos tipos de ciclinas A-, B- D- y E- (Medina et al, 2010). Actualmente, se han identificado en *T. gondii* proteínas homólogas a las ciclinas y a las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que existen en mamíferos. En *T. gondii* estos homólogos de Cdks se denominan Crks por su sigla en inglés “Cdk related kinases” (Alvarez y Suvorova, 2017). La incorporación de los factores de transcripción Apetala2 que dieron lugar a los ApiAp2 se dio gracias a eventos de endosimbiosis con algas rojas (Suvorova et al, 2015; Woo et al, 2015). En resumen, se puede decir que en *T. gondii* coexisten dos sistemas de regulación como producto de su evolución en el cual se tiene una parte eucariota general donde se encuentran las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, y una parte “vegetal” donde tenemos los factores de transcripción de tipo Apetala2.

1.2.4 Crks

Las quinasas relacionadas con Cdks (Crks) de *T. gondii* se identificaron a partir de estudios genómicos en donde se encontraron dominios de quinasa conservados y la secuencia de unión a ciclina. A su vez, se ha identificado un conjunto de ciclinas incluidas TgCycH, TgCycL y TgCycY, entre otras. Las mismas se expresan abundantemente en la etapa de taquizoíto y existen varios ejemplos que presentan la capacidad de asociarse a diferentes Crks y viceversa, demostrando su plasticidad funcional típica de las ciclinas (Alvarez y Suvorova, 2017). Por ejemplo, la ciclina H puede asociarse con la Crk7 para controlar el inicio de la transcripción, mientras que también puede asociarse con la Crk2 (Alvarez y Suvorova, 2017; Khan et al, 2002). Aún resta mucho por conocer de la dinámica de estas ciclinas y con cuáles Crks interactúan. Sin embargo, mediante ensayos de knock out condicional, se ha demostrado que la TgCycY no es esencial para la sobrevivencia de los taquizoitos de *T. gondii* y tampoco interactúa con ninguna de las siete Crks caracterizadas al momento. Estos datos arrojan la conclusión de que TgCycY es un vestigio evolutivo (Alvarez y Suvorova, 2017).

Durante la fase G1 de *T. gondii* se tiene un punto de control ejercido por una quinasa atípica denominada Crk2 que se une a P/U-ciclina. La progresión de esta fase y su punto de control es llevada a cabo por un aumento de su actividad quinasa que se da al formarse el complejo, mecanismo desencadenado por una cascada de señalización de quinasas que detectan y transducen señales ambientales (Behnke et al, 2010; Lourido et al, 2012). La actividad quinasa de este complejo Crk2-ciclina no señala efectores de las familias E2F/DP-1/Rb (o SBF/Whi5) que se suelen observar, ya que se perdieron en el curso de su evolución. Más bien se cree que los efectores de G1 en apicomplejos fueron reemplazados por la familia de factores de transcripción ApiAp2 provenientes de su pasado endosimbionte con las algas rojas. En los ciclos celulares “canónicos” el punto de control de la fase S gobierna dos procesos: el chequeo de la integridad del ADN y autoriza la replicación del mismo. En *T. gondii*, el primero está regulado por una quinasa ATM ancestral y el segundo por la Crk5 (Vonlaufen et al 2010 Naumov et al, 2017). Luego de la fase S, le es seguida la mitosis, la cual conserva muchos componentes ancestrales sobre todo en la entrada de dicha fase. La replicación y segregación de los MTOC que se da al inicio de la fase M, está regulada por las familias de serina/treonina quinasas Nek y Aurora solamente (Matthews et al, 2018; Suvorova et al, 2015; Chen y Gubbels, 2013; Berry et al, 2016; Carvalho et al, 2013). Las quinasas polo like (PLK) que se observan en mamíferos no están presentes en apicomplejos. Más avanzada la fase M, en la transición de la metafase a la anafase entra en juego la Crk6 controlando la salida de la mitosis. Finalmente la citocinesis es regulada por la Crk1 en complejo con la ciclina L (CycL), el cual se encuentra emparentado con el complejo eucariótico Cdk11/CycL de reguladores transcripcionales

(Alvarez y Suvorova, 2017). De esta forma queda ampliamente demostrado que el control del ciclo celular por factores solubles en apicomplejos, es una mezcla entre factores conservados y nuevos como son las Crks y ApiAp2s.

En cuanto a la fase G2, *Toxoplasma* carece de los reguladores de esta fase y esta ausencia se le atribuye a su capacidad de posponer la citocinesis para dar lugar a varias rondas de síntesis de ADN. Como se discutió anteriormente, este desacople entre mitosis y citocinesis es llevado a cabo por mecanismos novedosos como el complejo centrosoma/huso mitótico, algunos AP2 y la Crk4 (Alvarez y Suvorova, 2017).

1.2.5 AP2s

La familia de factores de transcripción ApiAP2 es el principal regulador transcripcional que se encuentra en todos los apicomplejos, y es homóloga a los factores de transcripción AP2 que se encuentran en plantas (Balaji et al, 2005). El nombre de esta familia se debe al dominio de unión al ADN AP2/ERF que poseen todas las proteínas que la integran. En plantas este dominio tiene un tamaño de unos 60 aminoácidos aproximadamente y se puede encontrar como un solo módulo o varios en tándem (Broadbent et al, 2011). Esta familia de proteínas actúa activando o reprimiendo la expresión génica a través del reclutamiento de complejos modificadores y remodeladores de la cromatina. Dentro de estos, se encuentra la enzima HDAC3 que elimina las acetilaciones de histonas, reprimiendo la expresión (Licausi et al, 2013). Por otro lado, GCN5b está asociado a genes activos en *T. gondii*; se encuentra unido a varios AP2 y a la maquinaria de transcripción (Wang et al, 2014). Tanto AP2 represores como AP2 activadores comparten la especificidad por los mismos motivos de unión al ADN y parecen regular la expresión del mismo conjunto de genes. Por ejemplo, el motivo reconocido por el activador AP2XI-4 comparte los cuatro nucleótidos CACA con el motivo del represor AP2IX-9 (Walker et al, 2013).

Para *T. gondii* se han predicho unas 68 proteínas con dominios de unión al ADN del tipo AP2, de las cuales 24 están reguladas por el ciclo celular, 11 se expresan en el estadio de bradizoítos, 27 se expresan constitutivamente y 6 no se expresan en taquizoítos (Altschul et al, 2010; Behnke et al, 2010). La expresión de estos 24 factores de transcripción regulados por el ciclo celular se encuentran sujetas a olas de transcripción que se dan durante el ciclo y abarca a distintas clases de genes. Se distinguen dos principales olas: una en G1 y otra en la transición hacia la fase S. El tipo de función que cumple las clases de genes de cada ola, se correlaciona con la fase del ciclo celular en que se da. Es decir, genes que se transcriben en la ola de G1, son genes involucrados en el crecimiento y mantenimiento celular. Mientras que en la segunda ola se transcriben genes necesarios para la formación de las células hijas e invasión de la célula hospedera (Behnke et al, 2010). Cada ola de expresión de ApiAP2 no solo dirige la coexpresión de grupos de genes, sino que además podría establecer un patrón autoorganizado de expresión que sustenta la progresión del desarrollo del parásito y del ciclo celular (Kibe et al, 2005).

1.3 Problemas al abordar el ciclo celular en *T. gondii*

Aún resta mucho por saber acerca de las bases moleculares que regulan el avance y la plasticidad del ciclo celular de *T. gondii*. Sobre todo en la identificación de componentes físicos y solubles divergentes que participan en la regulación tal como se mencionó anteriormente, y el diálogo que pueden tener entre ellos. En la práctica, es de interés contar con este conocimiento

acerca de estos mecanismos divergentes que garantizan una proliferación exitosa, ya que pueden constituir blancos farmacológicos contra estos parásitos.

Uno de los intereses del laboratorio es entender la dinámica y biogénesis del centrosoma, cómo éste regula la división celular y su plasticidad al momento de optar por los diferentes modos de división. La duración temporal de los diferentes eventos que se dan al momento de la división constituyen un gran obstáculo para su estudio. Al ser eventos temporalmente acotados, es difícil encontrar en una población cierta representatividad que permita su estudio. Mediante ese diálogo entre factores reguladores solubles y físicos, es posible generar herramientas a partir de unos para así poder estudiar los otros y viceversa.

1.3.1 El problema de la sincronización

En un cultivo asincrónico, las diferentes fases del ciclo celular se encuentran representadas de acuerdo a la duración temporal que tenga cada una. La fase G1 ocupa la mayor parte del ciclo celular en estos parásitos, por lo que un 80% de la población se va a encontrar en esta fase. El resto se distribuye en las restantes fases S y M, dificultando el estudio de estas fases como se mencionaba anteriormente. La forma de poder sortear este problema es la sincronización, de tal forma que la población transite por el ciclo celular en forma coordinada y de esta forma obtener poblaciones enriquecidas en diferentes fases del ciclo celular.

Actualmente, la sincronización de poblaciones de taquizoitos de *T. gondii* se ha logrado expresando transitoriamente una timidina-quinasa de herpes simplex (Schlosser et al, 1981; Ross y White, 1998). Esta sincronización arresta a los parásitos en G1 cuando son expuestos a timidina exógena. Una vez levantado el arresto, estos permanecen sincronizados durante el primer ciclo solamente ya que el arresto no es acotado en determinado momento de G1, produciendo un desfase de la población. Además la actividad de esta enzima es tóxica debido a que produce un desbalance en las cantidades de nucleótidos en los parásitos (Iwasawa et al, 2019). Por otro lado, se ha descrito otro método de sincronización que no requiere de manipulaciones genéticas y que se basa en la inhibición reversible del crecimiento con ditiocarbamato de pirrolidina (de Felipe et al, 2008). Los autores demostraron por citometría que el arresto se produce mayoritariamente en G1 y una menor parte en citocinesis tardía, y que la población permanece sincronizada durante dos ciclos post arresto. Los autores de ambos mecanismos de sincronización sostienen que la posibilidad de sincronizar las poblaciones farmacológicamente pone en evidencia la existencia de checkpoint que regulan el pasaje durante la fase G1. Sin embargo, esto no ha sido demostrado formalmente.

En conclusión, hasta el momento se han descrito mecanismos farmacológicos que interfieren en la progresión y regulación del ciclo celular y que además, en el caso de la sincronización con timidina exógena, requiere de expresión de una proteína exógena y produce toxicidad para el parásito. Por consiguiente, el estudio de procesos relacionados a la regulación y progresión del ciclo celular y la división se ven obstaculizados debido a que los mecanismos de sincronización actuales interfieren con estos procesos. Es necesario el desarrollo de métodos que permitan la sincronización de forma lo menos invasiva, sin interferir en la homeostasis del parásito y que permitan obtener poblaciones sincronizadas de manera más precisa y sostenida en el tiempo.

1.3.2 Planteo del trabajo

Dada la necesidad de generar un mecanismo de sincronización menos invasivo como se mencionaba anteriormente, en el presente trabajo proponemos la generación de una herramienta

para la obtención de poblaciones enriquecidas en diferentes fases del ciclo celular basada en cepas indicadoras del ciclo celular y cell sorting de las mismas. La generación de las cepas indicadoras se basa en la idea de generar por recombinación homóloga y tecnología de CRISPR-Cas9, parásitos que expresen proteínas de fusión formadas por una proteína fluorescente y otra endógena, cuya expresión sea dependiente del ciclo celular. Una vez obtenidas estas cepas hipotetizamos que la proteína de fusión al igual que la proteína salvaje, se va a expresar fluctuando en el ciclo celular y por consiguiente fluctuará su fluorescencia. Esto permitiría por cell sorting seleccionar y generar poblaciones que se encuentran en determinado momento del ciclo celular. A su vez, proponemos la validación del sistema por microscopía y RT-qPCR.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo es la generación y validación de una herramienta que permita la obtención de poblaciones de *T. gondii* enriquecidas en fases del ciclo celular específicas. Partiendo de la hipótesis que a partir de genes con una expresión dependiente del ciclo celular es posible generar proteínas de fusión entre una proteína fluorescente y el producto de expresión de estos genes, y que su patrón de expresión se reproduce de igual forma que la proteína salvaje, obteniéndose un patrón de fluorescencia fluctuante dependiente del ciclo celular. Explotando este patrón de fluorescencia, se podría obtener poblaciones enriquecidas en determinada fase del ciclo celular por cell sorting.

1.4.2 Objetivos específicos

- Generar cepas de *T. gondii* reporteras del ciclo celular a través de la inserción de secuencias codificantes de proteínas fluorescentes por recombinación homóloga en genes cuya expresión es dependiente del ciclo celular.
- Obtener subpoblaciones sincronizadas por cell sorting a partir de las cepas reporteras.
- Analizar el alcance temporal de la sincronización y por cuánto ciclos celulares esta permanece.

2 Materiales y métodos

2.1 Generación de la cepas knock-in indicadoras del ciclo celular

En la primera etapa de este trabajo, se generaron parásitos por recombinación homóloga que expresan proteínas de fusión formadas por proteínas endógenas con un perfil de expresión que fluctúa a lo largo del ciclo celular y proteínas fluorescentes. Para lograr esto, se transfectó en la cepa RH $\Delta ku80$ de *Toxoplasma gondii* un constructo producido por PCR. El último está formado por la secuencia codificante de la proteína fluorescente y una resistencia a antibiótico para selección, flanqueado por regiones de homología con el locus correspondiente al extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína a ser fusionada.

Para la selección de las proteínas que queremos utilizar como indicadoras de la fase del ciclo celular nos basamos en: 1- proteínas que tuvieran un perfil de expresión dependiente del ciclo celular, 2- que se haya reportado exitosamente su knock-in con proteínas fluorescentes o epítopes tags, y 3- que se evidenciara por microscopía su presencia fluctuante en el citoplasma y/o núcleo. En base a la revisión bibliográfica y los criterios mencionados, seleccionamos en una primera instancia los factores de transcripción de la familia de proteínas relacionadas con plantas con dominio de unión al ADN Apetala2 ApiAP2VI-1 y ApiAP2VIIa-1 y la ciclina CycY. El ApiAP2VI-1 alcanza su máximo de expresión en fase S y ApiAP2VIIa-1 en M, mientras que CycY es máxima en G1 tardía de acuerdo a los datos de transcriptómica publicados en ToxoDB y en Behnke et al, 2010. En cuanto a las observaciones por microscopía de la presencia de tales proteínas en el citoplasma y/o núcleo, en Behnke et al (2010) reportan las distribuciones nucleares de ApiAP2VI-1 y ApiAP2VIIa-1 fusionadas a la proteína amarilla fluorescente (YFP) estando la primera presente exclusivamente en fase S mientras que la segunda presenta mayor intensidad en citocinesis y ausencia total en fase G1. En tanto el producto de la fusión de la CycY con el tag HA describe una distribución nuclear y su concentración en el mismo se da en mayor medida en la fase G1 (Alvarez y Suvorova, 2017). Resultados similares de localización de CycY se observaron con anticuerpos contra CycY (Deshmukh et al 2028).

