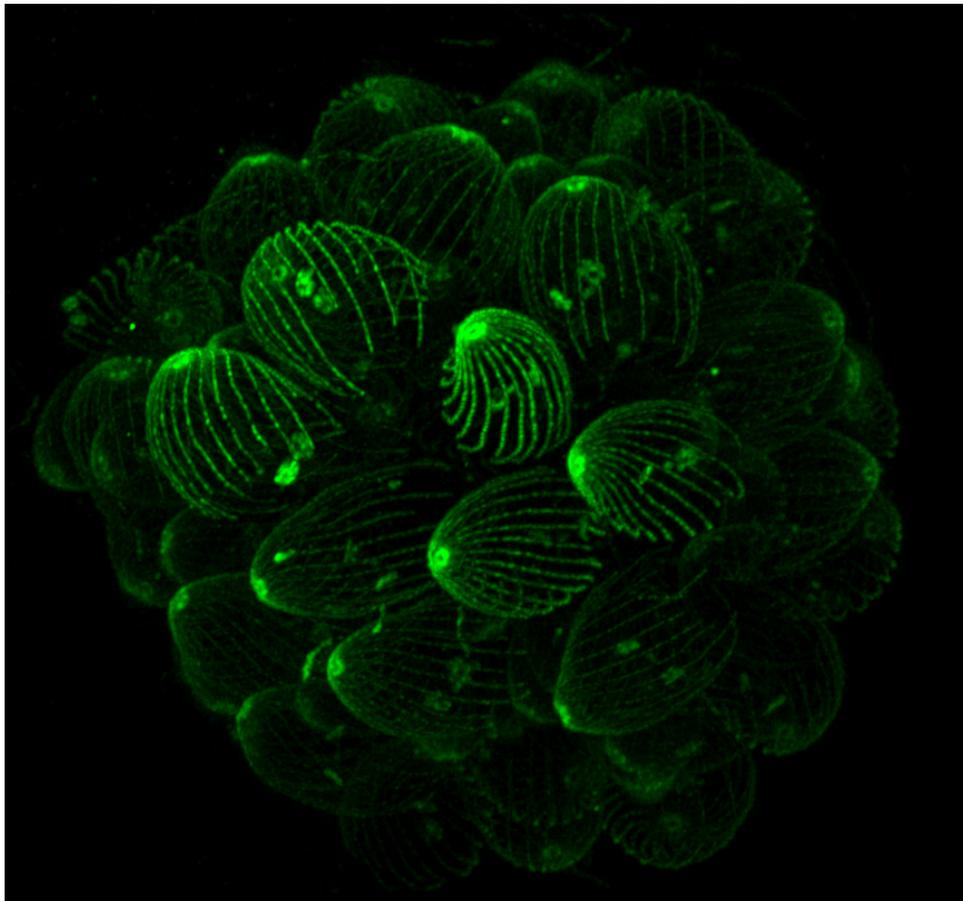


Tesis de doctorado en Ciencias biológicas.

PEDECIBA

“Descifrando la función de los dominios centrosomales en el contexto de la división celular de *Toxoplasma gondii*”

QF. Ramiro Tomasina



Orientadora:

Dra. María Eugenia Francia

Comité evaluador:

Dra. Florencia Irigoín

Dr. Flavio Zolessi

Dra. Mariana Bonilla

Institut Pasteur Montevideo. 2023

Índice de contenido

<i>Tesis de doctorado en Ciencias biológicas. PEDECIBA</i>	1
Lista de Figuras:	6
Lista de Tablas	8
<i>Agradecimientos</i>	9
CAPÍTULO 1.0 Introducción	11
1.1 Importancia del tema	11
1.2 Introducción general	12
1.2.1 Taxonomía de <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2.2 Estadios del parásito y ciclo biológico	14
1.2.3 Ultraestructura de <i>T. gondii</i>	16
1.2.7 La toxoplasmosis	19
1.2.8 La división celular	20
1.2.9 Centrosoma en <i>T. gondii</i>	23
1.3 Bibliografía	27
CAPÍTULO 2.0 Hipótesis y Objetivos	30
2.1 Objetivo General	30
2.2 Objetivos específicos	30
Capítulo 3.0	30
Capítulo 4.0	31
Capítulo 5.0	31
Capítulo 6.0	31
CAPÍTULO 3.0 “El centrosoma de <i>T. gondii</i> desde una mirada de alta resolución”	32
3.1 Resumen	32
3.2 Resultados	34
3.2.1 Los centriolos siguen una dinámica acompañada por la formación de las células hijas	34
3.2.2 El outer core alberga los centriolos	35
3.2.3 Inner core dominio lejano a los centriolos y contenido en el Centrocono	36
3.2.4 Los cinetocoros están contenidos en el Centrocono	38
3.3 Conclusiones	41

3.4 Materiales y Métodos	42
3.4.1 Cultivo celular de <i>Toxoplasma gondii</i>	42
3.4.2 Microscopía de Expansión de Ultraestructura (U-ExM)	42
3.4.3 Generación de la cepa TgSAS6-mAID-3HA y TgCEP250L1-mAID-3HA.....	43
3.5 Bibliografía	44
<i>CAPÍTULO 4.0 “Explorando la función del inner core”</i>	46
4.1 Resumen	46
4.2 Conclusiones.....	75
<i>CAPÍTULO 5.0 “Explorando el rol de TgSAS6”</i>	76
5.1 Resumen	76
5.2 Resultados.....	77
5.2.1 Rol de TgSAS6 en <i>T. gondii</i>	77
5.3 Conclusiones.....	85
5.4 Materiales y Métodos	86
5.4.1 Generación de la cepa TgSAS6-mAID-3HA	86
5.4.2 Ensayo de placa.....	86
5.4.3 Western blot.....	87
5.4.4 Microscopía de Fluorescencia en <i>T. gondii</i>	87
5.4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	88
5.4.6 Alineamientos múltiples y modelos proteicos	89
5.5 Bibliografía	89
<i>CAPÍTULO 6.0 “Hacia la generación de un proteoma centrosomal en T. gondii”</i>	91
6.1 Resumen	91
6.2 Objetivo 1: Identificación de un “proteoma centrosomal”	94
6.2 Resultados.....	94
6.2.1 Obtención de las cepas TgCEP250L1-APEX2 y TgSAS6-APEX2.....	94
6.2.2 Optimización de un marcado con APEX2 para proteínas fusionadas no mitocondriales en <i>Toxoplasma gondii</i>	95
6.3 Conclusiones.....	100
6.4 Materiales y Métodos	102

6.4.1 Generación de las cepas TgCEP250L1-APEX2 yTgSAS6-APEX2	102
6.4.2 Ensayos de biotilación de proteínas fusionadas a APEX2	104
6.4.3 Espectrometría de masas	105
6.4.4 Análisis de datos y generación de tablas y gráficos	106
6.4 Objetivo 2: Validación del proteoma adquirido en <i>Trypanosoma brucei</i>	107
6.4.1 Introducción	107
6.4.1.1 Taxonomía de <i>Trypanosoma brucei</i>	107
6.4.1.2 Cuerpo basal en <i>T. brucei</i>	108
6.5 Resultados.....	110
6.5.1 Obtención de las cepas TbCEP120A,TbCEP120B y Tb927.10.3130	110
6.6 Conclusiones:	116
6.7 Materiales y Métodos	117
6.7.1 Cultivo celular de <i>Trypanosoma brucei</i> :	117
6.7.2 Generación de las cepas Tb927.76250-3mNg-Ty(CEP120A), Tb927.11.8920-3mNg-Ty (CEP120B) y Tb 927.10.3130- 3mNg-Ty.....	117
6.7.3 Microscopía de inmunofluorescencia	117
6.7.4 Microscopía de Ultraestructura de Expansión (U-ExM)	118
6.8 Bibliografía	120
<i>CAPÍTULO 7.0 Discusión general.....</i>	122
<i>CAPÍTULO 8.0 Conclusiones.....</i>	124
<i>CAPÍTULO 9.0 Perspectivas</i>	125
9.1 Bibliografía	127
<i>CAPÍTULO 10.0 Anexos</i>	128

Lista de Figuras:

Capitulo 1.0

Figura (I). 1. Imágenes de alta resolución de estructuras asociadas a MTOC en <i>Toxoplasma gondii</i>.	13
Figura (I). 2. Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>.	16
Figura (I). 3. Microscopía de ultraestructura de expansión de un taquizoíto de <i>T. gondii</i>.	18
Figura (I). 4. <i>T. gondii</i> es capaz de seguir tres diferentes esquemas de replicación dependiendo del hospedero y el tipo celular invadido.	22

Capitulo 3.0

Figura (III). 1. Dinámica de los centriolos en <i>T. gondii</i> a lo largo del ciclo celular.	34
Figura. (III). 3. El inner core es un dominio distante a los centriolos.	37
Figura (III). 4. El inner core está contenido en el centrocono.	37
Figura (III). 5. El cinetocoro de <i>T. gondii</i> está contenido en el centrocono.	39
Figura (III). 6. Representación esquemática del modelo del centrosoma para <i>T. gondii</i>.	40

Capitulo 5.0

Figura (V). 1. Estrategia utilizada para obtener la cepa TgSAS6-mAID-3HA.	79
Figura (V). 2. Los dos homólogos a SAS6 que presenta <i>T. gondii</i> presentan diferencias estructurales importantes.	80
Figura (V). 3. Generación y validación del mutante condicional para TgSAS6.	81
Figura (V). 4. SAS6 se encuentra en los centriolos de <i>T. gondii</i> a lo largo de todo el ciclo celular.	82
Figura (V). 5. SAS6 no es esencial para la formación de centriolos en <i>T. gondii</i>.	83
Figura (V). 6. La depleción de SAS6 en <i>T. gondii</i> no afecta la localización relativa de los centriolos entre sí.	84

Capítulo 6.0

Figura. (VI). 1. Obtención de las poblaciones TgSA6-APEX-2 y TgCEP250L1-APEX-2.	95
Figura. (VI). 2. Resultados de ensayos de biotilnilación observados por Western-blot.	96
Figura. (VI). 3. Diagramas de Venn resultados ensayos proteómica.	99
Figura. (VI). 4. Ciclo de vida <i>T. brucei</i>.	108
Figura. (VI). 5. Ciclo de celular de <i>T. brucei</i> y replicación del Cuerpo basal.	109
Figura. (VI). 6. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>T. brucei</i> y la estrategia utilizada durante este trabajo.	111
Figura. (VI). 7. Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120A a través de la división celular.	112
Figura. (VI). 8. Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120A en modelo tridimensional.	113
Figura. (VI). 9. Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120B a través de la división celular.	113
Figura. (VI). 10. Inmunofluorescencia indirecta de células tratadas con detergente expresando Tb927.10.3130::mNG en diferentes fases del ciclo celular.	114
Figura. (VI). 11. Inmunofluorescencia indirecta de células que expresan Tb927.10.3130:: mNG en diferentes fases del ciclo celular.	114
Figura. (VI). 12. Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de Tb927.10.3130 a través de la división celular.	115

Lista de Tablas

Capitulo 1.0

Tabla (I). 1. Genes centrosomales conservados en el genoma de <i>T. gondii</i>	25
--	----

Capitulo 6.0

Tabla (V) 1. Lista de 20 candidatos centrosomales a validar.	97
Tabla (VI). 2. Lista de primers utilizados en la estrategia de clonación en pLIC y de screening	103

“Al camino que elegí, yo no sé quién me llevo, si las vueltas de la vida o si las vueltas las di yo”

“Sin palabras”. A contraluz, La Vela Puerca. 2004

Agradecimientos

Primero que nada, me gustaría agradecer a mi tutora Dra. María Eugenia Francia por estos años de formación académica y por todas las oportunidades que me ha brindado a lo largo de este trayecto. Sin ella, esta tesis doctoral no sería posible.

Me gustaría agradecer también a mis compañeros de laboratorio del ApiLab, en especial a Fabiana y Andrés con los que más tiempo he coincidido. A Fabiana me gustaría agradecerle por su visión crítica de las microscopias, por las tardes de café y vueltas en bici. A Andrés por el buen humor, las charlas de fútbol y por enseñarme a sembrar mis primeros geles de agarosa. A toda la gente de UBM donde empezamos con todo esto, extendiendo mis agradecimientos al Dr. Carlos Robello. A la gente de la Unidad de Microscopía del Instituto que me han dado una mano enorme, en especial a Marcela, Tabaré y Leonel por su visión crítica y por sus consejos y enseñanzas. A Leticia, Federico y Camila de la UMPI por su “aguante” en el cultivo celular todos los días. A la gente de los galácticos del Pasteur y de los ex-miércoles de fútbol⁵. A la gente de la cantina (en especial a Lu, Leti y “al pelado”), a la gente de mantenimiento, de limpieza y a Beatriz de la unidad de medios de cultivo.

Me gustaría agradecer al Dr. Mathieu Gissot por recibirme en su laboratorio en el Institut Pasteur de Lille en 2019, por su visión crítica de los experimentos y por todas sus enseñanzas. También me gustaría agradecer a los compañeros de laboratorio de aquel entonces, Thomas, Silvie y Asmha.

Me gustaría agradecer al Dr. Philippe Bastin por recibirme dos veces en su laboratorio en el Institut Pasteur de Paris en 2019 y 2022. Me gustaría agradecerle en especial por el tiempo dedicado a las discusiones científicas, consejos de la vida y por ser siempre tan dedicado y amable. Me gustaría agradecer al Dr. Serge Bonnefoy por sus enseñanzas, por sus consejos, su interminable paciencia y por compartir su experiencia de vida académica conmigo. También me gustaría agradecer a los compañeros de laboratorio en Paris en especial a: Jean Marc, Daniel, Parul, Lorette, Thierry, Estefanía y Mariana.

Me gustaría extender mis agradecimientos a mis compañeros del Departamento de Parasitología y Micología de Facultad de Medicina, que hace casi dos años me recibieron con los brazos abiertos. En especial a la Dra. Yester Basmadjian grado 5 del Departamento quien siempre me ha apoyado en las diferentes actividades académicas que ha involucrado mi doctorado.

A mi madre, a mi padre, a Mateo, a Camila y a Florencia, por todos estos años de aguante. A todos mis amigos. A Erika y a Lía por hacer del mundo un sitio mejor.

CAPÍTULO 1.0 Introducción

1.1 Importancia del tema

La toxoplasmosis es una parasitosis de distribución mundial y de alta prevalencia, tanto en humanos como en animales. Se estima que el 30% de la población mundial está infectada con el parásito causal de la enfermedad, *Toxoplasma gondii*. Las presentaciones clínicas de la toxoplasmosis en humanos abarcan una extensa gama de manifestaciones, pudiendo comprender entre estas afectaciones neurológicas diversas en recién nacidos, abortos, afectaciones oculares y encefalitis agudas entre otras. A nivel de salud animal, esta parasitosis genera pérdidas económicas producto de los abortos que puede provocar, principalmente en ovejas [1].

Toxoplasma gondii es un parásito protozooario intracelular perteneciente al filo Apicomplexa. La patogenia de los parásitos pertenecientes a este filo está vinculada a su “estilo de vida”, donde la necesidad y capacidad de invadir una célula hospedera y su rápida capacidad de replicación, tienen como consecuencia la destrucción de las células invadidas mediante lisis celular. *T. gondii*, en particular, se replica mediante un esquema de división denominado “endodiogenia”. El mismo transcurre en una ventana corta de tiempo (aproximadamente de unas 6 horas) [2]. Estudios previos demostraron que la división celular en estos parásitos, así como sucede en otros organismos eucariotas, está coordinada por un organelo denominado centrosoma [2–4]. Sin embargo, a diferencia de otros organismos eucariotas, la regulación del ciclo celular se da únicamente mediante anclajes físicos a este organelo, no existiendo checkpoints, moderados por factores solubles. Recientemente se demostró que este organelo está compuesto por al menos tres dominios proteicos topológicamente ordenados de forma secuencial entre sí [5,6]. En base a su proximidad o lejanía al núcleo, se definieron un dominio próximo al núcleo denominado “inner core”, un dominio más lejano al núcleo denominado “outer core” y un dominio que se localiza en medio de estos dos denominado “middle core” [5,6]. En este trabajo caracterizamos mediante microscopía de expansión, la distribución relativa de diferentes proteínas en el espacio de este organelo, estudiamos la función del inner core y su rol en la replicación de estos parásitos. Para esto, nos enfocamos en determinar la localización y función de dos proteínas, cada una representativa de un

domino del centrosoma. Por un lado, caracterizamos al homólogo de SAS6, una proteína central en la biogénesis del centrosoma en otros eucariotas, en *T. gondii*. Por otro lado, caracterizamos a TgCEP250L1 el único marcador conocido del inner core. Adicionalmente utilizando ensayos de biotinilación y proteómica, hemos identificado un proteoma preliminar del centrosoma de *T. gondii*, identificando veinte proteínas candidatas, dentro de los que se encuentran cinco proteínas anotadas como quinasas o fosfatasa y diez proteínas que presentan homología con proteínas del cuerpo basal en *Trypanosoma brucei*. *T. brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño, es un protozoo flagelado distantemente relacionado. Tres de las diez proteínas de *T. gondii* que presentan homología a proteínas de *T. brucei* fueron validadas como proteínas *bona fide* del cuerpo basal en este organismo.

1.2 Introducción general

1.2.1 Taxonomía de *Toxoplasma gondii*

Los parásitos apicomplejos son agentes causales de importantes enfermedades humanas y veterinarias como la malaria, la criptosporidiosis, la toxoplasmosis y la neosporosis. *Toxoplasma gondii* es el agente causal de la toxoplasmosis. *T. gondii* fue observado por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux en el Institut Pasteur de Túnez. Fue originalmente aislado de *Ctenodactylus gondii*, un roedor presente en la zona. Su nombre se deriva de la combinación de tres palabras: “Toxo” que hace referencia a la forma arqueada de este parásito; “plasma” que significa vida, y gondii que heredó del roedor a partir del cual fue originalmente aislado [7]. Las relaciones filogenéticas para *T. gondii* han estado en constante revisión durante las últimas décadas. Actualmente está agrupado en el reino Protista, dentro del phylum Apicomplexa y superphylum Alveolata. Este superphylum se caracteriza por presentar un sistema de alveolos membranosos que en el caso de los Apicomplejos se denomina complejo de membrana interno (IMC por su sigla en inglés). Todos los integrantes del filo Apicomplexa presentan, además del sistema de alveolos membranosos, un complejo denominado “complejo apical” caracterizado por presentar las siguientes estructuras: Roptrias (varían en número y estructura entre las especies), Micronemas, Microtúbulos subpeliculares, y Anillos polares. Todos los integrantes de este filo realizan reproducción sexual en los hospederos definitivos y

reproducción asexual en los hospederos intermediarios. Los apicomplejos han evolucionado a partir de organismos fotosintéticos de vida libre, mediante dos procesos de endosimbiosis separados en el tiempo. A lo largo de la evolución junto a su adaptación a la vida parasitaria han ido perdiendo funciones y características originarias. Esto se evidencia en la pérdida de genes para ciertas estructuras y/o actividades metabólicas [8]. En este proceso de adaptación a la vida parasitaria, junto a la pérdida de la capacidad fotosintética, por ejemplo, se incorporaron otras habilidades que le permiten a los parásitos desarrollar su vida parasitaria plena [9]. Dentro de estas características incorporadas se destacan la capacidad de invadir las células hospederas.

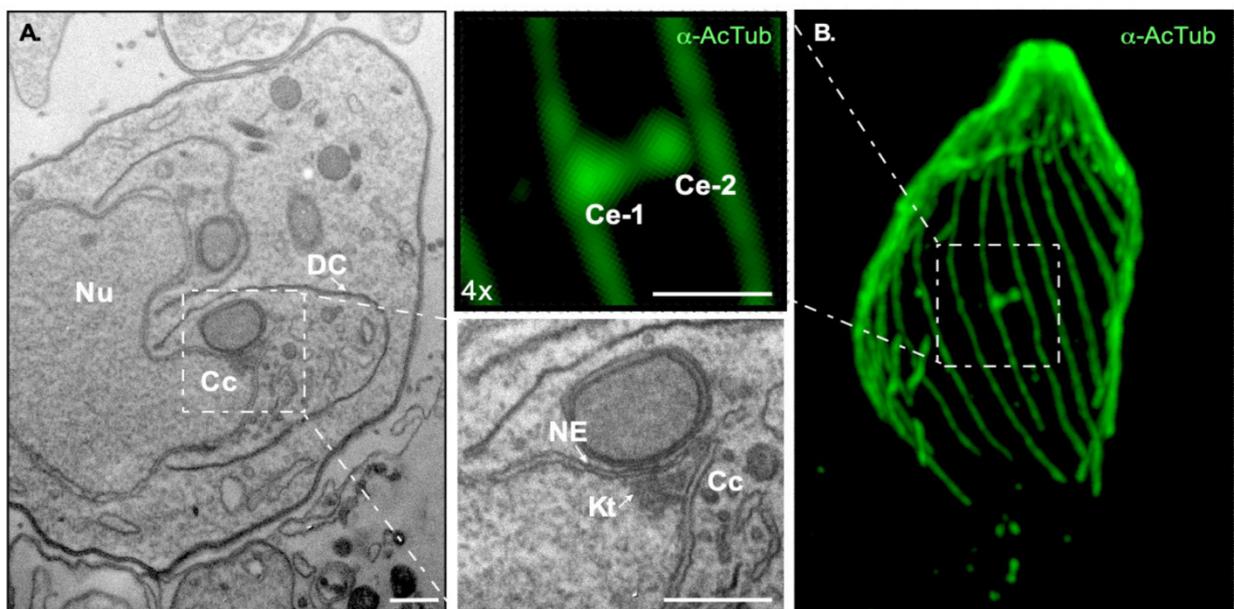


Figura (I). 1. **Imágenes de alta resolución de estructuras asociadas a MTOC en *Toxoplasma gondii*.** Adaptado de [10] (A) Micrografía electrónica de transmisión de tachizoitos de *T. gondii* en división por endodiogenia. Se observa el centrocono (Cc), el núcleo en división (Nu) en proceso de segregación en dos células hijas (DC). El recuadro muestra una visión detallada de la envoltura nuclear (NE) que forma el centrocono (Cc) y los cinetocoros (Kt). (B) Imagen de microscopía confocal de tachizoíto de *T. gondii* utilizando la técnica de microscopía de expansión de ultraestructura. En esta imagen se utiliza un anticuerpo anti-tubulina acetilada para marcar la tubulina con dicha modificación post traduccional, como se indica. Nótese que usando esta técnica el par de centriolos (Ce1 y Ce2) que forman el centrosoma en este parásito son observables y pueden resolverse. Escala = 500 nm en todos los casos.

1.2.2 Estadios del parásito y ciclo biológico

Toxoplasma gondii presenta un ciclo de vida heteroxeno [7]. Esto implica que para completar su ciclo biológico precisa de dos hospederos. Un hospedero denominado “definitivo” y otro hospedero denominado “intermediario”. Por definición, el hospedero definitivo es aquel en el que el parásito realiza reproducción sexuada, mientras que, en el hospedero intermediario, la replicación se da de manera únicamente asexual [7,11]. Los hospederos definitivos de este parásito son los felinos, mientras que pueden actuar como hospederos intermediarios cualquier animal de sangre caliente [7,11]. *T. gondii* es un parásito intracelular obligado, por lo que toda su vida se desarrolla dentro de una célula hospedera, la cual debe invadir. El proceso de invasión celular por parte de este parásito involucra un conjunto de etapas concatenadas en el tiempo. Primero el parásito debe reconocer a la célula a invadir, luego adherirse a esta, para luego realizando un conjunto de movimientos, comenzar el ingreso a la misma [12]. Durante el proceso de invasión dos organelos secretores son claves: las micronemas y las roptrias. Las micronemas liberan adhesinas y son las primeras en actuar. Estas proteínas son claves en el proceso de adhesión y van a desencadenar, la liberación de otras proteínas denominadas “RON” contenidas en las roptrias. Luego de liberadas ambas proteínas, el parásito comienza un movimiento activo dependiente de motores de miosina, que genera la penetración celular [12]. Una vez dentro de la célula *T. gondii* forma la vacuola parasitófora, un ambiente de protección donde desarrolla su vida dentro de la misma. La vacuola parasitófora es consecuencia de la invaginación de la membrana celular alrededor del parásito durante el proceso de invasión [12]. Establecida la vacuola parasitófora, el parásito comienza la replicación celular. Las formas de vida que presenta este parásito se pueden agrupar en dos grandes grupos; las que son producto de una reproducción sexual y las que son producto de una reproducción asexual [11]. La reproducción asexual se da en células nucleadas de cualquier animal de sangre caliente. Esta reproducción clonal va a generar dos formas de vida clasificadas en base a la velocidad de replicación denominadas: taquizoítos y bradizoítos. Los taquizoítos son una forma rápida de replicación. Los bradizoítos en cambio son formas de replicación lenta que forman quistes tisulares en sitios inmunoprivilegiados como músculo cardíaco, tejidos del sistema nervioso central o músculo esquelético. Esta forma de vida es la responsable

de la etapa crónica de la enfermedad. Tanto los bradizoítos como los taquizoítos se dividen siguiendo un esquema de división celular, denominado Endodiogenia [3]. La misma consiste en la formación interna de dos células hijas en el citosol de una célula madre, en el contexto de una mitosis nuclear semicerrada como se observa en las figuras 1 y 2 [3]. Este proceso de división celular es altamente eficiente y rápido (con una duración del entorno de 6hs) [3]. En cada ronda de replicación se generan dos nuevos parásitos, cuyas rondas de replicación subsecuentes pueden generar hasta 64 nuevos taquizoítos por vacuola parasitófora, mientras que en quistes de bradizoítos el número puede superar a los miles por quiste [13,14]. La reproducción sexual de este parásito se da únicamente en el epitelio intestinal de los felinos. Una vez en su interior estos bradizoítos se pueden convertir en merozoítos o en taquizoítos. Los taquizoítos continuarán el ciclo de reproducción asexual en el animal mientras que los merozoítos serán los responsables del inicio de la reproducción sexual. Los merozoítos continuarán varias rondas de replicación denominadas etapas enteroepiteliales (EES, por su sigla en inglés) que terminarán en un proceso de diferenciación y gametogénesis [11]. De este proceso de gametogénesis surgirán microgametos y macrogametos. Los microgametos, que son motiles por la presencia de dos flagelos, fecundarán a los macrogametos intracelulares, para dar lugar a la generación de ooquistes que serán liberados en las fecas de los félidos al ambiente, de manera no esporulada. En el ambiente, frente a la exposición a oxígeno, estos ooquistes esporulan, generando esporozoítos y volviéndose infectivos.

El ciclo biológico de *T. gondii* comienza con la liberación de ooquistes en las fecas de felinos infectados. Estos ooquistes contaminan el ambiente y entran en contacto con los diferentes hospederos intermediarios mediante agua contaminada, o el consumo de vegetales contaminados con ellos. Los hospederos intermediarios también se pueden infectar por el consumo de tejidos conteniendo quistes de bradizoítos de otros animales infectados crónicamente, por carnivorismo. En humanos esto se traduce principalmente en el consumo de carne mal cocida proveniente de ganado ovino. Otro mecanismo de transmisión de este parásito en los hospederos intermediarios es la transmisión intrauterina. Esta forma de transmisión genera que el producto de gestación se infecte de forma aguda con este parásito. Si bien los mecanismos moleculares involucrados se desconocen, se sabe que esta forma de transmisión

mayoritariamente se da en madres que transcurren una primoinfección durante el embarazo.

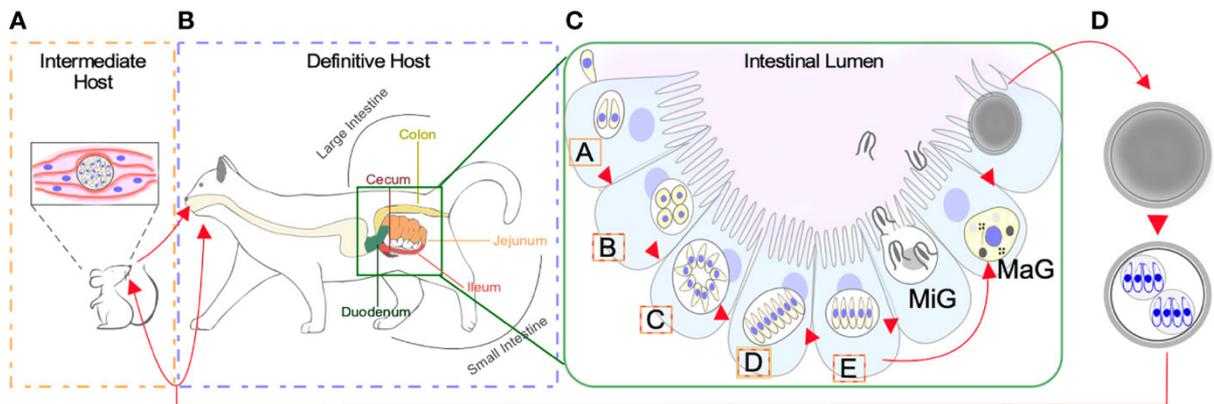


Figura (1). 2. **Ciclo biológico de *T. gondii*:** En este esquema adaptado de [11] se ejemplifica lo complejo del ciclo biológico del parásito. (A) Cualquier animal de sangre caliente puede ser infectado por *T. gondii*. En la mayoría de los casos, en animales inmunocompetentes, esto conlleva a la formación de quistes de bradizoitos. (B) La reproducción sexual ocurre en los hospederos definitivos (gatos) cuando éstos ingieren quistes provenientes de hospederos intermedios. (C) Los bradizoitos se diferenciarán secuencialmente en merozoitos cuyas fases de diferenciación se denomina A-E según características morfológicas vagamente definidas, antes de dar lugar a gametos “femeninos” y “masculinos” denominados macrogametos (MaG) y microgametos (MiG) respectivamente. (D) Luego de realizada la fecundación se originan oocistos, forma infectiva para hospederos intermedios.

1.2.3 Ultraestructura de *T. gondii*

Toxoplasma gondii presenta cuatro formas de vida con capacidad de invadir células hospederas: los taquizoítos, los bradizoítos, los merozoitos y los esporozoitos. Aunque estas cuatro formas de vida cumplen roles diferentes a lo largo del ciclo de vida de este parásito, son morfológicamente muy similares. Los cuatro se caracterizan por presentar una forma y polaridad dada por un conjunto de organelos y estructuras características. Estos poseen algunos organelos conservados entre los eucariotas como son ribosomas, una única mitocondria, un núcleo con envoltura nuclear y un retículo endoplasmático. En cuanto a los organelos y estructuras presentes en este parásito propias de los apicomplejos, están los gránulos densos, el apicoplasto, las roptrias y las micronemas. [15]

1.2.4 Apicoplasto

El apicoplasto es un organelo presente en la mayoría de los apicomplejos salvo contadas excepciones. Su origen es producto de un evento endosimbiótico de especies de algas fotosintéticas rojas por parte de un ancestro común a los apicomplejos [16–19]. Aunque aún resta mucho por entender de la función de este organelo, se sabe que es esencial para la supervivencia de los parásitos que lo tienen. La capacidad fotosintética de este organelo “Cloroplasto-Like” se ha perdido a lo largo de la evolución. En la actualidad las funciones conocidas de este organelo están vinculadas a la síntesis de ácidos grasos. Si bien este organelo presenta su propio genoma (~35 Kb), la gran mayoría de sus proteínas provienen del genoma nuclear [16–19]. Dado su rol esencial para la supervivencia de estos parásitos es un organelo de interés como target farmacéutico. Vale destacar que las vías metabólicas de este organelo presentan mayor similitud a las procariotas que a las eucariotas, explicando así la alta actividad inhibitoria de las funciones del apicoplasto por una variedad de antibióticos [16–18]

1.2.5 Mitocondria

Otro organelo presente en este parásito que es producto de un evento endosimbiótico es la mitocondria. La mitocondria en *T. gondii* es única y presenta una estructura altamente dinámica. Mientras *T. gondii* se encuentra dentro de la célula hospedera, este organelo presenta una forma de lazo distribuida a los bordes del parásito como se observa en la figura 3, mientras que en parásitos extracelulares la estructura se colapsa [19]. Al igual que el apicoplasto la mitocondria presenta su propio genoma, que se traduce en la información genética para la síntesis de tan solo 3 proteínas. Estas proteínas son: cob, cox1 y cox3. La función de este organelo está asociada a la generación de ATP pero también vinculada íntimamente con el pasaje de taquizoíto a bradizoíto [19]. Esta última función está asociada a la capacidad de actuar como “sensor” de pH, concentración de Oxígeno y disponibilidad de nutrientes [19]. Dado el rol esencial en la sobrevivencia de estos parásitos es un organelo de interés como target farmacéutico.