Para la obtención de los knock-in se empleó el sistema CRISPR-Cas9 para mejorar las probabilidades de recombinación exitosa del constructo de PCR en el locus correcto. En este trabajo usamos el vector pSAG1::Cas9-U6::sgRNA. Este, una vez transfectado en parásitos, se expresa como episoma dando lugar a expresión de la endonucleasa Cas9 que posee codificada en su secuencia bajo el control del promotor de SAG1 (una proteína de *T. gondii* de expresión constitutiva). Además, este sistema permite introducir por mutagénesis la secuencia que codifica para la guía de RNA (Brown & Sibley, 2014; Addgene: #54467). Dicha guía de RNA se va a encontrar bajo control del promotor U6 en el mencionado vector y es específica para cada gen que se quiera editar. La transfección de este vector da lugar a que la endonucleasa Cas9 clive el extremo 3' de los genes de interés que reconoce con la ayuda de su ARN guía específico para cada gen. Este corte dirigido permitirá que se dé la reparación por recombinación homóloga de estos loci, empleando para ello los constructos de proteínas fluorescentes anteriormente mencionados.

En esta primera parte, el objetivo es la obtención de cepas clonales de *T. gondii* knock-in con proteínas fluorescentes para los genes *ApiAP2VI-1*, *ApiAP2VIIa-1* y *CycY*. Generadas por recombinación homóloga asistida por el sistema CRISPR-Cas9, a través de la co-transfección de construcciones de PCR y del vector pSAG1::Cas9-U6::sgRNA. De esta forma se obtienen poblaciones

de parásitos que expresan ApiAP2VI-1, ApiAP2VIIa-1 o CycY fusionadas a proteínas fluorescentes en el extremo C-terminal.

2.1.1 Clonación de los sgRNA en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgRNA del sistema CRISPR-Cas9

La inserción de las secuencias guías en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgRNA se realiza a través de una mutagénesis por PCR en la que sustituye la secuencia de una guía que previamente se encontraba en el vector (UPRT), por la secuencia que codifica la guía de interés. En esta reacción se emplearon los primers con las guías como primer forward y un primer reverso genérico U6 (Tabla 1). El primer reverso hibrida en la secuencia del promotor U6 del vector que se encuentra adyacente corriente arriba del sgRNA donde hibrida el primer forward. Teniendo en cuenta esto último, la reacción de PCR va a amplificar el vector en su totalidad y a su vez va a introducir la sgRNA nueva que está en el primer forward. Para la confección de los primers con las guías, se empleó la herramienta Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool disponible en la web (Peng & Tarleton, 2015) y se seleccionaron las guías con mejor score de especificidad y menor score de *off-targets*. De esta selección se obtuvieron los primers sgRNA_AP2VI-1, sgRNA_AP2VIIa-1 y sgRNA_CycY. Parte de la secuencia de los mismos hibridan en la secuencia del scaffold del gRNA que se encuentra en el vector (en minúscula, ver Tabla 1) y el resto codifica el crRNA que hibrida en el blanco genómico que ha de ser editado (en mayúscula, Tabla 1).

La reacción de mutagénesis por PCR se llevó a cabo con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor para una reacción de volumen final 50 μ L. Para este protocolo se realizó la reacción por cuadruplicado, en total 200 μ L de PCR por cada guía. La desnaturalización inicial es de 1 min a 98°C, seguido de 35 ciclos con 15 seg a 98°C de desnaturalización, 20 seg a 54°C de annealing y 6 min a 72°C de extensión, finalizando con 10 min de extensión final a 72°C y 10 min a 4°C. Al finalizar, se evaluó la amplificación por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Se juntaron todas las muestras en un solo pool y se limpió el producto de la mezcla de reacción con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania) según las indicaciones del fabricante. Al producto (pSAG1 mutagenizado) se le realizó una digestión con DpnI (New England Biolabs, USA) para eliminar rastros del vector molde usado en la PCR ya que el mismo no posee la guía deseada: 1 μ L DpnI, 1 μ g de DNA (pSAG1 mutagenizado), 5 μ L 10x NEBuffer, agua csp 50 μ L. Se incubó por 1 h a 37°C. Luego se realizó la fosforilación y ligación del plásmido: 2 μ L Buffer T4 ligasa, 2 μ L ATP 10mM, 1 μ L de T4 PNK y 15 μ L de pSAG1 digerido. Se incubó 40 min a 37°C y 20 min a 65°C para la fosforilación. Luego se le añade 1 μ L de T4 ligasa y se incubó ON a 4°C. Al siguiente día se transformó cada ligación en *E. coli* DH5- α quimiocompetentes, en una relación 1:10 entre el volumen de la ligación y el de las bacterias, y se sembró en placas de agar-LB en selección con ampicilina 0.1 μ g/ μ L (Sigma, USA). Por último, se realiza colony PCR con MangoMix (Meridian Bioscience, USA) para seleccionar las colonias con el vector. Para esto se empleó 5 μ L MangoMix 5x (Meridian Bioscience, USA), 1 μ L M13 reverse primer 10 μ M (la secuencia M13 se encuentra río abajo del sitio de mutagénesis), 1 μ L forward primer 10 μ M (los mismos que se usaron para la mutagénesis), agua csp 10 μ L.

Se enviaron a secuenciar (Macrogen, Corea) las regiones de los crRNA en pSAG a partir de minipreparaciones (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit Invitrogen, USA) por método de Sanger (Applied Biosystems, USA) empleando el primer M13_reverse cuya secuencia se encuentra río abajo del sitio de clonación del ARN guía en el vector pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT. Las secuencias se analizaron utilizando A Plasmid Editor v3.1.1 (Wayne, 2003), y en todos los casos se corroboró la correcta inserción de la sgRNA deseada en el vector.

2.1.2 Diseño y generación de los constructos

Las construcciones que se eligieron para transfectar se amplificaron de los vectores: pLIC_YFP_DHFR, pLIC_NeonGreen_DHFR y pLIC_tdTomato_CAT. Del primero se amplifica la región que codifica para la proteína fluorescente amarilla (YFP) y la dihidrofolato reductasa (DHFR) que confiere la resistencia a la pirimetamina. Este constructo fue el primero que se transfectó en los tres genes seleccionados. El segundo fue pLIC_mNeonGreen_DHFR, es similar al anterior salvo que tiene NeonGreen monomérica como proteína fluorescente. Y el último, pLIC_tdTomato_CAT, es un vector que fue clonado para sustituir la resistencia original (que era DHFR; *dihydrofolate reductase* por su sigla en inglés, que confiere resistencia a la pirimetamina) por la cloranfenicol acetil transferasa (CAT, la cual confiere resistencia al cloranfenicol), para así amplificar un constructo formado por tdTomato y CAT. En los tres casos, los constructos una vez amplificados van a quedar flanqueados por regiones de homología de los genes *ApiAP2VI-1*, *ApiAP2VIIa-1* o *CycY*, respectivamente. En total se realizaron nueve transfecciones que corresponden a las diferentes permutaciones entre genes y constructos.

Las regiones de homología flanqueantes de cada constructo se incluyen en los primers del mismo PCR que se utiliza para amplificar el constructo del pLIC (primers AP2VI-1_LIC_fwd/rev, AP2VIIa-1_LIC_fwd/rev y CycY_LIC_fwd/rev, Tabla 1). El primer forward se genera a partir de los últimos 35 pares de bases del CDS del gen, menos el codón stop. En el extremo 3' se le agrega una secuencia que está presente en todos los vectores pLIC y que sirve para clonar y modificar estos cassette. El primer reverse son los 35 pares de bases después del sitio donde hibrida el crRNA, ya que se tiene que evitar el sitio que reconoce la Cas9 porque sino la Cas9 destruiría el mismo justo antes de que se de la recombinación. Al igual que en el primer forward, en el extremo 3' se coloca una secuencia de clonación de los pLIC.

La amplificación de las construcciones para transfectar se llevó a cabo usando Ranger Mix (Meridian Bioscience, USA) con las siguientes indicaciones: el plásmido usado como molde debe estar eluido en agua y la cantidad empleada no debe superar los 10 ng totales, la concentración de primers es el doble de la habitual (20 μ M en vez de 10 μ M). El programa de amplificación consta de tres etapas: una desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, seguido de 10 ciclos con desnaturalización a 98°C 10 seg y annealing a 57°C 4 min, y por último 20 ciclos con desnaturalización 10 seg a 98 y annealing 4 min a 68°C. La reacción se realiza por octuplicado a volumen final 25 μ L cada reacción, de manera de obtener suficiente amplicón para transfectar. Se corre en un gel para verificar la amplificación, se limpia la mezcla de PCR con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania) y se determina la concentración.

2.1.3 Clonación de CAT en pLIC tdTomato DHFR

Como se mencionó anteriormente, al constructo de tdTomato_CAT fue generado particularmente para estos experimentos a partir de un vector pLIC_tdTomato_DHFR al cual se le sustituyó por clonación con enzimas de restricción el DHFR por CAT. Se realizó la digestión tanto del vector receptor pLIC_tdTomato_DHFR como del donante pLIC_3HA_CAT con las enzimas de restricción XhoI y XbaI (New England Biolabs, USA). Con esta digestión se logra escindir los cassette de selección de ambos vectores. Las digestiones fueron de 1 μ g de vector y se combinaron ambas enzimas: 1 μ L XbaI, 1 μ L XhoI, 5 μ L NEBuffer 2.1 10x, 1 μ g de pLIC (TT_DHFR o 3HA_CAT), agua csp 50 μ L. Se digiere durante 2 hs a 37°C y luego se le agrega fosfatasa alcalina 1 μ L y 5.5 μ L de su buffer (Roche, Suiza) y se incuba por una hora más. Se corre las digestiones en un gel de agarosa al 1% y se cortan las bandas de pLIC_tdTomato y la del CAT para recuperarlas del gel con Pure Link Quick Gel Extraction Kit

(Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las indicaciones del producto. La ligación se llevó a cabo con una relación inserto:vector de 3 a 1. Para el cálculo de las cantidades contemplando el tamaño del vector y del inserto en pares de bases, se empleó la siguiente expresión: masa del inserto=(relación inserto/vector)x(la masa del vector en 1 μ L)x(la relación de la longitud inserto/vector).

2.2 Cultivo, transfección y clonación

2.2.1 Cultivo de los parásitos

La cepa parental RH Δ ku80 de *Toxoplasma gondii* y sus transfectantes (Huynh & Carruthers, 2009) fueron cultivadas por pasajes serial en la línea celular VERO mantenidas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con penicilina-estreptomina y complementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco) y L-glutamina 0.5 mM (Gibco, USA) a 37°C y 5% de CO₂. Para el clonado de las cepas se empleó la línea celular hRPE, las condiciones de cultivo fueron iguales que las de la línea VERO.

2.2.2 Protocolo de transfección

Primero se amplificaron los vectores de pSAG1::Cas9-U6::sgRNA mediante maxiprep. Para ello se transformaron los vectores en la cepa de *E. coli* DH5- α y se cultivaron ON a 37°C en 100 mL de LB con ampicilina 0.1 μ g/ μ L (Sigma, USA). Posteriormente los vectores fueron purificados empleando PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Se precipitaron los vectores de pSAG1::Cas9-U6::sgRNA junto con sus respectivos insertos de PCR para cada gen que se desea hacer el knock-in. Se toma 50 μ g de pSAG1::Cas9-U6::sgRNA y 50 μ g de inserto por cada transfección y se precipitan en un mismo tubo al que se le agrega 2 volúmenes de etanol absoluto y 1:10 de acetato de sodio 3M, pH 5. Se incuba por 1 hora y media a -80°C y se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a velocidad máxima. Se deja el pellet en etanol al 70% a -20°C hasta su utilización. Dentro de la cámara de flujo al momento de transfectar, se resuspende en 100 μ L de citomix por transfección (2 mM EDTA, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂; pH 7.6).

La cepa parental fue recolectada a partir de un cultivo casi lisado (se refiere a un cultivo celular infectado con *Toxoplasma*, al cual ya los parásitos se han multiplicado a tal punto de tener casi todas las células hospederas infectadas y llenas de parásitos en su interior, las cuales empiezan a sufrir la lisis celular producto del egreso del parásito de la célula hospedera) de una botella T75, para ser filtrada y lavada con 10 ml de citomix. Previo a la centrifugación del lavado, se tomaron 10 μ L para calcular la concentración de parásitos, siendo necesario hacer una dilución. Todas las centrifugaciones de parásitos se realizaron a 400 g durante 10 minutos. Una vez conocida la concentración, se llevó a 5x10⁷ y 1x10⁸ parásitos cada 700 μ L de citomix por transfección.

100 μ L de 1 μ g/ μ L de DNA (partes iguales de inserto y pSAG1::Cas9-U6::sgRNA) fueron electroporados en 700 μ L de parásitos empleando un electroporador BTX Electro Cell Manipulator 600, y un pulso de 2.5 A, 24 ohm, 2.0 kV. Luego fueron colocados los parásitos en cultivo toda la noche sin selección. Al día siguiente se cambia el medio por uno con selección: las transfecciones con el inserto NeonGreen_CAT y tdTomato_CAT fueron con cloranfenicol (1:5000 de un stock a 34mg/mL) y las de YFP_DHFR con pirimetamina (25mM).

Pasada la selección, se chequean las poblaciones por PCR para detectar los insertos en los loci correctos con los primers forward: AP2VI-1_screenF, AP2VIIa-1_screenF y CycY_screenF y el

primer reverse que hibrida en la proteína fluorescente del donador (YFP_rev, NeonGreen_rev y tdTomato_rev) (Tabla 1).

2.2.3 Enriquecimiento por cell sorting y clonación

Dada la baja eficiencia de transfección que se obtiene por el método utilizado (10% aproximadamente), se realizaron enriquecimientos por cell sorting con el citómetro BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences) seleccionando los parásitos fluorescentes. Tanto en el blanco como en la muestra fluorescente primero se identificó la población de parásitos en un dot plot de SSC-H vs. FSC-H. Una vez seleccionada la población, se excluyen los dobletes en un dotplot de FSC-H vs. FCS-A tomando solamente los eventos de la diagonal y los que están por encima de esta. Luego, se estableció el blanco de fluorescencia con la población parental no transfectada, para ello se visualizó la población en un dot plot y en un histograma con el eje de las abscisas expresando la fluorescencia para PE (PE-A más específicamente). El PE es el equivalente a fluorescencia de tdTomato. De esta forma quedó establecido en qué porciones de los gráficos se encuentra la población no fluorescente, así como los gráficos y gates necesarios para identificar y adquirir la muestra fluorescente.

Para la preparación de la muestra, se tomó una botella T75 de parásitos a punto de lisis y se rompieron las células hospederas haciéndolas pasar por una aguja 26G de una jeringa de 1 ml. Se filtró los restos celulares con un filtro de 3 µm y de ser necesario, se centrifugaron para renovarles el medio. El día previo, se dejó bloqueando con suero fetal bovino (Gibco) los tubos Falcon de 15 mL que fueron empleados para depositar los parásitos durante el sorting. Inmediatamente luego del sorting, las poblaciones enriquecidas se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos para quitar el exceso de buffer del sorting y se colocaron en cultivo.

A partir de las poblaciones enriquecidas se clonó por dilución límite en placas de 96 wells a las cuales se les sembró células hRPE el día previo. Pasado unos 10 días, se seleccionan los wells que posean una única placa de lisis para determinar por PCR si es que constituyen una población knock-in clonal. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con MangoMix 5x (Meridian Bioscience, USA), 1 µL forward primer 10 µM 1 µL reverse primer 10 µM, agua csp 10 µL. Desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos con desnaturalización a 95°C, annealing a 55°C y extensión a 72°C 30 segundos. Se llevaron a cabo dos tipos de reacciones con diferentes pares de primers para testear cada población: (1) Para determinar si la población posee el inserto se utilizaron los primers: screen forward primer que hibrida en el extremo 3' de cada gen (AP2VI-1_screenF, AP2VIIa-1_screenF y CycY_screenF) más un screen reverso que hibrida en los 5' de la proteína fluorescente (YFP_rev, NeonGreen_rev y tdTomato_rev), (2) Para determinar por negativa, que la población no sea una mezcla entre la cepa parental y knock-in en caso de que amplifique en (1), se utilizan Screen forward anteriores que hibridan en el extremo 3' de la CDS de cada gen y los primers screen reverso (AP2VI-1_screenR, AP2VIIa-1_screenR y CycY_screenR). Se espera que no amplifique si estamos ante una población compuesta solamente por mutantes knock-in.

2.3 Evaluación del sorting como método para realizar enriquecimientos de diferentes fases del ciclo celular

Una vez obtenidas las cepas fluorescentes, estas fueron evaluadas para generar poblaciones por cell sorting enriquecidas en diferentes fases del ciclo celular. Para lograrlo, se explotó la expresión fluctuante a lo largo del ciclo celular de las proteínas marcadas con proteínas fluorescentes de la primera parte. Este perfil de expresión va a generar que la intensidad de fluorescencia del parásito fluctúe junto con la expresión de la proteína de fusión. Son estas diferentes intensidades de

fluorescencia las que intentamos correlacionar a cada fase del ciclo celular a través del sorting. Para determinar que las poblaciones sorteadas se encuentren enriquecidas en determinada fase del ciclo celular, las mismas son evaluadas por inmunofluorescencia indirecta y RT-qPCR.

2.3.1 Microscopía

La evaluación por inmunofluorescencia indirecta de las poblaciones sorteadas se llevó a cabo empleando anticuerpos marcadores contra proteínas que se localizan en estructuras subcelulares que permiten determinar el momento del ciclo celular en el que se encuentra el parásito de acuerdo a la conformación que adquieran. Estos marcadores son: IMC-1 (complejo de membrana interno) el cual se localiza por debajo de la membrana plasmática; con el mismo se puede observar la formación de las células hijas durante fines de fase M y citocinesis. Anti-centrina el cuál se localiza en los centriolos de los centrosomas; esta permite diferenciar G1 de fase S y M ya que los mismo se encuentran duplicados en las últimas dos fases mencionadas. Y anti-H2Bz, una variante de la histona H2B que permite ver el núcleo y cómo varía su tamaño, contenido y forma a lo largo del ciclo.

Se preparó la población clonal fluorescente para el sorting tal como se describe en 1.3.3. Una vez sorteadas las poblaciones seleccionadas, estas fueron puestas en cultivo en placas con cubreobjetos previamente cubiertas con células hospederas confluentes, los cuales fueron fijados luego de transcurridas diferentes horas post sorting. Se fijaron muestras a diferentes tiempos dependiendo del ensayo, pero todas fueron dentro de las 72hs post sorting.

2.3.2 Inmunofluorescencia indirecta

Se fijó con etanol absoluto 15 minutos a temperatura ambiente (RT) y luego se dejó con PBS 1x en el caso que se realizaron fijaciones a diferentes tiempos en una misma placa. El bloqueo se realizó con BSA 3% (Sigma) en PBS (15 min, RT). Los anticuerpos primarios: mouse anti-centrina 1:1000 (Millipore), mouse anti-IMC-1 1:500 obsequio del Dr. Gary Ward, University of Vermont (Mann, & Beckers, 2001) y rabbit anti-H2Bz (1:500) (obsequio del Dr. Sergio Angel, INTECH, Universidad de San Martín), todos diluídos en solución de bloqueo y se incubaron por una hora a RT o toda la noche a 4°C. Luego de 5 lavados con PBS 1x, se incubó los secundarios durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: goat anti-mouse conjugado a Alexa 488 y goat anti-rabbit conjugado a Alexa 594 (ambos 1:1000, Invitrogen). Finalmente se incubó durante media hora con 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) 1 µg/mL y se montó con medio de montaje ProLong™ Gold Antifade Mount (Invitrogen).

Las adquisiciones de imágenes se realizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 880, el objetivo usado fue Plan Achromat 63x/1.4 Oil y se procesaron en FIJI ImageJ versión 2.9.0 (Schindelin et al, 2012). Las cuantificaciones se llevaron a cabo en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, observando directamente el campo y contando manualmente. Se contabilizaron 500 parásitos individuales por cada condición estudiada, diferenciándolos de parásitos en interfase de los que estaban en división. Y se registró en 100 vacuolas el número de parásitos por vacuola en muestras no sorteadas y sorteadas.

2.3.3 RT-qPCR

En los ensayos de RT-qPCR intentamos determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran enriquecidas las poblaciones al momento que salen del sorting con respecto a una población sin ningún tipo de enriquecimiento. Se evaluó el nivel de expresión de diferentes genes cuya expresión fluctúa a lo largo del ciclo celular y si existen diferencias entre una población asincrónica y una población enriquecida en un fase específica.

2.3.4 cDNA

Para la generación de los cDNA, primero se realizó la extracción de RNA con el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research) siguiendo las indicaciones del mismo. Se determinó empíricamente que el número de parásitos necesarios por muestra sorteada debe ser de al menos 1.5 millones para poder realizar una extracción en la que se recupere ARN suficiente como para poder hacer la síntesis de cDNA. De inmediato se realiza la síntesis de cDNA con SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando oligo-dT. Debido a la escasa muestra que se obtiene, se optó por escalar la reacción de síntesis cinco veces más y se completó con ARN en cantidad suficiente para el volumen de reacción especificada en el protocolo del proveedor.

Cada cDNA es testeado por PCR para detectar contaminación con DNA genómico con un par de primers para la amplificación del gen GAPDH. Para esto se empleó 5 µL MangoMix 5x (Meridian Bioscience, USA), 1 µL de cDNA, 1 µL GAPDH forward primer 10 µM 1 µL GAPDH reverse primer 10 µM, agua csp 10 µL. Annealing a 60°C y extensión de 30 segundos.

2.3.5 Panel de genes ciclo celular específicos

Se elaboró un panel de genes marcadores del ciclo celular. Para esto se recurre a la herramienta "Identify Genes based on *T. gondii* ME49 Cell Cycle Expression Profiles (RH) Microarray (fold change)" disponible en la base de datos ToxoDB, la cual emplea datos de perfiles de expresión determinados por microarray a diferentes horas después de una sincronización con timidina (Behnke et al, 2010). Esta herramienta permite encontrar genes que se encuentren regulados negativamente o positivamente con un fold change especificado por el usuario y a un tiempo específico post sincronización del ciclo celular. La selección inicial de los genes marcadores se realizó partiendo de la base de que el ciclo celular de *T. gondii* dura unas 6 hs aproximadamente, que la expresión fluctuante y cíclica de estos genes se da durante este periodo de tiempo y que usualmente cuando un gen se encuentra regulados positivamente a tiempo 0, a las 3hs se va a encontrar regulados negativamente o sea a la mitad del ciclo. Dado el método de sincronización con el que se recabaron estos datos, el tiempo 0 corresponde a la fase S, pasando por mitosis y citocinesis a las 4hs y por último comenzar con la fase G1 entre las 4 y 8 hs post sincronización. Se armaron categorías de genes en base a la hora en que se encuentren regulados positivamente o negativamente: genes que se encuentran regulados positivamente a las 0 hs y negativamente a las 3 hs, positivo a las 4 hs y negativo a la 1 hs, y positivo a las 5 hs y negativo a las 2 hs. Finalmente se eligen los dos genes que posean los fold change mayores para cada categoría, que poseen intrones (de modo de poder distinguirlos del ADN genómico) y se encuentren bien anotados (cuya anotación coincida con la anotación comunitaria en Apollo, o exista evidencia empírica de su anotación por transcriptómica o proteómica).

2.3.6 qPCR

Los primers de los genes marcadores seleccionados se diseñaron empleando el NCBI Primer BLAST (Ye et al, 2012). Se le especificó accession number para cada gen, que el producto de PCR sea entre 100 y 150 pb, que los primers deben estar separados por al menos un intrón, su temperatura de melting óptima sea de 60°C y que no exista una diferencia de temperaturas mayor a 2°C entre los primers pares. En Database se le especificó RefSeq mRNA y en Organism, *Toxoplasma gondii* ME49 (taxid:508771). Se seleccionan dos pares de primers por cada gen para la puesta a punto (Tabla 2).

Las reacciones de qPCR se realizaron con FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) en el termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System. La mezcla de reacción consistió en 0.5 µL de primer mix (forward y reverse primer a 30 µM), 12.5 µL SYBR Green, 11 µL de agua y 1 µL cDNA. En todas las reacciones, incluidas las réplicas técnicas, se incluye un blanco con agua y como

gen housekeeping la Tubulina (primers Tubulina fwd y rev). El diseño y la corrida del programa de ciclado se llevó a cabo en el software Design and Analysis Software v2.6.0 con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial 95°C 10 min, desnaturalización 95°C 10 seg y annealing 60°C 30 seg por 40 ciclos.

Tabla 1. Primers PCR tiempo final

Nombre primer	Secuencia
sgRNA_AP2VI-1	CCT GGG TTT GAT ACC GAC ATg ttt tag agc tag aaa tag c
sgRNA_AP2VIIa-1	CGA GGC CGG TAA GGC GGG CCg ttt tag agc tag aaa tag c
sgRNA_CycY	CGA GAC AAT GTC CTG ACC GTg ttt tag agc tag aaa tag c
U6	AAC TTG ACA TCC CCA TTT AC
M13 reverse	GTA AAA CGA CGG CCA G
AP2VI_LIC_fwd	TAG CGG AAG TTT GGA AGT GGA ATG AGC CCT GGG TTA AAA TTG GAA GTG GAG GAC GG
AP2VI_LIC_rev	ACG CTG AAC CGT CCC TGC TCG TTA ATC GCA GTG CTC GAA TTG GAG CTC CAC CGC
AP2VIIa_LIC_fwd	ACT CTT CGA GCG TGG ATT GGC GGC GAC GAG GCC GGA AAA TTG GAA GTG GAG GAC GG
AP2VIIa_LIC_rev	GTG TCC TGT AAC TCT CCT CTG GCT CTG GGA GTT ACC GAA TTG GAG CTC CAC CGC
CycY_LIC_fwd	GCA AAT TTA CTG ACT GGA AGG CCG AGA CAA TGT CCA AAA TTG GAA GTG GAG GAC GG
CycY_LIC_rev	AGG AAA TCC TTG ACT CTT GAG GAT TGT TTC TCC ATC GAA TTG GAG CTC CAC CGC
CycY_screenF	GAG GTC GTC GTC AAG CCG TC
CycY_screenR	CAG TCA GTG CAC TAC TGC TA
APVI-1_screenF	CTC GTA CGA TTC CTA CGC GAT GA
AP2VI-1_screenR	TGC AGG AGT TAA TGG CGG CT
APVIIa-1_screenF	CTC GAG ACT ACC GAA TCT CGG A
AP2VIIa-1_screenR	TGC CAC TAG GCT CCT ACA CG
YFP_rev	GGC GGA TCT TGA AGT TCA CC
NeonGreen_rev	AGG TAC TGA TGG AAG CCA TAC CCG
tdTomato_rev	ATG ACC TCC TCG CCC TTG CT
GAPDH fwd	TGG TGT TCC GTG CTG CGA TGG AAC
GAPDH rev	GAG CTT GCC GTC CTT GTG GCT GAC
Tubulina fwd	GAC GAC GCC TTC AAC ACC TTC TTT
Tubulina rev	AGT TGT TCG CAG CAT CCT CTT TC

Tabla 2. Primers RT-qPCR

Nombre primer	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
TGME49_294330 fwd 1	CCTGATCACGAAACCAATG	54.98	77
TGME49_294330 rev 1	GTTGTGTCTAAGGGCAAGTA	55	
TGME49_294330 fwd 2	GTGGCAATACCACATACAGA	55.15	119
TGME49_294330 rev 2	AATCTTTGCACTCGAACTCT	55.01	
TGME49_243200 fwd 1	CAGTCTCGAGCAGGCTAATG	62	90
TGME49_243200 rev 1	CATCCAACCTCCGTGCGAT	62	
TGME49_243200 fwd 2	TCCTCGCAGCGTTCTATCAC	59.9	86