1.2.6 Arsenal de invasión

Como fue mencionado anteriormente, todos los parásitos apicomplejos son parásitos intracelulares obligados, lo que se traduce en que desarrollan su vida dentro de una célula hospedera que deben invadir. *T. gondii* es quizás el parásito más exitoso en cuanto a su capacidad de invadir prácticamente cualquier tipo de célula nucleada. Este parásito ha desarrollado a lo largo de la evolución un conjunto de herramientas que le permiten realizarlo. Por un lado, posee un conjunto de organelos secretores como son las roptrias y las micronemas. Por otro lado, presenta una estructura denominada Anillo Apical Polar (APR por sus siglas en inglés) como se observa en la figura 3, que en conjunto con los organelos secretores orquestan la invasión.

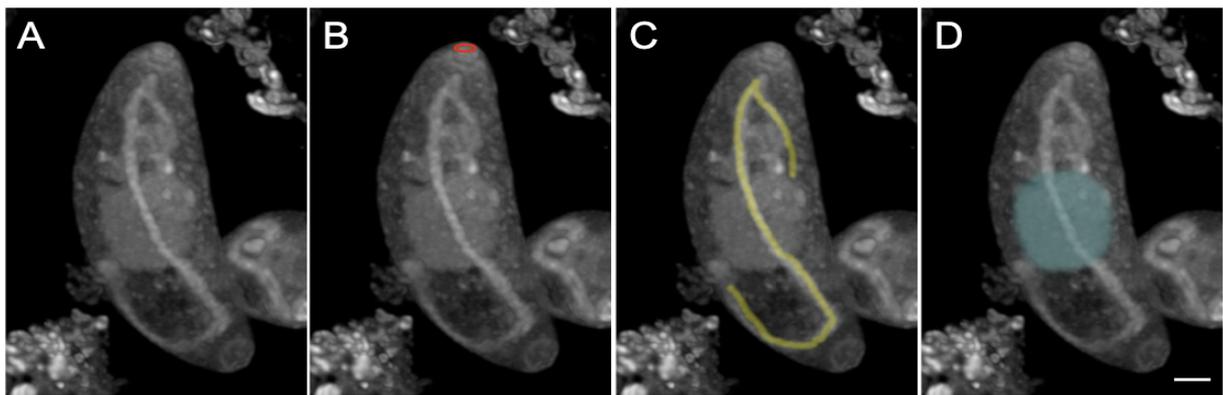


Figura (I). 3. **Microscopía de ultraestructura de expansión de un taquizoíto de *T. gondii*.** Todas las estructuras están marcadas por NHS-Ester, un componente que reconoce todos los enlaces peptídicos. (A) Microscopía de ultraestructura de expansión de un taquizoíto de *T. gondii*. (B) En rojo se marca el Anillo Polar Apical (APR por su sigla en inglés). (C) En amarillo se observa la estructura de lazo de la única mitocondria de este parásito. (D) En celeste se marca el núcleo. La barra de escala representa 1 μ m.

1.2.7 La toxoplasmosis

La Toxoplasmosis es una parasitosis de distribución mundial y de alta prevalencia, tanto en humanos como en animales. Se estima que el 30% de la población mundial está infectada con este parásito [1]. Las presentaciones clínicas en humanos abarcan una gama extensa de manifestaciones, pudiendo comprender entre éstas, afectaciones neurológicas diversas en recién nacidos, abortos, afectaciones oculares y encefalitis agudas entre otras. [7]. Para categorizar las presentaciones clínicas de esta enfermedad es importante distinguir los posibles escenarios que pueden presentarse según tres tipos de pacientes: pacientes inmunocompetentes, pacientes con inmunidad comprometida y embarazadas. En los pacientes inmunocompetentes la infección ocurre de forma asintomática o paucisintomática. Los síntomas son leves y se pueden confundir con un síndrome de impregnación viral similar al provocado por la influenza. La enfermedad transcurre en dos etapas: una etapa aguda y una etapa crónica. La etapa aguda se desarrolla desde el comienzo de la infección hasta la generación de la respuesta inmunitaria por parte del paciente. En esta etapa predomina la forma de vida del parásito denominada taquizoíto y su distribución es sistémica. Una vez montada la respuesta inmune por parte del hospedero, el parásito cambia a una forma de vida cuya replicación es más lenta (denominada bradizoíto) y se aloja, en forma de quiste, en sitios inmunoprivilegiados como son el músculo esquelético, cardíaco y los tejidos del sistema nervioso central [7,20]. En el caso de pacientes con algún tipo de inmunosupresión, dos escenarios son posibles; el primero es el derrumbe de la inmunidad en un contexto de infección crónica, lo que desencadena la reactivación, y el segundo es una primoinfección sin una respuesta inmune que la contenga. La reactivación tendrá como consecuencia la generación de taquizoítos a partir de quistes de bradizoítos. Estas reactivaciones pueden desencadenar encefalitis agudas que si no se tratan oportunamente pueden desembocar en daños neurológicos irreversibles e incluso la muerte. En el caso de una primoinfección con el parásito en el contexto de una persona con inmunidad debilitada, la distribución del parásito no está contenida y el mismo puede diseminarse por todo el organismo provocando daño tisular, que sin tratamiento puede desembocar en la muerte. Por último, en el caso de las pacientes embarazadas, cobra relevancia la primoinfección de la madre durante el embarazo. Si este es el caso, el parásito

puede pasar la barrera placentaria y generar consecuencias en el producto de gestación [20]. Estas consecuencias varían dependiendo de la edad gestacional al momento de la infección, pudiendo provocar desde abortos, hasta consecuencias sobre el feto que pueden manifestarse como ceguera, macro o microcefalias, calcificaciones cerebrales, entre otras, en los recién nacidos [7].

1.2.8 La división celular

Todos los Apicomplejos son parásitos intracelulares obligados, lo que implica que deben necesariamente invadir una célula hospedera para replicarse y sobrevivir. La proliferación intracelular dentro del filo varía, tanto mecánicamente como en el número de nuevos parásitos generados, pudiendo resultar en la generación de 2 a 64 células hijas por ciclo. En cada ciclo, la célula hospedera se lisa, liberando en el proceso a nuevos parásitos competentes para la reinfección, dando origen al daño celular y tisular característico de todas las enfermedades causadas por estos patógenos. La proliferación intracelular es entonces el mecanismo principal a través del cual estos parásitos ejercen su patogenicidad. Sin embargo, pese a su importancia, los eventos estructurales y moleculares que desencadenan una división celular exitosa en Apicomplejos, son poco comprendidos. A diferentes escalas, todos los apicomplejos siguen el mismo esquema de proliferación; mitosis semi-cerrada del núcleo y formación interna o externa de células hijas por ensamblaje *de novo*. A diferencia de lo que sucede en mamíferos (donde la mitosis nuclear abierta precede a la fisión del citosol, y la formación de dos células hijas por ciclo), la mitosis y citocinesis en apicomplejos no necesariamente ocurren de manera coordinada. La coordinación espacio-temporal de estos eventos se da exclusivamente a través de anclajes físicos al centrosoma, el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) en estas células. Los diferentes esquemas de replicación que pueden seguir los parásitos apicomplejos son: endodiogenia, esquizogonia, endopoligenia[3]. La endodiogenia es la forma más simple de replicación de las tres, involucrando la formación de dos células hijas dentro de una célula madre en el contexto de una mitosis nuclear semicerrada [3]. Este es el esquema de división que siguen los taquizoítos de *T. gondii* en el hospedero intermediario y es la forma responsable de la patogenia de este parásito en humanos (Figuras 1,4). La esquizogonia es una forma de replicación que involucra primero la generación de una célula madre con múltiples núcleos producto

de varias rondas de replicación asincrónica nuclear, seguida por una última etapa de formación de múltiples células hijas de forma sincrónica (Figura 4). Esta forma de replicación es la utilizada por los esquizontes de *Plasmodium spp*, como también por *T. gondii* en estadios previos a la reproducción sexual en felinos [11]. La endopoligenia por otro lado consiste primeramente en varias rondas de replicación sincrónicas del material genético, sucedidas por un evento de segregación nuclear y de formación de células hijas (Figura 4)[3]. Dependiendo del hospedero y el tipo celular invadido, *T. gondii* puede realizar cualquiera de las tres formas de replicación.

Se ha caracterizado que no existe una fase G2 que separe a las fases S y M en el ciclo celular en Apicomplejos. De hecho, el contenido de ADN medible de los parásitos es 1n o 1.8n, ya que la citocinesis y la compleción de la división nuclear ocurren casi simultáneamente. Se han caracterizados también una serie de reguladores citosólicos solubles, dentro de los cuales se destacan factores de transcripción y quinasas, cuyas actividades catalizan la regulación temporal de la expresión génica, y la modificación de proteínas blanco, necesarias para desencadenar la división celular. Por un lado, existen programas transcripcionales cuya activación coincide con cada fase del ciclo celular, y corresponden a “olas” de expresión génica de grupos de genes específicos, necesarios para el avance de esa fase del ciclo celular. Dentro de los reguladores solubles que controlan este proceso se destacan los factores de transcripción conocidos como los “ApiAP2”, y por enzimas que guardan similitud funcional con quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) conocidas como CRKs (del inglés “cyclin-related kinases”). Estas últimas catalizan procesos citosólicos que controlan el avance y la transición entre las fases del ciclo celular (G1-S-M). En *Toxoplasma gondii*, se identificaron más de sesenta ApiAP2 y diez CRKs. Algunos ApiAP2 y CRKS juegan un papel clave en el transcurso del ciclo celular.

No obstante, a pesar de que existan estos reguladores “globales”, la regulación “física/local” determina la sincronidad de los procesos, pudiendo descoordinarse si los anclajes que unen tanto los cromosomas como las células hijas al centrosoma se “desconectan”.

En el contexto de una mitosis cerrada, durante la cual la envoltura nuclear permanece prácticamente intacta y los cromosomas no se condensan visiblemente, su segregación ocurre por asociación al huso mitótico. Los cromosomas permanecen asociados al centrosoma en todas las fases del ciclo celular, a través de los MTs

durante la mitosis, y a través de la interacción con un poro nuclear especializado, durante la interfase. Se considera que esta conexión física permite a los parásitos “contar” sus cromosomas en el contexto de un núcleo inalterado y un estado relajado de la cromatina, durante todo el ciclo celular. La generación de nuevas células se da a través de la formación *de novo* de los componentes necesarios para el ensamblaje de células hijas dentro del citosol de la madre. Este proceso comienza con el ensamblaje de “la fibra SFA”. Esta estructura está formada por al menos dos proteínas relacionadas estructural y evolutivamente a las proteínas “striated fiber assemblins” o SFA, caracterizadas originalmente como componentes del sistema de “raíces” que anclan el cuerpo basal de flagelos en algas. La fibra SFA se origina en el centrosoma y se extiende hacia el citosol de la célula madre. Su extremo distal nuclea los componentes que inician la formación de la célula hija. La polimerización y extensión de la fibra SFA ocurre temporalmente asociada a la duplicación del centrosoma, coincidente con el inicio de la replicación del ADN nuclear. La migración de los centrosomas hacia polos opuestos del núcleo, separa en el proceso un complemento de cromosomas asociado a cada célula hija en formación. En las etapas finales, concomitante con la fisión nuclear, cada fibra SFA se disuelve a la vez que la formación de la célula hija se completa. Como se describió anteriormente, el centrosoma (MTOC) en apicomplejos es esencial para la división celular.

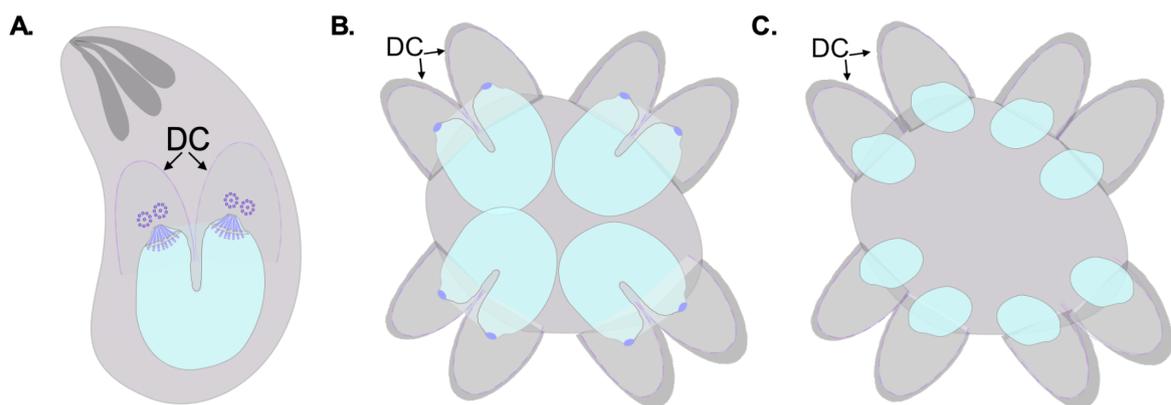


Figura (I). 4. *T. gondii* es capaz de seguir tres diferentes esquemas de replicación dependiendo del hospedero y el tipo celular invadido. (A) Representación esquemática de la endodiogenia, este tipo de división implica la formación de dos células hijas dentro de una célula madre en el contexto de una mitosis nuclear semicerrada. Por favor notar que con DC están marcadas las células hijas. (B)

Representación esquemática de la esquizogonia. La misma involucra primero la generación de una célula madre con múltiples núcleos producto de varias rondas de replicación asincrónica nuclear, seguida por una última etapa de formación de múltiples células hijas de forma sincrónica. Por favor notar que con DC están marcadas las células hijas. (C) Representación esquemática de la endopoligenia. Este tipo de división celular consiste primeramente en varias rondas de replicación sincrónicas del material genético, sucedidas por un evento de segregación nuclear y de formación de células hijas. Por favor notar que con DC están marcadas las células hijas. Figura Adaptada de [10].

1.2.9 Centrosoma en *T. gondii*

Los mecanismos que coordinan y regulan el avance de la división celular en *T. gondii*, son divergentes a los observados en células de mamíferos. A diferencia de lo que ocurre en nuestras células en las que factores solubles controlan el ritmo de avance de los ciclos de replicación, el ciclo celular en *T. gondii* se encuentra controlado por anclajes físicos [3-6]. Específicamente, se ha demostrado que los cromosomas y las células hijas se encuentran físicamente unidas al centro organizador de microtúbulos de la célula, un organelo conocido como el centrosoma [3]. La eliminación de estos anclajes mediante manipulación genética desencadena ciclos de división fútiles, deteniendo la infección [3-6]. Además de su importancia funcional, el centrosoma en *T. gondii* presenta importantes divergencias estructurales que lo distinguen de los centrosomas humanos. Los centrosomas humanos están compuestos por dos barriles de microtúbulos, conocidos como centriolos, dispuestos de manera ortogonal [26]. Cada barril está compuesto por un cilindro hueco - lo cual genera un lumen- cuyas paredes están definidas por 9 grupos cada uno de tres microtúbulos (tripletes) [26]. Estos tres microtúbulos están denominados A, B y C, siendo el A el más próximo al centro y el único que está completo. La estabilidad de los centriolos está dada por las interacciones entre los microtúbulos A y C contiguos. Mientras que la simetría radial es producto de una estructura denominada Cartwheel [25]. Esta estructura consiste en nueve radios que se conectan con los microtúbulos de las paredes de los centriolos. Cada radio está formado por dímeros de una proteína denominada SAS6 [25]. Esta proteína es esencial para la formación de centriolos o para la conservación correcta de su geometría [25]. La duplicación del centrosoma humano está sometida a un estricto control, donde una quinasa de tipo "Polo" PLK4 (del inglés, "Polo-like Kinase 4) inicia la biogénesis fosforilando a "STIL" al final de G1. Fosfo-STIL puede interaccionar con SAS6, para la formación del cartwheel [25]. La interacción con STIL

recluta a SAS6 al centrosoma iniciando la biogénesis [25]. Vale destacar que la capacidad de nuclear microtúbulos del centrosoma está dada por el material pericentriolar (PCM) en el que se encuentran embebidos los centriolos. Por otra parte, el centrosoma en *T. gondii* consta de dos centriolos, dispuestos de manera paralela, compuestos por 9 microtúbulos simples (singletes), y sin evidencia empírica de la presencia de PCM [21]. Interesantemente el genoma de *T. gondii* codifica para algunas de las proteínas presentes en los centrosomas humanos, pero carece de un grupo importante de ellas [10,21]. Dentro de los genes que codifican para proteínas centrosomales ausentes se destacan: SPICE, CEP135, CEP63, CEP152, CEP192, SAS-5, POC5, C2CD3, Ofd1, Polo-like kinase -1 (PIK-1), PIK-4, CP110, Centrobín [10,21]. A su vez de la ruta canónica de biogénesis de los centriolos solo se encuentra conservado SAS6, sin evidencia de STIL o de PLK1-4. Por lo que se desconoce la ruta de biogénesis centrosomal que siguen estos parásitos. *T. gondii* presenta dos homólogos para SAS6 en su genoma, TgSAS6 y TgSAS6L respectivamente [5,22]. TgSAS6L se encuentra en el anillo polar apical (APR por su sigla en inglés) lejos del centrosoma, mientras que TgSAS6 si presenta una localización centrosomal [5,22]. Otra característica del centrosoma de *T. gondii* es que el mismo está compuesto por al menos dos dominios [5]. Un dominio lejano al núcleo donde inicialmente se propuso residen los centriolos (denominado outer core en inglés), y un dominio cercano al núcleo (inner core en inglés[5]). Si bien el rol del outer core ha sido explorado experimentalmente [2], la función de las proteínas que residen en el inner core se desconocía hasta el presente trabajo. Las proteínas CEP (del Inglés “centrosomal proteins”) son una familia grande de proteínas centrosomal identificadas en eucariotas superiores caracterizadas por la presencia de dominios de interacción proteica coiled-coiled. La proteína centrosomal Cep250, también conocida como cNap, es una proteína crucial para la duplicación del centrosoma en eucariotas superiores. Trabajo previo por Suvorava, en colaboración con integrantes de nuestro laboratorio [5] identificaron dos homólogos de Cep250 en el genoma de *T. gondii*, denominados TgCep250 y TgCep250L1, respectivamente. Estas proteínas presentan la particularidad de localizarse diferencialmente en el centrosoma; TgCep250 se encuentra tanto en el inner como el outer core del centrosoma y TgCep250L1 se localiza exclusivamente en el inner core. Trabajos previos en los que se evaluó la función de TgCep250 en *T. gondii*, determinaron que esta proteína cumple la función

de unir ambos dominios [23]. Sin embargo, el rol de TgCep250L1 era un enigma hasta que fue abordado en esta tesis.

Tabla .(l). 1. Genes centrosomales conservados en el genoma de *T. gondii*. Se muestran los genes centrosomales que se encuentran en el genoma de *T. gondii* y su relevancia en la supervivencia de este parásito en su estadio de taquizoíto. *HTS*: *high throughput CRISPR-Cas9 mutagenesis-based screening*; ** *SGKO*: *single gene knockout*. Tabla adaptada de [10].

Gene ID	<i>T. gondii</i> Gene ID (TGME49_)	Role en la supervivencia de <i>T. gondii</i>
SAS-4/C-PAP	258710	No esencial por HTS
CEP120	285210	No esencial por HTS
CEP76	226610	No esencial por HTS
POC1	216880	Esencial por HTS
SAS6	306430	No esencial por HTS
SAS6L	301420	Esencial por SGKO[22]
Centrin 1	247230	Esencial por HTS
Centrin 2	250340	Esencial por SGKO [24]
Centrin 3	260670	Esencial por HTS
Centrin 4	237490	No esencial por HTS
Sfi1	274000	Esencial por SGKO [5]
CEP164	314358	Esencial por HTS
CEP170	201790	Esencial por HTS

CEP110	211430	No esencial por HTS
kif24	287160	No esencial por HTS
EB1	227650	Not essential by SGKO [23]
CEP250	212880	Esencial por SGKO [23]
CEP250L1	290620	Esencial por HTS
PP1	310700	Esencial por HTS
Nek2/NimA	292140	Esencial por SGKO [23]
LLRC45	209830	No esencial por HTS
CEP72	233940	No esencial por HTS
CEP131	205590	No esencial por HTS

1.3 Bibliografía

1. Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OCH, Su C. Economic and public health importance of *Toxoplasma gondii* infections in sheep: 2009-2020. *Vet Parasitol.* octubre de 2020;286:109195.
2. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLOS Biol.* el 11 de diciembre de 2012;10(12):e1001444.
3. Francia ME, Striepen B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol.* el 1 de febrero de 2014;12(2):125–36.
4. Tomasina R, Gonzalez FC, Martins-Duarte ÉS, Bastin P, Gissot M, Francia ME. Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in *Toxoplasma gondii*. Soldati-Favre D, editor. *mBio.* el 7 de septiembre de 2022;e01859-22.
5. Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLOS Biol.* el 3 de marzo de 2015;13(3):e1002093.
6. Courjol F, Gissot M. A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* junio de 2018;20(6):e12832.
7. Dubey JP. Chapter 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 1–17. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964816000015>
8. Woo YH, Ansari H, Otto TD, Klinger CM, Kolisko M, Michálek J, et al. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. Nordborg M, editor. *eLife.* el 15 de julio de 2015;4:e06974.
9. White MW, Suvorova ES. Apicomplexa Cell Cycles: Something Old, Borrowed, Lost, and New. *Trends Parasitol.* septiembre de 2018;34(9):759–71.
10. Tomasina R, González FC, Francia ME. Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Microorganisms.* el 3 de diciembre de 2021;9(12):2503.

11. Tomasina R, Francia ME. The Structural and Molecular Underpinnings of Gametogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Front Cell Infect Microbiol.* el 7 de diciembre de 2020;10:608291.
12. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* febrero de 2007;10(1):83–9.
13. Knoll LJ, Tomita T, Weiss LM. Chapter 15 - Bradyzoite Development. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 521–49. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964816000155>
14. Weiss LM, Kim K. the development and biology of bradyzoites of *toxoplasma gondii*. *Front Biosci J Virtual Libr.* el 1 de abril de 2000;5:D391–405.
15. Ferguson DJP, Dubremetz JF. Chapter 2 - The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 19–59. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964816000027>
16. Striepen B, Crawford MJ, Shaw MK, Tilney LG, Seeber F, Roos DS. The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol.* el 25 de diciembre de 2000;151(7):1423–34.
17. Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Fraunholz M, Harb OS, He CY, et al. Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* el 29 de enero de 2002;357(1417):35–46.
18. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol.* el 9 de marzo de 2004;34(3):423–32.
19. Seeber F, Feagin JE, Parsons M. Chapter 9 - The Apicoplast and Mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 297–350. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012396481600009X>
20. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis humanas*, 5a Ed. [Internet]. Corporación para investigaciones Biológicas CIB; 2012. Disponible en: <https://books.google.com.uy/books?id=bgT2DwAAQBAJ>

21. Morlon-Guyot J, Francia ME, Dubremetz JF, Daher W. Towards a molecular architecture of the centrosome in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskelet* Hoboken NJ. febrero de 2017;74(2):55–71.
22. de Leon JC, Scheumann N, Beatty W, Beck JR, Tran JQ, Yau C, et al. A SAS-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot Cell*. julio de 2013;12(7):1009–19.
23. Chen CT, Gubbels MJ. TgCep250 is dynamically processed through the division cycle and is essential for structural integrity of the *Toxoplasma* centrosome. *Mol Biol Cell*. el 1 de mayo de 2019;30(10):1160–9.
24. Leung JM, Liu J, Wetzel LA, Hu K. Centrin2 from the human parasite *Toxoplasma gondii* is required for its invasion and intracellular replication. *J Cell Sci*. el 1 de julio de 2019;132(13):jcs228791.
25. Nakazawa Y, Hiraki M, Kamiya R, Hirono M. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr Biol CB*. el 18 de diciembre de 2007;17(24):2169–74.
26. Gräf R. Comparative Biology of Centrosomal Structures in Eukaryotes. *Cells* [Internet] 2018;7(11):202. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cells7110202>

CAPÍTULO 2.0 Hipótesis y Objetivos

Esta tesis propone las siguientes hipótesis a contrastar;

- Dado que los centriolos en *Toxoplasma gondii* presentan gran divergencia estructural con sus contrapartes en mamífero, y su genoma no parecen codificar factores conservados asociados a la biogénesis de los mismos, proponemos que la duplicación del centrosoma de *T. gondii* se encuentra gobernado por vías de regulación mediadas por factores no presentes en la célula de mamíferos.
- Dado que el centrosoma en *Toxoplasma gondii* presenta una estructura bipartita, proponemos que en el outer core se encuentran los centriolos y que el inner core cumple funciones vinculadas a la segregación nuclear.

2.1 Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es descifrar el rol de la organización topológica del centrosoma en *T. gondii*, en la coordinación de la división del parásito y por ende de su patogenicidad. Así mismo, nos propusimos identificar nuevas proteínas centrosomales, evaluar el rol del inner core, el rol de TgSAS6 en la biogénesis de los centriolos y revisar el modelo bipartito del centrosoma.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo 3.0

El objetivo de este capítulo es evaluar la relación espacial entre los dominios proteicos y diferentes componentes del centrosoma utilizando técnicas de microscopía de alta resolución. Específicamente propusimos

- Evaluar la localización relativa de diferentes proteínas centrosomales con respecto a los centriolos.

Capítulo 4.0

El objetivo de este capítulo es entender el rol del inner core en la sobrevivencia de *T. gondii* y la importancia del mismo en la homeostasis del centrosoma. Específicamente propusimos, en el contexto de la degradación condicional de TgCep250L1:

- Evaluar la integridad estructural del centrosoma y las células hijas formadas durante la división celular
- Evaluar el mecanismo subyacente a los defectos de segregación del ADN observados en ausencia de TgCep250L1

Capítulo 5.0

El objetivo de este capítulo es entender el rol del outer core en la sobrevivencia de *T. gondii* y la importancia del mismo en la homeostasis del centrosoma. Específicamente propusimos, en el contexto de la degradación condicional de TgSAS6:

- Evaluar la integridad estructural del centrosoma y las células hijas formadas durante la división celular
- Evaluar el rol de TgSAS6 en la biogénesis del centrosoma

Capítulo 6.0

El objetivo de este capítulo es el de generar una metodología sistemática que permita la caracterización molecular y funcional, en profundidad, del centrosoma en parásitos Apicomplexa. Específicamente propusimos:

- La generación de un pequeño proteoma centrosomal de *T. gondii*
- La validación del proteoma en dos sistemas biológicos: *T. brucei* y *T. gondii*

CAPÍTULO 3.0 “El centrosoma de *T. gondii* desde una mirada de alta resolución”

3.1 Resumen

El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos (MTOC por su sigla en inglés) por excelencia de las células. Sus funciones abarcan un amplio abanico de tareas a nivel celular. Este organelo es pieza clave en la generación de flagelos y cilias, estructuras de gran importancia para las células. En la mayoría de las especies el centrosoma está formado por dos barriles de nueve tripletes de microtúbulos orientados de forma ortogonal [1]. Este no es el caso de *Toxoplasma gondii*. En *T. gondii* este organelo está conformado por dos centriolos, tal como es el caso para las células de mamíferos, aunque su disposición paralela entre sí, su composición de singletes de microtúbulos y su tamaño, lo diferencian del centrosoma canónico. Recientemente se demostró que este organelo está compuesto por al menos 3 dominios proteicos topológicamente encadenados entre sí [2,3]. Un core cercano al núcleo denominado “inner core”, otro lejano al núcleo denominado “outer core” y un dominio que se localiza en medio de estos dos denominado “middle core” [2,3]. La función del outer core está relacionada con el ensamblaje de las células hijas, dado que este proceso sucede en el citosol. La función del inner core, está asociada a la segregación nuclear [4], mientras que la función del “middle core” está vinculada a la homeostasis de ambos “cores” [3]. La primera descripción del comportamiento bipartito del centrosoma en *T. gondii* [2], implicó un salto cualitativo en el poder de resolución de los componentes centrosomales de este parásito. En dicho trabajo se utilizaron técnicas de microscopía óptica convencionales combinadas con una técnica de microscopía de superresolución denominada microscopía de iluminación estructurada (SIM por sus siglas en inglés) [2]. Gracias a la resolución obtenida por la utilización de SIM en este trabajo, se pudo entender el comportamiento bipartito centrosomal, estableciendo este modelo por primera vez [2]. En dicho trabajo se describieron diferentes componentes del outer y del inner core respectivamente, pudiendo por primera vez resolverlos espacialmente. Entre las proteínas descritas para el outer core se destacan TgSAS6, Centrina-1, TgSFI-1, TgCEP250, entre otras,

mientras que del inner core solo se describió TgCEP250L1. Desafortunadamente la técnica de SIM tiene un límite de resolución que está por encima de la distancia que tienen los centriolos de este parásito entre sí. Esto tuvo como consecuencia que los centriolos y sus componentes, no fueron discernibles entre sí en dicho trabajo [2]. Avances recientes en el campo permitieron la introducción de una técnica de microscopía denominada microscopía de ultraestructura de expansión (U-ExM por sus siglas en inglés). La misma consiste en un tratamiento especial de la muestra, que permite la obtención de límites de resolución 4 veces superiores a los límites de resolución obtenidos por microscopía óptica convencional, sin el uso de microscopios de mayor resolución[5]. Este límite de resolución es 2 veces mayor que el obtenido utilizando SIM y es capaz de resolver los centriolos individuales de este parásito y los extremos distales y proximales de cada uno de ellos. Con el objetivo de aportar una localización fina de las proteínas contenidas en los dominios proteicos que conforman el centrosoma de este parásito, en este capítulo combinamos la generación de dos cepas transgénicas (TgSAS6-mAID-3HA y TgCEP250L1-mAID-3HA), con anticuerpos específicos para estructuras de interés, junto a la utilización de U-ExM. Utilizando la técnica de CRISPR/Cas9, fuimos capaces de generar las cepas TgSAS6-mAID-3HA (como proxy del outer core) y TgCEP250L1-AID-3HA (como proxy del inner core), en el background de una cepa que expresa el receptor TIR1 [6]. Estas cepas pueden depletar la proteína de forma condicionada con el agregado de Auxina [6]. Utilizando estas cepas, pudimos estudiar el rol de las mismas en este parásito. Los últimos resultados están agrupados en los capítulos 3.0 y 4.0 de esta tesis.

3.2 Resultados

3.2.1 Los centriolos siguen una dinámica acompasada por la formación de las células hijas

Desde los estudios pioneros en la década del 70 utilizando microscopía de electrónica de transmisión, la dinámica de los centriolos que componen el centrosoma en *Toxoplasma gondii* ha llamado la atención de muchos investigadores [8]. Dada las limitaciones de resolución en las técnicas de microscopía óptica y de superresolución aplicadas en este parásito, no se ha podido avanzar hasta recientemente, en la localización fina de componentes centrosomales y su posición relativa frente a los centriolos. En este trabajo pudimos observar la dinámica de los centriolos de este parásito a lo largo de su ciclo celular utilizando U-ExM como nunca antes reportado. En la Figura 1 se observa primero los centriolos en interfase (dos barriles paralelos), luego durante la división celular donde en primera instancia, son cuatro enfrentados con el huso mitótico en medio, para luego observar los siguientes estadios donde cada par de centriolos está contenido en las células hijas que van creciendo hasta terminar en células “adultas”.