TGME49_243200 rev 2	GCGACATTGGGCTTTGAGTT	59.4	
TGME49_254890 fwd 1	TCCCTGACAAGGATGGAAGC	59.38	141
TGME49_254890 rev 1	GTCCGTCGATAGCCCCAAAA	60.11	
TGME49_254890 fwd 2	TGCTGTGCCGTTACATTTT	59.26	140
TGME49_254890 rev2	CGCACCTATGTACCGGATG	60.32	
TGME49_287040 fwd 1	CCGCGACAGCTGATACTCAT	59.97	116
TGME49_287040 rev 1	TGTGTAGGAACTGGGTTTCGC	59.97	
TGME49_287040 fwd 2	ATACTCATTGCGCCAACGGA	60.11	103
TGME49_287040 rev 2	GTGTAGGAACTGGGTTTCGCC	60.67	
TGME49_204050 fwd 1	TGGGGAATGGATGCGTTGAA	59.96	92
TGME49_204050 rev 1	ACACAAACTAGTGGCCTCCG	59.97	
TGME49_204050 fwd 2	CTTCCGTGCAAATTCCTCGC	60.18	128
TGME49_204050 rev 2	TCACTTGCCATGAACCTCC	59.96	
TGME49_243930 fwd 1	GCTGTGCAACTGAGTGATGC	60.11	98
TGME49_243930 rev 1	CCCTTCACGACAGCTTCCAT	60.04	
TGME49_243930 fwd 2	CTGTGCAACTGAGTGATGCG	59.83	107
TGME49_243930 rev 2	GAATGAGTGCCCCTTACGA	60.04	

3 Resultados

3.1 Generación de las cepas knock-in indicadoras del ciclo celular

La generación de una cepa indicadora del ciclo celular implicó primero la identificación de posibles proteínas indicadoras de cada fase del ciclo celular, como fue descrito en la metodología. La selección de los genes de expresión dependiente del ciclo celular candidatos para el marcado se realizó en base a diferentes criterios tomados a partir de la literatura disponible y se mencionan en la sección materiales y métodos. Habiendo seleccionado inicialmente 12 candidatos para posibles indicadores, comenzamos ensayando la realización de tres knock-in en donde se le introdujo el marco abierto de lectura de una proteína fluorescente en el marco de lectura de los diferentes genes de expresión dependiente del ciclo celular. Se logró exitosamente la generación del knock-in en el gen de la Ciclina Y (*CycY*) con la introducción del marco de lectura abierto de la proteína fluorescente tdTomato, en su extremo 3' y el cassette de resistencia CAT para la selección.

Las proteínas fluorescentes y los marcadores de selección que se emplearon fueron las que se encontraban disponibles en el laboratorio, las cuales cumplían con el criterio de ser compatibles con los filtros de excitación y emisión de los citómetros y el sorter disponibles en el Instituto. La cepa parental de la que se partió fue RH $\Delta ku80$ la cual tiene depletado la proteína ku80, responsable del mecanismo de reparación del ADN independiente de secuencias homólogas (NHEJ). Por lo tanto la cepa RH $\Delta ku80$ no va a ser capaz de reparar su ADN por mecanismos independientes de la recombinación homóloga, siendo este último el mecanismo explotado para generar los knock-in. A su vez se empleó el sistema de CRISPR-Cas9, en este caso formado por el vector *pSAG1::Cas9-U6::sgRNA*, para favorecer la recombinación homóloga en el sitio deseado a través de la interrupción en el extremo 3' de cada gen.

3.1.1 Generación de las cepas indicadoras

Las primeras seis transfecciones que se realizaron (resumidas en la tabla 1) involucraron a los tres genes *ApiAP2VI-1*, *ApiAP2VIIa-1* y *CycY* y los insertos YFP_DHFR y mNeonGreen_DHFR. Estas se seleccionaron con pirimetamina ya que el cassette de resistencia introducido fue el de la dihidrofolato reductasa (DHFR) la cual provee resistencia a esta droga. La evaluación de estas transfecciones se llevó a cabo a las 48 hs post transfección y luego de pasado el periodo de selección con pirimetamina, el cual dura unos 10 días aproximadamente. De todas estas transfecciones, solo se observó por PCR la inserción de YFP_DHFR y de mNeonGreen en el locus de *CycY* y de mNeonGreen en *ApiAP2VIIa-1*. Sin embargo, por microscopía no se lograron observar parásitos con expresión de estas proteínas fluorescentes. Al momento que se realizaron las primeras transfecciones, que fueron las de YFP_DHFR, no contábamos con la posibilidad de realizar un enriquecimiento de las poblaciones por cell sorting, ya que este se encontraba inoperativo, por lo que se desistió de seguir trabajando con esta construcción ya que se evaluó que el nivel de fluorescencia podría no ser suficiente para enriquecer. En su lugar optamos por transfectar mNeonGreen_DHFR, ya que mNeonGreen posee una intensidad de fluorescencia mayor que YFP. Para las poblaciones transfectadas con mNeonGreen, ya contábamos con la posibilidad de hacer sorting, por lo que se realizaron enriquecimientos de estas poblaciones. Luego de tres rondas de sorting, testeamos por PCR la poblaciones enriquecidas logrando detectar el inserto de mNeonGreen en las dos poblaciones que pasaron las tres rondas. Posteriormente, estas poblaciones fueron clonadas por dilución límite. Sin embargo, no conseguimos generar poblaciones clonales. A su vez, se realizaron varios testeos por

PCR durante un periodo de tiempo de las poblaciones policlonales enriquecidas observándose que con el paso del tiempo se hacía más difícil detectar el inserto, lo que sugiere que la proteína de fusión no estaba inserta de manera estable. A su vez, observando los datos de la Tabla 2 donde se puede ver como evolucionan las poblaciones luego de sucesivos sorting, hipotetizamos que el knock-in le confiere a los parásitos un fitness negativo que los pone en desventaja frente a los parásitos salvajes que también forman parte de la población policlinal. Observándose una disminución de la representatividad de los parásitos mNeonGreen positivos en cada población a medida que pasa el tiempo. Como consecuencia de esto último, resolvimos volver a transfectar, pero esta vez probando un nuevo inserto, el de tdTomato_CAT.

Tabla 1. Resumen de las transfecciones realizadas

Gen	Nro. ToxoDB	sgRNA	Inserto	Selección
<i>ApiAP2VI-1</i>	TGME49_240460	sgRNA_AP2VI-1	YFP_DHFR	Pirimetamina
			mNeonGreen_DHFR	Pirimetamina
			tdTomato_CAT	Cloranfenicol
<i>ApiAP2VIIa-1</i>	TGME49_280470	sgRNA_AP2VIIa-1	YFP_DHFR	Pirimetamina
			mNeonGreen_DHFR	Pirimetamina
			tdTomato_CAT	Cloranfenicol
<i>CycY</i>	TGME49_266900	sgRNA_CycY	YFP_DHFR	Pirimetamina
			mNeonGreen_DHFR	Pirimetamina
			tdTomato_CAT	Cloranfenicol

Tabla 2. Resumen de los porcentajes de enriquecimiento post sorting para las tres poblaciones transfectadas. Para las poblaciones *ApiAP2VIIa-1_mNeonGreen* y *CycY_mNeonGreen* se realizaron tres rondas sucesivas. La primera se realizó a los 27 días, la segunda a los 48 días y la tercera a los 70 días luego de la transfección.

Población	1er Sorting		2do Sorting		3er Sorting	
	% pre sorting	% post sorting	% pre sorting	% post sorting	% pre sorting	% post sorting
<i>ApiAP2VI-1_mNeonGreen</i>	2.4	51.7	-	-	-	-
<i>ApiAP2VIIa-1_mNeonGreen</i>	2	46	15	70	11	24
<i>CycY_mNeonGreen</i>	1.4	20	8	60	15	34

Las últimas tres transfecciones involucraron al inserto tdTomato_CAT y a los tres genes anteriores. A las 48 post transfección se logró detectar por PCR y microscopía, la inserción del tdTomato y la expresión del mismo respectivamente en la población de CycY_tdTomato_CAT (Figura 6). Se optó por hacer enriquecimientos antes de clonar a dilución límite, ya que la eficiencia de recombinación fue muy baja. Se realizaron enriquecimientos de 100 parásitos por pocillo en placas de 12 well de forma exitosa, observándose por PCR una clara amplificación del inserto en el locus correcto en 2 de 12 pocillos. Posteriormente se seleccionó una de las poblaciones enriquecidas manualmente y se sorteó de forma exitosa con un 83.9% de pureza. A partir de esta población, logramos clonar eficientemente por dilución límite, obteniéndose una gran cantidad de clones knock-in positivos.

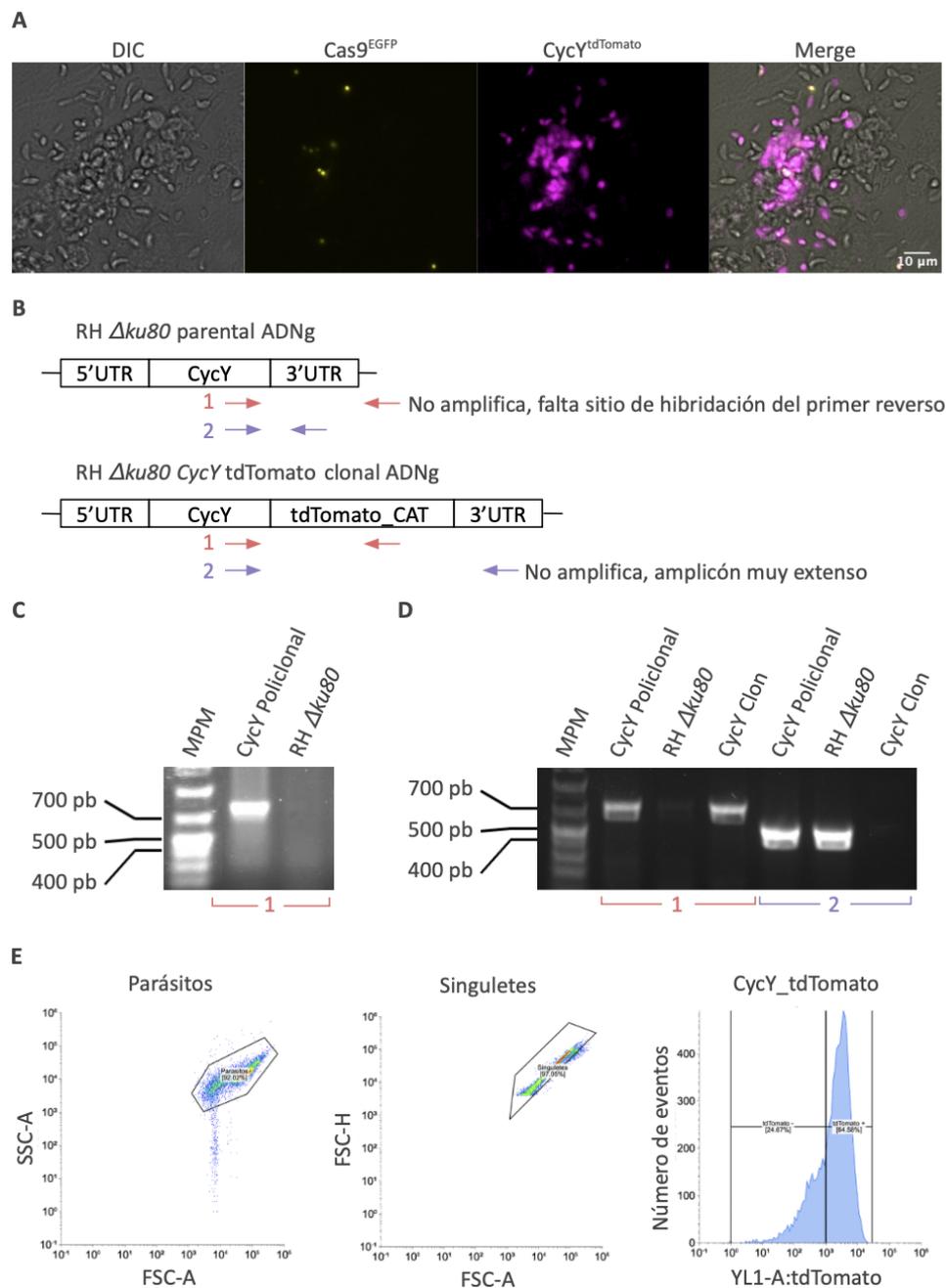


Figura 6. A Microscopía de epifluorescencia de la población CycY_tdTomato_CAT 48hs post transfección. En DIC se observa una célula hospedera (VERO) siendo lisada y cómo los parásitos salen desde la vacuola parasitófora hacia el medio. La expresión transiente de la Cas9 fusionada a EGFP se localiza en los núcleos de algunos parásitos, mientras que en magenta se observa la expresión endógena de CycY fusionada a tdTomato. **B** PCR a las 48hs post transfección donde se corrobora la inserción del inserto en el locus de CycY en la población transfectada (CycY policlonal) y su ausencia en la población parental (RH $\Delta Ku80$). **C** PCR luego de realizar el clonado por dilución límite obteniendo una población clonal (CycY clon). En los tres primeros carriles de la izquierda (1) se corresponden a un par de primers que amplifica el extremo 3' del gen CycY y el extremo 5' de tdTomato, se puede observar que en la población parental RH $\Delta Ku80$ no hay amplificación. Mientras que los restantes carriles (2) de la derecha se observa la clonalidad de la población clonal a través de un par de primers que amplifican el extremo 3' y el 5' UTR de CycY, tanto en la población parental como en la policlonal se observa amplificación de este segmento, ya que esta última está conformada por una mezcla de parásitos con el knock-in y salvajes. En la población clonal, este tramo queda interrumpido por el inserto siendo este muy extenso como para ser amplificado en el tiempo de extensión de la PCR. **D** Análisis por citometría de flujo que corrobora la expresión de CycY_tdTomato en la población clonal.

3.2 Evaluación del sorting como herramienta para obtener poblaciones enriquecidas en diferentes fases del ciclo celular

Una vez obtenida la cepa de CycY_tdTomato validada como una cepa monoclonal que expresa tdTomato fusionado a la CycY, se continuó con la determinación y puesta a punto para la obtención de poblaciones enriquecidas en estadios específicos del ciclo celular por cell sorting. Para lograr esto, se asumió que la expresión de la proteína de fusión CycY-tdTomato va a tener un perfil de expresión similar al reportado para la CycY salvaje, la cual fluctúa a lo largo del ciclo celular y posee un mayor nivel de traducción y de presencia citoplasmática en G1 tardío (Alvarez y Suvorova, 2017). Explotando esta fluctuación se determinó un perfil de expresión CycY-tdTomato por citometría de flujo. En el mismo, se puede diferenciar poblaciones con diferentes intensidades de fluorescencia para PE lo que se traduce en diferentes niveles de tdTomato que se correlaciona con la expresión fluctuante de CycY (Figura 8).

Para evaluar las poblaciones sorteadas en cuanto al enriquecimiento en etapas específicas del ciclo celular, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta y RT-qPCR. En la inmunofluorescencia se emplearon anticuerpos primarios marcadores de estructuras celulares, estos permiten establecer una aproximación al momento del ciclo celular que está atravesando el parásito a través de la conformación que adquieren. El principal marcador utilizado fue un anticuerpo contra IMC1, una proteína del complejo de membrana interno. Básicamente este anticuerpo va a marcar las membranas citoplasmáticas del parásito, permitiendo diferenciar la formación de las células hijas dentro de la progenitora y su grado de avance (Figura 7). De esta forma nos permite establecer si el parásito se encuentra o no en división. Mediante la marcación de IMC1 es posible observar cómo estas poblaciones transitan por el ciclo celular con el paso del tiempo, diferenciando parásitos en división y no, y si es posible establecer lo mencionado anteriormente.

Por otro lado, de forma paralela a los experimentos de inmunofluorescencia indirecta, se tomaron muestras para RT-qPCR. En este caso no existían reportes en la literatura que utilizaran genes de expresión específica del ciclo celular como marcadores de las fases del ciclo celular. Primeramente identificamos genes cuyos niveles de expresión variarían de manera sensible entre las etapas del ciclo celular. Utilizando datos de microarray tomados de ToxoDB se elaboró un panel de genes marcadores de las diferentes fases del ciclo celular. Los datos empleados se visualizaron en una

interfaz del ToxoDB denominada “Identify Genes based on *T. gondii* ME49 Cell Cycle Expression Profiles (RH) Microarray (fold change)”, la cual permite filtrar genes con diferentes fold change en función del tiempo post sincronización.

Finalmente se optó por hacer estos ensayos en poblaciones recién sorteadas, no se pusieron en cultivo para que retomen su ciclo ya que el objetivo que se buscaba era establecer si el sorting y la estrategia de gating empleada, constituyen una herramienta para el enriquecimiento fase-ciclo celular-específico.

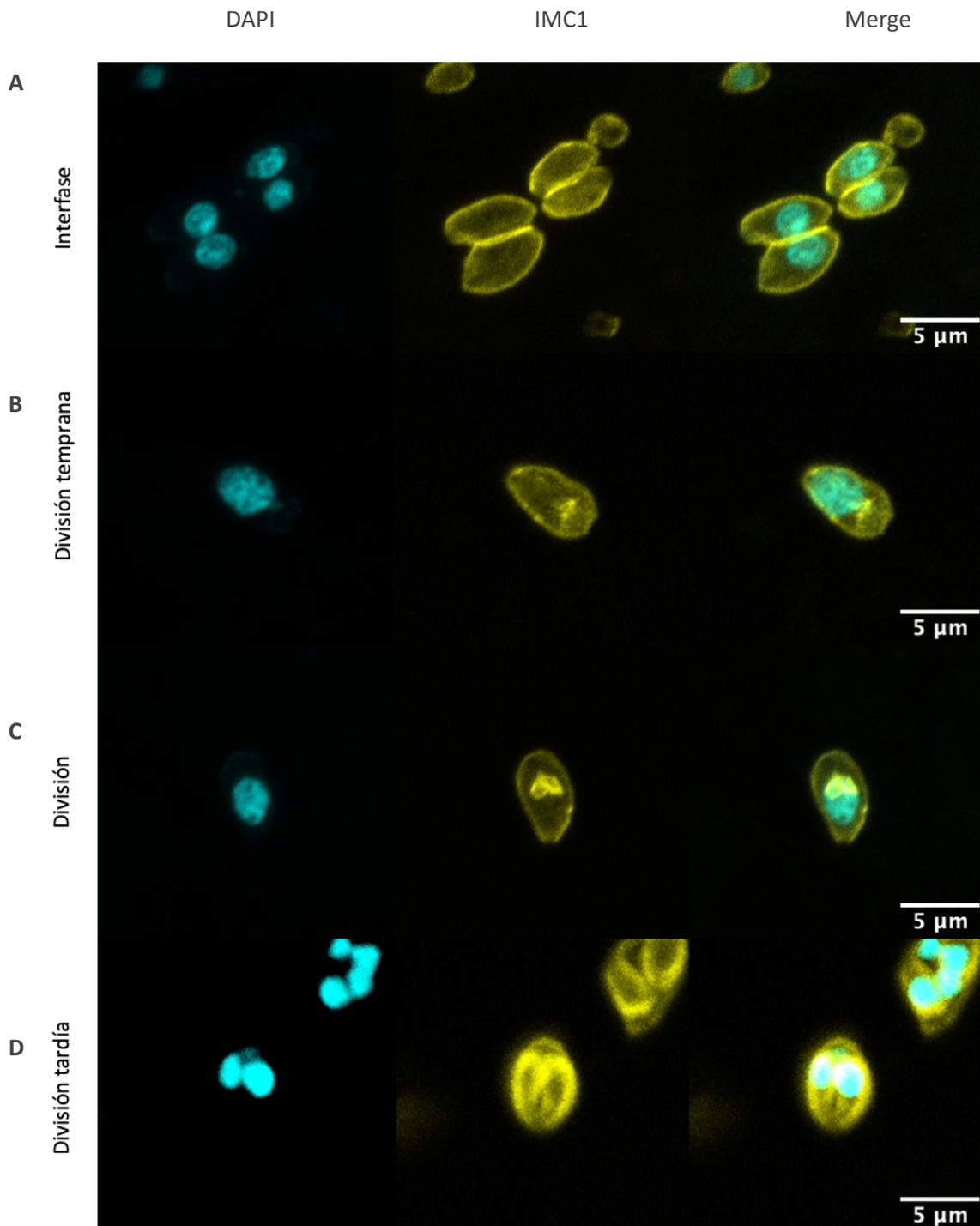


Figura 7. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo contra IMC1 para la determinación y cuantificación de las divisiones celulares. Aquí se muestra cómo progresa la división del parásito con la formación de las células hijas en el interior de la progenitora. En **A** se observan parásitos en interfase, mientras que en **B** ya comienza a aparecer las células hijas en la parte apical del parásito y el núcleo (en DAPI) adquiere un mayor tamaño debido a que duplicó su ADN. En **C** y en **D** se muestran estadios más avanzados y se puede apreciar cómo las células hijas se van elongando hasta completar su formación. En **D** los núcleos ya se segregaron completamente.

3.2.1 Citometría de flujo y cell sorting de la cepa CycY_tdTomato

Del análisis de citometría de flujo obtenidos previo a la realización del sorting, se observó sostenidamente en el histograma de tdTomato un hombro que se repetía en cada ensayo de sorting (Figura 6E). Luego de una puesta a punto en cuanto al gating, se logró establecer una estrategia en el que se sortean dos poblaciones en simultáneo, diferenciándose una por poseer una intensidad de fluorescencia baja y la otra alta. Estas poblaciones en un dot plot de tdTomato, se ubican como una nube claramente separada y positiva (Figura 8A y C). En el mismo gráfico se puede observar eventos intermedios y negativos (sin fluorescencia), pero estos no se corresponden a parásitos (Figura 8A y B, en naranja). Esto último lo comprobamos en los primeros sortings donde sorteamos esta población intermedia y una vez que se ponía en cultivo, no se observaron parásitos por microscopía de campo claro ni por IFA. Finalmente se optó por separar las poblaciones de intensidad baja (CycY tdTomato Low) y alta (CycY tdTomato High) de fluorescencia dentro del pico de los tdTomato positivos (Figura 8D).

Luego de observar el comportamiento de los parásitos luego de que son sorteados, se resolvió testear el estrés que puede llegar a producirles el mismo. Se intentó evaluar si este estrés puede producir un retraso en el proceso de invasión de la célula hospedera y en la progresión del ciclo celular y división con respecto a una población no sorteada. Para evaluar esto, se prepararon dos muestras de una misma botella de cultivo, una fue pasada por el sorting seleccionando el gate que se corresponde a todos los parásitos independientemente de la fluorescencia que tuvieran, y la restante muestra se dejó en la estufa de cultivo. Una vez que el sorting de la primera muestra finalizó, ambas muestras fueron puestas en cultivo y se fijaron a diferentes tiempos para realizar inmunofluorescencia indirecta. Se evaluó el número de parásitos por vacuola en función del tiempo, esto lo que nos indica es si hubo un retraso en la reanudación de la división celular y si se vio afectada la proliferación en el mediano plazo (dentro de las 24 hs luego del sorting para un ciclo celular que dura 6 hs) (Figura 9). Se observó una menor cantidad de vacuolas con dos parásitos (es decir, parásitos que acaban de realizar su primera división luego de invadir la célula) en la población que fue sorteada. Esta diferencia se acentúa a las 16 hs luego de que son puestos en cultivo. Los parásitos que no fueron sorteados presentan un 13% de ventaja relativa frente a la población sorteada en cuanto al número de vacuolas de dos, es decir de parásitos que realizaron la primera división. Se observó además que un 45% de los parásitos no sorteados ya pasaron por al menos una división celular frente a un 23% de la población sorteada. Sin embargo, estas diferencias no parecen ser importantes durante las primeras horas post sorting, sobre todo en el entorno de las 5-8 hs, donde los parásitos están transitando por el primer ciclo celular post sorting. Es en esta ventana temporal donde nos interesa evaluar el estrés provocado, ya que nuestra prioridad es lograr una sincronización (enriquecimiento) durante al menos este primer ciclo.

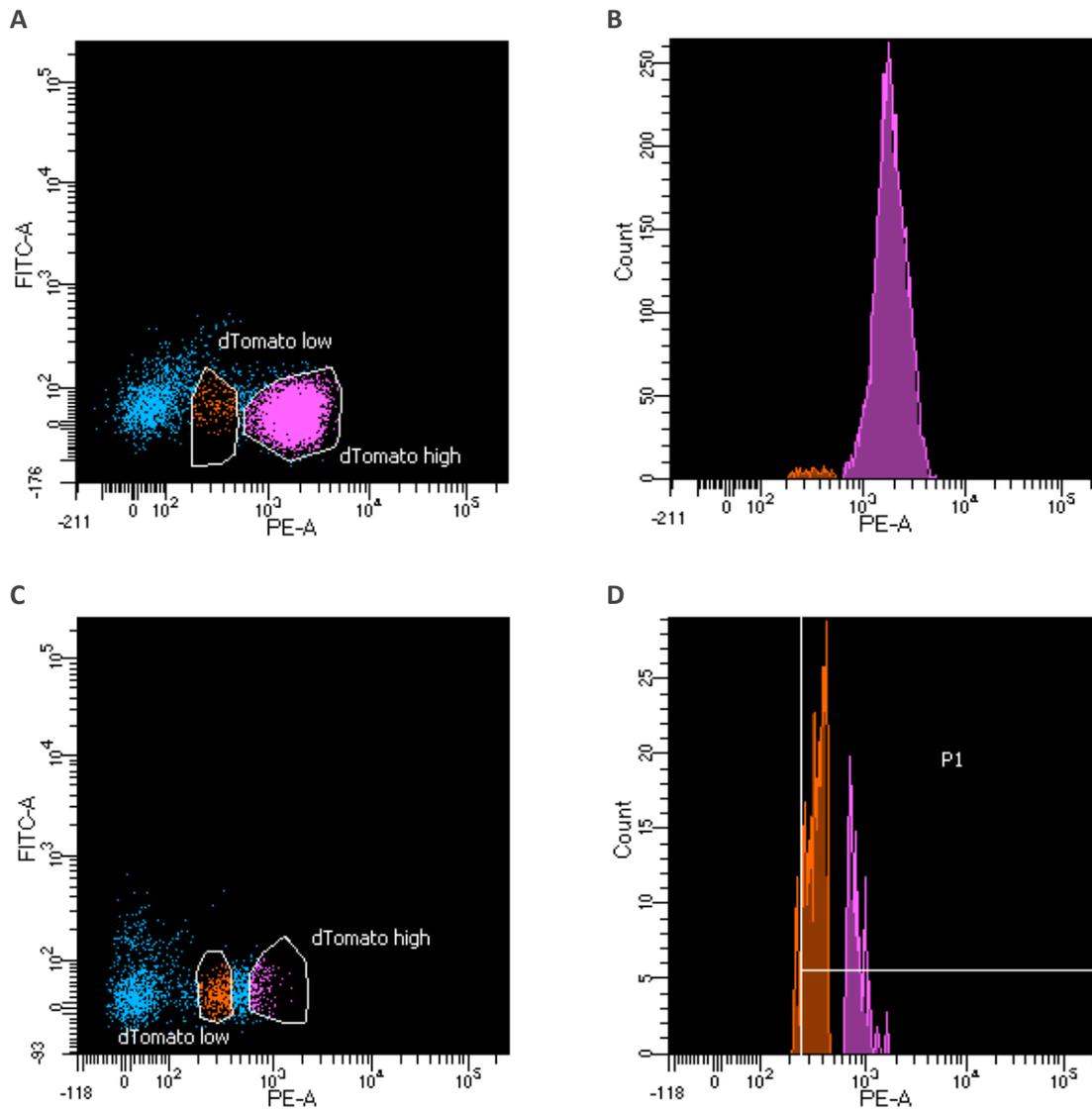


Figura 8. Selección de las poblaciones sorteadas. En A y B se muestra uno de los primeros ensayos de sorting en el que se seleccionó la población tdTomato High, de fluorescencia marcada (magenta) y la población tdTomato Low de fluorescencia intermedia (naranja). Finalmente se determinó por microscopía que esta última población no estaba formada por parásitos. C y D Luego de estos últimos resultados, se optó por tomar como la población Low y High dentro del pico de los tdTomato positivos, siendo la población Low el tramo más bajos del pico y los High el tramo con los valores más altos.