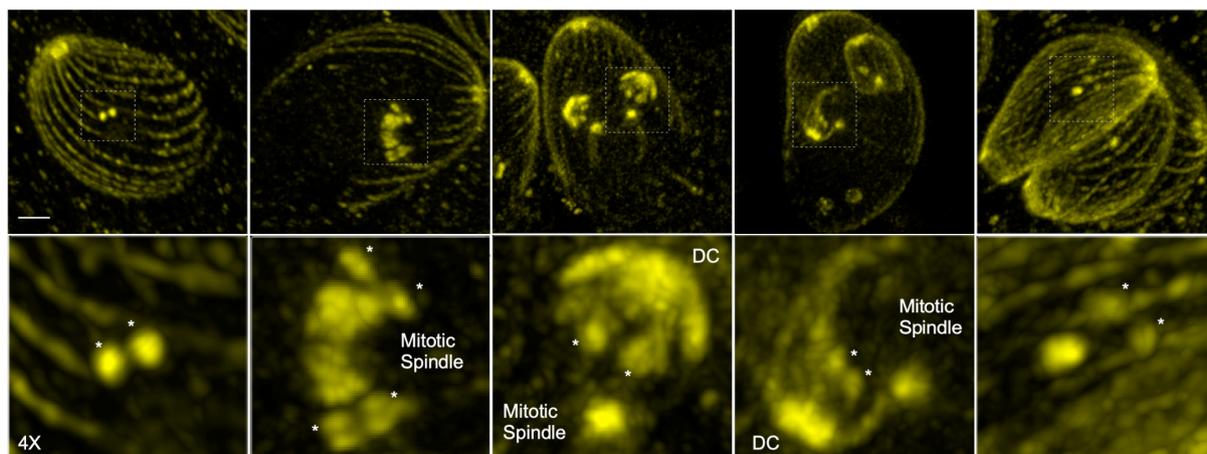


Figura (III). 1. **Dinámica de los centriolos en *T. gondii* a lo largo del ciclo celular.** Microscopía de ultraestructura de expansión (UExM) revela la dinámica de los centriolos a lo largo del ciclo celular de *T. gondii*. Los centriolos, el huso mitótico y las estructuras que contienen tubulina acetilada están marcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (amarillo). Nótese que con los asteriscos están marcados los centriolos y con DC las células hijas. La escala corresponde a 1 μ m.

3.2.2 El outer core alberga los centriolos

Desde la primera descripción del comportamiento bipartito del centrosoma de *T. gondii* en 2015 [2], varias preguntas se han instalado en el campo. Entre las preguntas se destacan cuál de los dominios proteicos alberga los centriolos, cuál es el rol de cada uno de los dominios, hasta cual es la vinculación -si existe- entre dichos dominios. En esa búsqueda por contestar las preguntas anteriormente mencionadas, diferentes trabajos han sido publicados. La función del outer core ha sido vinculada a la generación de las células hijas durante la endodiogenia [8], la función del inner core observamos (en un trabajo reciente de nuestro grupo, que conforma el capítulo 2 de esta tesis [4]) está vinculada a la segregación nuclear. Pero hasta la fecha la localización de los centriolos con respecto a los dos dominios proteicos centrosomales, seguía siendo una incógnita. Utilizando una cepa que expresa TgSAS6-mAID-3HA combinada con la técnica de U-ExM y anticuerpos anti-Centrina1 en este trabajo pudimos observar que el outer core definitivamente alberga los centriolos como se muestra en la Figura 2, pero también que TgSAS6 está en la base de los centriolos y que Centrina1 está fuera del lumen centriolar.

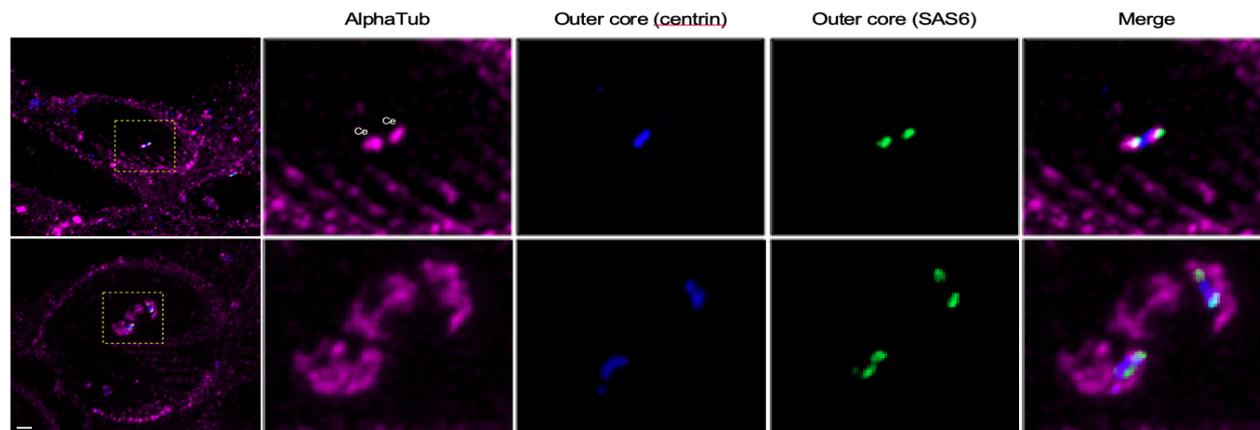


Figura. (III). **El outer core alberga los centriolos.** Microscopía de ultraestructura de expansión (UExM) revela que el outer core alberga los centriolos. Centrina-1 está marcado con anticuerpo anti-Centrin-1 (azul), los centriolos, el huso mitótico y las estructuras que contienen tubulina acetilada están marcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (violeta) y TgSAS6 está marcado con anticuerpo anti-HA (verde). Notar que los marcadores del outer core TgSAS6 y Centrina-1 se encuentran junto a los centriolos. TgSAS6 colocalizando con los mismos, mientras que Centrin-1 en una localización entre los mismos. La escala corresponde a 1 μ m.

3.2.3 El inner core es un dominio lejano a los centriolos y está contenido en el Centrocono

TgCEP250L1 es una proteína únicamente hallada en el inner core y por ende utilizada como proxy de este dominio proteico. Utilizando una cepa que expresa TgCEP250L1-mAID-3HA, pudimos observar la localización de esta proteína con respecto a los centriolos. El mayor poder de resolución de UExM nos permitió observar que el inner core presenta una localización relativa lejana a los centriolos a lo largo del ciclo celular (Figura 3). En un trabajo reciente del grupo (contenido en el capítulo 2 de esta tesis doctoral) demostramos que la localización del inner core no solo es distante con respecto a los centriolos, sino que es dinámica a lo largo del ciclo celular y coincidente con la dinámica del huso mitótico[4]. Por otro lado pudimos observar que el inner core se encuentra localizado dentro de una estructura denominada Centrocono como se observa en la figura 4. El Centrocono es una estructura dinámica que durante la división celular de este parásito alberga los microtúbulos del huso mitótico [11]. TgMORN-1 es una proteína que se encuentra en la base del centrocono, ampliamente utilizada como proxy de esta estructura [11]. Para poder observar la localización relativa de TgCEP250L1 frente al Centrocono, utilizamos anticuerpos anti-alfa Tubulina, anti-TgMORN-1 y anti-HA. Los anticuerpos anti-alfa tubulina se utilizaron como proxy a las estructuras de los centriolos, el huso mitótico y células hijas, TgMORN-1 como proxy del centrocono y HA para reconocer TgCEP250L1-mAID-3HA que se utilizó como marcador del inner core.

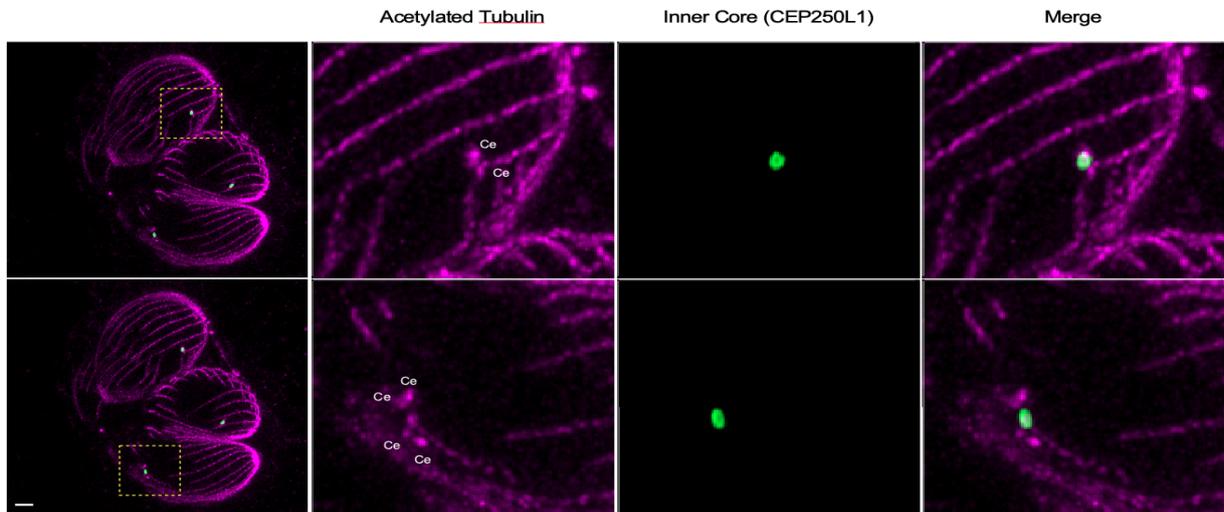


Figura. (III). 2. **El inner core es un dominio distante a los centriolos.** Usando Microscopía de ultraestructura de expansión (UExM) se observa la distancia relativa del inner core con respecto a los centriolos, de acuerdo a lo demostrado en [10]. TgCEP250L1 el marcador del inner core, está marcado con un anticuerpo anti-HA (verde), los centriolos, el huso mitótico y las estructuras que contienen tubulina acetilada están marcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (violeta), los centriolos están rotulados (Ce). La escala corresponde a 1 μm .

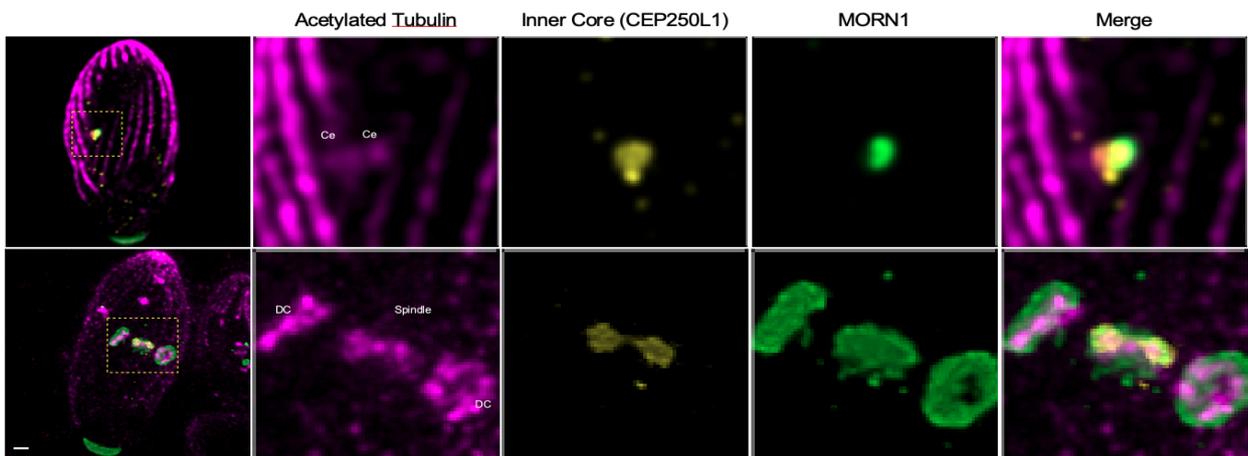


Figura (III). 3. **El inner core está contenido en el centrocono.** Usando UExM se observa la posición relativa del inner core con respecto al centrocono. TgCEP250L1 el marcador del inner core, está marcado con un anticuerpo anti-HA (amarillo), los centriolos, el huso mitótico y las estructuras que contienen tubulina acetilada están marcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (violeta), TgMORN-1 está marcado con un anticuerpo anti-TgMORN-1 (verde). Los centriolos están rotulados (Ce). La escala corresponde a 1 μm .

3.2.4 Los cinetocoros están contenidos en el Centrocono

El modelo centrosomal aceptado de este parásito propone que el centrosoma se encuentra unido por anclajes físicos (desconocidos) a los centrómeros a través de los cinetocoros [13,14,15]. *T. gondii* presenta algunos componentes “canónicos” de los cinetocoros observados en eucariotas superiores [16]. Entre estos componentes se destacan las proteínas Tg-Nuf-2 y Tg-NDC80 [16]. Una pregunta que nos realizamos es si los cinetocoros se encontraban dentro o fuera de este compartimento. Para responder esta pregunta utilizamos U-ExM combinados con los siguientes anticuerpos: anti-alfa tubulina como proxy a las estructuras de los centriolos, el huso mitótico y células hijas, Tg-MORN-1 como proxy del centrocono y anti-NDC80 como marcador del cinetocoro. Pudiendo observar que los cinetocoros se encuentran agrupados en el interior del centrocono a lo largo del ciclo celular como se muestra en la Figura 5.

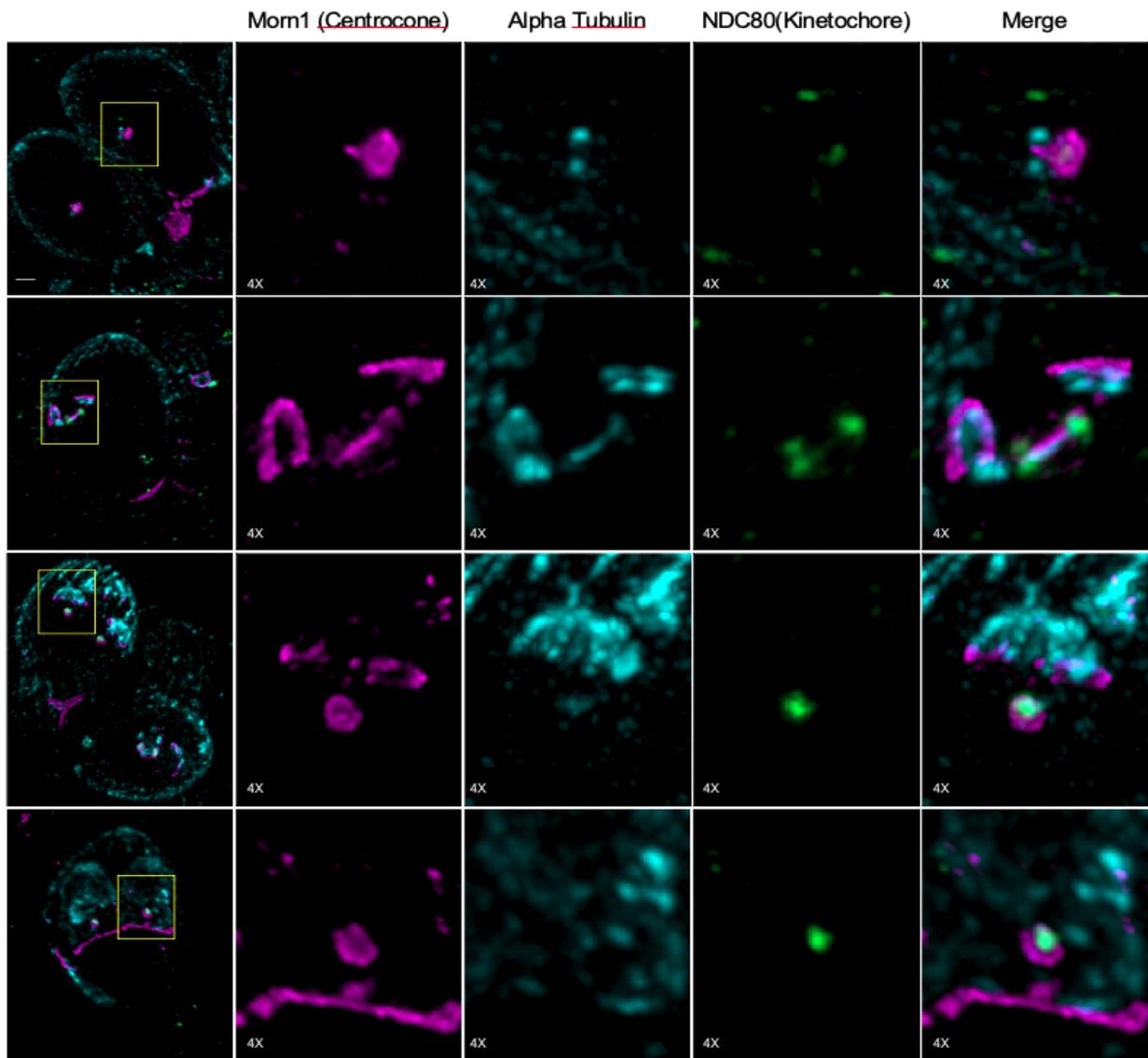


Figura (III). 4. **El cinetocoro de *T. gondii* está contenido en el centrocono.** Usando UExM se observa la posición relativa del cinetocoro con respecto al centrocono. A lo largo de los diferentes paneles se puede observar cómo a medida que avanza el ciclo celular, el cinetocoro (marcado con un anticuerpo anti-NDC80 en verde) co-localizan con el centrocono (marcado con un anticuerpo anti-TgMORN-1 en violeta). En cyan se marcan la alfa- tubulina de células hijas, centriolos y huso mitótico. La escala corresponde a 1 μ m.

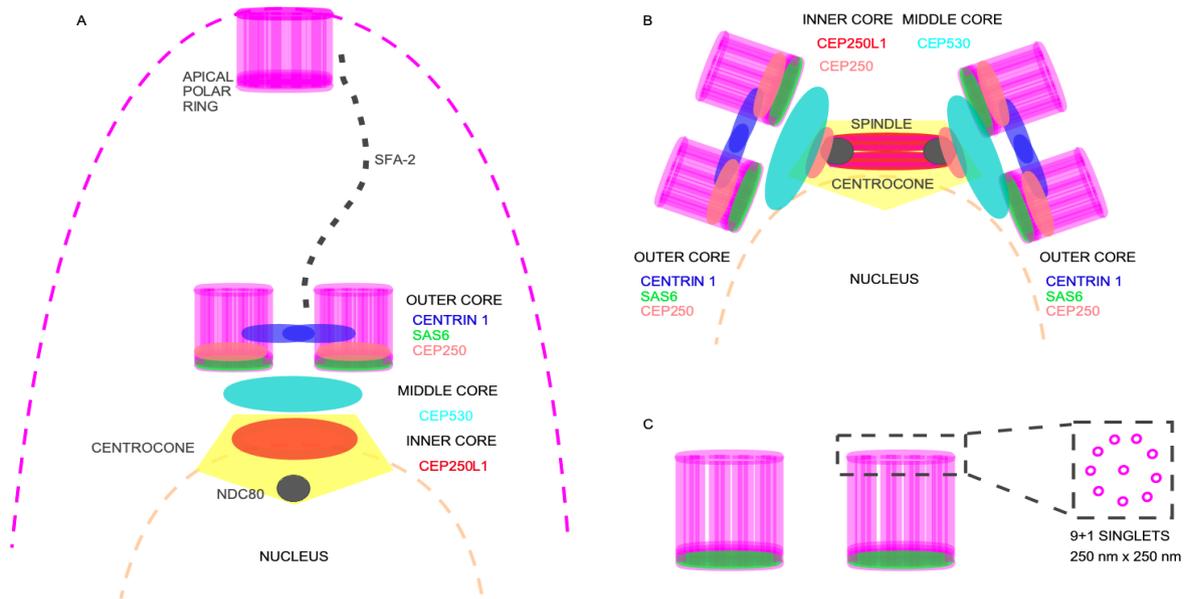


Figura (III). 5. **Representación esquemática del modelo del centrosoma para *T. gondii*.** En violeta se marcan los centriolos y el anillo apical polar (APR por su sigla en inglés). En azul se muestra la ubicación de Centrina-1, en Celeste la ubicación del middle core con CEP530[3] , en naranja la ubicación del inner core (localización dada por TgCEP250L1), en amarillo el centrocono (localización dada por datos con anticuerpos anti-MORN-1) y en gris la ubicación del cinetocoro (localización dada por datos con anticuerpos anti-NDC80).

3.3 Conclusiones

El centrosoma en *T. gondii* posee una estructura dinámica a lo largo del ciclo celular que mediante la separación del mismo en diferentes dominios proteicos (al menos tres), le permitiría realizar la compleja coordinación de su división celular. Esta segregación en dominios le permite al parásito realizar en paralelo los diferentes eventos que involucran la división celular de forma coordinada [3,4,9]. En este capítulo utilizando microscopía de ultraestructura de expansión (U-ExM), pudimos observar la dinámica de los centriolos a lo largo del ciclo celular, pudiendo descifrar en cuál de los dominios centrosomales están contenidos los centriolos. También pudimos observar por primera vez la localización de Centrina 1 con respecto a los centriolos en este parásito. Las centrinas son proteínas que presentan un dominio EF característico y que se localizan en los centriolos y en cuerpos basales de células eucariotas. En *T. gondii* existen tres homólogos para Centrina [17]. Las tres presentan localización centrosomal salvo TgCEN2 que presenta una localización centrosomal y apical [17]. En este capítulo pudimos observar que TgCEN1 (extensamente utilizado como marcador centriolar en el campo) no se encuentra en el lumen de los centriolos como era asumido, sino que lo hace en una zona periférica a los mismos. Por otro lado pudimos observar que los cinetocoros están contenidos en el Centrocono, una estructura que alberga el huso mitótico durante la división en este parásito. Como conclusión final, en este capítulo pudimos revisar la localización de componentes centrosomales conocidos con un poder de resolución sin precedentes. Aportando al campo, la generación de un modelo centrosomal de este parásito con el mayor nivel de detalle hasta la fecha resumido en la Figura 6.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Cultivo celular de *Toxoplasma gondii*

Células de epitelio de riñón de mono verde (VERO) fueron mantenidas en botellas de plástico tratadas para cultivo celular, en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino de complementado (Gibco), 4 mM de L-glutamina (Gibco), 200 U/ml de penicilina (Gibco) y 200 ug/ml de estreptomicina (Gibco), a 37 °C y 5 % de CO₂. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* fueron mantenidos por pasaje serial en células Vero en las condiciones mencionadas anteriormente. Nótese que el cultivo de *T. gondii* fue llevado a cabo siempre de igual manera para todas las aproximaciones experimentales descritas en esta tesis, excepto que se indique lo contrario.

3.4.2 Microscopía de Expansión de Ultraestructura (U-ExM)

La microscopía de expansión de ultraestructura (UEX_M) se realizó como se ha descrito anteriormente [5] sin modificaciones. Brevemente, los cubreobjetos, conteniendo las células infectadas con parásitos, se incubaron por 5 horas con una mezcla de 0.7 % de acrilamida (AA) y 1% de formaldehído (FA), a 37°C. Seguidamente, se cataliza la gelación de la mezcla agregando una solución de acrilato de sodio (SA) al 19%; 10% AA; 0,1% BIS-AA en PBS, por 1 hora a 37°C. Luego, se desnaturalizan las proteínas, incubando la mezcla a 95°C por 1h30, lo cual posibilita luego la expansión del gel, conteniendo a los parásitos, en agua toda la noche. Para la visualización de la ultraestructura del parásito, y la localización de proteínas específicas, se utiliza un protocolo estándar de inmunofluorescencia indirecta descrito anteriormente. Las diluciones de los anticuerpos tanto primarios como secundarios fueron utilizados al doble. Todas las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM880 con un objetivo de aceite Plan-Apochromat 63x/1,40. Una vez obtenidas las imágenes las mismas fueron procesadas utilizando ImageJ (NIH) y el software Zeiss ZEN blue edition v2.0. La deconvolución de las imágenes se realizó utilizando Huygens Professional v19.10.0p2 64b (Scientific Volume Imaging, Países Bajos). Nótese que esta técnica fue llevada a cabo siempre de igual manera para todas las

aproximaciones experimentales descritas en esta tesis, excepto que se indique lo contrario.

3.4.3 Generación de la cepa TgSAS6-mAID-3HA y TgCEP250L1-mAID-3HA

Con el objetivo de tener un marcador del outer core centrosomal se generó una cepa que expresa TgSAS6-mAID-3HA en el contexto de la cepa RH Δ ku80 Tir1 [6]. Para la obtención de TgSAS6-mAID-3HA, se amplificó un producto de PCR de la secuencia mAID-3HA con 35 pb de homología con cualquiera de los extremos del STOP codón del gen TgSAS6 utilizando los cebadores 5'-TGCGCGCAGCGAGCTCGGCGGCGCGACAGCCGCGT-3' y 5'-CGTGA ACTACAAAGTGCGGGTCCAAATCTTTTCGAC-3'. Se generó un plásmido que codifica para un ARN guía dirigido al extremo 3' del gen TgSAS6 y SpCas9 mediante mutagénesis utilizando los cebadores 5'-ACACTCTACGAACCTGTCCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA-3' y 5'-GGAAAAGAGTTGCTCAAACGTGG-3'. Luego, 50 μ g del vector pSagCas9 y 10 μ g del producto PCR se transfectaron en $5,0 \times 10^7$ parásitos utilizando un electroporador BTX 600 de acuerdo con los protocolos publicados previamente [9]. El vector pSagCas9 [17] fue proporcionado amablemente por David Sibley. La inserción exitosa de la secuencia 3HA-mAID fue monitoreada por PCR. Las líneas celulares clonales se obtuvieron mediante dilución limitante.

Con el objetivo de tener un marcador del inner core centrosomal se generó una cepa que expresa TgCEP250L1-mAID-3HA en el contexto de la cepa RH Δ ku80 Tir1. [6]. Brevemente, un producto de PCR de la secuencia mAID-3HA que tiene 35 pb de homología con la región 3 prima del gen TgCEP250L1 se amplificó utilizando los cebadores: (5'-GCACAGGAAGGGGAAAGTCGTCGCTTTTCGGGGCGA-3') y (5'-TTAGGCATAATCTGGAACATCG-3'). Se generó un plásmido que codifica una guía de ARN dirigida al extremo 3' del gen TgCEP250L1 y SpCas9 mediante mutagénesis utilizando los cebadores : (5'-ACACTCTACGAACCTGTCCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA-3') y (5'-AACTTGACATCCCCATTTAC-3'), luego se transfectaron 50 μ g de vector pSagCas9 y 10 μ g de producto de PCR en $5,0 \times 10^7$ parásitos usando un

electroporador BTX 600 73, siguiendo protocolos publicados previamente [9]. El vector pSagCas9 [17] fue proporcionado amablemente por el Dr. David Sibley. La inserción exitosa de la secuencia 3HA-mAID se verificó mediante PCR. Las líneas celulares clonales se obtuvieron mediante dilución límite.

3.5 Bibliografía

1. Azimzadeh J, Bornens M. Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci.* el 1 de julio de 2007;120(13):2139–42.
2. Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLOS Biol.* el 3 de marzo de 2015;13(3):e1002093.
3. Courjol F, Gissot M. A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* junio de 2018;20(6):e12832.
4. Tomasina R, Gonzalez FC, Martins-Duarte ÉS, Bastin P, Gissot M, Francia ME. Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in *Toxoplasma gondii*. Soldati-Favre D, editor. *mBio.* el 7 de septiembre de 2022;e01859-22.
5. Dos Santos Pacheco N, Soldati-Favre D. Coupling Auxin-Inducible Degron System with Ultrastructure Expansion Microscopy to Accelerate the Discovery of Gene Function in *Toxoplasma gondii*. En: de Pablos LM, Sotillo J, editores. *Parasite Genomics: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021. p. 121–37. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9_8
6. Brown KM, Long S, Sibley LD. Plasma Membrane Association by N-Acylation Governs PKG Function in *Toxoplasma gondii*. *mBio.* el 2 de mayo de 2017;8(3).
7. Dos Santos Pacheco Nicolas, Tosetti Nicolò, Krishnan Aarti, Haase Romuald, Maco Bohumil, Suarez Catherine, et al. Revisiting the Role of *Toxoplasma gondii* ERK7 in the Maintenance and Stability of the Apical Complex. *mBio.* 2021;12(5):e02057-21.

8. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLOS Biol.* el 11 de diciembre de 2012;10(12):e1001444.
9. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. *PLOS ONE.* el 27 de junio de 2014;9(6):e100450.
10. Dubey JP. Chapter 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 1–17. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964816000015>
11. Ferguson DJP, Dubremetz JF. Chapter 2 - The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. En: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014. p. 19–59. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964816000027>
12. Tomasina R, González FC, Francia ME. Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Microorganisms.* el 3 de diciembre de 2021;9(12):2503.
13. Gubbels MJ, Vaishnav S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci.* el 1 de junio de 2006;119(Pt 11):2236–45.
14. Berry L, Chen CT, Francia ME, Guerin A, Graindorge A, Saliou JM, et al. *Toxoplasma gondii* chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: a prerequisite for productive endodyogeny. *Cell Mol Life Sci CMLS.* diciembre de 2018;75(23):4417–43.
15. Brooks CF, Francia ME, Gissot M, Croken MM, Kim K, Striepen B. *Toxoplasma gondii* sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci.* el 1 de marzo de 2011;108(9):3767.
16. Farrell M, Gubbels MJ. The *Toxoplasma gondii* kinetochore is required for centrosome association with the centrocone (spindle pole). *Cell Microbiol.* enero de 2014;16(1):78–94.
17. Leung JM, Liu J, Wetzel LA, Hu K. Centrin2 from the human parasite *Toxoplasma gondii* is required for its invasion and intracellular replication. *J Cell Sci.* el 1 de julio de 2019;132(13):jcs228791.

CAPÍTULO 4.0 “Explorando la función del inner core”

4.1 Resumen

En este capítulo de la tesis nos enfocamos en el estudio de la biología del centrosoma, el principal centro organizador de microtúbulos en células eucariotas, y el regulador de la división celular en Apicomplejos. Más precisamente en el estudio del inner core centrosomal. Trabajos recientes demostraron que este organelo está compuesto por al menos 3 dominios proteicos topológicamente encadenados entre sí [9-11]. Un core cercano al núcleo denominado “inner core”, otro lejano al núcleo denominado “outer core” y un dominio que se localiza en medio de estos dos denominado “middle core” [9-11]. La función del outer core está relacionada con el ensamblaje de las células hijas, dado que este proceso sucede en el citosol. La función del “middle core” está vinculada a la homeostasis de ambos “cores” [11], mientras que la función del inner core, se piensa está asociada a la segregación nuclear. Desde la descripción inicial del comportamiento bipartito centrosomal en este parásito en 2015 [9], seguido por trabajos posteriores [10]; se han descrito tan solo dos proteínas con localización en el inner core centrosomal, TgCEP250 y TgCEP250L1. Las proteínas CEP (del inglés “centrosomal proteins”) son una familia de proteínas centrosomales identificadas en eucariotas superiores caracterizadas por la presencia de dominios coiled-coiled. La proteína centrosomal Cep250, también conocida como cNap, es una proteína crucial para la duplicación del centrosoma en eucariotas superiores; los dos homólogos de Cep250 en el genoma de *T. gondii*, son denominados TgCep250 y TgCep250L1. Estas proteínas presentan la particularidad de localizarse diferencialmente en dominios físicamente distintos del centrosoma; TgCep250 se encuentra tanto en el inner como el outer core del centrosoma y TgCep250L1 se localiza exclusivamente en el inner core. TgCep250 cumple la función de unir ambos dominios. Sin embargo, el rol de TgCep250L1 no había sido explorado hasta el desarrollo de este trabajo. En

este capítulo nos centramos en tratar de responder las siguientes preguntas. ¿Cuál es la función de TgCEP250L1? ¿Cuál es el rol de inner core?, ¿Cómo se vinculan el outer y el inner core a lo largo del ciclo celular?, ¿Cuál es el rol del inner core en la segregación nuclear?

Para poder contestar las preguntas anteriormente mencionadas, nos abocamos al estudio de la función de TgCep250L1, la única proteína conocida a la fecha que sólo se encuentra en el inner core centrosomal.



Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in *Toxoplasma gondii*

Ramiro Tomasina,^{a,b} Fabiana C. Gonzalez,^{a,b} Érica S. Martins-Duarte,^c Philippe Bastin,^d  Mathieu Gissot,^{e,f}  María E. Francia^{a,b}

^aLaboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

^bParasitology and Mycology Department, School of Medicine, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^cDepartamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^dTrypanosome Cell Biology Unit, Institut Pasteur, Paris, France

^eLille University, CNRS, Inserm, CHU Lille, Lille, France

^fU1019/UMR 9017/CIL—Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

ABSTRACT Centrosomes are the main microtubule-organizing center of the cell. They are normally formed by two centrioles, embedded in a cloud of proteins known as pericentriolar material (PCM). The PCM ascribes centrioles with their microtubule nucleation capacity. *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis, divides by endodyogeny. Successful cell division is critical for pathogenesis. The centrosome, one of the microtubule organizing centers of the cell, plays central roles in orchestrating the temporal and physical coordination of major organelle segregation and daughter cell formation during endodyogeny. The *Toxoplasma* centrosome is constituted by multiple domains: an outer core, distal from the nucleus; a middle core; and an inner core, proximal to the nucleus. This modular organization has been proposed to underlie *T. gondii*'s cell division plasticity. However, the role of the inner core remains undeciphered. Here, we focus on understanding the function of the inner core by finely studying the localization and role of its only known molecular marker; TgCep250L1. We show that upon conditional degradation of TgCep250L1 parasites are unable to survive. Mutants exhibit severe nuclear segregation defects. In addition, the rest of the centrosome, defined by the position of the centrioles, disconnects from the nucleus. We explore the structural defects underlying these phenotypes by ultrastructure expansion microscopy. We show that TgCep250L1's location changes with respect to other markers, and these changes encompass the formation of the mitotic spindle. Moreover, we show that in the absence of TgCep250L1, the microtubule binding protein TgEB1, fails to localize at the mitotic spindle, while unsegregated nuclei accumulate at the residual body. Overall, our data support a model in which the inner core of the *T. gondii* centrosome critically participates in cell division by directly impacting the formation or stability of the mitotic spindle.

IMPORTANCE *Toxoplasma gondii* parasites cause toxoplasmosis, arguably the most widespread and prevalent parasitosis of humans and animals. During the clinically relevant stage of its life cycle, the parasites divide by endodyogeny. In this mode of division, the nucleus, containing loosely packed chromatin and a virtually intact nuclear envelope, parcels into two daughter cells generated within a common mother cell cytoplasm. The centrosome is a microtubule-organizing center critical for orchestrating the multiple simultaneously occurring events of endodyogeny. It is organized in two distinct domains: the outer and inner cores. We demonstrate here that the inner core protein TgCep250L1 is required for replication of *T. gondii*. Lack of TgCep250L1 renders parasites able to form daughter cells, while unable to segregate their nuclei. We determine that, in the absence of TgCep250L1, the mitotic spindle, which is responsible for karyokinesis, does not

Editor Dominique Soldati-Favre, University of Geneva

Copyright © 2022 Tomasina et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to María E. Francia, mfrancia@pasteur.edu.uy.

The authors declare no conflict of interest.

Received 19 July 2022

Accepted 10 August 2022

Published 7 September 2022

assemble. Our results support a role for the inner core in nucleation or stabilization of the mitotic spindle in *T. gondii*.

KEYWORDS endodyogeny, mitosis, mitotic spindle, *Toxoplasma*, ultrastructure expansion microscopy, cell division, centrosome

Centrosomes are the main microtubule-organizing centers (MTOCs) of the cell. In mammalian cells, the centrosome is formed by two microtubule-based barrels, known as centrioles, which display a highly conserved, 9-fold radial symmetry of triplet microtubules. Centrioles reside within a complex matrix of proteins, collectively known as the pericentriolar material (PCM). The PCM ascribes centrioles with their microtubule nucleation capacity. The centrosome's microtubule organization capacity plays pivotal roles in cellular life, impacting cell shape and polarity, organizing the formation of motile structures, and participating in karyokinesis.

The phylum *Apicomplexa* is a large group of protozoan parasites, consisting of more than 6,000 species (1). Apicomplexans cause important human and animal diseases, including toxoplasmosis, malaria, neosporosis, and cryptosporidiosis. Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, arguably the most successful parasitic organism of warm-blooded animals in the world. It is estimated that around 30% of the human population is infected with this parasite. The most severe outcomes by *T. gondii* infection are due to reactivation of chronic infections, primo-infections in immunocompromised individuals, and congenital transmission (2, 3). The latter could lead to miscarriage or irreversible sequelae in the newborn.

T. gondii actively invades virtually any nucleated cell. Once inside the cell, it replicates, scaling its numbers rapidly and exponentially, eventually causing host cell lysis. Newly released parasites can subsequently invade healthy neighboring cells perpetuating the infection and exponentially upscaling the damage. The fast dividing form of the parasites, known as the tachyzoite, follows a cell division scheme known as endodyogeny. Endodyogeny consists of a semiclosed nuclear mitosis—i.e., no appreciable chromatin condensation or nuclear envelope breakdown occurs—concomitant with the assembly of two daughter cells within the mother cell (4).

Tachyzoites bear two MTOCs: the apical polar ring (APR) and the centrosome. The APR is involved in nucleating the cortical microtubules that shape and permit parasite motility (5). The centrosome in *T. gondii* has been shown to orchestrate the temporal and spatial coordination of nuclear mitosis and daughter cell formation (6, 7). On one hand, the centrosome nucleates the mitotic spindle microtubules, impacting chromatin organization and nuclear segregation, while on the other hand, the centrosome organizes the seeds of new cells by physically positioning the offspring's APR, thereby spatially and temporally linking new daughter cell formation with nuclear content segregation (8).

Recently, the centrosome in *T. gondii* was shown to be constituted by three distinct protein localization domains. Initially, an outer core, distal from the nucleus, and an inner core, proximal to the nucleus, were identified (9). These domains were described based on the localization of centrosomal protein homologs. A homolog of Centrin1, an EF-hand calcium binding protein and a *bona fide* marker of centrioles in many species, was shown to localize at the outer core. Likewise, SAS6, a protein involved in forming the structure responsible for ascribing centrioles with their characteristic geometry, known as the cartwheel, colocalizes with TgCentrin1. Sfil and γ -tubulin orthologs are also found at the outer core (9, 10). These observations led to the proposal that centrioles likely reside within the outer domain (9). However, this has not been experimentally validated. On the other hand, TgCep250L1 (TgME49_290620), a distant homolog of CEP250, a centrosomal protein involved in centriole cohesion, localizes to the inner core exclusively (9, 11). An additional CEP250 homolog, TgCep250 (TgME49_212880) localizes to both the inner and outer cores (9, 11). Experimental manipulation of TgCep250 causes physical separation of the cores and the concomitant dysregulation of cytosolic and nuclear events during cell

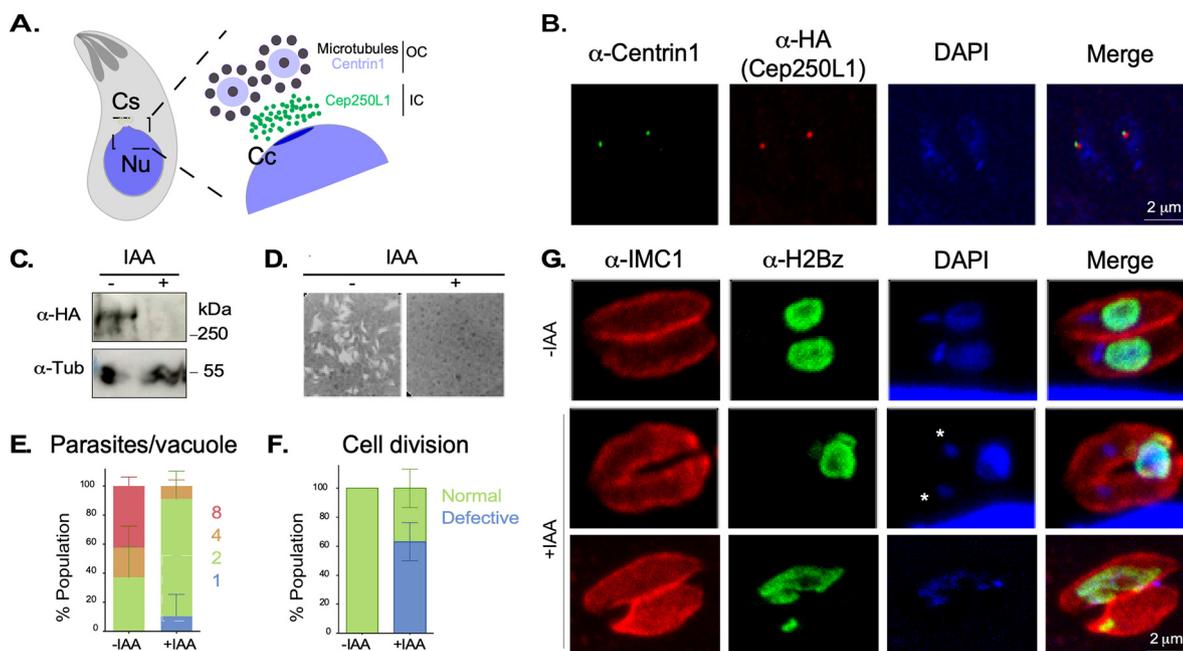


FIG 1 Conditional knockdown of TgCep250L1 causes nuclear segregation defects. (A) Schematic representation of the bipartite centrosome of *T. gondii*. The centrosome (Cs) of *T. gondii* is organized into two core domains. The outer core houses proteins such as Centrin1 and has been proposed to house two parallel centrioles displaying a 9-fold symmetry of single microtubules. The relative position of TgCep250L1, previously approximated by structured illumination super-resolution microscopy, is shown. The centrocone (Cc) is a nuclear (Nu) envelope elaboration apposed to the centrosome present throughout the cell cycle. (B) The fusion protein TgCep250L1-mAID-3HA correctly localizes to the centrosome. The results of an IFA of TgCep250L1-mAID-3HA parasites stained with anti-Centrin1 antibody (green), anti-HA antibody for TgCep250L1-mAID-3HA (red), and DAPI (blue) are shown. A maximum intensity projected z-stack spanning the entire parasite is shown. (C) TgCep250L1-mAID-3HA rapidly degrades upon addition of IAA to the growth media. Western blot analysis of total protein extracts from the TgCep250L1-mAID-3HA strain treated or not with IAA for 24 h. (D) TgCep250L1 is required for tachyzoite proliferation. HFF monolayers were infected with equal numbers of TgCep250L1-mAID-3HA and treated or not, as indicated, for a week. Note that while untreated parasites (–IAA) are able to generate lysis plaques in the monolayer, treated parasites (+IAA) do not proliferate. (E) TgCep250L1 knockdown stalls parasite replication. The numbers of TgCep250L1-mAID-3HA parasites per vacuole, treated as indicated, were quantified. The data shown are the averages of three independent experiments. A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. The data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean. (F) TgCep250L1 knockdown yields parasites displaying aberrant cell division phenotypes. The numbers of parasites displaying mis-segregated or no nuclei were quantified by IFA. The data shown are the averages of three independent experiments. A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. The data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean. (G) TgCep250L1 depletion causes nuclear mis-segregation. TgCep250L1-mAID-3HA parasites, treated as indicated for 24 h, were stained with anti-IMC1 (red; pellicle marker), anti-H2Bz (green; nucleus), and DAPI (blue; DNA marker). An asterisk marks the apicoplast DNA labeled with DAPI.

division. This protein has been proposed to bridge cohesion between the two opposite cores (11). More recently, a third protein localization domain, in between the initially described outer and inner cores, was identified. The “middle” core houses TgCep530 (TgME49_246190); a mutant of this protein loses synchrony between cytokinesis and karyokinesis and exhibits outer core fragmentation, indicating that this domain is also important for centrosomal homeostasis (12).

Although the outer core has been proposed to regulate aspects of daughter cell formation and the middle core has been shown to play a role in cohesion and outer core stability, the role played by the inner core remains experimentally unexplored. To gain further insight into these domains, we focus here on the characterization of TgCep250L1's function, as a proxy to the role of the centrosomal inner core in cell division in *T. gondii*.

RESULTS

TgCep250L1 is required for parasite growth and survival. To assess the role of the centrosomal inner core of *T. gondii*, we generated a knockdown strain of its only identified marker, TgCep250L1, by inserting a mini-auxin inducible degron sequence (mAID) (13), followed by a triple-hemagglutinin epitope tag (3HA), in frame with the TgCep250L1's coding sequence in a Tir1-expressing parental cell line (Fig. 1A; see also

Fig. S1A in the supplemental material). Successful generation of TgCep250L1-mAID-3HA was corroborated by PCR (see Fig. S1B). Immunofluorescence assays (IFAs) with anti-HA antibodies to visualize TgCep250L1 and anti-Centrin as a proxy for the centrosome position show that the TgCep250L1-mAID-HA fusion correctly localizes to the organelle (Fig. 1B).

Degradation of TgCep250L1-mAID-HA is rapidly triggered by the exogenous addition of the auxin indole acetic acid (IAA) to the growth media. Protein knockdown is observed by Western blotting (WB) as early as 30 min after IAA addition (see Fig. S1C and Fig. S2A and B), becoming undetectable in 2 h both by WB and IFA (Fig. 1C; see also Fig. S1C).

To assess the effect of TgCep250L1 knockdown on parasite survival, we performed plaque assays. Protein knockdown was triggered at the beginning of the assay, and the ability of parasites to lyse a host cell monolayer was assessed after a weeklong incubation. Although the ability of the parental strain to generate plaques is undisturbed by the addition of IAA to the media (see Fig. S3), TgCep250L1-mAID-3HA parasites are unable to form plaques upon TgCep250L1's knockdown, suggesting that TgCep250L1 is essential for survival (Fig. 1D).

To delve into the mechanism of death experienced by the TgCep250L1-mAID-3HA parasites, we analyzed *in vitro* growth. For this, we quantified the number of parasites per vacuole upon 24 h of protein knockdown. At that time point, the vast majority of mutant parasites presented two parasites per vacuole (80%). In contrast, only 40% of the control parasites exhibited two parasites per vacuole at the same time point. While ~55% of the control parasites exhibit four to eight parasites per vacuole, no vacuoles of eight parasites were observed in the IAA-treated parasites (Fig. 1E).

TgCep250L1 knockdown causes nuclear segregation defects. To understand the underlying defects giving rise to the mutant's growth arrest, we performed IFAs upon TgCep250L1's knockdown. We used anti-IMC1 to label the inner membrane complex, a structure that scaffolds the emerging daughter and marks the mother cell's pellicle (14); anti-TgH2Bz, to label a histone variant (as a nuclear DNA marker) (15); and DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; for general DNA labeling). Although TgH2Bz specifically labels a histone bound to the nuclear genome, DAPI labels both the nuclear chromatin and the apicoplast, an organelle of endosymbiotic origin present in most apicomplexans which bears its own genome (16). By 24 h after TgCep250L1 knockdown, we observed cell division progression. Although 40% of the vacuoles appeared normal (i.e., each parasite contains a single nucleus), 60% of the vacuoles exhibited parasites displaying nuclear segregation defects (Fig. 1F and G). A third of these defective-looking vacuoles (approximately 20% of the total) exhibited an individual containing an enlarged nucleus and individuals with either a minimal fragment or no detectable nuclear content. The remaining vacuoles (approximately 40% of the total) contained parasites whereby the nucleus has not segregated into either one of the forming cells but instead remained excluded from the parasites' pellicle (Fig. 1G). Unpacked nuclei were observed by IFA, by labeling the plasma membrane with the marker TgSag1 (Fig. 2A). Observation of the latter by transmission electron microscopy (TEM) showed nuclei within a structure known as the residual body (Fig. 2B). Note that the residual body can be clearly distinguished from the daughter cells, since the former is only delimited by mother-cell derived plasma membrane (labeled in IFAs by TgSag1), while the latter displays the inner membrane complex (labeled in IFAs by TgIMC1), visualized by TEM as an electron-dense outline underlying the plasma membrane (17).

Nuclear segregation and daughter cell scaffold formation are physically linked to the centrosome (8, 18, 19). Cells in interphase display a single centrosome which is duplicated upon S-phase entry and then segregated during mitosis/cytokinesis. We assessed whether the nuclear segregation defect observed upon knockdown of TgCep250L1 could be linked to defects in the segregation of the centrosome itself. The outer core of the centrosome can be approximated by labeling the centriolar centrin with an anti-Centrin1 antibody (see Fig. S4). We labeled parasites with anti-Centrin1 and DAPI and

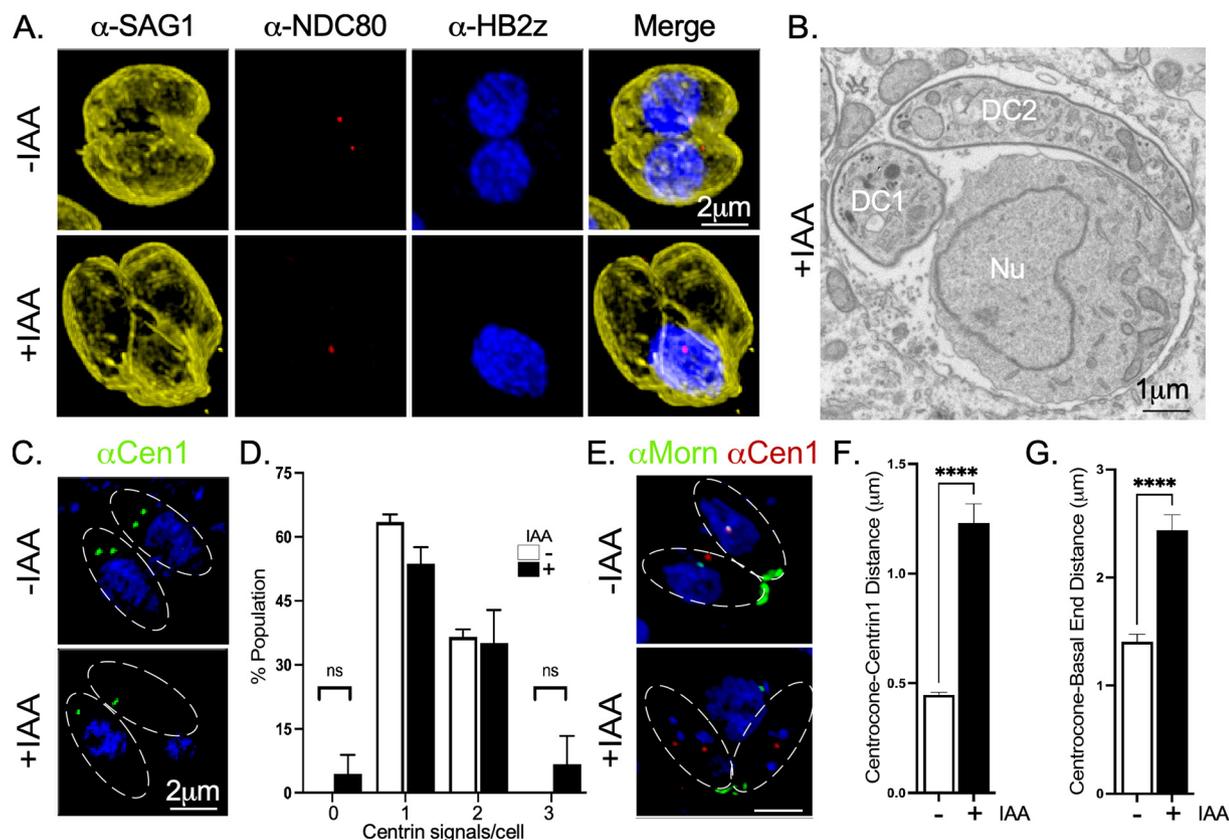


FIG 2 TgCep250L1 knockdown causes nuclear loss to the residual body. (A) Representative images of an IFA of TgCep250L1-mAID-HA parasites, stained with anti-Ndc80, anti-H2Bz, and anti-SAG1, markers of the kinetochore, nucleus, and plasma membrane, respectively, and treated as indicated are shown. The images shown correspond to maximum intensity projected z-stacks spanning the entire vacuole. Note that the plasma membrane marker SAG1 also labels the periphery of the residual body. (B) Electron micrograph of parasites treated with auxin for 24 h displaying an unsegregated nucleus within the residual body. Two individual cells (daughter cells 1 and 2 [DC1 and DC2], respectively) can be identified by the presence of the electron-dense inner membrane complex. A large nucleus (Nu) resides in the residual body, recognized at the ultrastructural level by its lack of inner membrane complex. (C) Outer core position and number are unaffected by absence of TgCep250L1. Representative IFA using anti-Centrin1 marks the position of the outer core of the centrosome (green) in parasites treated as indicated. The approximate parasite position is shown as dotted lines on the merge panel. Maximum intensity projected z-stacks, spanning the entire vacuoles, are shown. (D) Quantification of outer cores per cell. The number of centrin dots per cell was determined for parasites treated as indicated by IFA using anti-Centrin1 as a proxy of the outer core and DAPI. The data shown are the averages of three independent experiments. A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. Data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean (n.s.; $P \geq 0.05$). (E) Representative IFA results for parasites labeled and treated as indicated. Note that anti-MORN1 labels the base of the centrocone, an elaboration of the nuclear envelope that houses the mitotic spindle during cell division, and the basal end of the parasite. The linear distance between the outer core and either the centrocone (F) or the basal end of the cell (G) (labeled with anti-Centrin1 and anti-MORN1, respectively, as shown in panel E) was determined in parasites treated as indicated. The data shown are the averages of three independent experiments. A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. Data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean (****, $P < 0.0001$).

quantified the number of Centrin1 dots per cell. We observed the expected distribution of either one or two centrin dots per cell, in both treated and untreated parasites (Fig. 2C and D; see also Fig. S5). We seldom detected parasites displaying either none or up to three centrin signals upon TgCep250L1's knockdown; specifically, 7 of 150 cells displayed no centrin signal (4.6%), and 10/150 (6%) cell displayed three centrin dots. These exceptions, however, do not significantly alter the overall distribution. These analyses reveal that the absence of TgCep250L1 does not seem to significantly impact either the segregation or the duplication of the outer core the centrosome (Fig. 2C and D).

TgMORN1 marks the base of the centrocone, a structure of the nuclear envelope known to house the mitotic spindle during mitosis, and the basal end of the parasite. Nuclear TgMORN1 is physically adjacent to the position of the centrosome (20) (Fig. 2E). To gain quantitative insight into the separation between the outer core of the centrosome and the nucleus upon TgCep250L1 knockdown, we analyzed the relative distance of TgCentrin1

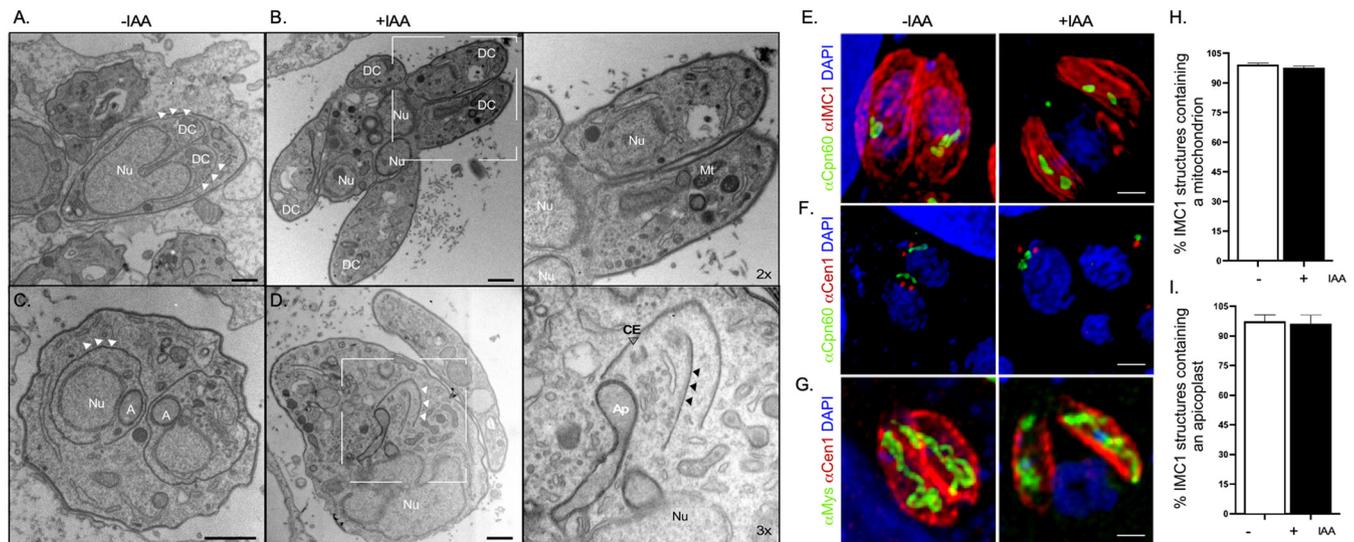


FIG 3 Lack of TgCep250L1 does not preclude segregation of the apicoplast or mitochondria. (A) Electron micrograph of a parasite dividing *T. gondii* cell (longitudinal view). The image shows the assemblage of two daughter cells scaffolds within an untreated mother cell displaying a bilobed nucleus (Nu) in the process of segregating to each daughter cell (DC). White arrowheads indicate the daughter cell's inner membrane complex. (B) Ultrastructure of *T. gondii* parasites upon 24 h of TgCep250L1's knockdown reveals proper mitochondrion segregation. Note that the *T. gondii* mitochondrion (M) is detectable within the forming daughter cell. However, several nuclei (Nu) remain excluded from the individual daughter cells. The inset shows an enlarged view of two of the daughter cells, wherein a mitochondrion profile (M) can be appreciated. (C) Electron micrograph of untreated *T. gondii* parasite dividing by endodyogeny (transversal view). Two daughter cells are assembled within a mother cell. A nucleus (Nu) is packed into each daughter cell. An apicoplast (A) that divides by association with the centrosome and hence segregates physically adjacent to the nucleus (Nu) and the centrocone (Cc) is shown. White arrowheads indicate the inner membrane complex of the daughter cells. (D) Ultrastructure of *T. gondii* parasites upon 24 h of TgCep250L1 knockdown reveals proper apicoplast segregation. The inner membrane complex of an assembling daughter cell is shown (white arrowheads). The apicoplast (A), a centriole (CE, empty arrowhead, inset), and the striated fiber (8) (black arrowheads, inset) are positioned as expected and are associated with the daughter cell scaffold. Note that nucleus (Nu), however, remains physically distant from the site of daughter cell assembly. All scale bars represent 500 nm. The zoom factor from the original image is indicated for each inset. (E to G) Projected z-stack of IFAs of parasites labeled and treated as indicated. α -Cpn60 was used as a marker of the apicoplast (E and F), while α -Mys marks the mitochondrion (G). Scale bars represent 1 μ m. (H and I) Quantification of the number of cell scaffolds (as labeled with α -IMC1, as shown in panels E and G) containing either a mitochondrion (H) or an apicoplast (I). A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. The data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean. Note that there are no significant differences between treated and untreated parasites for the segregation of either the apicoplast or the mitochondrion.

with respect to that of nuclear TgMORN1. On average, TgCentrin1 and TgMORN1 are 447 nm apart (± 103 nm; 150 nuclei) in untreated parasites. Upon IAA addition, the average distance approximately triples ($1.23 \pm 0.52 \mu$ m; 150 nuclei) (Fig. 2F). In untreated parasites, the average distance between basal end TgMORN1 and nuclear TgMORN1 is $\sim 1.5 \mu$ m; this distance increases on average by 170% upon TgCep250L1 knockdown ($2.4 \pm 0.73 \mu$ m) (Fig. 2G). Taken together, these data strongly suggest that the mechanism underlying the cell division defect is caused by the disconnect of the outer core of the centrosome and cell pellicle from the nucleus.

TgCep250L1 knockdown does not affect segregation of other organelles.

During cell division, many of the preexistent mother cell organelles are duplicated and segregated into daughter cells. These include not only the centrosome and the nucleus but also both the apicoplast and the mitochondria, among others (19, 21). In particular, the apicoplast is segregated by association with the centrosome. To understand the extent to which the lack of TgCep250L1 affects general organelle segregation, we further investigated the ultrastructure of TgCep250L1-mAID-3HA parasites upon TgCep250L1 knockdown by TEM (Fig. 3A to D). In the IAA- treated population, we observe vacuoles containing daughter cell scaffolds that showcase both mitochondria and apicoplast (Fig. 3B and D, insets, labeled "Mit" and "Ap," respectively). Consistent with our quantifications by IFA, we found dividing parasites showcase centrioles (housed within the outer core) within emerging daughters (Fig. 3D, inset, "Ce"), reinforcing the notion that the outer core is segregated correctly. In these vacuoles, we observed that nuclei are positioned away from the site of daughter cell assembly (Fig. 3B and D, inset, "Nu"). Of note, multiple centrioles within daughter cell scaffolds were never observed by TEM.

We further performed IFAs with either anti-IMC1 antibodies (to label the daughter cell scaffold) or anti-Centrin1, and anti-TgCpn60 to label the apicoplast (Fig. 3E and F). We observed that the organelle associates with the outer core, and its segregation is unaffected by the absence of TgCep250L1 (Fig. 3E, F, and H; see also Fig. S6). Likewise, labeling with anti-IMC1 and anti-Mys (a mitochondrial marker), revealed that mitochondria are properly segregated (Fig. 3G and I). Together, these data suggest that the nuclear segregation defect observed upon TgCep250L1 knockdown is not related to a general defect in cell division or to a defect in partitioning of the outer core of the centrosome between emerging cells but is instead specific to nuclear segregation.

TgCep250L1 localizes at the site of the mitotic spindle assembly during mitosis.

To gain insight into the molecular mechanism underlying the nuclear missegregation phenotype of the TgCep250L1 knockdown cells, we set out to finely map the localization of TgCep250L1 along the cell cycle, with respect to structures known to participate of nuclear segregation. The centrosome of *T. gondii* is at the limit of optical microscopy resolution (~200 nm in size). Although much has been deciphered about the ultrastructure of the organelle by TEM, molecular insight into relative position of different elements (such as, for example, the inner and outer cores) has been incremental due to the use of super-resolution fluorescence microscopy technologies, such as structured illumination (9).

A cost-effective alternative to the latter is the combined use of isotropic sample expansion and classical confocal fluorescence microscopy. Ultrastructure expansion microscopy (UExM) has been recently incorporated for routine use in *T. gondii* (22). We found that this technique allowed us to expand parasites, on average, ~3.5-fold. We labeled expanded parasites with an anti-acetylated tubulin antibody that labels the mitotic spindle, the centrioles, and the cortical microtubules (Fig. 4; see also Fig. S4 and S6). The increase in resolution allowed us to clearly visualize that, as reported previously, TgCep250L1 does not colocalize with the centrioles (see Fig. S4). We observed that in newly formed daughter cells (early interphase, defined by the presence of two centrioles) TgCep250L1 localizes adjacent to the centrioles (Fig. 4, merge panel a, "asterisks"). Upon entry into S phase, defined by centriole duplication, TgCep250L1 consistently localizes in between the duplicated pair (Fig. 4, merge panel b, "asterisks") (21, 23). Shortly after duplication, the two pairs of centrioles move away from each other, and daughter cell scaffolds become apparent (7, 8). Samples fixed at this stage systematically display an oval-like shape localization for TgCep250L1 bridging the centrioles' localization, and colocalizing with acetyl-tubulin positive staining (Fig. 4, subpanel c; daughter cells are marked as "DC1" and "DC2" [Fig. 6B, -IAA panel]; see also Fig. S5, "Early Cell Division" panel). Later in mitosis TgCep250L1 localizes to two distinct dots, each localizing at the tip of an anti-acetylated tubulin-labeled structure (Fig. 4, subpanels d and e; see also Fig. S5).

The mitotic spindle is a key structure of the molecular machinery controlling chromosome segregation. The spindle is generally made up of dynamic microtubules that are decorated by microtubule binding proteins fulfilling different roles to ensure proper DNA segregation. Microtubule binding proteins of the EB1 family directly bind and stabilize microtubules in species ranging from yeast to human. In *T. gondii*, spindle microtubules are only polymerized during cell division and are absent during interphase (24). TgEB1 is a well-conserved member of the EB1 protein family that displays a dynamic localization, residing in the nucleoplasm outside of division, being virtually undetectable, but moving along with the spindle as it forms early in mitosis (see Fig. S7, -IAA panels) (25). In dividing parasites TgEB1 markedly localizes in between the centrioles, where the mitotic spindle resides (see Fig. S7, -IAA lower panel). Likewise, EB1 foci can be observed adjacent to the apicoplast during division, as the latter divides by association with the centrosome (Fig. 5B). Using UExM, we visualized the relative positions of TgCep250L1, TgEB1, and the spindle tubulin labeled with anti-acetylated tubulin (Fig. 5A). We observed that TgCep250L1 localizes in between duplicated centriole pairs prior to the time when TgEB1 is detectable at the spindle (Fig. 5Aa, centrioles are marked by asterisks). The time at which TgEB1 becomes appreciably detectable coincides with the "oval" staining pattern adopted by TgCep250L1 (Fig. 5Ab; see also Fig. S4). When TgCep250L1 localizes

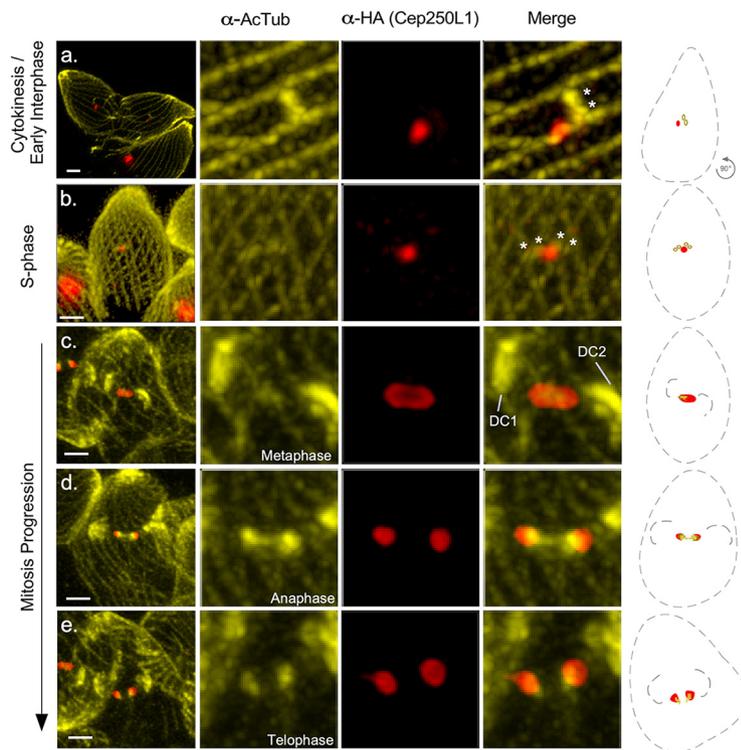


FIG 4 TgCep250L1 localization along the cell cycle. Parasites were subjected to ultrastructure expansion (UEx) and stained with antibodies as indicated. Note that acetylated tubulin is present, and therefore labeled, by the specific antiserum in multiple structures, including the scaffold microtubules of both the mother and the forming daughter cells, the centrosomes, and the mitotic spindle. Asterisks indicate the position of individual centrosomes. Daughter cells are labeled “DC1” and “DC2”. All images shown are maximum-intensity projected z-stacks spanning the entire vacuole. The scale bar represents 1 μm in all cases. Schematic representations of the main structures labeled are shown. TgCep250L1 position is shown in red (α -HA signal), the mother cell and daughter cell scaffolds are outlined by dotted lines, and the Ac-tubulin (acetylated tubulin) of the centrosomes (a and b) or of the spindle (c to e) are shown in yellow.

to the proximal tip of the tubulin structure labeled by anti-acetyl tubulin antibodies, TgEB1 localizes immediately beneath it (Fig. 5A*c*; see also Fig. S5).

Using the apicoplast as proxy for the centrosome position (having previously established that the apicoplast and outer core segregate properly), we sought to determine whether TgEB1's localization and/or dynamics are impacted upon TgCep250L1's knockdown. We observed that in dividing parasites, displaying the mutant phenotype (i.e., fragmented or unsegregated nuclei), TgEB1 is undetectable (Fig. 5B, +IAA panel). We seldomly observe cumulates of TgEB1 at the nucleus, however, we never detect it at its expected position adjacent to TgCentrin1 (see Fig. S7, +IAA panels). To quantitate the extent of this defect, we quantified the presence of nuclei exhibiting diffuse or undetectable TgEB1, both in untreated and treated parasites (Fig. 5C). TgEB1 is undetectable in roughly 75% of untreated parasites (–IAA); this is expected, since about 75% of an asynchronously growing population will be in interphase at a given time. In contrast, >90% of parasites exhibit diffuse or undetectable TgEB1 upon TgCep250L1 knockdown. Conversely, TgEB1 foci could be detected (albeit not necessarily adjacent to the centrosome) in <10% of TgCep250L1 knockdowns, whereas >25% nuclei display TgEB1 foci in untreated parasites (Fig. 5D; see also Fig. S7 and S8).

The inner core resides with the chromatin-free region of the nucleus termed the centrocone. We reckoned that the defect in TgEB1 recruitment during cell division could be underlay by defects in the formation or stability of the mitotic spindle. The mitotic spindle is known to assemble adjacent to the centrosome within a conical elaboration of the nuclear envelope, devoid of chromatin, adjacent to the ER exit site known as the centrocone (Fig. 6A*a* and *c*) (20, 26, 27). Mitotic spindle microtubules can normally be detected within the centrocone in dividing parasites. The centrocone is visible as invaginations of the nuclear envelope (Fig. 6A*c*, inset arrows “MT”). We detect

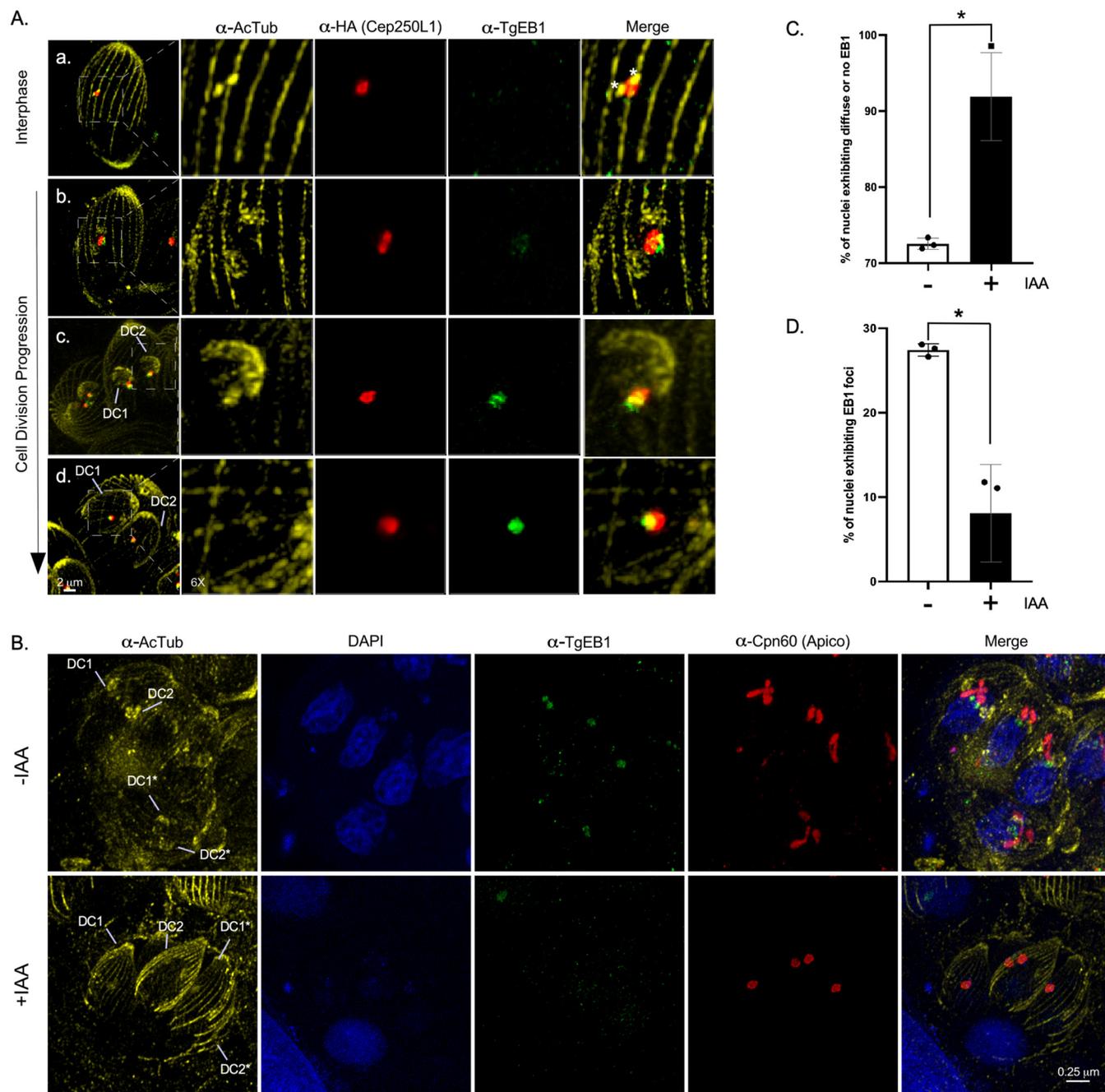


FIG 5 TgCep250L1 dynamics correlates with a microtubule binding protein of the mitotic spindle. (A) Parasites subjected to ultrastructure expansion were labeled with antibodies as indicated. Note that acetylated tubulin is present, and therefore labeled, by the specific antiserum in multiple structures, including the scaffold microtubules of both the mother and the forming daughter cells, the centrioles, and the mitotic spindle. An asterisk indicates the position of the individual centrioles. Daughter cells are labeled “DC1” and “DC2.” All images shown are maximum-intensity projected z-stacks spanning the entire vacuole. TgEB1 (green) is a mitotic spindle marker that displays a dynamic cell cycle-dependent pattern of localization (25). Note that in subpanel a, centrioles (marked with asterisks) can be individually resolved. At this stage, while TgCep250L1 is detectable, TgEB1 is not. Accumulates of ac-tub (acetylated tubulin), at the poles of the TgCep250L1 location, are perceptible in subpanel b. TgEB1 is detectable at this stage. Daughter cells (DC1 and DC2) are clearly identifiable in subpanel c. Larger daughter cell scaffolds (DC1 and DC2) are observable in subpanel d. At the latter two stages, TgCep250L1 colocalizes with foci of TgEB1. (B) TgCep250L1-mAID parasites treated as indicated were subjected to ultrastructure expansion and labeled with antibodies as indicated. Note that the apicoplast marker α -Cpn60 was used as a proxy for the position of the centrosome. Note that when daughter cells (DCs) are barely detectable in untreated parasites, TgEB1 can be clearly seen concentrated at the periphery of the nucleus, in apposition to the apicoplast. In IAA-treated parasites, despite displaying larger and apparently well-formed daughter cell scaffolds and segregated apicoplast, no TgEB1 is detectable. (C and D) Quantification of the number of nuclei (as labeled with DAPI, as shown in panel B) displaying either a focus of TgEB1 (D) or nondetectable TgEB1 (C). A minimum of 50 vacuoles were quantified per replicate. The data plotted are the averages of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean (*, $P < 0.05$).

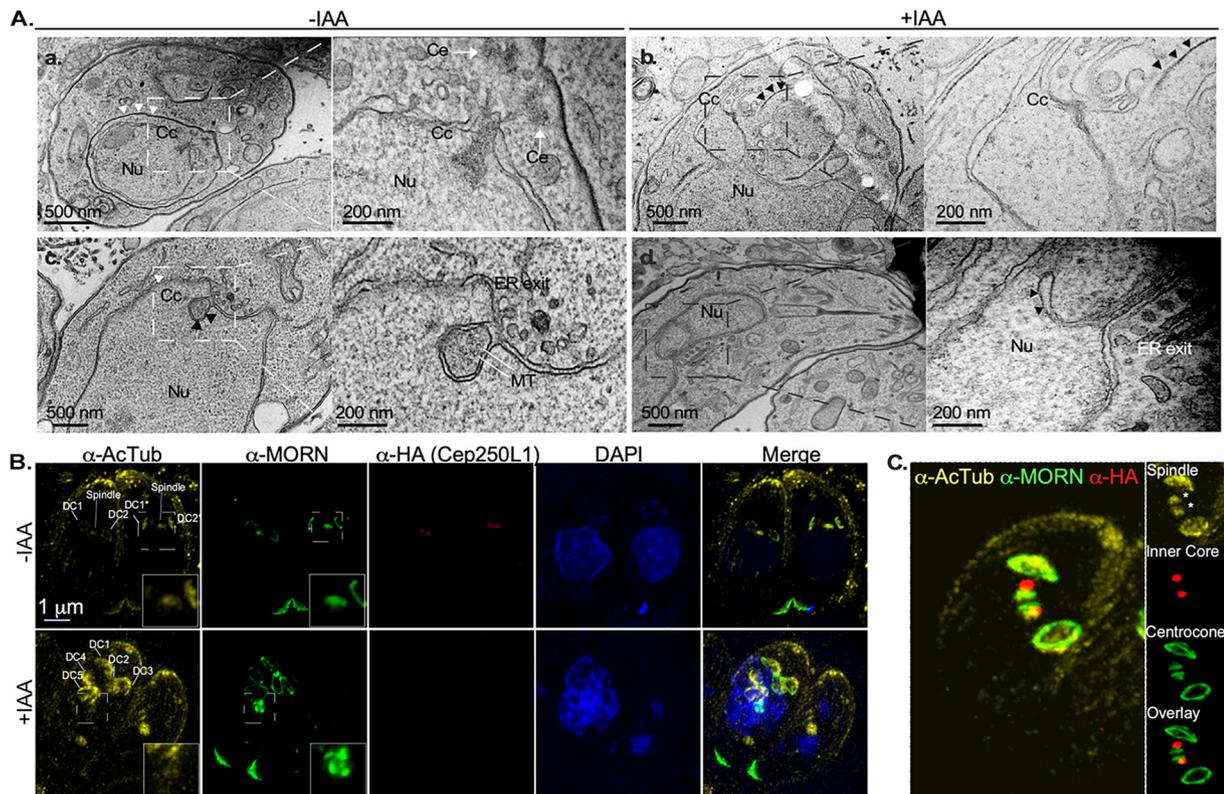


FIG 6 TgCep250L1 knockdown causes mitotic spindle assembly defects. (A) TgCep250L1 knockdown alters the centrocone structure. The centrocone houses the mitotic spindle during cell division. A transmission electron micrograph of untreated TgCep250L1-mAID-3HA parasites (transverse view, subpanel a) shows the centrioles (Ce), centrocone (Cc), and segregating nucleus (Nu). Note that the centrocone houses electron dense material and that its position at the nuclear envelope is always adjacent to the endoplasmic reticulum (ER) exit site. White arrowheads indicate the inner membrane complex position of the assembling daughter cell. An additional electron micrograph of untreated TgCep250L1-mAID-3HA parasites (subpanel c) shows a view of the mitotic spindle microtubules (MT) housed within the centrocone (Cc), enveloped by nuclear envelope (black arrowheads), and is adjacent to the ER exit site. An electron micrograph (longitudinal view, subpanel b) of an IAA-treated parasite reveals a bilobed large nucleus, physically distant from the site of daughter cell assembly (black arrowheads indicate the forming daughter's inner membrane complex). Note that adjacent to the ER exit site, an elaboration of the nuclear envelope, which is possibly reminiscent of the centrocone structure, can be appreciated. However, the structure is electron translucent. An additional electron micrograph of TgCep250L1-mAID-3HA parasites treated with IAA for 24 h parasites (subpanel d) shows a void invagination of the nuclear envelope adjacent to the ER exit site. Mitotic spindle microtubules are undetectable. (B) Parasites treated as indicated were subjected to ultrastructure expansion and labeled as indicated. Parasites undergoing division are shown. Daughter cells (DC) are indicated. The spindle microtubules are labeled by the anti-acetylated tubulin serum, albeit only visible in untreated parasites (α -AcTub panels, insets). Note that TgMORN1 localizes as expected in both treated and untreated parasites at the basal ends of mother and forming daughter cells. However, nuclear TgMORN1 accumulates aberrantly in +IAA-treated parasite's nuclei (a-MORN panel, inset). Note that the images shown are maximum-intensity projected z-slices selected to clearly display the daughter cells' scaffolds and spindles. The mother cell scaffold is not fully appreciable in these images. (C) Untreated parasites were subjected to ultrastructure expansion and labeled as indicated. A parasite undergoing division is shown. Insets show a detailed view of the relative localizations of the indicated markers. Spindles are marked by asterisks. Note that the conical shape of the centrocone can be resolved by combining UExM and α -MORN labeling.

nuclear envelope invaginations in IAA treated adjacent to the ER exit site (Fig. 6Ad). However, these are devoid of detectable microtubules. Conspicuously, we observe by TEM that IAA-treated parasites which failed to segregate their nuclei display protrusions of the nuclear envelope in the vicinity of the ER exit site (Fig. 6Ab). However, these protrusions only vaguely resemble the centrocone morphology during division, as they are devoid of electron dense material or detectable spindle microtubules (electron translucent structure labeled "CC" in inset of Fig. 6Ab).

The only known molecular marker for the centrocone is TgMORN1; it "decorates" first the opening at the nuclear envelope which persists outside of cell division, and later the conical structure that houses the mitotic spindle. As mentioned before, TgMORN1 also labels the parasite's basal end from early in division, hence labeling coming daughter cells, as well as the mother's base. We reckoned that the structural defects of the centrocone observed by TEM could be linked to the position of the inner

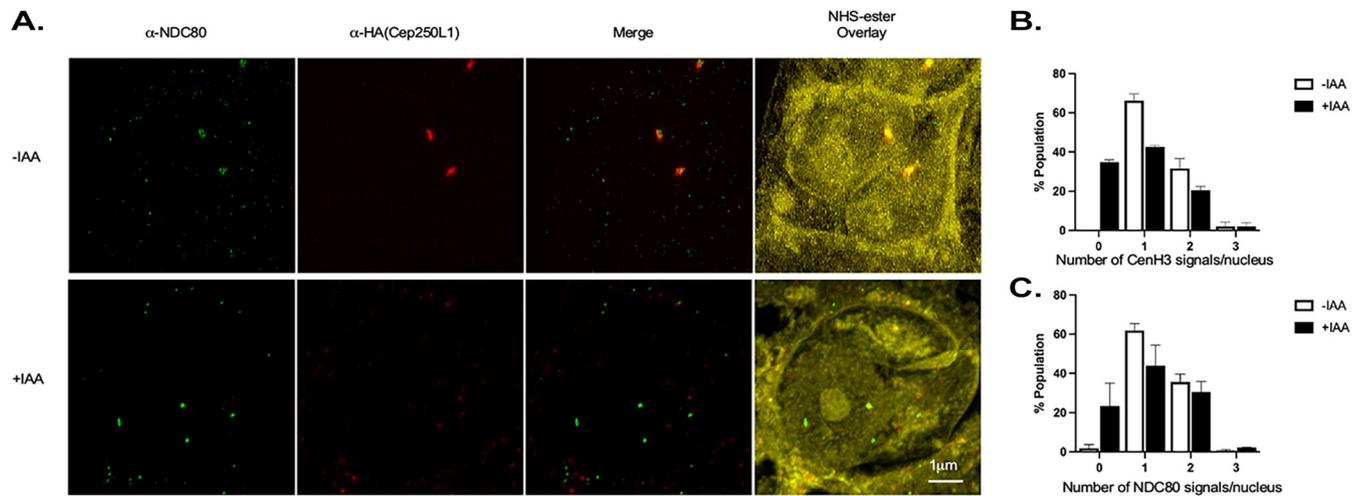


FIG 7 DNA segregation is aberrant upon TgCep350L1 knockdown. (A) Parasites treated as indicated were subjected to ultrastructure expansion and labeled as indicated. Note that the NHS-ester labels the pan-proteome, simultaneously labeling the nucleus, and the cell scaffold, among other structures. The lower panel (+IAA) displays multiple Ndc80 signals on an unsegregated/unpacked nucleus. Note that this is an infrequent finding, and it is shown to illustrate abnormal Ndc80 signaling. Images shown are maximum-intensity projections of z-stacks spanning the entire vacuole. (B) Quantification of the number of centromeres (labeled with anti-TgCenH3) per nucleus, showing that the untreated population exhibits the expected distribution of one or two centromeric foci. IAA-treated parasites, on the other hand, display one and two dots, but also accumulate DAPI-labeled DNA with no CenH3 signals. Parasites seldom exhibit an excessive number of centromeres per nucleus (>2) in the IAA-treated population, suggesting that segregation is affected but that polyploid nuclei are rare findings. (C) Quantification of the number of kinetochores (labeled with anti-Ndc80) per nucleus show that the untreated population exhibits the expected distribution of one or two kinetochores signals per nucleus. IAA-treated parasites, on the other hand, display one and two dots but also accumulate nuclei (DNA labeled with DAPI) with no Ndc80 signal. Parasites rarely exhibit an excessive number of kinetochores per nucleus (>2 , as shown in lower part of panel A) in the IAA-treated population.

core relative to the centrocone structure. We therefore explored TgMORN1's localization upon TgCep250L1 knockdown. We observed by IFA that nuclei accumulate aberrant TgMORN1 signals specifically at the nucleus, while the protein localizes properly at the basal end of coming daughter cells displaying its characteristic ring-shape (Fig. 6B, +IAA panel; see also Fig. S9). We therefore wondered whether the inner core could in fact be contained within the centrocone itself. To explore this possibility we labeled expanded parasites with anti-TgMORN1, anti-acetyl tubulin to label the mitotic spindle, and anti-HA to label TgCep250L1. We observed that, indeed, TgCep250L1 is contained within the conical elaboration of the nuclear envelope formed during division, marked by TgMORN1, at a location which coincides with the tip of the site of spindle microtubule assembly (Fig. 6C). The overlay among the three markers persists throughout division (see Fig. S10A and B).

Absence of TgCep250L1 precludes proper DNA segregation. We reckoned that if the loss of nuclear content displayed by the TgCep250L1 knockdown is linked to defects in mitotic spindle assembly, parasites should not only display “tossed out” nuclei but rather should suffer from DNA partitioning defects. To test this, we assayed two centromere-associated proteins whose distribution vary along with ploidy. We simultaneously assessed the parasite's kinetochore marker TgNdc80 (18) and the centromeric histone TgCenH3 (28). In wild-type parasites, antibodies against either one of these proteins label a punctate structure at the nuclear periphery that arranges either as a single dot in nondividing parasites representing all centromeres/kinetochores bundled in one spot or as duplicated dots when chromatin and its associated structures (centromeres and kinetochores) have duplicated and began segregating.

Quantification of the number of kinetochore/centromeres per nucleus shows that the untreated population exhibits the expected number of nuclei displaying 1 and 2 dots (Fig. 7). However, IAA-treated parasites showcase a significant decrease in the number of nuclei displaying one or two dots, and a concomitant increase in nuclei displaying 0, for both markers (Fig. 7). Rarely, nuclei displaying three or more dots are detected (Fig. 7). The significant accumulation of nuclei with no Ndc80/CenH3 signal, however, suggests either unequal DNA segregation, whereby some nuclei inherit no centromere/kinetochore, or

fragmentation of the signal, rendering it below the limit of detection by fluorescence microscopy (Fig. 7A and B). Overall, these data support the notion that not only does the nucleus disconnect from the outer core, consequently disconnecting from the cell scaffold but also that proper DNA segregation to the poles of the undivided nucleus is impaired. The latter is consistent with defective assembly or maintenance of the mitotic spindle.

DISCUSSION

TgCep250L1 is the only marker known to exclusively localize at the inner core of the *T. gondii* centrosome. In this study, we finely define its localization and described its function as a proxy for the role of the inner core. We observed that upon depletion of TgCep250L1 parasites exhibit nuclear segregation defects, while forming daughter cells containing other correctly segregated organelles. We further described the localization of TgCep250L1 as cell cycle, and particularly as spindle formation, progress. We found that TgCep250L1 displays a more complex localization pattern than previously appreciated, which particularly correlates with mitotic spindle formation during mitosis. Finally, we demonstrated that the spindle marker TgEB1 and acetyl-tubulin are absent upon TgCep250L1's knockdown in dividing parasites, suggesting that either the formation or the stability of the mitotic spindle is affected. Finally, we show that as a consequence of the defect in spindle assembly, DNA segregation is aberrant in mutant parasites.

Animal centrosomes display a protein called c-NAP1 which participates in physically linking centrioles during interphase. Phosphorylation of c-NAP1 catalyzes the dissolution of the linkage between mother and daughter centrioles. Centriole separation in S-phase allows not only their duplication, forming a new centrosome, but it is also required for their separate migration to opposite poles of the cell. This process is catalyzed prior to mitosis by a NIMA (never in mitosis, gene A)-related kinase, called Nek1. The *T. gondii* genome encodes two homologs of c-NAP1, TgCep250 and TgCep250L1, both of which were initially described by Suvorova et al. (9). These were identified principally based on the presence of coiled-coiled domains (9). However, later *in silico* studies showed that both proteins are only distantly related to c-NAP1 (29). A conditional mutant of TgNek1 results in parasites displaying a single centrosome, suggesting that this kinase regulates centrosome splitting in *T. gondii* in an akin manner to that described for animal Nek1 (7, 11). However, it was experimentally proven that TgCEP250 is not a substrate of TgNek1 (11). On the other hand, TgCep250L1 is located at the inner core, distant from the outer core where centrioles reside, and TgNek1 is expected to exert its activity (9). The functional homolog of c-NAP1 and substrate of TgNek1 remain to be deciphered.

It was established in the early 60s by TEM that a mitotic spindle assembles adjacent to the centrioles of *T. gondii* (4, 30). Microtubules remain extranuclear, only penetrating the nuclear membrane at the base of a conical elaboration of the envelope, a structure coined more recently "the centrocone," molecularly marked by the presence of TgMORN1 (31). Previous studies have addressed the dynamics of the mitotic spindle, showing that recruitment of tubulin to the centrocone happens at the end of interphase/G₁, just before the onset of S phase, a stage marked by duplication of the centrioles (20, 21, 23, 25). The chromosomes, through their centromeres and kinetochore proteins, are associated with the centrocone throughout the cell cycle but are only reached by the microtubules of the spindle during mitosis (18, 24, 28). Although the ultrastructure of the mitotic spindle and its dynamics have been broadly described, the molecular pathways involved in the nucleation of the microtubule in *T. gondii* remain poorly understood.

In animal cells, the pericentriolar material (PCM) serves as a platform for protein complexes that regulate organelle trafficking, protein degradation and spindle assembly. This complex and dynamic matrix of proteins visibly envelopes the centrioles. A vast number of protein components of the PCM have been identified in species ranging from humans to flies. These include, but are not limited to, CEP152, CEP57, CPAP (SAS-4), CEP192, pericentrin, CDK5RAP2 (Cnn), and a number of microtubule binding/stabilizing proteins, together with regulatory kinases and phosphatases (including Polo-like kinase 1, Aurora A kinase, and PP2 homologs). Strikingly, many of the functionally most important PCM proteins seem to be absent from the *T. gondii* genome (9,

29, 32). On the other hand, γ -tubulin, a crucial protein participating in spindle microtubule nucleation through the nucleation of the γ -tubulin ring complex (γ TuRC) in other eukaryotes, has been previously localized to the outer core of the centrosome (9, 33). It is noteworthy that microtubules of the cortical cytoskeleton of the daughter cell are nucleated at this location. Hence, the function of γ -tubulin and the uncharacterized γ -tubulin ring complex (γ TuRC) could be circumscribed to nucleation of scaffold microtubules rather than the spindle.

Our results support the function of the inner core as a key element for organizing or stabilizing the mitotic spindle and further support the notion that an “in tandem” organized centrosome structure is the basis of compartmentalizing functions providing the physical and temporal coordination of cell cycle events in *T. gondii*. The modular nature of cell division in *T. gondii* (i.e., nuclear division and budding operate through seemingly independent regulatory networks) allows this parasite to divide using distinct modes, including endodyogeny and schizogony. In endodyogeny, nuclear mitosis is immediately followed by budding, while in schizogony budding only occurs following multiple rounds of nuclear mitosis. When failing, these modes of division result in the unusual generation of multiple zoites devoid of nuclear material. This is quite unusual in nature, whereby most cell division failures culminate in the unequal segregation of the genetic material between mother and daughter. The dual organization of the *T. gondii* centrosome has been repeatedly proposed to contribute to this cell division flexibility, whereby the outer core determines the number of daughter cells assembled while the inner core controls nuclear events, separately, overriding the classical “checkpoint” notions.

Our deep understanding of schizogonic cell division comes from studies of the *Plasmodium* genus. However, central structural differences exist between *T. gondii* and *Plasmodium* that raise questions about the conservation of certain regulatory principles between the schizogony in these species. One such difference is that *T. gondii* displays microtubule-based centrioles, whereas *Plasmodium* species do not. *Plasmodium falciparum* nuclear MTOCs is known as the centriolar plaque (CP). Until very recently, it was considered that the CP resided within the nuclear envelope, much like the budding yeast spindle pole body does. However, new advances in microscopy (including the combination of UExM with STED and CLEM) allowed Simon et al. to observe and describe an MTOC made of a bipartite structure; an extranuclear segment housing markers such as centrin, and an intranuclear segment housing tubulin (34). This study helped clarify that microtubule nucleation during schizogonic mitosis occurs at an intranuclear site devoid of chromatin rather than at the nuclear envelope itself. Concomitantly, Liffner and Absalon showed that the spindle undergoes dynamic changes which accompany the chromatin dynamics as mitosis progresses (35). Nondividing nuclei sustain a handful (~5) of bundled individual intranuclear microtubules that have been named the “hemi-spindle.” Upon DNA replication onset in S phase, the hemi-spindle retracts, the CP duplicates, and the mitotic spindle forms (35, 36).

Overall, these new molecular and structural insights suggest that while the nature of the nuclear MTOCs are different between species (i.e., centrioles versus no centrioles), the organization principle underlying positioning and activity of the nuclear MTOCs with respect to the nuclear envelope and chromatin are more similar than previously appreciated. Nonetheless, no homologs of TgCep250L1 are present in the *Plasmodium* genomes, suggesting that the molecular players differ.

Despite of the significant recent advances in our understanding of the centrosome structures in other *Apicomplexa*, the centrosome of *T. gondii* continues to be the most extensively studied and best understood within the phylum. The functional domains, the molecular players and regulatory enzymes, identified have increased significantly in recent years. Rather than a bipartite organelle, we now understand that the centrosome in *T. gondii* can be regarded as a continuum, delimited at its proximal end by the centrioles and at its basal end by the base of the centrocone, the kinetochores and the centromeres. In this context, TgCep530, was shown to localize in between the outer

and inner cores, for the first time defining the “middle core” region. Conspicuously, inducible knockdown of TgCep530 renders parasites displaying enucleated parasites and mis-segregated nuclei. However, the TgCep530 mutant display additional outer core fragmentation (12), a phenotype we did not observe. This suggests that while the stability of the continuum may be required to coordinate karyokinesis with cytokinesis, middle core function may additionally be to regulate centriole/outer core stability. Consistent with the idea that cores are subject to differential regulation, a temperature-sensitive mutant of a mitogen-activated protein-related kinases (MAPKs) displays overduplication of Centrin1 but not of TgCep250L1 (9). Here, we show that lack of TgCep250L1 does not affect centriole duplication, suggesting that changes at the inner core are not directly transduced to the outer core. Consistently, depletion of TgArk-1, an aurora-related serine-threonine kinase which accumulates in the centrocone region, leads to underduplication of both the spindle pole and the inner core (37), with the unperturbed independent expansion of the outer core. The physical compartmentalization of proteins to distinct domains makes it so that defects at the middle core and inner core are rather circumscribed to the assembly or stability of the centrioles and the mitotic spindle, respectively.