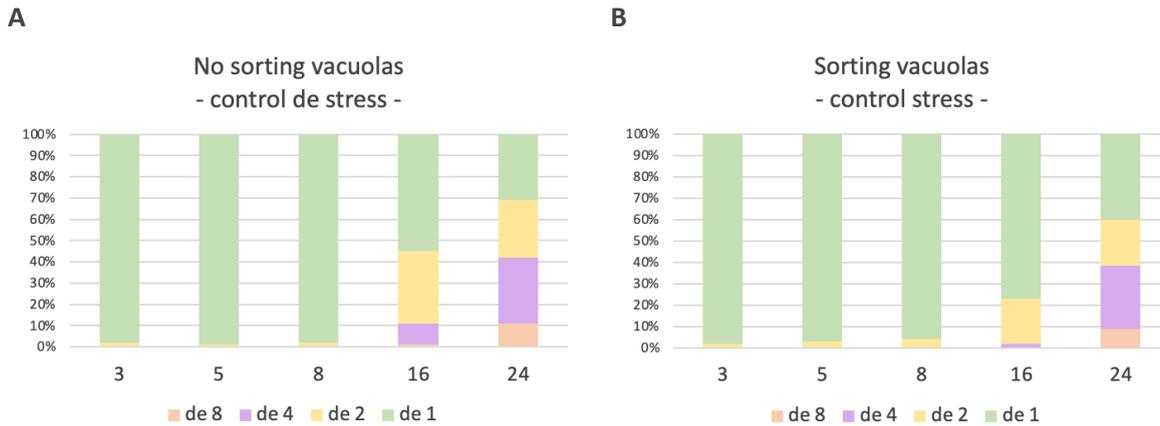


Figura 9. Evaluación del estrés provocado por el sorting en la proliferación celular de *T. gondii*. En **A** se tiene graficados los datos de la población no sorteada. A las 16 hs de puesta en cultivo, el 45% de los mismos ya pasaron por al menos una división celular. Mientras que en **B**, los parásitos sorteados solo el 23% se ha dividido para las 16 hs. Este atraso no resulta ser tan notorio durante las primeras horas de puesta en cultivo, justo cuando los parásitos están transitando por el primer ciclo celular luego de la invasión.

3.2.2 Evaluación de las poblaciones sorteadas por microscopía

Partiendo de poblaciones sorteadas para determinado nivel de expresión de CycY_tdTomato, una vez puestas en cultivo para que retomen su ciclo, se esperaría observar con el paso del tiempo que en la población predomine determinada fase del ciclo celular y que esta se sostenga con el paso del tiempo. Es decir, que la población se encuentra “algo sincronizada” o se encuentra enriquecida en parásitos que transitan por el ciclo celular de forma paralela o “en fase”. La progresión del ciclo celular de las poblaciones obtenidas CycY tdTomato Low y High fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta para así determinar si existe algún enriquecimiento en determinada fase del ciclo celular cuando salen del sorting y si éste perdura en el tiempo. En una primera instancia se evaluó a largo plazo en una ventana temporal de 72 hs, donde se fijaron muestras a las 2, 5, 16, 25, 43 y 72 hs post sorting. Los datos se resumen en la figura 10, donde se contabilizaron parásitos en división versus parásitos en interfase. Si bien la gran mayoría de los parásitos contabilizados se encontraban en interfase, ya para las 72 hs la población adquiere una proporción división:interfase típicas de una población asincrónica en condiciones normales de cultivo. Estas rondan entre un tercio y un cuarto de parásitos en división versus el resto en interfase. Esto se relaciona directamente con los tiempos de cada fase del ciclo celular, a más larga sea la duración de determinada fase, más probable va a ser que se observe un parásito en esa fase y más representada va a estar en la población. En el caso del ciclo celular de *T. gondii*, como ya fue descrito en la introducción, la fase más duradera es G1, mientras que las fases S y M del ciclo celular ocupan aproximadamente un 25% del tiempo total del ciclo.

Luego de observar que a partir de las 72 hs las poblaciones se comportan como una población asincrónica, se continuó explorando cómo se comportan estas poblaciones dentro de las primeras horas. A partir de aquí solo se continuó trabajando con la población CycY tdTomato High ya que la Low se obtenía muy escasa muestra debido a su baja representatividad, lo cual dificulta distribuir la muestra obtenida entre todos los cubreobjetos que se necesitaban en cada experimento de inmunofluorescencia. Primero se optó por incluir una observación a las 8 hs y

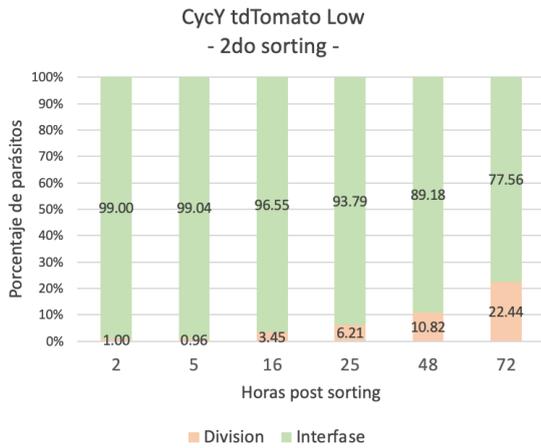
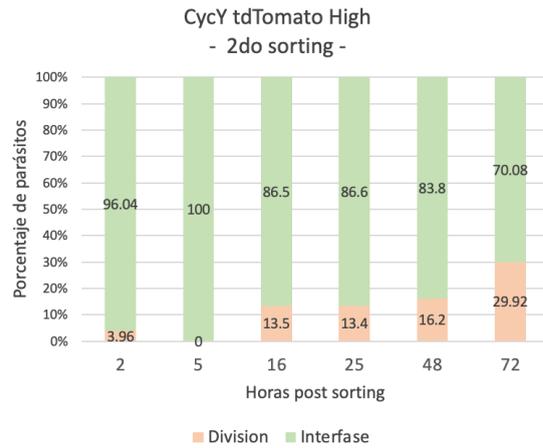
A**B**

Figura 10. Evaluación de las poblaciones sorteadas CycY tdTomato Low y High a largo plazo. En ambos casos se observa que a las 72 hs post sorting ambas poblaciones adquieren una proporción de células en división versus en interfase similar al de una población asincrónica sin ningún tipo de manipulación. En cambio, dentro de las primeras 48 hs se observa que predomina claramente la interfase por sobre la división, algo que no es típico de una población no manipulada.

retrasar la primera una hora, en vez de ser a las 2 hs se cambió para las 3 hs. Aquí se observó que entre las 5 y 8 horas hay una meseta en el número de las divisiones y que pasada las 8 horas esta vuelve a decrecer. Teniendo en cuenta esta observación, se repitió el ensayo y se fijaron muestras a las 6.5 horas para ver qué pasaba con esa meseta. Como se puede ver en la Figura 11B, aparece un incremento notorio de las divisiones seguido de un desplome de las mismas pasada la hora y media. Sin embargo, en el control *No gate* de parásitos sorteados sin ningún gate específico, se observa un comportamiento similar pero menos pronunciado (Figura 11A).

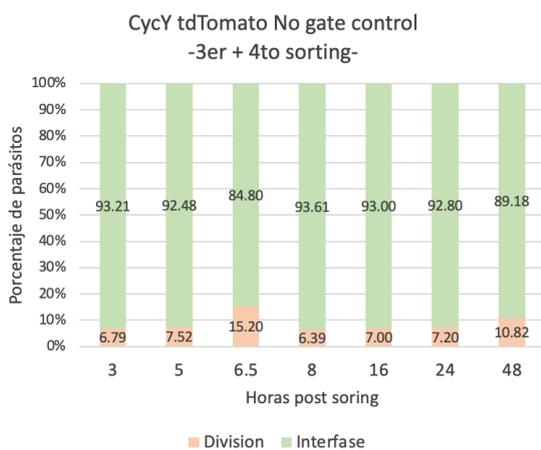
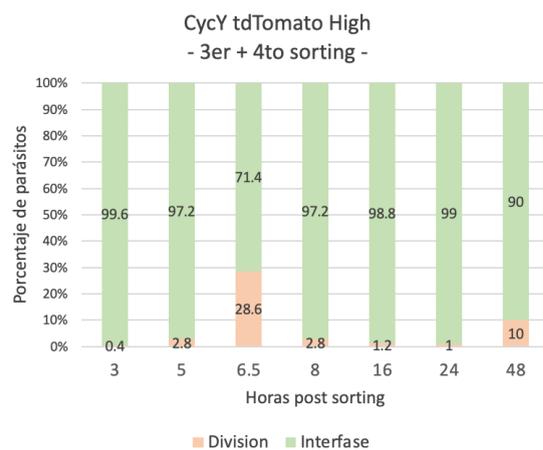
A**B**

Figura 11. Evolución de la población CycY tdTomato High dentro de las 48 hs post sorting. En **A** se tiene el control que consiste en una muestra de parásitos sorteada pero sin ningún criterio de selección (*No gate*). Se puede observar que existe un incremento en las divisiones a las 6.5 hs, pero este no es tan notorio como el que se obtuvo para la población CycY tdTomato High (**B**) que sí fue seleccionada bajo un criterio de gating.

3.2.3 Análisis de expresión de marcadores del ciclo celular por RT-qPCR en poblaciones enriquecidas

Para estos ensayos originalmente se intentó realizarlos en paralelo a los de microscopía de forma tal de ver el comportamiento de las poblaciones con el paso del tiempo. Sin embargo, la dificultad de obtener suficiente muestra se reiteró, obstaculizando completamente el ensayo como originalmente se había pensado. Por consiguiente se resolvió obtener los cDNA para las qPCR a partir de las muestras recién sorteadas entera, sin ponerla en cultivo para que invada y cicle ya que esto implicaba fraccionar las muestras en diferentes wells para después fijar a diferentes tiempos. De esta forma, lo que intentamos buscar fue “sacar una foto” del perfil de expresión de diferentes marcadores del ciclo celular al momento de que los parásitos salen del sorting, determinando si esta población está enriquecida en alguna fase del ciclo celular específica.

Se elaboró un panel de genes marcadores del ciclo celular ya que no se reportaba en la literatura este tipo de ensayos para *T. gondii* (Tabla 3). La selección inicial incluyó más de 40 genes tomados de datos de microarray de poblaciones sincronizadas con timidina disponibles en ToxoDB (Behnke et al, 2010). Se tomaron genes cuyo nivel de expresión es fluctuante en función del ciclo celular y que tuvieran el mayor fold change posible entre fases temporalmente distantes del ciclo. La depuración de esta lista se realizó analizando gen por gen teniendo en cuenta los requisitos básicos para un qPCR, como lo es la presencia de intrones y el fold change (en este caso el fold change que reportaba el microarray).

Tabla 3. Selección de genes empleados como marcadores de ciclo celular en los ensayos de RT-qPCR. Los mismos fueron seleccionados en base a datos de microarray disponibles en ToxoDB (Behnke et al, 2010).

TGME49_number	Descripción	fold change	Fase máx. expresión	Fase mín. expresión
294330	EGF family domain-containing protein	9.2	M/C	G1
243200	hypothetical protein	30.5	M/C	G1
254890	hypothetical protein	6.5	M/C	S
287040	hypothetical protein	12.8	M/C	G1
204050	subtilisin SUB1	7.4	G1	S
243930	hypothetical protein	9.6	G1	G1

Luego de la puesta a punto del panel y de poner a punto la extracción de ARN y la generación de cDNA a partir de muestras sorteadas, se optimizó el ensayo de qPCR para el cDNA obtenido de la población CycY tdTomato Low y finalmente se seleccionaron (por cuestiones prácticas) tres genes marcadores: TGME49_287040, TGME49_243200 y TGME49_204050.

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos. El primer gen (TGME49_287040), de acuerdo a los datos de expresión del mismo, presenta un incremento en la expresión durante la mitosis y citocinesis, y un descenso en G1 tardío. En el segundo (TGME49_243200), se expresa en S y baja en G1 tardío. Mientras que el último, TGME49_204050 incrementa en G1 y baja en S tardía. Los valores de fold change obtenidos en estos ensayos no representan cambios relevantes en la expresión relativa (de genes cuya expresión es dependiente del ciclo celular) en la población enriquecida con respecto a la población asincrónica (Tabla 4 y Figura 8). Sin embargo,

TGME49_287040 se observa un leve incremento, el cual según los datos de la tabla 3, se corresponde a un enriquecimiento en las fases M y C.

Tabla 4. Resultados de qPCR para las muestra CycY_tdTomato Low sorteadas. Se muestran los resultados de los tres genes marcadores seleccionados por separado los cuales están identificados por su ID de ToxoDB. El ensayo fue realizado con tres réplicas técnicas, tanto de la muestra sorteada cuyo estado queremos interrogar (CycY_tdTomato Low) como de la muestra de referencia (CycY_tdTomato Asincron.).