Recently, a study describing the function of cyclin-dependent-related kinase 6 and its associated atypical cyclin 1 showed the complex to interact with the centromeric protein TgCenH3 and to be required for cell cycle progression past metaphase. Though it was shown that duplication of both the outer and inner core were unaffected, the assembly or stability of the mitotic spindle, however, was not directly explored in these mutants (38). Nonetheless, a conditional knockdown of MAPK2 displays concomitant underduplicated Centrin1 and TgCep250L1, suggesting that despite the modular regulation of the cores, an overall regulatory mechanism positively regulates the coordinated duplication of (possibly) all cores of the centrosome (39). It would be interesting to understand how the relative activities of these regulatory kinases (and the still to be identified counteracting phosphatases) interplay along the life stages of *T. gondii* whereby the parasite adjusts its cell division mode from endodyogeny to schizogony, modifying the relative temporal execution of each event of the cell cycle.

Future studies addressing the cell cycle-specific interactions of TgCep250L1 and their interplay with other elements of the multiple centrosomal cores and the regulatory enzymes of mitotic spindle assembly and the centromere/kinetochore function will shed light on the detailed mechanisms of action of this protein at the region of the nuclear periphery it inhabits and on the peculiar organization of the centrosome in *T. gondii*.

MATERIALS AND METHODS

Parasite culture. *T. gondii* tachyzoites of the RHΔKu80 strain expressing the Tir1 receptor (13) were maintained in Vero cells grown in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco, St. Louis, MO) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 4 mM L-glutamine (Gibco), and 200 U/mL of penicillin and 200 μg/mL of streptomycin (Gibco). Cultures were kept at 37°C and 5% CO₂.

Generation and preliminary characterization of the TgCep250L1 inducible knockdown strain. TgCep250L1-mAID-3HA was generated in the RHΔku80 Tir1 strain background (40). Briefly, a PCR product of the mAID-3HA sequence bearing 35 bp of homology to either end of the TgCep250L1 gene stop codon was amplified using the primers 5'-GCACAGGAAGGGAAAGTCGTCGCTTCGGGGCGA-3' and 5'-CTGTAGGCCCATGTTTTCATTTCTCTTCACAC-3'. A plasmid coding for a guide RNA targeting the 3' end of the TgCep250L1 gene and SpCas9 was generated by mutagenesis using the primers 5'-ACACTCTACGAACCTGTCGCGGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA-3' and 5'-AACTTGACATCCCCATTAC-3'. Then, 50 μg of pSagCas9 vector and 10 μg of PCR product were transfected into 5.0 × 10⁷ parasites using a BTX 600 electroporator according to previously published protocols (24). The pSagCas9 vector (41) was kindly provided by David Sibley. Successful insertion of the 3HA-mAID sequence was monitored by PCR using the primers a (5'-GAGACTCAGAGCGCAAGACG-3'), a* (5'-CCCCGAAAGCGACGACTTTCCC-3'), and b (5'TTAGGCATAATCTGGAACATCG-3'), according to the schematic shown in Fig. S1A. Clonal cell lines were obtained by limiting dilution. Protein degradation was triggered by the addition of 0.5 mM indoleacetic acid (IAA; Sigma-Aldrich) to the growth medium.

Plaque and intracellular growth assays. For plaque assay, two hundred parasites of the TgCep250L1-mAID-3HA strain were inoculated on human foreskin fibroblast cells (HFFs; kindly provided by Sebastian Lourido) previously grown to confluence on six-well plates and kept for 7 days in presence or absence of 0.5 mM IAA. Wells were then fixed with methanol and stained with crystal violet for plaque visualization.

Intracellular growth was determined by immunofluorescence assay (IFA; according to the protocol specified below) labeling parasites with the pellicle marker anti-IMC1 and DAPI (nuclear and apicoplast DNA marker). Assays were performed by infecting confluent HFF cells grown on 13-mm coverslips with 1,000 parasites. Parasites were allowed to invade and grow for 2 h prior to IAA addition to the media, when appropriate. Note that the medium was changed at the same time for parasites grown under control conditions (no IAA). Parasites were allowed to grow for an additional 24 h, prior to fixation and processing. Assays were performed in triplicate. Quantification was done by determining the number of parasites per vacuole in 35 randomly acquired fields (~100 vacuoles per experiment) using an Olympus epifluorescence microscope.

Western blotting. Total proteins were extracted from 1.0×10^8 parasites grown on media supplemented with 0.5 mM IAA at different times or as indicated in the figure legends. Total proteins were extracted by resuspending the cell pellet in Laemmli buffer and boiling for 5 min. Protein samples were run on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane overnight. Primary and secondary antibody incubations were done in 5% milk-PBS with rabbit anti-HA at 1:500 (Cell Signaling, catalog no. 37245) and anti-rabbit HRP at 1:10,000 (Bio-Rad, catalog no. 1721017). Images were obtained using an ImageQuant 800 Western blot imaging system (Amersham) with exposure for a total of 30 s.

Optical microscopy. IFAs were performed as previously reported (24). In short, HFFs were grown on coverslips and inoculated with parasites. Depending on the assay, intracellular parasites were fixed at different times using methanol for 5 min at -20°C or 4% formaldehyde for 20 min at room temperature. For primary antibodies, we used mouse anti-centrin at 1:1,000 (Cell Signaling, catalog no. 04-1624), rabbit anti-HA at 1:200 (Cell Signaling, catalog no. 37245), mouse anti-IMC-1 (42), at 1:500 (kindly provided by Gary Ward, University of Vermont), guinea pig anti-TgEB1 (25) at 1:3,000 (kindly provided by Marc-Jan Gubbels, Boston College), rabbit anti TgH2Bz (15, 43) at 1:3,000 (kindly provided by Sergio Angel, INTECH-Chascomus), guinea pig anti-Ndc80 (18) at 1: 2,000 (kindly provided by Marc-Jan Gubbels, Boston College), rabbit anti-Cpn60 (44) at 1:3,000, rabbit anti-Mys at 1:2,000 (45), and mouse anti-acetylated tubulin at 1:1,000 (Sigma, catalog no. T7451). Goat anti-rabbit Alexa Fluor 405 (Invitrogen, catalog no. A-31556), goat anti-rat Alexa Fluor 488 (Invitrogen, catalog no. A-11006), goat anti-mouse Alexa Fluor 488. (Invitrogen, catalog no. A28175), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, catalog no. A-11008), goat anti-guinea pig Alexa Fluor 594 (Invitrogen, catalog no. A-11076), goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Invitrogen, catalog no. A27040) and goat anti-mouse Alexa Fluor 647 (Invitrogen, catalog no. A-21235) were all used at a dilution of 1:2,000. Coverslips were mounted onto glycerol or fluoroshield, with DAPI, when appropriate.

Ultrastructure expansion microscopy (UEXM) was performed as described previously (46) without modifications. The primary and secondary antibodies were used twice as concentrated than specified for IFA above for the UExM experiments.

All images were acquired using a Zeiss confocal LSM880 microscope using a Plan-Apochromat $63\times/1.40$ oil objective. All images were acquired and processed using the Zeiss ZEN blue edition v2.0 software. All images were deconvolved using Huygens Professional v19.10.0p2 64b (Scientific Volume Imaging, The Netherlands).

Quantifications were done on z-projected images spanning the entire vacuole, using the ImageJ measurements tool when appropriate. Results were plotted using GraphPad Prism v9.3.1. For all quantifications, three biological replicates were performed. A minimum of 50 nuclei or cells were quantitated for each condition, per experiment. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism v9.3.1 analytical tools. Unpaired two-tailed *t* tests with Welch's corrections (parametric) were carried out to determine the statistical significance of the differences detected. Differences were considered significant if the *P* values were <0.05 .

Transmission electron microscopy. TEM sample preparation was done according to previously published protocols (47). In short, intracellular parasites were fixed in 2.5% glutaraldehyde–0.1 M sodium phosphate buffer for 2 h at room temperature. The fixative solution was washed out three times with 0.1 M sodium phosphate buffer, and infected cells were postfixed with 1% OsO_4 . Dehydration was done sequentially incubating samples in 30, 50, 70, and 90% and pure acetone for 10 min each. Embedding was done using epoxy resin (PolyBed resin; Polysciences, Inc., Warrington, PA). Ultrathin sections were obtained, stained, and observed in a JEOL transmission electron microscope coupled to a digital camera.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.1 MB.

FIG S2, PDF file, 0.1 MB.

FIG S3, PDF file, 0.1 MB.

FIG S4, PDF file, 0.1 MB.

FIG S5, PDF file, 0.2 MB.

FIG S6, PDF file, 0.1 MB.

FIG S7, PDF file, 0.1 MB.

FIG S8, PDF file, 0.1 MB.

FIG S9, PDF file, 0.1 MB.

FIG S10, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Cell Biology Unit, the joint research unit between the Institut Pasteur de Montevideo and the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (UMPI), and the Advanced Bioimaging Unit at the Institut Pasteur Montevideo for their support and assistance in the present work. We especially thank Marcela Diaz, Tabare de los Campos, and Paula Céspedes. We are deeply grateful to Nicolas Dos Santos and Dominique Soldati-Favre for sharing their UExM protocol prior to publication. We are also especially grateful to Gabriela Casanova, Gaby Martínez, and Magela Rodao from the TEM Unit at the School of Sciences, Universidad de la República, for their diligent assistance in acquisition and processing of images. We also thank the TEM units of the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, and the Centro Nacional de Biología Estructural e Bioimagem, Rio de Janeiro, Brazil. We thank Gonzalo Ferreira and Mariana Di Doménico for assistance with image processing.

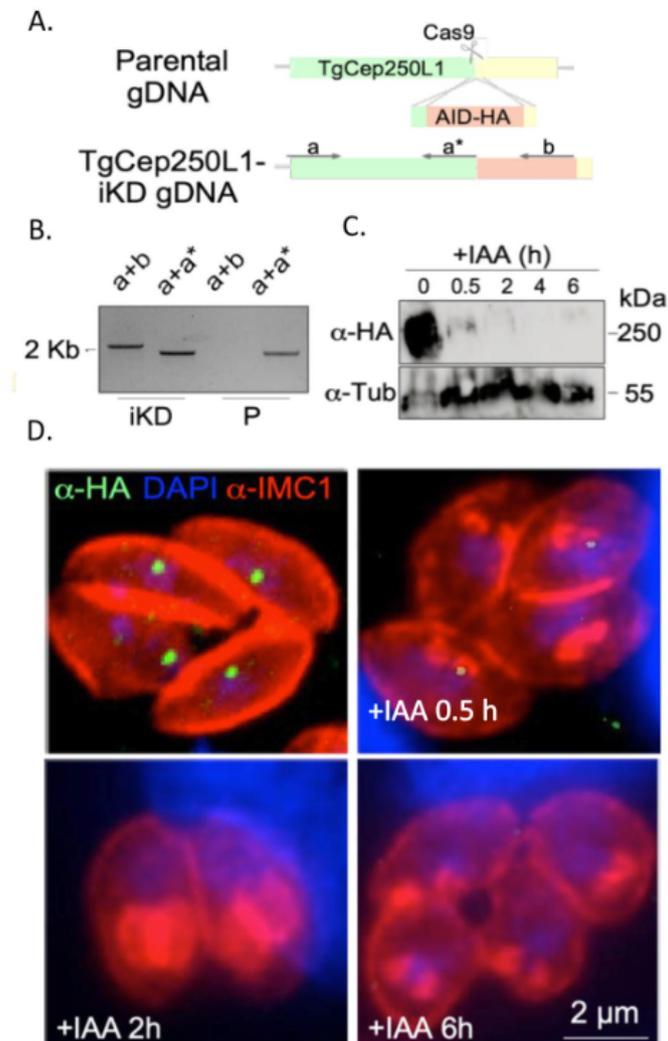
R.T., F.C.G., and M.E.F. are PEDECIBA researchers. M.E.F. is an SNI researcher.

REFERENCES

- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59:429–514. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.
- de Lima Bessa G, de Almeida Vitor RW, Dos Santos Martins-Duarte E. 2021. *Toxoplasma gondii* in South America: a differentiated pattern of spread, population structure and clinical manifestations. *Parasitol Res* 120:3065–3076. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07282-w>.
- Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier MN, Belfort R. 2009. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:345–350. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200030>.
- van den Zypen E, Piekarski G. 1968. Ultraestructura de la endodiogenia en *Toxoplasma gondii*. *Bol Chil Parasitol* 23:90–94.
- Morrisette N, Gubbels M-J. 2020. The *Toxoplasma* cytoskeleton: structures, proteins, and processes, p 743–788. In Louis M, Weiss KK (ed), *Toxoplasma gondii* (third edition). Academic Press, Cambridge, MA, USA.
- Francia ME, Striepen B. 2014. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol* 12:125–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3184>.
- Chen CT, Gubbels MJ. 2013. The *Toxoplasma gondii* centrosome is the platform for internal daughter budding as revealed by a Nek1 kinase mutant. *J Cell Sci* 126(Pt 15):3344–3355. <https://doi.org/10.1242/jcs.123364>.
- Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, de Leon JC, Morrisette NS, Dubremetz J-F, Striepen B. 2012. Cell division in apicomplexan parasites is organized by a homolog of the striated rootlet fiber of algal flagella. *PLoS Biol* 10:e1001444. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001444>.
- Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. 2015. A novel bipartite centrosome coordinates the apicomplexan cell cycle. *PLoS Biol* 13:e1002093. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002093>.
- de Leon JC, Scheumann N, Beatty W, Beck JR, Tran JQ, Yau C, Bradley PJ, Gull K, Wickstead B, Morrisette NS. 2013. A Sas-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot Cell* 12:1009–1019. <https://doi.org/10.1128/EC.00096-13>.
- Chen CT, Gubbels M. 2019. TgCep250 is dynamically processed through the division cycle and is essential for structural integrity of the *Toxoplasma* centrosome. *Mol Biol Cell* 30:1160–1169. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0608>.
- Courjol F, Gissot M. 2018. A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 20:e12832. <https://doi.org/10.1111/cmi.12832>.
- Brown KM, Long S, Sibley LD. 2017. Plasma Membrane Association by N-Acylation Governs PKG Function in *Toxoplasma gondii*. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00375-17>.
- Hu K, Roos DS, Murray JM. 2002. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol* 156:1039–1050. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>.
- Bogado SS, Dalmaso MC, Ganuza A, Kim K, Sullivan WJ, Jr, Angel SO, Vanagas L. 2014. Canonical histone H2Ba and H2A.X dimerize in an opposite genomic localization to H2A.Z/H2B.Z dimers in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 197:36–42. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.09.009>.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJM, Palmer JD, Roos DS. 1997. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 275:1485–1489. <https://doi.org/10.1126/science.275.5305.1485>.
- Attias M, Miranda K, De Souza W. 2019. Development and fate of the residual body of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 196:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.11.004>.
- Farrell M, Gubbels MJ. 2014. The *Toxoplasma gondii* kinetochore is required for centrosome association with the centrocone (spindle pole). *Cell Microbiol* 16:78–94. <https://doi.org/10.1111/cmi.12185>.
- Striepen B, Crawford MJ, Shaw MK, Tilney LG, Seeber F, Roos DS. 2000. The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol* 151:1423–1434. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1423>.
- Gubbels MJ, Vaishnav S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B. 2006. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci* 119:2236–2245. <https://doi.org/10.1242/jcs.02949>.
- Verhoef JMJ, Meissner M, Kooij TWA. 2021. Organelle dynamics in apicomplexan parasites. *mBio* 12:e01409-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01409-21>.
- Tosetti N, Pacheco NdS, Bertiaux E, Maco B, Bournonville L, Hamel V, Guichard P, Soldati-Favre D. 2020. Essential function of the alveolin network in the subpellicular microtubules and conoid assembly in *Toxoplasma gondii*. *Elife* 9:56635. <https://doi.org/10.7554/eLife.56635>.
- Hartmann J, Hu K, He CY, Pelletier L, Roos DS, Warren G. 2006. Golgi and centrosome cycles in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 145:125–127. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.015>.
- Francia ME, Bhavsar S, Ting LM, Croken MM, Kim K, Dubremetz JF, 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*. *Front Cell Infect Microbiol* 10:295. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00295>.
- Chen CT, Kelly M, De Leon J, Nwagbara B, Ebbert P, Ferguson DJP, Lowery LA, Morrisette N, Gubbels MJ. 2015. Compartmentalized *Toxoplasma* EB1 bundles spindle microtubules to secure accurate chromosome segregation. *Mol Biol Cell* 26:4562–4576. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0437>.
- Dubremetz JF. 1973. Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la coccidie *Eimeria necatrix* (Johnson 1930). *J Ultrastruct Res* 42:354–376. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(73\)90063-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(73)90063-4).
- Dubremetz J-F. 1971. L'ultrastructure du centriole et du centrocone chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Étude au Cours de la Schizogonie 23:453–458.
- Brooks CF, Francia ME, Gissot M, Croken MM, Kim K, Striepen B. 2011. *Toxoplasma gondii* sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3767–3772. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006741108>.
- Morlon-guyot J, Francia ME, Dubremetz J, Wassim D. 2017. Towards a molecular architecture of the centrosome in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton* 74:55–71. <https://doi.org/10.1002/cm.21353>.
- Sheffield HG, Melton ML. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 54:209–226. <https://doi.org/10.2307/3276925>.

31. Dubremetz J. 1971. L'ultrastructure du centriole et du centrocone chez la coccidie eimeria necatrix: etude au cours de la schizogonie. *J Microsc* 23: 453–458.
32. Tomasina R, González FC, Francia ME. 2021. Structural and functional insights into the microtubule organizing centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Microorganisms* 9:2503. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122503>.
33. Morrissette N. 2015. Targeting *Toxoplasma* tubules: tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot Cell* 14:2–12. <https://doi.org/10.1128/EC.00225-14>.
34. Simon CS, Voss Y, Funaya C, Machado M, Penning A, Klaschka D, Cyrklaff M, Kim J, Ganter M, Guizetti J. 2021. An extended DNA-free intranuclear compartment organizes centrosomal microtubules in *Plasmodium falciparum*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.12.435157>.
35. Liffner B, Absalon S. 2021. Expansion microscopy reveals *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites undergo anaphase with a chromatin bridge in the absence of mini-chromosome maintenance complex binding protein. *Microorganisms* 9:2306. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112306>.
36. Brusini L, Santos Pacheco ND, Soldati-Favre D, Brochet M. 2021. Organization and composition of apicomplexan kinetochores reveal plasticity in chromosome segregation across parasite modes of division. *bioRxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.03.466924v1>.
37. Berry L, Chen CT, Francia ME, Guerin A, Graindorge A, Saliou JM, Grandmougin M, Wein S, Bechara C, Morlon-Guyot J, Bordat Y, Gubbels MJ, Lebrun M, Dubremetz JF, Daher W. 2018. *Toxoplasma gondii* chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: a prerequisite for productive endodyogeny. *Cell Mol Life Sci* 75:4417–4443. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2889-6>.
38. Hawkins LM, Naumov AV, Batra M, Wang C, Chaput D, Suvorova ES. 2022. Novel CRK-cyclin complex controls spindle assembly checkpoint in *Toxoplasma* endodyogeny. *mBio* 13:e03561-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03561-21>.
39. Hu X, O'shaughnessy WJ, Beraki TG, Reese ML. 2020. Loss of the conserved alveolate kinase MAPK2 decouples *Toxoplasma* cell growth from cell division. *mBio* 11:e02517-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02517-20>.
40. Brown K, Long S, Sibley L. 2018. Conditional knockdown of proteins using auxin-inducible degron (AID) fusions in *Toxoplasma gondii*. *Bio-Protocol* 8:2728. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2728>.
41. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. 2014. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 9: e100450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100450>.
42. Mann T, Gaskins E, Beckers C. 2002. Proteolytic processing of TgIMC1 during maturation of the membrane skeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 277:41240–41246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205056200>.
43. Vanagas L, Jeffers V, Bogado SS, Dalmaso MC, Sullivan WJ, Jr, Angel SO. 2012. *Toxoplasma* histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:1189–1201. <https://doi.org/10.1586/eri.12.100>.
44. Agrawal S, Chung DWD, Pons N, van Dooren GG, Prudhomme J, Brooks CF, Rodrigues EM, Tan JC, Ferdig MT, Striepen B, Le Roch KG. 2013. An apicomplex localized ubiquitylation system is required for the import of nuclear-encoded plastid proteins. *PLoS Pathog* 9:e1003426. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003426>.
45. MacRae JI, Sheiner L, Nahid A, Tonkin C, Striepen B, McConville MJ. 2012. Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* 12:682–692. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.013>.
46. Santos Pacheco ND, Soldati-Favre D. 2021. Coupling auxin-inducible degron system with ultrastructure expansion microscopy to accelerate the discovery of gene function in *Toxoplasma gondii*, p 121–137. *In de Pablos LM, Sotillo J (ed), Parasite genomics: methods and protocols*. Springer, New York, NY.
47. Martins-Duarte ES, de Araujo Portes J, Borges da Silva R, Pires HS, Garden SJ, de Souza W. 2021. *In vitro* activity of *N*-phenyl-1,10-phenanthroline-2-amines against tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Bioorg Med Chem* 50:116467. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116467>.

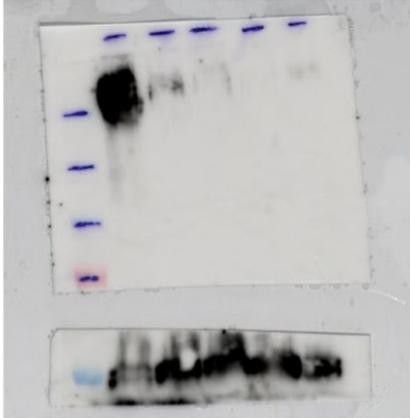
Supplementary Figure 1



FigS1: Strategy used for obtaining TgCEP250L1-mAID-3HA strain. (A) TgCEP250L1iKD was obtained by replacing its 3' end with the mAID degron sequence in a Tir1-expressing parental strain, using CRISPR/Cas9 directed to the desired locus. (B) PCR showing the correct insertion of mAID-3HA in the locus of TgCEP250L1. The expected band of ~2 kb in the parasites with the insertion is observed. (C) Western blot showing the correct expression of the protein TgCEP250L1-mAID-3HA and its inducible knockdown after 0.5, 2, 4, and 6 h of incubation with IAA. (D) IFA of TgCEP250L1-mAID-3HA showing the depletion of the protein at 0.5, 2, 4, and 6 h after incubation with IAA

Supplementary Figure 2

A.



B.

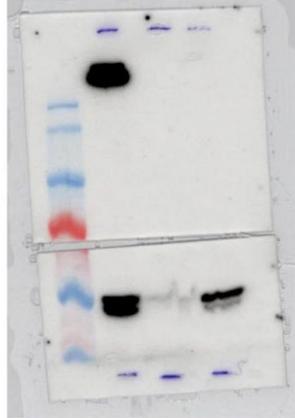


Fig S2: TgCEP250L1 is completely depleted upon the incubation with IAA.
(A) Uncropped Western blot image of the cropped image shown in Fig. S1C.
(B) Uncropped Western blot image of the cropped image shown in Fig. 1C.

Supplementary Figure 3

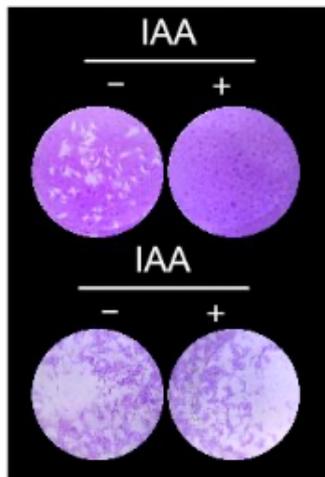


Fig S3: IAA addition to the growth media has no effect on growth of the parental strain. The upper panel shows a plaque assay of the TgCEP250L1-iKD strain (RH DHXGPRT DKu80_HXGPRT+ OsTir1_3FLAG_CAT+_Cep250L1-3HA-mAID) in presence or absence of IAA (shown in Fig. 1D). The lower panel shows a plaque assay performed under the same conditions on the parental strain (RH DHXGPRT DKu80_HXGPRT+ OsTir1_3FLAG_CAT+). Although the total number of plaques is greater for the parental strain (likely due to a slightly larger number of plated parasites), note that the plaque size, when present, is comparable for both strains

Supplementary Figure 4

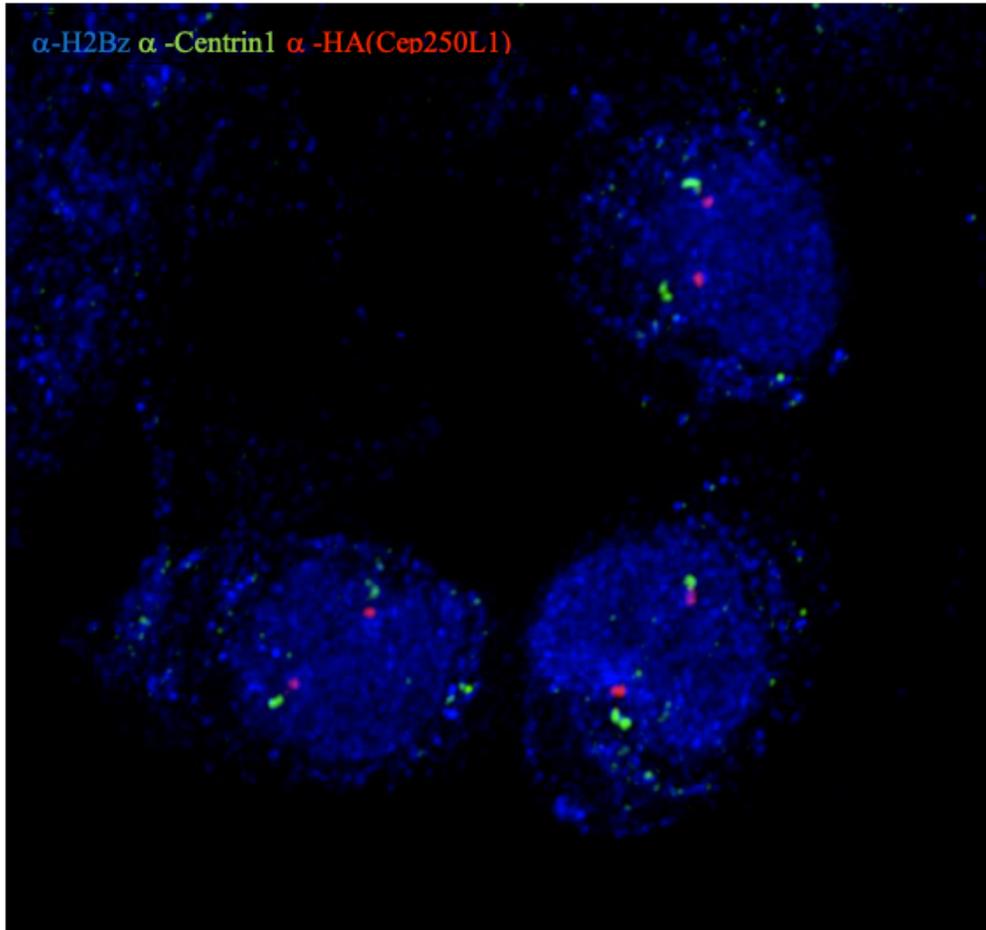


Fig S4: Outer and Inner core relative position observed by UExM. Intracellular dividing parasites were subjected to ultrastructure expansion (UEx) and stained with antibodies as indicated. Cell division is evidenced by the duplicated centrosomes in each nucleus. Note that α -H2Bz labels the nucleus. In expanded parasites, anti-TgCentrin1 staining (green) allows the resolution of both centrioles of the outer core in most centrosomes. The inner core (TgCep250L1, labeled with anti-HA in red) remains as a single dot distanced from the centrioles

Supplementary Figure 5

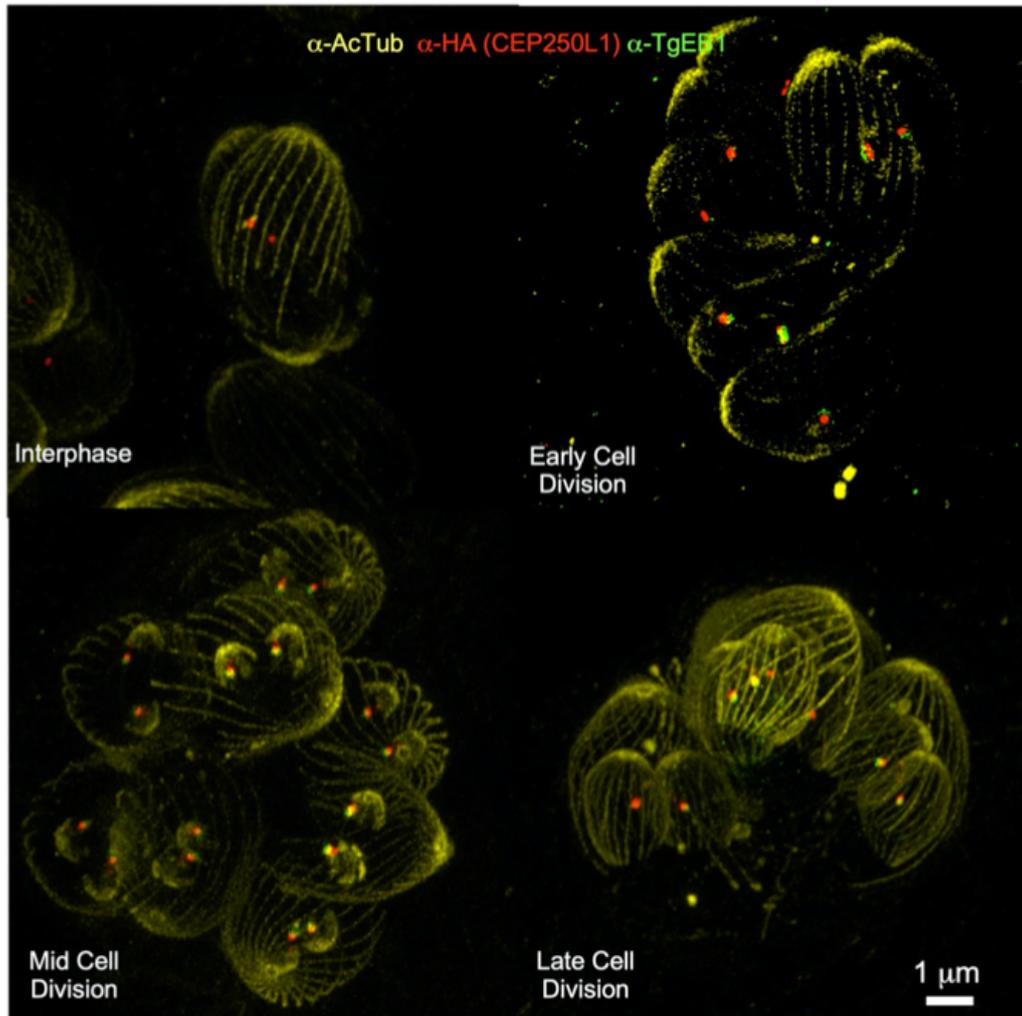


Fig S5: TgCEP250L1 localization along the cell cycle. Intracellular parasites were subjected to UEx and stained with antibodies as indicated. Note that acetylated tubulin is present, and therefore labeled, by the specific antiserum in multiple structures, including the scaffold microtubules of both the mother and the forming daughter cells, the centrioles, and the mitotic spindle.

Supplementary Figure 6

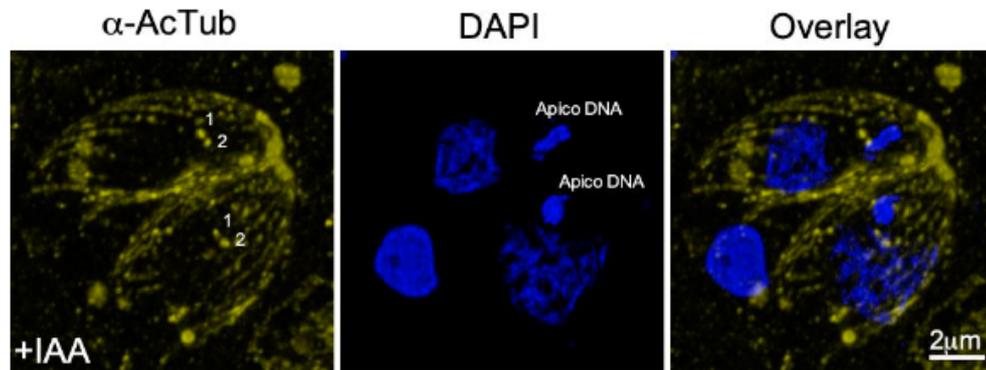


Fig S6: TgCEP250L1 knockdown does not affect outer core duplication or segregation, nor does it affect the segregation of its associated organelles. Parasites subjected to IAA treatment were expanded, labeled with the indicated antibodies, and observed under confocal fluorescence microscopy. 1 and 2 refer to the pair of centrioles for each parasite. “Apico DNA” marks the apicoplast genome, which is labeled, together with the nuclear chromatin, by DAPI.

Supplementary Figure 7

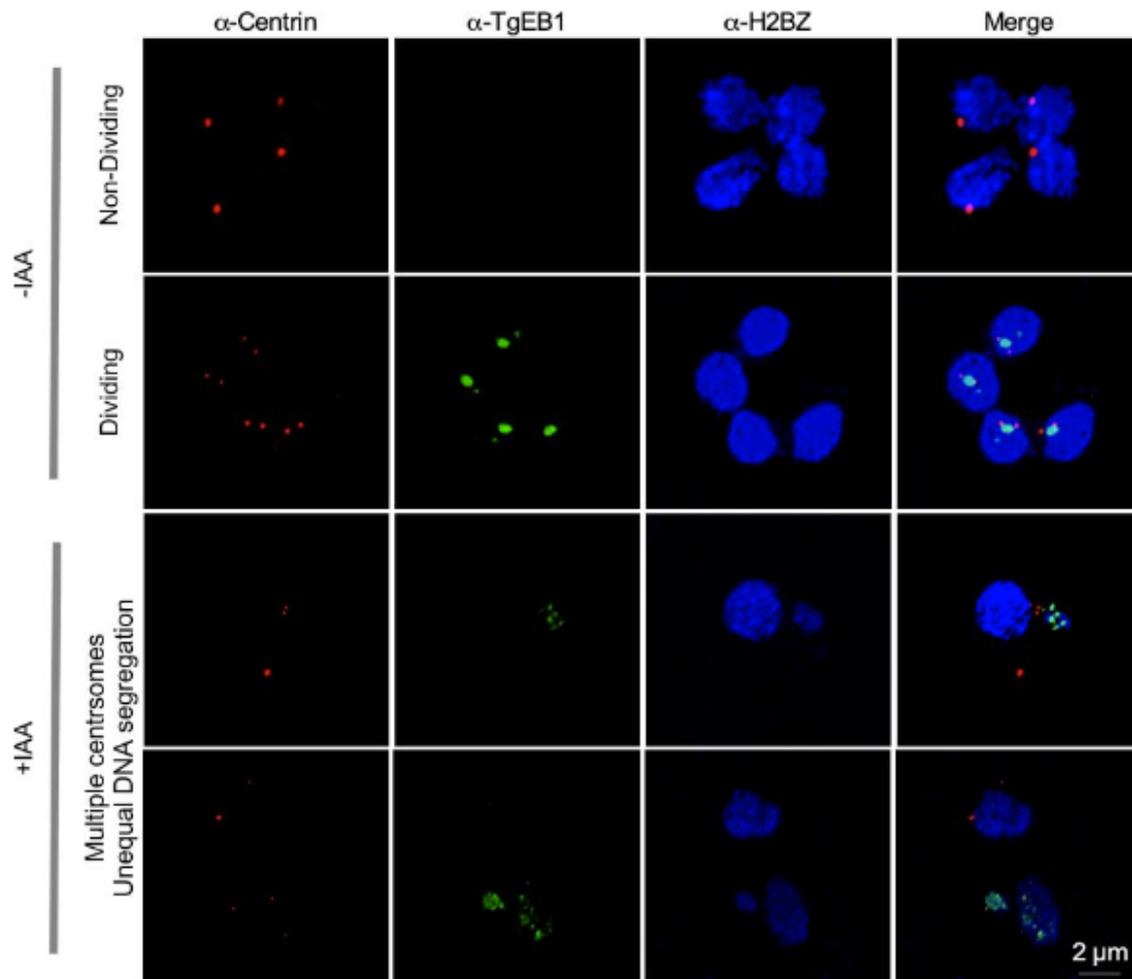


Fig S7: Knockdown of TgCep250L1 precludes TgEB1 translocation to the spindle. TgCep250L1-mAID-HA parasites were stained with antibodies and treated as indicated. In the presence of TgCep250L1, untreated parasites exhibit either largely undetectable TgEB1 outside of division (upper panel) or readily detectable TgEB1 in between the duplicated centrosomes (red) during division (lower panel). The latter corresponds with the expected position of the mitotic spindle. In treated parasites, where the TgCep250L1 is knocked down, TgEB1 remains in the nucleoplasm when detectable (both panels) and does not relocalize even in the presence of multiple centrosomes, which is indicative of cell division (lower panel).

Supplementary Figure 8

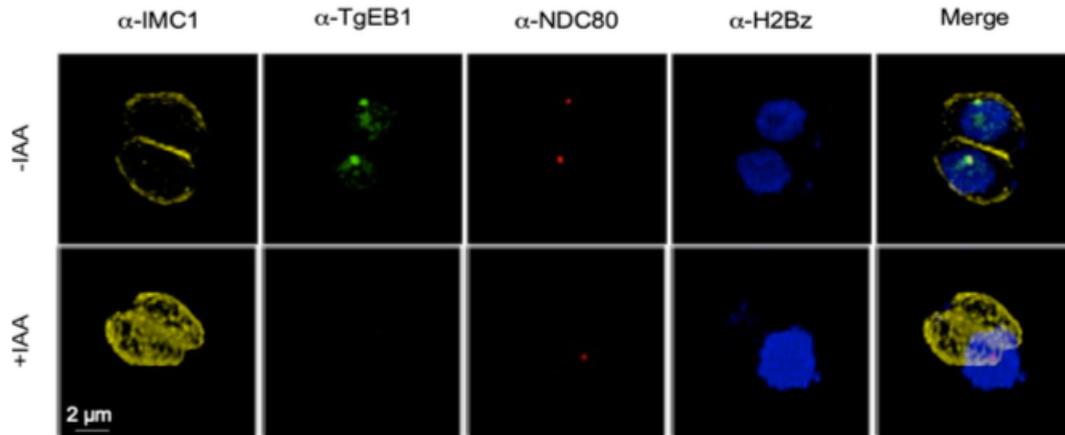


Fig S8: TgCEP250L1 knockdown causes severe nuclear segregation defects. (A) Indirect immunofluorescence (IFA) of TgCEP250L1-mAID-3HA parasites labeled and treated as indicated. Note that the depletion of TgCep250L1 causes nuclear segregation defects, including the incorrect segregation of the nuclear content (marked by the histone H2Bz) and the kinetochores (marked by Ndc80) segregate. Defective Ndc80 segregation coincides with the lack of detection of the mitotic spindle marker (TgEB1). In contrast, daughter cells are fully formed.

Supplementary Figure 9

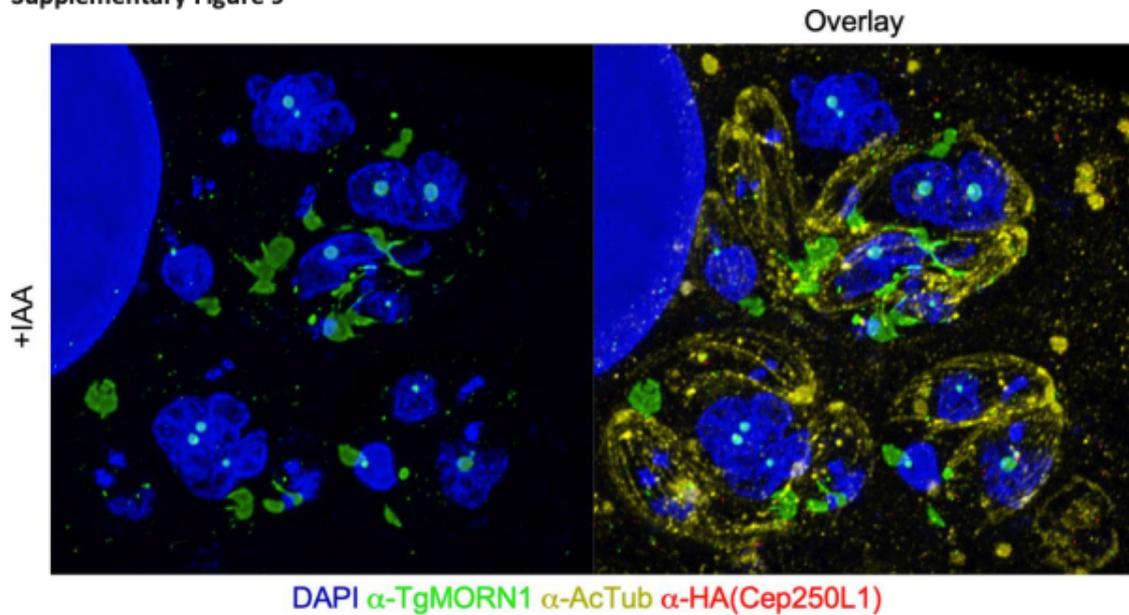


Fig S9: Defective TgMORN1 in mutant parasites. Intracellular IAA-treated parasites were subjected to ultrastructure expansion and labeled as indicated. Parasites undergoing division are shown. Daughter cells are discernable by the labeling of their scaffold by the anti-acetyl tubulin serum. Note that TgMORN1 localizes as expected at the basal ends of mother and forming daughter cells. However, nuclear TgMORN1 accumulates aberrantly in parasite's nuclei. The image shown is a maximum-intensity projection of z-slices spanning the vacuoles shown.

Supplementary Figure 10

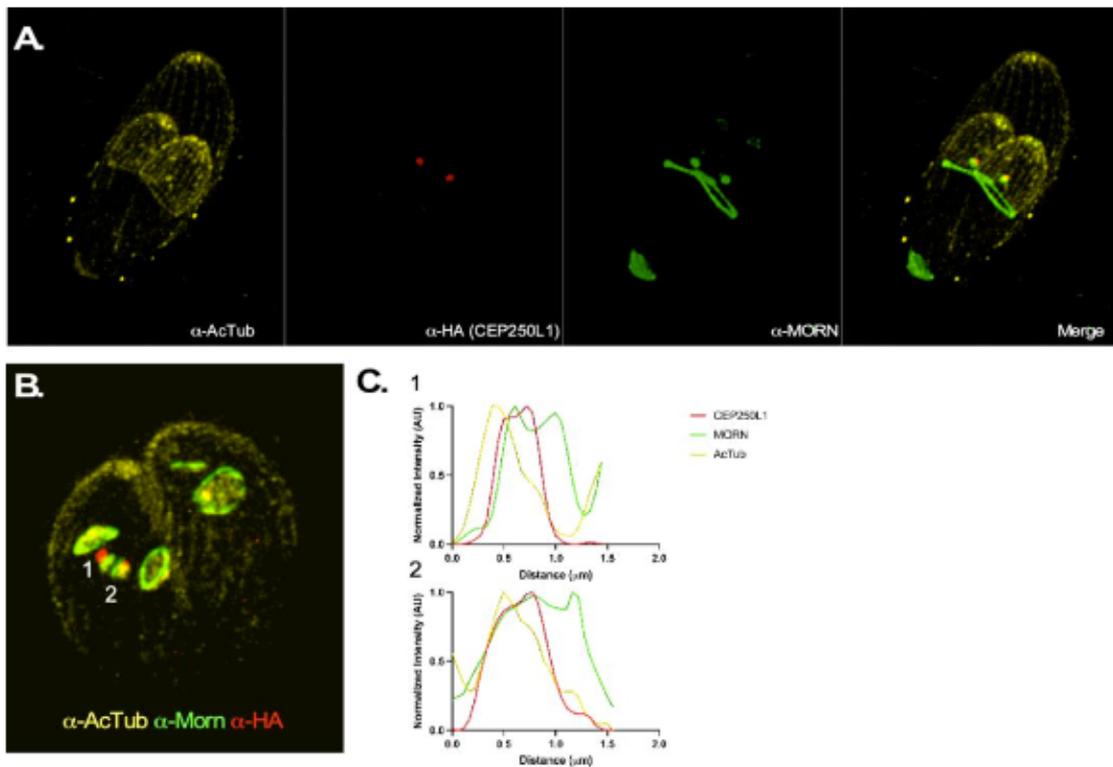


Fig S10 : Relative disposition of elements involved in mitotic spindle assembly. (A) Untreated parasites were subjected to ultrastructure expansion and labeled as indicated. A parasite undergoing division is shown. (B) The two mitotic poles of dividing parasites (at an early stage of division) treated and labeled as in panel A were used to measure the linear disposition of the different elements involved in mitotic spindle assembly. (C) The relative distances among the inner core (TgCep250L1), the centrocone (TgMORN1), and the mitotic spindle (AcTub) were determined. Note that the signals of TgCep250L1 and TgMORN1 largely overlap in space. Separate staining of each marker can be found in the insets of Fig. 6C.

4.2 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo de la tesis aportan al entendimiento de la biología del centrosoma en *T. gondii*. Como fue descrito anteriormente este organelo es crucial en la coordinación de la división celular en este parásito. La estructura dinámica del centrosoma en *T. gondii* a lo largo del ciclo celular (demostrado en trabajos previos), le permitiría realizar la compleja coordinación de su división celular. Como se mencionó previamente en la introducción de esta tesis, el centrosoma de este parásito está conformado por al menos tres dominios proteicos. Esta segregación en dominios podría ser la razón por la cual este parásito puede realizar en paralelo los diferentes eventos que involucran la división celular de forma coordinada. Al momento de iniciar el trabajo agrupado en este capítulo, el modelo centrosomal de *T. gondii* se encontraba subcategorizado desde el punto de vista estructural, principalmente por las limitaciones de resolución de las técnicas de microscopía disponibles. A lo largo del desarrollo del trabajo agrupado en este capítulo y artículo científico hemos podido descifrar el rol de TgCEP250L1 en la homeostasis centrosomal, en la supervivencia del parásito y en la división del mismo. Por otra parte hemos podido aportar al entendimiento del modelo centrosomal, aportando la localización fina de algunos componentes estructurales utilizando microscopía de ultraestructura de expansión. Algunos componentes como TgEB1, TgCEP250L1, TgNDC80 fueron observados por primera vez con una resolución sin precedentes. Se pudo concluir que TgCEP250L1 es esencial para la supervivencia de los taquizoitos y que su función está vinculada con la formación o en la estabilidad del huso mitótico. Esta información nos aproxima un poco más en el entendimiento del inner core y su función; teniendo en cuenta que TgCEP250L1 es la única proteína conocida al momento que presenta una localización única en este dominio centrosomal.

CAPÍTULO 5.0 “Explorando el rol de TgSAS6”

5.1 Resumen

Rol de TgSAS6 en *T. gondii*

Los genomas de los parásitos apicomplejos aparentan no codificar los factores desencadenantes de la biogénesis de los centriolos presentes en otros eucariotas (Zyg1, PLK1 o PLK4), por lo que su ruta de biogenesis es completamente desconocida. Sin embargo, sabemos que *T. gondii* codifica algunas proteínas evolutivamente conservadas en organismos que presentan centriolos. Particularmente, TgSAS6 es un homólogo de la proteína Spindle assembly abnormal protein 6, que en humanos está codificada por el gen SAS6. Sas-6 es reconocida por su importancia en la biogénesis del centrosoma, ya que tiene la capacidad de autoensamblarse en la estructura, conocida como la rueda de carreta o “cartwheel” (en inglés) que les imparte su característica geometría a los centriolos lo que constituye la base mecánica de la duplicación del centrosoma [1–3]. Dado que el cartwheel define la posición de los microtúbulos que forman el barril centriolar [1–3], Sas6 es una de las primeras proteínas en reclutarse al centrosoma durante su biogénesis. La localización de TgSAS6 ha sido descrita en el outer core centrosomal en *T. gondii* [1] y su localización ha sido explorada en mayor resolución en esta tesis en el capítulo 1 por microscopía de expansión ultraestructural, confirmando su localización esperada en el extremo basal de los centriolos del centrosoma. El genoma de *T. gondii* presenta dos genes con homología al gen humano de SAS6 (HS-SAS6): TgSAS6 presente en centrosoma del parásito [2] y TgSAS6L presente en el anillo polar apical (APR por sus siglas en inglés) [5]. La presencia de TgSAS6L no es necesaria ni para el ensamblado del APR, ni para la formación de los centriolos ni para la supervivencia de los mismos [2]. Si bien la localización y función de TgSAS6L fue explorada en un trabajo reciente, la función de TgSAS6 sigue siendo una incógnita. En este capítulo, nos planteamos explorar la función de TgSAS6 en la supervivencia de los taquizoitos, en la división celular y en la biogénesis y homeostasis centrosomal,

utilizando una combinación de técnicas de microscopía de alta resolución y técnicas de biología molecular.

5.2 Resultados

5.2.1 Rol de TgSAS6 en *T. gondii*

El genoma de *T. gondii* presenta dos genes con homología al gen humano de SAS6 (HS-SAS6): TgSAS6 presente en centrosoma del parásito [4] y TgSAS6L presente en el anillo polar apical (APR por sus siglas en inglés) [5]. Si bien presentan homología entre sí, existen importantes divergencias estructurales como se muestran en la Figura 1. TgSAS6 presenta la estructura con mayor similitud a HS-SAS6 de las dos, y presenta tanto un dominio globular en N-Terminal como la cadena larga rica en coiled-coil del extremo C-Terminal (Fig. 2). En el caso de TgSAS6L solo dispone del dominio globular en N-Terminal (Fig. 2). La primera pregunta que nos realizamos fue cuál es el rol de TgSAS6 en la biogénesis y homeostasis del centrosoma en *T. gondii*. Para abarcar esta pregunta generamos la cepa TgSAS6-mAID-3HA, que permite la degradación condicional controlada (con el agregado de auxina al medio) de la proteína fusionada al degrón AID. Esta cepa se obtuvo como población clonal y estable. La inserción en el marco abierto de lectura del gen de interés de la secuencia mAID-3HA pudo comprobarse por PCR (Fig. 1). Así mismo, la expresión de una única proteína de fusión del peso molecular esperado (~123kD) se comprobó por western blot (Fig. 2D). Finalmente, la correcta localización de la proteína de fusión al centrosoma se observó por inmunofluorescencia indirecta (Fig. 3B). Para analizar si TgSAS6 juega un papel en la supervivencia del parásito realizamos ensayos de placas, mediante los cuales evaluamos la capacidad de los parásitos para sobrevivir a largo plazo tras la degradación inicial de proteínas. Esta degradación se realizó con el agregado de IAA al comienzo del ensayo, y evaluando al cabo de una semana la capacidad de los parásitos para lisar una monocapa de células huésped. Estos ensayos mostraron claramente que los parásitos pueden formar placas de lisis en la presencia de IAA, lo que sugiere que TgSAS6 no es esencial para la división (Fig. 3E). Para comprender

si existían defectos estructurales subyacentes una vez depletada TgSAS6, realizamos IFIs después de la eliminación de la proteína usando anti-IMC1 para marcar la membrana periférica del parásito (IMC1 [10]); anti-HA y DAPI. Veinticuatro horas después de la eliminación de TgSAS6, pueden observarse tanto parásitos en interfase como en división. Pudimos concluir que TgSAS6 no es esencial para la sobrevivencia de los taquizoítos. Dado el rol crítico que SAS6 juega en el ensamblaje de los centriolos, y a la vez entendiendo que los centriolos *per se* pueden ser dispensables en algunos organismos *transigentemente*, decidimos analizar si existían defectos en los centriolos de *T. gondii* una vez depletada TgSAS6. Para ello, realizamos ensayos de Inmunofluorescencia indirecta primeramente con centrina, un marcador del outer core y ampliamente utilizado como marcador de la presencia de los centriolos (Figura 5). Al observar que la señal de centrina en el contexto del knock-down de TgSAS6 parecía normal, decidimos utilizar técnicas de mayor resolución como TEM y U-ExM para analizar la ultraestructura de los centriolos, cuyas dimensiones se encuentran cerca del límite de resolución de la microscopía óptica convencional. Utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) observamos la presencia de estructuras electrodensas característica de los centriolos de este parásito como se muestra en la Figura 6. Las observaciones realizadas usando U-ExM combinada con anticuerpos anti-tubulina acetilada arrojaron la presencia de estructuras de tubulina cuya morfología y localización es idéntica a la observada en los centriolos en este parásito, como se muestra en Figura 5. Utilizando tanto TEM como por UExM pudimos observar la presencia de los centriolos, el cual fue un resultado sorprendente dada la esencialidad de los homólogos de SAS6 en la biogénesis de los centriolos en todos los organismos estudiados hasta el momento (Figura 5 y 6). Adicionalmente en este trabajo pudimos determinar con una resolución sin precedentes, la localización de TgSAS6 a lo largo del ciclo celular. En este trabajo pudimos determinar que TgSAS6 se encuentra en la base de los centriolos de este parásito en todo el ciclo celular y que efectivamente el outer core alberga a los centriolos (Figura 4).

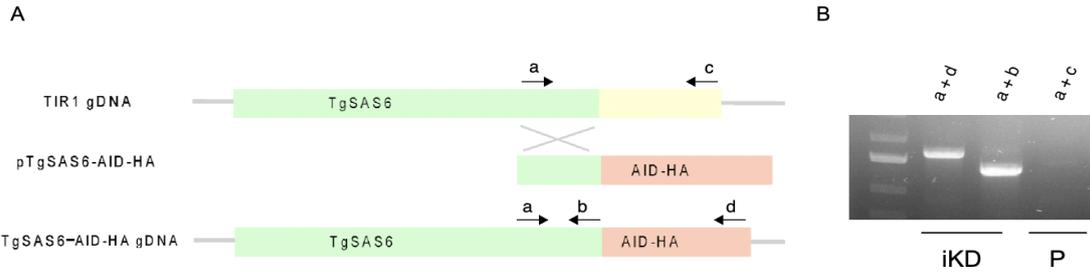


Figura (V). 1. **Estrategia utilizada para obtener la cepa TgSAS6-mAID-3HA.** (A) TgSAS6 iKD se obtuvo reemplazando su extremo 3' con la secuencia del degrón mAID en una cepa parental que expresa Tir1, usando CRISPR/Cas9 dirigido al locus deseado. (B) PCR que muestra la inserción correcta de mAID-3HA en el locus de TgSAS6. Se observa la banda esperada de aproximadamente 1200 pb en los parásitos con la inserción.

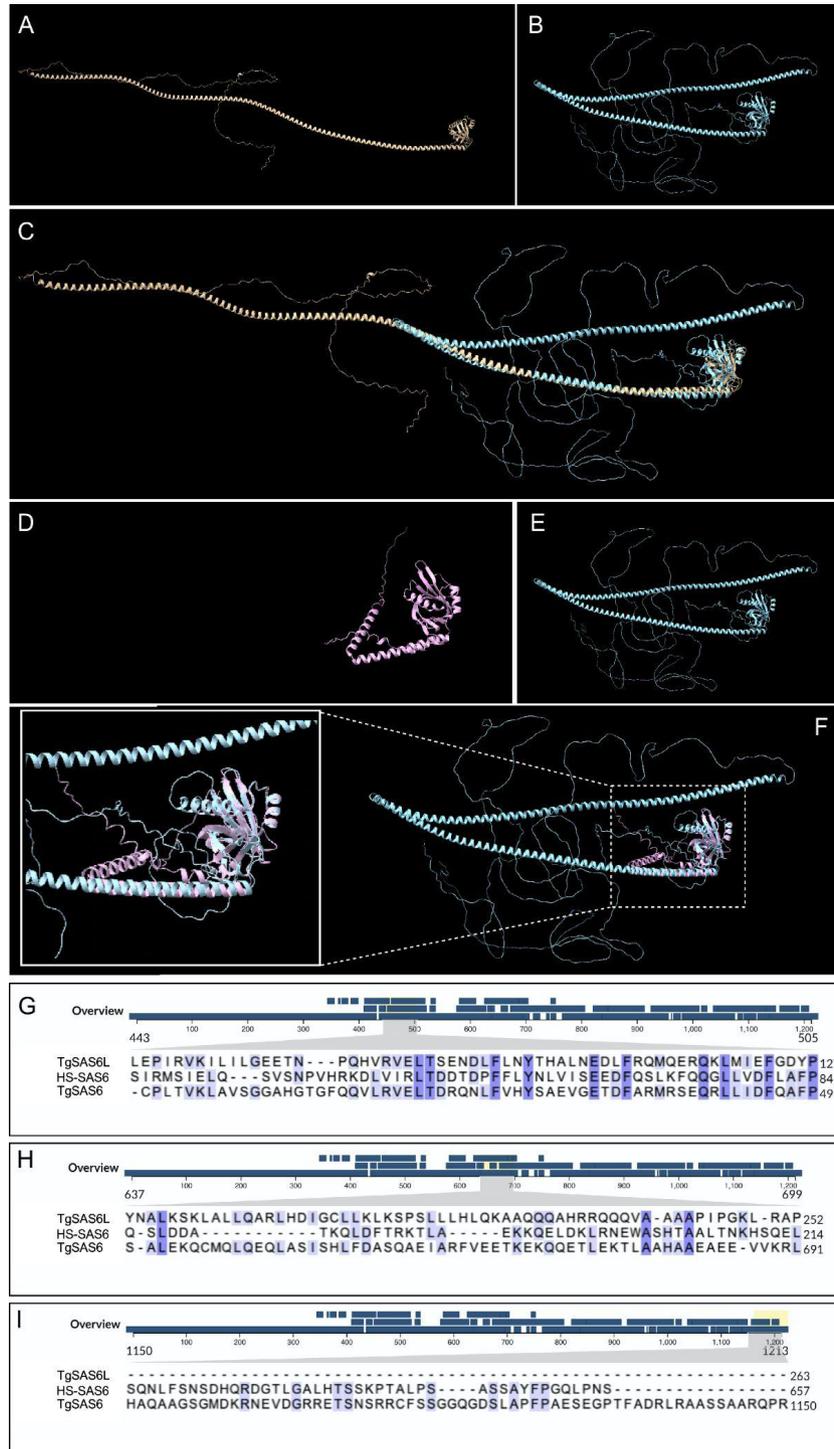


Figura (V). 2. Los dos homólogos a SAS6 que presenta *T. gondii* presentan diferencias estructurales importantes. (A) Modelado de la estructura de SAS6 de Humanos presente en la base de datos del software predictivo AlphaFold y visualizado con ChimeraX [11,12]. (B y E) Modelado de la estructura de TgSAS6 presente en la base de datos del software predictivo AlphaFold y visualizado con ChimeraX [11,12]. Nótese que TgSAS6 presenta un dominio N-Terminal globular y una estructura de coiled-coil hacia el extremo C-Terminal. Ambas estructuras son características de SAS6 en humanos. (C) Alineamiento de estructuras secundarias de

TgSAS6 (celeste) y SAS6 de Humano(Amarillo). Nótese que la mayoría de la homología está en el dominio globular. Adicionalmente TgSAS6 conserva estructuras de alfa-hélice como las presentes en “SAS6 canónica” y presenta un largo de cadena en C-terminal similar. (D) Modelado de la estructura de TgSAS6L presente en la base de datos del software predictivo AlphaFold y visualizado con ChimeraX [11, 12]. Por favor notar que TgSAS6L presenta el dominio globular en el extremo N-terminal pero no así la estructura “alargada” en el extremo C-Terminal. (F) Alineamiento de estructuras secundarias de TgSAS6 (Amarillo) y TgSAS6L (Rosado). Notar que la homología solo está en el dominio globular. (G) (H) (I) Alineamientos de secuencias de proteínas de TgSAS6, TgSAS6L y HS-SAS6 según se indica. Para realizar los alineamientos se usó el algoritmo Clustal a través del programa de Uniprot-Blast presente en la cita [13]. Nótese que TgSAS6 presenta mayores áreas de homología a SAS6 humana, incluso en la zona C-Terminal como se muestra en (I).

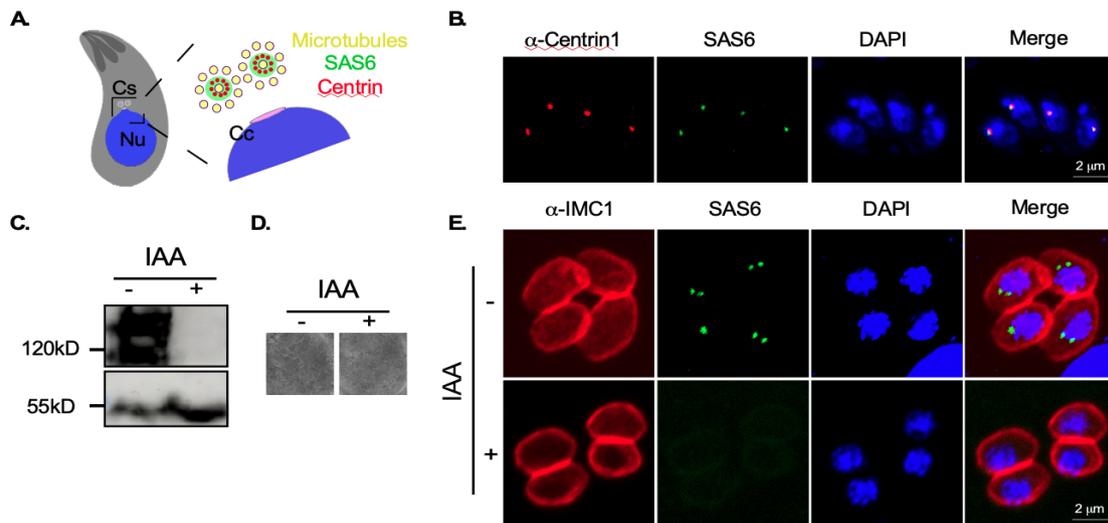


Figura (V). 3. **Generación y validación del mutante condicional para TgSAS6.** (A) Representación esquemática de la estructura bipartita del centrosoma de *T. gondii*. El centrosoma (Cs) de *T. gondii* está organizado en dos dominios principales. El outer-core alberga proteínas como Centrina 1, y aloja los dos centriolos paralelos con una simetría de 9 singletes de microtúbulos. (B) Inmunofluorescencia indirecta mostrando la correcta localización centrosomal de la proteína de fusión TgSAS6-mAID-3HA. En verde se observa TgSAS6-mAID-3HA, en rojo centrina y en azul DAPI. (C) Análisis por Western blot de extractos de proteína total de la cepa TgSAS6-mAID-HA tratada y sin tratar con IAA durante 24 h. TgSAS6-mAID-3HA se degrada rápidamente al añadir IAA al medio de crecimiento. (D) Ensayos de crecimiento en placa revelan que TgSAS6 no es necesaria para la proliferación del taquizoíto. Se infectaron monocapas HFF con igual número de TgSAS6mAID-3HA y se trataron o no, según se indica, durante una semana. Obsérvese que mientras que tanto los parásitos tratados (+IAA) como los no tratados (-IAA) son capaces de generar placas de lisis en la monocapa. (E) La degradación de TgSAS6 no genera defectos estructurales en el parásito.