Gen: TGME49_287040 (máx. en M/C, mín. en G1)

Réplica	Muestra	Ct Tubulina	Ct Gen	Δ Ct	Réplica	$\Delta\Delta$ Ct	Fold change
1	CycY_tdTomato Low 1	21.032	24.640	3.608	1	-2.348	5.091
2	CycY_tdTomato Low 2	21.021	24.925	3.904			
3	CycY_tdTomato Low 3	20.935	24.725	3.790	2	-2.064	4.181
1	CycY_tdTomato Asincron 1	19.313	25.269	5.956			
2	CycY_tdTomato Asincron 2	19.330	25.298	5.968	3	-2.210	4.627
3	CycY_tdTomato Asincron 3	19.249	25.249	6.000			

Gen: TGME49_243200 (máx. en M/C, mín. en G1)

Réplica	Muestra	Ct Tubulina	Ct Gen	Δ Ct	Réplica	$\Delta\Delta$ Ct	Fold change
1	CycY_tdTomato Low 1	21.032	24.092	3.060	1	-1.745	3.352
2	CycY_tdTomato Low 2	21.021	24.121	3.100			
3	CycY_tdTomato Low 3	20.935	24.141	3.206	2	-1.651	3.141
1	CycY_tdTomato Asincron 1	19.313	24.118	4.805			
2	CycY_tdTomato Asincron 2	19.330	24.081	4.751	3	-1.579	2.988
3	CycY_tdTomato Asincron 3	19.249	24.034	4.785			

Gen: TGME49_204050 (máx. en G1, mín. en S)

Réplica	Muestra	Ct Tubulina	Ct Gen	Δ Ct	Réplica	$\Delta\Delta$ Ct	Fold change
1	CycY_tdTomato Low 1	21.032	20.017	-1.015	1	-1.682	3.209
2	CycY_tdTomato Low 2	21.021	20.034	-0.987			
3	CycY_tdTomato Low 3	20.935	20.051	-0.884	2	-1.643	3.123
1	CycY_tdTomato Asincron 1	19.313	19.980	0.667			
2	CycY_tdTomato Asincron 2	19.330	19.986	0.656	3	-1.668	3.178
3	CycY_tdTomato Asincron 3	19.249	20.033	0.784			

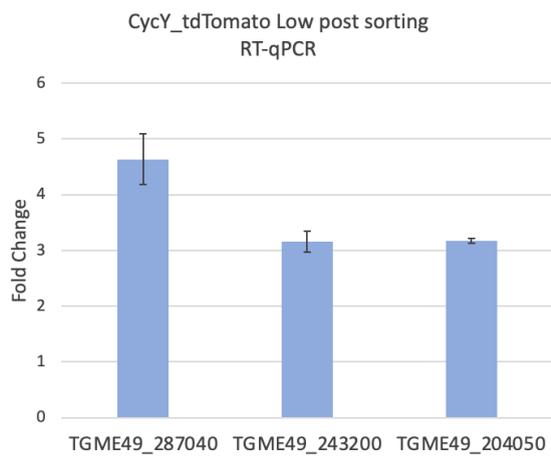


Figura 12. Valores de fold change obtenidos por RT-qPCR en la población de CycY_tdTomato Low enriquecida comparados con una población asincrónica de la misma cepa.

4 Discusión

4.1 El objetivo de esta tesis

La división celular es el proceso que prima en cuanto a los mecanismos de virulencia del protozoario intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. Nuestro laboratorio se ha enfocado en el estudio de los procesos que conllevan a una división celular efectiva, enfocándose particularmente en los aspectos evolutivamente divergentes de la división como potenciales fuentes de blancos farmacológicos. Particularmente nos hemos enfocados en la mitosis y sus particularidades (como lo es que sea semi cerrada, sin condensación de cromosomas), y además en la regulación espacio-temporal de este proceso con el proceso de ensamblaje de células hijas. En este proceso surge como un actor relevante en la coordinación de los procesos de división celular, el centrosoma, con sus centriolos pequeños y de disposición espacial inusual. Sin embargo, el estudio detallado de los procesos que afectan la biogénesis y estabilidad de este organelo se ve obstaculizado por la baja frecuencia de parásitos en fase S/M, momento en el cual ocurre la síntesis de nuevos centriolos. Esto se debe a que una población proliferante es naturalmente asincrónica, y la fase S/M representa en tiempo una ínfima parte del ciclo celular, traducándose esto en un número muy bajo de individuos que se encuentran en este estadio en un tiempo dado. El proyecto presentado en esta tesis no se enfoca en el estudio del centrosoma, sus dinámicas y la cinética de su síntesis, sino en generar una herramienta de sincronización del ciclo celular del parásito *Toxoplasma gondii* que permita enriquecer en las fases del ciclo celular que nos interesa estudiar. Si bien existían en la literatura reportes de intentos previos, todos estaban basados en intervenciones que alteran la biología del ciclo celular interfiriendo con algunos de sus procesos (por ejemplo, la síntesis del ADN). Por otro lado, las técnicas de sincronización ampliamente utilizadas para sincronizar células de mamíferos no funcionan en *T. gondii*. En este contexto, y basándonos en el conocimiento de proteínas reguladoras del ciclo celular que conocíamos variaban sus niveles a lo largo del mismo, nos embarcamos en la generación de cepas indicadoras. A continuación discutimos los resultados obtenidos en el contexto del conocimiento previo y las perspectivas y nuevas posibilidades que genera el trabajo aquí expuesto.

4.2 Desarrollo de la herramienta

La generación de las cepas indicadoras se basó en la selección de genes cuyo nivel de expresión reportado se basa en datos de microarray obtenidos de poblaciones sincronizadas con timidina exógena (Behnke et al, 2010). Si bien estos datos fueron de gran importancia para el desarrollo de nuestro trabajo, es importante tener en cuenta cómo se generaron esos datos, más específicamente en lo que respecta al método de sincronización. En la duplicación del ADN, los taquizoitos de *T. gondii* sintetizan *de novo* los nucleótidos de pirimidina, sobre todo de dTTP cuya fuente se da exclusivamente de la síntesis *de novo* a través de la actividad bifuncional de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (Ross, 1993; Donald y Ross, 1993). Las células que expresan la timidina quinasa recuperan la timidina mediante la conversión a monofosfato de desoxitimidina (dTMP), un precursor de dTTP que se utiliza en última instancia durante la replicación del ADN. En las células animales, el aumento de dTTP inhibe la actividad de la ribonucleótido reductasa y conduce al agotamiento de dCTP durante la síntesis de ADN y la detención reversible del crecimiento celular (Stein et al, 1994). El método de sincronización con timidina exógena explota este último mecanismo.

Sin embargo, en *T. gondii* este mecanismo no es posible aplicarlo ya que carece de timidina quinasa endógena. Radke y White en 1998 introdujeron el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HSTK su sigla en inglés) en *T. gondii*, logrando sincronizar en el ciclo celular poblaciones de taquizoitos y definieron la longitud relativa de las fases G1, S y G2+M por citometría de flujo (Radke y White, 1998). Sin embargo se ha demostrado que este mecanismo presenta inconvenientes ya que la acumulación de dTTP es tóxica para los parásitos y la sincronización no es precisa debido a que arresta a los parásitos a lo largo de todo G1-la fase más larga del ciclo celular- resultando en una población que se desincroniza rápidamente una vez liberado el bloqueo (Iwasawa et al, 2019). Observando los datos de microarray, describen las fases del primer ciclo celular post sincronización en un marco temporal de ocho horas, algo diferente a lo que se describe para un ciclo celular de *T. gondii* que es de unas seis horas en total. Partiendo de esta última observación y teniendo en cuenta las desventajas fisiológicas que presenta la sincronización con timidina exógena, no es posible asumir una correlación directa entre el tiempo post sincronización y la fase del ciclo en la que teóricamente se encontraría la población.

Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente, nuestro enfoque se basó en proteínas endógenas cuya expresión cíclica fuese indicadora de una etapa del ciclo celular, comprobada experimentalmente. Esta idea surge del sistema *Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator* (FUCCI, por su sigla en inglés) empleado para el análisis de la proliferación y del ciclo celular de mamíferos (Sakaue-Sawano et al, 2008). Este sistema se basa en dos factores, el factor Cdt1 que licencia el control de la replicación del ADN y su antagonista Geminin. La abundancia de ambas oscila durante el ciclo celular y de forma antagónica, Cdt1 alcanza su máximo en G1 tardío justo antes del inicio de la replicación cayendo abruptamente al inicio de S y Geminin sus niveles son altos durante S y G2 pero bajan en M tardío y G1. La fusión de fragmentos de estas proteínas a proteínas fluorescentes da lugar a sondas fluorescentes que son desestabilizadas por los mismos mecanismos que regulan la abundancia de Cdt1 y Geminin. Esto da lugar a que la fluorescencia de ambas sondas fluctue en el ciclo celular de igual forma que los hacen Cdt1 y Geminin, lo que va a permitir determinar la fase del ciclo celular en función de qué sonda se está observando.

En este contexto, se seleccionaron un set de genes en base a estos datos y a datos reportados en la bibliografía de su éxito en la inserción de un epítipo exógeno en el locus endógeno con epítipes tag (como 3HA) o proteínas fluorescentes, que sean proteínas que se expresan citoplasmáticamente prioritariamente y que sea en un nivel detectable. También se buscó datos sobre en qué fase del ciclo se da el mayor nivel de traducción versus la transcripción. Esta prospección desembocó en la generación de la cepa *CycY_tdTomato*, una cepa que expresa una proteína de fusión endógena formada por la Ciclina Y unida en su extremo C terminal a tdTomato. Se logró determinar que el nivel fluctuante de expresión de esta proteína de fusión reportera permite separar poblaciones en diferentes fases del ciclo celular, quedando demostrado por microscopía y por RT-qPCR. Por lo tanto, queda demostrado una vez más que Ciclina Y es una proteína de expresión cíclica, de presencia en el citoplasma y en niveles detectables lo cual permitió el desarrollo de la cepa reportera. Esto permitió el desarrollo de una metodología de sincronización del ciclo celular endógena que no depende de fármacos, pero sí con la necesidad de contar con la tecnología de cell sorting. Como cepa reportera, un aspecto que faltó explorar fue la caracterización *in vivo* de la evolución de la expresión de CycY fusionada a tdTomato por microscopía. Esto hubiese permitido determinar y correlacionar el patrón de expresión a las diferentes fases del ciclo celular. Estos experimentos no se lograron realizar ya que a nivel institucional no contamos con protocolos

aprobados para la utilización de microscopios de fluorescencia que permitan la observación de muestras que requieren de un nivel de bioseguridad BSL2.

4.3 La incidencia del estrés en la sincronización por cell sorting

El pasaje de los parásitos por el sistema de fluidos del cell sorter pone en duda si los mismos pueden sufrir cierto nivel de estrés que afecte la progresión del ciclo celular. Es por eso que intentamos evaluar si el pasaje por el sorter repercute en la reanudación de la replicación una vez que son puestos nuevamente en cultivo. El número de replications que pasa un parásito puede ser evaluada contando el número de parásitos que tiene una vacuola: una vacuola con dos parásitos proviene de un parásito que se dividió una vez, una vacuola de cuatro proviene de un parásito que se ha dividido dos veces y así sucesivamente. Los resultados obtenidos no arrojaron diferencias en cuanto al número de replications (vacuolas de dos parásitos) durante las primeras horas. Sin embargo, a partir de las 16 horas se observa una menor cantidad de parásitos replicados una o más veces en la población sorteada con respecto a la población que no fue pasada por el sorter.

Dado que el desfase en el número de división se observa a partir del mediano plazo, el estrés provocado por el sorter no repercute con la continuidad del ciclo celular de la población en el corto plazo. La relevancia del estrés del sorting en la invasión y la progresión del ciclo celular es algo que resta por explorar, ya que podría ser un elemento que perjudique la calidad de la sincronización desfasando las poblaciones sorteadas.

4.4 Sincronización: un diálogo entre la progresión del ciclo celular y el ciclo lítico

De los datos de la población sorteada de CycY_tdTomato “High” de la Figura 7 se desprende que tanto para el control (población pasada por el sorter pero sin ningún criterio de selección) como de la población sorteada, existe un incremento en el porcentaje de mitosis a las 6.5 horas de la puesta en cultivo post sorting. Si bien en la población control se denota un incremento de 7.68% en las mitosis a las 6.5 horas con respecto a las 5 horas post infección, en la población CycY_tdTomato “High” sorteada existió una diferencia de 25.8%.

Este incremento en las mitosis independientemente de si se realizó algún método de sincronización o no, es posible debido a que los parásitos experimentan cierta sincronización natural como producto de la coordinación del ciclo celular con el ciclo lítico (Gaji et al., 2010). Se ha demostrado que cuando los parásitos egresan de la célula hospedera de forma natural o artificialmente, y vuelven a invadir una célula hospedera, estos lo hacen mayoritariamente en fase G1 (Gaji et al., 2010). En caso de que egresen durante alguna fase que no sea la G1 ellos van a *progresar hasta completar* el ciclo extracelularmente, pero no van a iniciar el siguiente hasta invadir una célula hospedera (Hu et al., 2004).

Análisis de contenido de ADN por citometría de flujo en parásitos intracelulares a diferentes tiempos post infección demuestran que tanto en el egreso como la invasión, los parásitos se encuentran mayoritariamente en G1 con respecto a una población asincrónica que permaneció en cultivo por más tiempo (Gaji et al., 2010). Un perfil típico de contenido de ADN para *T. gondii* consiste en un gran pico para 1N que se corresponde a G1, otro pico de menor tamaño para 1.8N que corresponde a las fases M y C y una meseta entre ambos valores que es de la fase S. La distribución de este perfil es consistente con los tiempos de duración de cada fase del ciclo celular. La población 1N es la más abundante debido a que la fase G1 es la de mayor duración. Para *T. gondii*

nunca se observa un contenido de 2N debido a que estos parásitos carecen de fase G2 y la transición entre las fases S, M y C es muy rápida y se encuentran vinculadas. Gaji y colaboradores observaron que en una población de taquizoitos asincrónica que ha permanecido en cultivo por 36 horas, los mismos exhiben el perfil típico descrito anteriormente. Mientras que, en poblaciones de parásitos cuya invasión es sincronizada en una ventana temporal de 30 minutos y se lavan los que no logran invadir, la gran mayoría de los parásitos que invaden presentan un contenido de ADN de 1N por lo que los mismos se encuentran en G1. Lo mismo demostraron para el egreso. Esto anterior junto con análisis de sincronización con ditiocarbamato de pirrolidin (PDTC por sus siglas en inglés) donde evalúan su capacidad de invadir y egresar a diferentes tiempos post sincronización, los autores afirman que *T. gondii* prefiere realizar el egreso y la invasión durante la fase G1. Sin embargo, destacamos que utilizar la invasión como herramienta de sincronización presenta la misma limitante que la sincronización “artificial” utilizando timidina quinasa exógena, ya que la fase G1 es la más larga del ciclo y aun estando en la misma fase, los parásitos en G1 están naturalmente desfasados entre sí.

Sumado a esto último, es posible que esta preferencia de fase está relacionada al direccionamiento de recursos que hace el parásito durante las diferentes fases del ciclo celular, licenciando a los parásitos para llevar a cabo el egreso y la invasión de forma más eficiente en G1. De hecho, los organelos implicados en la invasión, las roptrias y las micronemas, se encuentran listos para funcionar en G1 ya que estos organelos procedentes de la célula progenitora durante las fases M y C se desmantelan y se ensamblan *de novo* en las células hijas (Nishi et al., 2008). También el complejo de membrana interno y el glideosoma (sistema de motilidad) de la célula parental se desmantelan durante las mismas fases, privando al parásito en división de su aparato de motilidad y de reconocimiento del hospedero. Esto deja al parásito durante las fases M y C en un estado comprometido para poder realizar el proceso de invasión de forma exitosa. Por último, desde el punto de vista energético, el egreso y la invasión son procesos activos que requieren de ATP. La disponibilidad de este durante las fases S, M y C se encuentra dirigida hacia los procesos de características de estas fases bien conocidos (duplicación del ADN, formación de las células hijas, etc.). Por tanto, durante la fase G1 es cuando el parásito puede destinar ATP para los mecanismos de egreso e invasión.

En base a los criterios expuestos en materiales y métodos para seleccionar las poblaciones CycY_tdTomato High y CycY_tdTomato Low, y de acuerdo a la expresión de CycY_tdTomato, es posible hipotetizar que la primera población se encuentra en fase G1 al momento de salir del sorting, mientras que la segunda se encuentra en fase M/C. Esta hipótesis fue validada por ensayos de qPCR en la que se corroboró un incremento en la expresión relativa de genes marcadores de la fase M/C en la población CycY_tdTomato Low.

De acuerdo a los valores de división graficados en el figura 7 y a lo discutido anteriormente, las poblaciones CycY_tdTomato sin gate y CycY_tdTomato High presentan una sincronización parcial la cual es producto de la mayor eficiencia en la invasión que presentan los parásitos en G1. A su vez, el incremento en la división observado a las 6,5 horas post infección en la población CycY_tdTomato High, es posible que sea producto de una doble contribución entre la sincronización natural y la sincronización del sorting. Esta doble contribución que se da al mismo tiempo, es consistente con el hecho de que esta población al momento de que salen del sorting, está enriquecida en la fase G1, fase en la que se encuentran en mejores condiciones para realizar el proceso de invasión de forma más eficiente. Con la sincronización por sorting es posible acotar la ventana del ciclo celular (en este caso la ventana de G1) en la que se encuentra una población a través de la selección de parásitos en función del nivel de expresión de la CycY_tdTomato. De esta forma es posible homogeneizar una

población en determinada fase del ciclo celular, en nuestro caso en G1. El hecho de que parásitos invadan preferencialmente en G1 sumado a la selección de parásitos en G1 por el sorter, hace que la sincronización parcial de parásitos de forma natural se enriquezca aún más. A diferencia de la población CycY_tdTomato High, la población CycY_tdTomato Low se encuentra en fases diferentes a G1 al momento de salir del sorting. Si partimos de la idea de que la invasión se da más eficientemente en G1, esto dificultará la invasión de esta población cuando es puesta en cultivo. Esto se ve reflejado en los gráficos de evolución de la división en el tiempo (Figura 6A) donde no se observa un incremento en las divisiones durante las primeras horas post sorting. Posiblemente sea debido a que esta población, enriquecida en fases S, M y/o C, no sea capaz de invadir eficientemente.

Continuando con el análisis de la población CycY_tdTomato Low, los datos de expresión obtenidos de los análisis de RT-qPCR, no arrojaron cambios relevantes en la expresión relativa de los marcadores de ciclo celular con respecto a una población no sincronizada. Sin embargo, se logra observar un leve incremento en el fold change del gen TGME49_287040 cuyo nivel de expresión incrementa en las fases M y C. Este resultado es congruente con el hecho de que se parte de una muestra de cDNA obtenido de una población recién sorteada que se encuentra hipotéticamente enriquecida en fases M y C. Este resultado, junto con el análisis de la evolución de las divisiones por microscopía, dan indicios de que el empleo del cell sorting como herramienta de sincronización podría ser viable.

En conclusión, es posible que la coordinación entre el ciclo lítico y el ciclo celular de *T. gondii* juega un rol en la sincronización por cell sorting, contribuyendo al enriquecimiento de forma indirecta al momento de la invasión de parásitos en fase G1. Sin embargo, sostenemos que no es posible considerar un ensayo de invasión como método de sincronización, ya que simplemente dejar que invadan no garantiza que todos los parásitos que invaden se encuentren en G1 por más que prefieran esa fase. Así mismo, siendo G1 la fase más larga del ciclo celular, aun estando favorecida la invasión en esta fase, la sincronización se perdería naturalmente en el corto plazo por el desfase en el que podrían encontrarse los parásitos, dentro de la misma fase. Por otro lado, la progresión extracelular del ciclo celular de estos parásitos continúa siendo un tema de discusión, existe el planteo de que pueden invadir estando en división temprana ya que aún preservan las estructuras implicadas en la invasión. Por tanto, esto último podría introducir variabilidad de fases en los parásitos que invaden. De esta forma, sostenemos que es necesario realizar intervenciones para la obtención de poblaciones enriquecidas en fases específicas. El desarrollo del enriquecimiento por cell sorter constituye una herramienta no farmacológica que podría abrir las puertas para estudios sobre los diferentes procesos implicados en vías de regulación del ciclo celular y división, vías que se ven afectadas por los mecanismos farmacológicos.

5 Perspectivas

En base a los resultados obtenidos, aún restan ensayos que validen a nuestra cepa como reportera del ciclo celular de los cuales hemos intentado sin éxito debido a diferentes problemas que quedan por sortear y puestas a punto que restan por hacer. Una de ellas, es correlacionar el contenido de ADN con yoduro de propidio con la expresión de CycY por citometría de flujo. Además de evaluar el contenido de ADN en las poblaciones sorteadas para complementar la validación por microscopía y RT-qPCR.

Una vez concluida la validación de la cepa CycY_tdTomato, proponemos generar una cepa con doble reportero, que emule la función reportera del sistema FUCCI. Para lograrlo, proponemos la transfección de una construcción que permita hacer un knock-in con alguna proteína fluorescente verde por ejemplo, sobre la cepa CycY_tdTomato. Este knock-in se realizaría sobre algún gen cuya expresión sea antagonista al perfil de expresión de CycY, es decir un gen con un pico de expresión sobre las fases S, M y/o C. De esta forma se obtendría una cepa con un doble reportero que en G1 se tiene la señal fluorescente de la CycY fusionada a tdTomato, y en las restantes fases se tendría el predominio de fluorescencia del reportero alternativo. Esto permitiría aumentar el poder resolutivo de las diferentes fases del ciclo celular tanto en el sorter como en ensayos de microscopía.

Por otro lado, este abordaje de la sincronización del ciclo celular plantea dos grandes limitantes: la dependencia de una tecnología que no es de tan fácil acceso como lo es el citómetro de flujo con cell sorter (que a su vez opere en condiciones BSL2), y la necesidad de transfectar, seleccionar y clonar, para generar la cepa fluorescente cada vez que se desee trabajar con otras cepas parentales. Teniendo en mente esto último, sería interesante pensar en un sistema que permita trasladarlo a diferentes cepas de *T. gondii* sin necesidad de realizar todo lo que implica generar una cepa desde cero (transfectar, seleccionar, enriquecer, clonar). La perspectiva de generar una herramienta basada en plásmidos, como es FUCCI, sería más “trasladable” entre cepas. Para esto habría que conocer las señales de degradación ciclo celular-específicas de las proteínas en *T. gondii* que de momento se desconocen.

La posibilidad de obtener poblaciones de *T. gondii* enriquecidas para diferentes fases del ciclo celular va a permitir explorar diferentes eventos de las fases del ciclo que transcurren rápidamente y que en una población asincrónica estas fases no se encuentran representadas justamente por lo previamente mencionado. En nuestro laboratorio, nos enfocamos en el estudio de la división y sus particularidades que diferencian a una mitosis canónica de una de *T. gondii*. La coordinación de la división es llevada a cabo por el centrosoma, el cual a diferencia de un centrosoma canónico, posee sus propias particularidades (centríolos más pequeños, con disposición paralela, diferente arreglo de los microtúbulos). La obtención de poblaciones sincronizadas permitirá generar librerías de ADNc para diferentes fases del ciclo, esta información de gran valor va a permitir identificar candidatos de genes implicados en la biogénesis y homeostasis centrosomal, replicación (tanto del parásito como de los centrosomas) y en el ensamblaje de las células hijas.

Bibliografía

Altschul, S. F., Wootton, J. C., Zaslavsky, E., & Yu, Y. K. (2010). The construction and use of log-odds substitution scores for multiple sequence alignment. *PLoS computational biology*, 6(7), e1000852.

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

Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2005). Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic acids research*, 33(13), 3994-4006.

Behnke MS, Wootton JC, Lehmann MM, Radke JB, Lucas O, Nawas J, et al. (2010) Coordinated Progression through Two Subtranscriptomes Underlies the Tachyzoite Cycle of *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* 5(8): e12354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012354>

Berry, L., Chen, C. T., Reininger, L., Carvalho, T. G., El Hajj, H., Morlon-Guyot, J., ... & Daher, W. (2016). The conserved apicomplexan Aurora kinase TgArk3 is involved in endodyogeny, duplication rate and parasite virulence. *Cellular microbiology*, 18(8), 1106-1120.

Bisio, H., Lunghi, M., Brochet, M. et al. Phosphatidic acid governs natural egress in *Toxoplasma gondii* via a guanylate cyclase receptor platform. *Nat Microbiol* 4, 420–428 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0339-8>

Broadbent, K. M., Park, D., Wolf, A. R., Van Tyne, D., Sims, J. S., Ribacke, U., ... & Rinn, J. L. (2011). A global transcriptional analysis of *Plasmodium falciparum* malaria reveals a novel family of telomere-associated lncRNAs. *Genome biology*, 12(6), 1-15.

Brooks CF, Francia ME, Gissot M, Croken MM, Kim K, et al. (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: 3767–3772. pmid:21321216

Carvalho, T. G., Doerig, C., & Reininger, L. (2013). Nima-and Aurora-related kinases of malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(7), 1336-1345.

Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2013). The *Toxoplasma gondii* centrosome is the platform for internal daughter budding as revealed by a Nek1 kinase mutant. *Journal of cell science*, 126(15), 3344-3355.

de Felipe, M. M. C., Lehmann, M. M., Jerome, M. E., & White, M. W. (2008). Inhibition of *Toxoplasma gondii* growth by pyrrolidine dithiocarbamate is cell cycle specific and leads to population synchronization. *Molecular and biochemical parasitology*, 157(1), 22-31.

Donald, R. G., & Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11703-11707.

Ferguson DJ, Sahoo N, Pinches RA, Bumstead JM, Tomley FM, et al. (2008) MORN1 has a conserved role in asexual and sexual development across the apicomplexa. *Eukaryotic cell* 7: 698–711. pmid:18310354

Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, et al. (2012) Cell division in Apicomplexan parasites is organized by a homolog of the striated rootlet fiber of algal flagella. *PLoS Biol* 10: e1001444. pmid:23239939

Francia ME, Striepen B (2014) Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol* 12: 125–136. pmid:24384598

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.

Gaji, R. Y., Behnke, M. S., Lehmann, M. M., White, M. W., & Carruthers, V. B. (2011). Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression. *Molecular microbiology*, 79(1), 192-204.

Gubbels, M. J., Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J. F., & Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *Journal of cell science*, 119(11), 2236-2245.

Hu, K., Roos, D.S., Angel, S.O., and Murray, J.M. (2004) Variability and heritability of cell division pathways in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 117: 5697– 5705.

Iwasawa, C., Tamura, R., Sugiura, Y., Suzuki, S., Kuzumaki, N., Narita, M., ... & Miyoshi, H. (2019). Increased cytotoxicity of herpes simplex virus thymidine kinase expression in human induced pluripotent stem cells. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 810.

Khan, F., Tang, J., Qin, C. L., & Kim, K. (2002). Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in *toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, 45(2), 321-332.

Kibe MK, Coppin A, Dendouga N, Oria G, Meurice E, et al. (2005) Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res* 33: 1722–1736.

Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013). APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199(3), 639-649.

Lourido, S., Tang, K. and Sibley, L.D. (2012), Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *The EMBO Journal*, 31: 4524-4534. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.299>

Matthews, H., Duffy, C. W., & Merrick, C. J. (2018). Checks and balances? DNA replication and the cell cycle in *Plasmodium*. *Parasites & vectors*, 11, 1-13.

Medina, E. M., Turner, J. J., Gordan, R., Skotheim, J. M., & Buchler, N. E. (2016). Punctuated evolution and transitional hybrid network in an ancestral cell cycle of fungi. *Elife*, 5, e09492.

Morrisette NS, Sibley LD (2002) Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 115: 1017–1025. pmid:11870220

Naumov, A., Kratzer, S., Ting, L. M., Kim, K., Suvorova, E. S., & White, M. W. (2017). The *Toxoplasma centrocone* houses cell cycle regulatory factors. *MBio*, 8(4), e00579-17.

Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., and Roos, D.S. (2008) Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 121: 1559–1568.

Radke, J. R., & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Molecular and biochemical parasitology*, 94(2), 237-247.

Roos, D. S. (1993). Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6269-6280.

Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., ... & Miyawaki, A. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 132(3), 487-498.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019

Schlosser, C. A., Steglich, C., DeWet, J. R., & Scheffler, I. E. (1981). Cell cycle-dependent regulation of thymidine kinase activity introduced into mouse LMTK-cells by DNA and chromatin-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(2), 1119-1123.

Silvina S. Bogado, María C. Dalmaso, Agustina Ganuza, Kami Kim, William J. Sullivan, Sergio O. Angel, Laura Vanagas, 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*, Volume 197, Issues 1–2, 2014, Pages 36-42, ISSN 0166-6851, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.09.009>.

Stein, G. S., Stein, J. L., Lian, J. B., Last, T. J., Owen, T., & McCabe, L. (1994). Synchronization of normal diploid and transformed mammalian cells. *Cell biology: a laboratory handbook*, 1, 282-287.

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>

Vonlaufen N, Naguleswaran A, Coppens I, Sullivan WJ (2010) MYST Family Lysine Acetyltransferase Facilitates Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase-mediated DNA Damage Response in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 285, Issue 15, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066134>.

Walker, R., Gissot, M., Croken, M. M., Huot, L., Hot, D., Kim, K., & Tomavo, S. (2013). The *Toxoplasma* nuclear factor TgAP2XI-4 controls bradyzoite gene expression and cyst formation. *Molecular microbiology*, 87(3), 641-655.

Wang, J., Dixon, S. E., Ting, L. M., Liu, T. K., Jeffers, V., Croken, M. M., ... & Sullivan Jr, W. J. (2014). Lysine acetyltransferase GCN5b interacts with AP2 factors and is required for *Toxoplasma gondii* proliferation. *PLoS pathogens*, 10(1), e1003830.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.