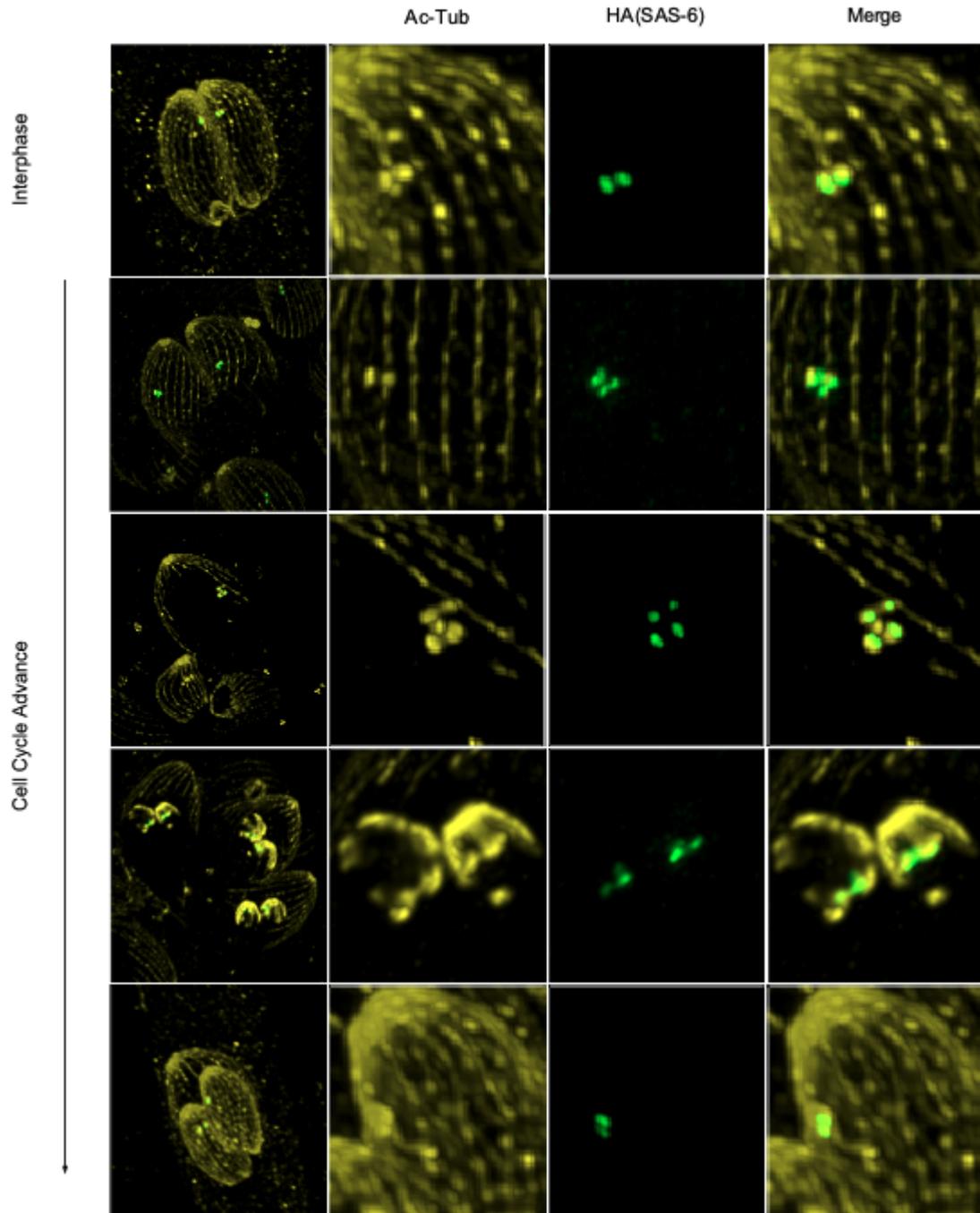


Figura (V). 4. **SAS6 se encuentra en los centriolos de *T. gondii* a lo largo de todo el ciclo celular.** Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TgSAS6 a través del ciclo celular. TgSAS6 está marcado con anticuerpo anti-HA (verde), I y las estructuras que contienen tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (amarillo). Nótese que TgSAS6 se duplica previo a la replicación de los centriolos muy temprano en la división celular.

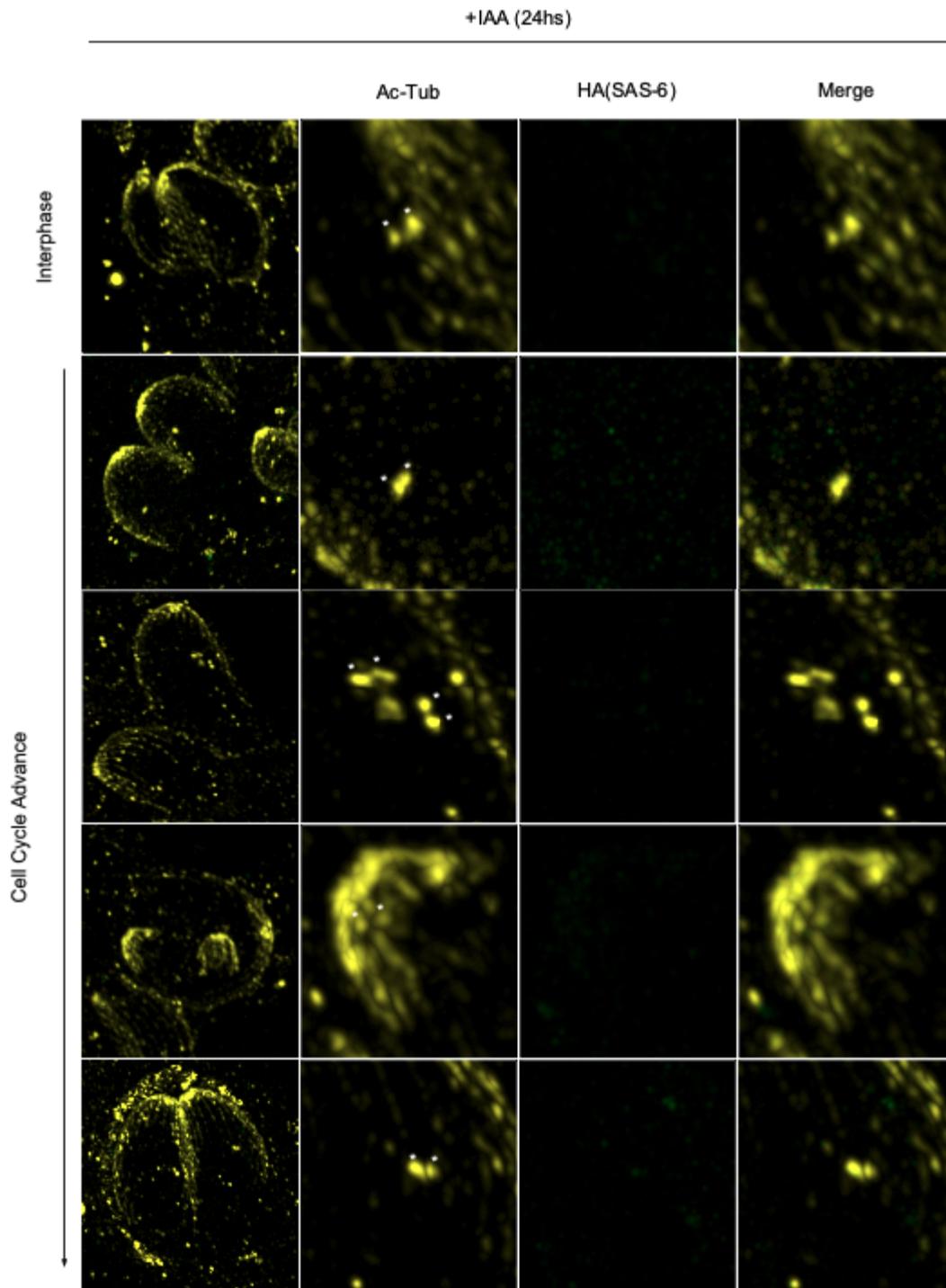


Figura (V). 5. **SAS6 no es esencial para la formación de centriolos en *T. gondii***. Microscopía de expansión de ultraestructura revela que una vez depletada TgSAS6, *T. gondii* es capaz de formar centriolos y de avanzar a través del ciclo celular. TgSAS6 está marcado con anticuerpo anti-HA (verde), y las estructuras que contienen tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (amarillo). Los parásitos fueron tratados con IAA durante 24hs como se indicó.

+IAA 24 hs

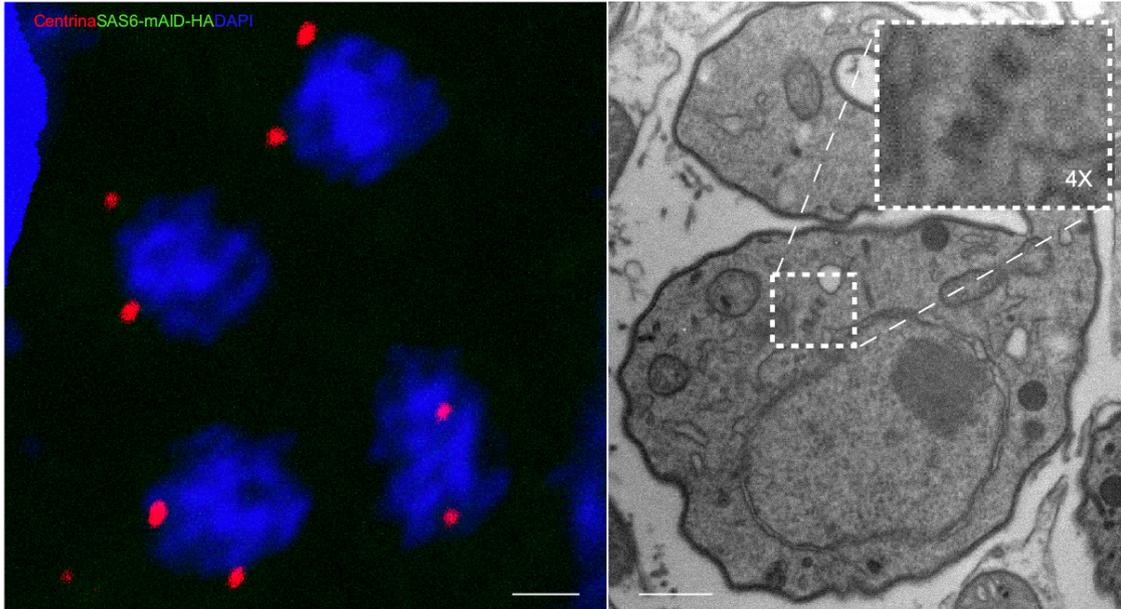


Figura (V). 6. **La depleción de SAS6 en *T. gondii* no afecta la localización relativa de los centriolos entre sí.** (A) La depleción de TgSAS6 no afecta la duplicación de la proteína Centrina 1 localizada en el outer core. Los parásitos TgSAS6-mAID-3HA, tratados con IAA durante 24 hs, se marcaron con anticuerpos anti-centrin1 (rojo; marcador del outer core), anti-HA (verde; señal de TgSAS6) y DAPI (azul; marcador de ADN). (B) La depleción de TgSAS6 no afecta la posición relativa de los centriolos. Los parásitos TgSAS6-mAID-3HA, tratados con IAA durante 24 hs, se observaron por Microscopía Electrónica.

5.3 Conclusiones

Rol de TgSAS6 en *T. gondii*

La degradación condicional de TgSAS6 no impide la supervivencia de los parásitos. Los mutantes no exhiben ningún defecto apreciable en la segregación nuclear ni en la formación de células hijas. El resto del centrosoma, definido por la posición de los centriolos y centrina 1, está presente. Exploramos la presencia de los centriolos durante la ausencia de TgSAS6 mediante microscopía de alta resolución (TEM y UExM). Mostramos que TgSAS6 se encuentra en la base de los centriolos a lo largo de todo el ciclo celular. Mostramos que en ausencia de TgSAS6, los centriolos persisten. Nuestros datos sugieren que podrían existir en *T. gondii* rutas de biogénesis centriolares divergentes, las cuales posiblemente difieren de aquellas caracterizadas en células eucariotas superiores. Alternativamente TgSAS6L podría compensar funcionalmente la pérdida de TgSAS6 en los mutantes. Sin embargo, nuestras predicciones *in silico*, sumado a la distante localización de TgSAS6L en el extremo distal del parásito nos llevan a pensar en que esto sea poco probable. Específicamente, se destaca que si bien TgSAS6L presenta homología al extremo N-terminal de HS-SAS6, no presenta así los dominios coiled-coil característicos del C-terminal, tan importantes en la generación de la estructura del cartwheel [1,5]. TgSAS6 en cambio presenta alta homología en el extremo N-Terminal con el HS-SAS6 y presenta los dominios coiled-coil característicos del C-terminal. No obstante, una pregunta válida sería qué sucede con la localización del pool proteico de TgSAS6L en el contexto de la depleción de TgSAS6. Estos experimentos están pendientes. De confirmarse que la ausencia de redundancia funcional entre TgSAS6 y TgSAS6L, estos hallazgos no tendrían precedentes en la literatura actual, ya que en todos los sistemas en los que homólogos de SAS6 han sido caracterizados, esta proteína ha resultado ser esencial para la formación de centriolos, la función del centrosoma y de los cuerpos basales que dan origen a cilios y flagelos. Destacamos además que conocidos interactores de Sas-6, esenciales para completar la formación de los centriolos, como la proteína Cep135, no parecería encontrarse codificados en el genoma de *T. gondii*, de

acuerdo a búsquedas bioinformáticas previamente realizadas [14] tampoco existen reportes de la presencia de un cartwheel en *T. gondii* [14].

5.4 Materiales y Métodos

5.4.1 Generación de la cepa TgSAS6-mAID-3HA

TgSAS6-mAID-3HA se generó en el contexto de la cepa RH Δ ku80 Tir1 [6]. Se amplificó un producto de PCR de la secuencia mAID-3HA con 35 pb de homología con cualquiera de los extremos del STOP codón del gen TgSAS6 utilizando los cebadores 5'-TGCGCGCAGCGAGCTCGGCGGCGCGACAGCCGCGT-3' y 5'-CGTGA ACTACAAAGTGCGGGTCCAAATCTTTCGAC-3'. Se generó un plásmido que codifica para un ARN guía dirigido al extremo 3' del gen TgSAS6 y SpCas9 mediante mutagénesis utilizando los cebadores 5'-ACACTCTACGAACCTGTCCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA-3' y 5'-GGAAAAGAGTTGCTCAAACGTGG-3'. Luego, 50 μ g del vector pSagCas9 y 10 μ g del producto PCR se transfectaron en $5,0 \times 10^7$ parásitos utilizando un electroporador BTX 600 de acuerdo con los protocolos publicados previamente [7]. El vector pSagCas9 [17] fue proporcionado amablemente por David Sibley. La inserción exitosa de la secuencia 3HA-mAID fue monitoreada por PCR utilizando los cebadores a (5'-CAGGAGGAACTTGCTGCTGC-3'), a* (5'-CCTCCACTTCC AATTTTAGCACGCGGCTGTCGCGCCGCGGAGCTC-3') y b (5'-TTA GGCATAATCTGGAACATCG-3'), según al esquema mostrado en la Fig.1. Las líneas celulares clonales se obtuvieron mediante dilución limitante. La degradación de la proteína se desencadenó mediante la adición de ácido indolacético 0,5 mM (IAA; Sigma-Aldrich) al medio de crecimiento.

5.4.2 Ensayo de placa

Para el ensayo de placas, se inocularon doscientos parásitos de la cepa TgSAS6-mAID-3HA en células de fibroblastos de prepucio humano (HFFs; amablemente proporcionadas por Sebastián Lourido) previamente cultivadas hasta confluencia en placas de seis pocillos y mantenidas durante 7 días en

presencia o ausencia de 0,5 mM de IAA. A continuación, los pocillos se fijaron con metanol y se tiñeron con violeta cristal para visualizar las placas.

5.4.3 Western blot

Las proteínas totales se extrajeron de 1×10^8 parásitos cultivados en medios suplementados con 0,5 mM de IAA durante diferentes tiempos, como se indica en las leyendas de las figuras. Las proteínas totales se extrajeron resuspendiendo el sedimento celular en buffer Laemmli e incubándolo a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras de proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10 % durante 2 horas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante la noche. Las incubaciones de anticuerpos primarios y secundarios se realizaron en leche al 5 % en PBS utilizando anti-HA de conejo a 1:500 (cell signaling, n.º de catálogo: 3724S) y anti-conejo fusionado a HRP a 1:10 000 (BioRad, n.º de catálogo: 1721017). Las imágenes se obtuvieron usando un sistema de adquisición de imágenes de transferencia Western ImageQuant 800 (Amersham) exponiendo la membrana durante un total de 30 segundos.

5.4.4 Microscopía de Fluorescencia en *T. gondii*

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realizaron infectando células HFF confluentes cultivadas en cubreobjetos de 13 mm con 1.000 parásitos. Se dejó que los parásitos invadieran y crecieran durante 2 horas antes de añadir IAA al medio. Obsérvese que el medio se cambió al mismo tiempo para los parásitos cultivados en condiciones de control (sin IAA). Se dejó que los parásitos crecieran durante 24 horas más antes de fijarlos y procesarlos. Los parásitos se fijaron utilizando metanol por 5 min a -20°C. Luego se procedió a realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esta técnica es utilizada de manera rutinaria en nuestro laboratorio. Brevemente, consta del bloqueo de las interacciones inespecíficas con 3% BSA, la incubación con los diferentes anticuerpos primarios y luego con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo. Por último, la visualización se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia invertido. En nuestro caso, utilizamos

el microscopio Olympus IX81 para el análisis primario de la marcación, y de haber sido exitosos, adquirimos imágenes de parásitos enteros (z-stacks) en el microscopio confocal Zeiss LSM 880, las cuales deconvolucionamos usando Huygens Software y luego analizamos seguidamente en ImageJ. Los anticuerpos utilizados fueron anti-HA de conejo a 1:200 (Cell Signaling, n° de catálogo 3724S), anti-HA de rata a 1:200 (Roche n° de catálogo 11867423001), anti-centrina de ratón a 1:1.000 (Cell Signaling, n° de catálogo 04-1624), anti-tubulina acetilada de ratón a 1:1.000 (Sigma, n° de catálogo. T7451) anti-IMC-1 de ratón a 1:500 (amablemente proporcionado por Gary Ward, Universidad de Vermont), y anti-alfa tubulina de conejo a 1:500 (cell signaling número de catálogo #2125S). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón de cabra Alexa Fluor 594 (Invitrogen, n° de catálogo 4600321), anti-rata de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen, n° de catálogo A-11006), anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen, n° de catálogo A-11008), anti-conejo de cabra Alexa Fluor 594 (Invitrogen, n° de catálogo A-11076). Todos se utilizaron todos a una dilución de 1:2000. Los cubreobjetos se montaron sobre glicerol con DAPI.

5.4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La preparación de las muestras para TEM se realizó de acuerdo con protocolos previamente publicados [9]. Brevemente se fijaron parásitos intracelulares utilizando buffer fosfato sódico 2,5%, glutaraldehído 0,1 M durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se lavó con buffer fosfato sódico 0,1 M por triplicado. Las células infectadas se volvieron a fijar con una solución de OsO₄ al 1%. El proceso de deshidratación se realizó secuencialmente incubando las muestras en acetona pura al 30, 50, 70 y 90% durante 10 minutos cada concentración. La incrustación se realizó utilizando resina epoxi (resina PolyBed; Polysciences, Inc., Warrington, PA). Las secciones ultrafinas se tiñeron y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL acoplado a una cámara digital.

5.4.6 Alineamientos múltiples y modelos proteicos

Los alineamientos de las secuencias de proteínas de TgSAS6, TgSAS6L y HS-SAS6 se realizaron usando el algoritmo clustal a través del programa de Uniprot-Blast que utiliza el software de la cita [13]. Para el modelado de la estructura de TgSAS6, TgSAS6L y HS-SAS6 se utilizó el modelo presente en la base de datos del software predictivo AlphaFold y se visualizó con ChimeraX [11,12].

5.5 Bibliografía

1. Nakazawa Y, Hiraki M, Kamiya R, Hirono M. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr Biol CB*. el 18 de diciembre de 2007;17(24):2169–74.
2. Banterle N, Nievergelt AP, de Buhr S, Hatzopoulos GN, Brillard C, Andany S, et al. Surface-catalyzed SAS-6 self-assembly directs centriole formation through kinetic and structural mechanisms [Internet]. *Biophysics*; 2020 sep [citado el 14 de octubre de 2021]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.04.283184>
3. Culver BP, Meehl JB, Giddings TH Jr, Winey M. The two SAS-6 homologs in *Tetrahymena thermophila* have distinct functions in basal body assembly. *Mol Biol Cell*. 2009/01/21 ed. marzo de 2009;20(6):1865–77.
4. Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLOS Biol*. el 3 de marzo de 2015;13(3):e1002093.
5. de Leon JC, Scheumann N, Beatty W, Beck JR, Tran JQ, Yau C, et al. A SAS-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot Cell*. julio de 2013;12(7):1009–19.
6. Brown KM, Long S, Sibley LD. Plasma Membrane Association by N-Acylation Governs PKG Function in *Toxoplasma gondii*. *mBio*. el 2 de mayo de 2017;8(3).
7. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the

Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLOS Biol.* el 11 de diciembre de 2012;10(12):e1001444.

8. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. *PLOS ONE.* el 27 de junio de 2014;9(6):e100450.

9. Martins-Duarte ES, Portes J de A, da Silva RB, Pires HS, Garden SJ, de Souza W. In vitro activity of N-phenyl-1,10-phenanthroline-2-amines against tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Bioorg Med Chem.* el 15 de noviembre de 2021;50:116467.

10. Mann T, Gaskins E, Beckers C. Proteolytic Processing of TgIMC1 during Maturation of the Membrane Skeleton of *Toxoplasma gondii* *. *J Biol Chem.* el 25 de octubre de 2002;277(43):41240–6.

11. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* el 1 de agosto de 2021;596(7873):583–9.

12. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* el 7 de enero de 2022;50(D1):D 439–44.

13. The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research*, Volumen 51, Issue D1, 6 de enero de 2023, Pages D523–D531,

14. Tomasina R, González FC, Francia ME. Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Microorganisms.* el 3 de diciembre de 2021;9(12):2503.

CAPÍTULO 6.0 “Hacia la generación de un proteoma centrosomal en *T. gondii*”

6.1 Resumen

El centrosoma es un organelo no delimitado por membranas que participa en procesos celulares fundamentales como la organización del huso mitótico, durante la mitosis, y de los microtúbulos corticales durante la interfase. Generalmente, en la mayoría de los modelos eucariotas, el centrosoma está compuesto por dos barriles de microtubulos llamados centriolos. Como se menciona previamente en esta tesis, los centriolos están formados por tripletes de microtúbulos dispuestos de forma ortogonal. Cada barril está compuesto por un cilindro hueco - generando un lumen- cuyas paredes están definidas por 9 grupos cada uno de tres microtúbulos (tripletes). Estos tres microtúbulos están denominados A, B y C, siendo el A el más próximo al centro y el único que está completo. La estabilidad de los centriolos está dada por las interacciones entre los microtúbulos A y C contiguos. Mientras que la simetría radial es producto de una estructura denominada Cartwheel. Esta estructura consiste en nueve radios que se conectan con los microtúbulos de las paredes de los centriolos. Cada radio está formado por dímeros de una proteína denominada SAS6. Esta proteína es esencial para la formación de centriolos o para la conservación correcta de su geometría. La duplicación del centrosoma en eucariotas superiores está sometida a un estricto control, donde una quinasa de tipo “Polo” PLK 1-4 (del inglés, “Polo-like Kinase 1 o 4) inicia la biogénesis fosforilando a “STIL” al final de G1. Fosfo-STIL puede interaccionar con SAS6, para la formación del cartwheel. La interacción con STIL recluta a SAS6 al centrosoma iniciando la biogénesis. Vale destacar que la capacidad de nuclear microtúbulos del centrosoma está dada por el material pericentriolar (PCM) en el que se encuentran embebidos los centriolos. El filo Apicomplexa está compuesto por diversos agentes causantes de enfermedades de relevancia para la salud humana y veterinaria, a nivel mundial. Ejemplos de estas, son la toxoplasmosis, la criptosporidiosis, la malaria y la neosporosis. Más de 6000 especies están

incluidas en este filo [1]. Los esquemas de división celular que siguen estos parásitos son altamente divergentes a las formas seguidas por eucariotas superiores [1]. Como se mencionó anteriormente a diferentes escalas, todos los apicomplejos siguen el mismo esquema de proliferación; mitosis semi-cerrada del núcleo y formación interna o externa de células hijas por ensamblaje *de novo*. A diferencia de lo que sucede en mamíferos (donde la mitosis nuclear abierta precede a la fisión del citosol, y la formación de dos células hijas por ciclo), la mitosis y citocinesis en apicomplejos no necesariamente ocurren de manera coordinada. La coordinación espacio-temporal de estos eventos se da exclusivamente a través de anclajes físicos al centrosoma, el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) en estas células. Los parásitos de este filo poseen centros organizadores de microtúbulos que están involucrados no solo en la división celular, sino también en la formación de microtúbulos corticales (estructuras claves en la invasión de las células hospederas) y en la formación de flagelos según corresponda [1,2,3]. El centrosoma en los Apicomplexa presenta divergencias estructurales con el centrosoma de eucariotas superiores. Dentro del mismo filo se encuentran diferencias en la organización de este principal centro organizador de microtúbulos [4]. Existen especies dentro de este filo que no presentan centriolos como es el caso de *Plasmodium spp.* que en su lugar presenta una placa centriolar [4]. En cuanto a *Toxoplasma gondii* su centrosoma está compuesto por dos centriolos paralelos formados de singletes de microtúbulos, con un comportamiento bipartito particular [5]. Los genomas de las especies agrupadas dentro del filo aparentan no codificar los factores desencadenantes de la biogénesis centrosomal presentes en otros eucariotas (Zyg1, PLK1 o PLK4). Pese a su importancia para la supervivencia de estos parásitos, y su aparente divergencia funcional y estructural, los componentes estructurales y reguladores del centrosoma de los apicomplejos se encuentran sub-caracterizados. Prácticamente no hay conocimiento a la fecha de las rutas biosintéticas que gobiernan el centrosoma en *T. gondii*. Poco ha sido descrito en cuanto a las enzimas que regulan la dinámica centrosomal en este parásito. En este trabajo nos propusimos identificar un potencial repertorio de nuevas proteínas centrosomales en *T. gondii* identificando interactores de las proteínas centrosomales TgSAS6 y TgCEP250L1. APEX2 es una peroxidasa que permite

la biotinylation de proteínas proximales (en el entorno de 20 nm), bajo condiciones de catálisis controlada, de una proteína de fusión de interés. Nos propusimos utilizar como aproximación experimental la generación de cepas mutantes que expresan, como proteínas de fusión endógenas, TgSAS6-APEX2 y TgCEP250L1-APEX2. Así mismo, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando una cepa que expresa TgSAS6 endógena fusionada a una triple hemmaglutinina (3HA), para identificar interactores físicos de TgSAS6. Utilizando estos enfoques, hemos identificado, por ensayos de proteómica, una lista extensa de candidatos, de los cuales seleccionamos veinte. Los criterios de selección utilizados combinaron un filtrado con un script de R utilizando la función filter del paquete dpyr (con un criterio de corte donde se les exigió a las proteínas que estuvieran enriquecidas 2 veces frente a los controles), seguido por un filtrado manual observando esencialidad y homología a proteínas de cuerpo basal de *T. brucei* para su posterior caracterización. Dentro de estas se encuentran cinco proteínas anotadas como quinasas o fosfatasas y diez proteínas que presentan homología con proteínas de *Trypanosoma brucei*, un patógeno flagelado distantemente relacionado, cuyo flagelo se encuentra organizado por un cuerpo basal canónico, un organelo estructural y funcionalmente relacionado al centrosoma. El objetivo de este capítulo es el de generar una metodología sistemática que permita la caracterización molecular y funcional, en profundidad, del centrosoma en parásitos Apicomplexa. Específicamente propusimos:

- La generación de un pequeño proteoma centrosomal de *T. gondii*
- La validación del proteoma ha adquirir en *Trypanosoma brucei*

6.2 Objetivo 1: Identificación de un “proteoma centrosomal”

6.2 Resultados

6.2.1 Obtención de las cepas TgCEP250L1-APEX2 y TgSAS6-APEX2

Con el objetivo de generar una aproximación de las proteínas presentes en el centrosoma e interactores de proteínas centrosomales, se obtuvieron dos cepas: TgSAS6 y TgCEP250L1 respectivamente fusionadas con APEX2. Tanto TgCEP250L1-APEX2-FLAG y TgSAS6-APEX2-FLAG se obtuvieron como población clonal y estables. La inserción en el marco de lectura abierta de los genes de interés de la proteína APEX2 pudo comprobarse por PCR (Fig. 1B). Así mismo, la expresión de una única proteína de fusión en cada cepa del peso molecular esperado (para TgSAS6-APEX2 de 150 kDa y para TgCEP250L1-APEX2 de 323 kDa) se comprobó por western blot (Fig 1C). Finalmente, la correcta localización de las proteínas de fusión al centrosoma se observó por inmunofluorescencia indirecta (Fig 1D). En suma, se logró generar exitosamente las cepas que expresan las proteínas de fusión propuestas para la concreción de nuestros objetivos.

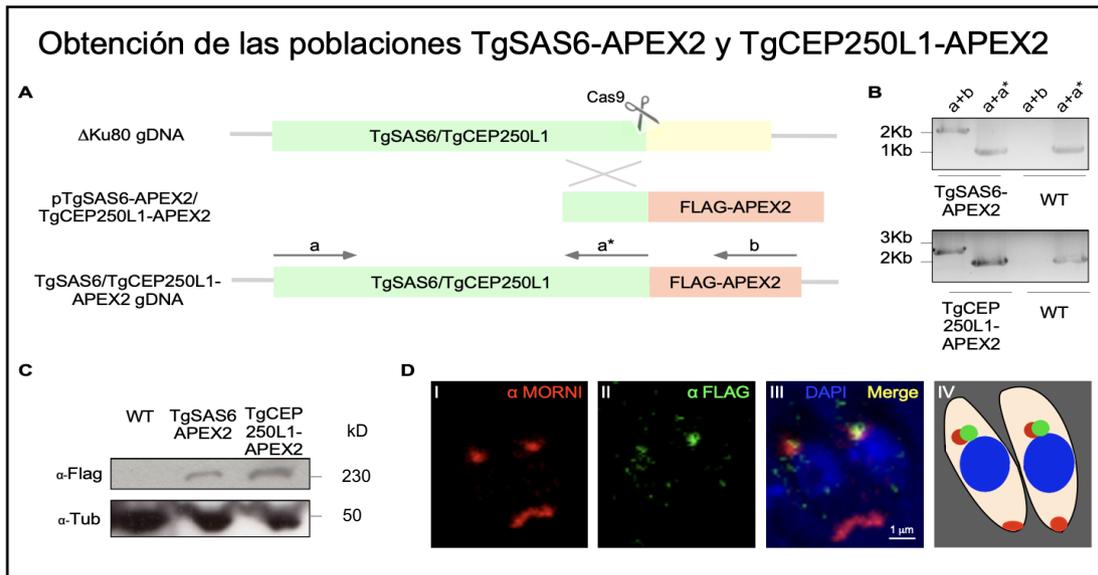


Figura. (VI). 1. **Obtención de las poblaciones TgSA6-APEX-2 y TgCEP250L1-APEX-2.** (A) Estrategia de generación de cepas Knocks-in para APEX2. Se representa el sitio de corte de la endonucleasa Cas9(B) PCR confirmatoria de la inserción de APEX2 en el marco de lectura abierto de los genes TgSAS6 y TgCEP250L1. (C)Western Blot confirmatorio de la expresión de las proteínas de fusión TgSAS6-APEX2 y TgCEP250L1-APEX2. (D) I. Inmunofluorescencia Indirecta de mutantes TgSAS6-APEX2 marcados con los anticuerpos que se indican. α-MORN es un marcador del centrocono, una estructura de la envoltura nuclear próxima al centrosoma, α-FLAG como marcador de las proteínas de fusión y DAPI. Representación esquemática de *T. gondii* y la localización relativa de TgSAS6APEX2 (IV). Nótese que la localización por IFI de TgCEP250L1-1APEX2 no pudo corroborarse.

6.2.2 Optimización de un marcado con APEX2 para proteínas fusionadas no mitocondriales en *Toxoplasma gondii*

APEX2 es una ascorbato peroxidasa modificada que para tener actividad precisa la presencia del grupo Hemo y condiciones específicas de concentración y tiempo de incubación de peróxido de hidrógeno y biotina-fenol. Por esta razón las aplicaciones más extendidas de uso de esta proteína como biotinizador promiscuo han sido reportadas para proteínas mitocondriales. En este trabajo, se logró obtener un protocolo de marcado con biotina en *T. gondii* para proteínas

fusionadas a APEX2 no mitocondriales.

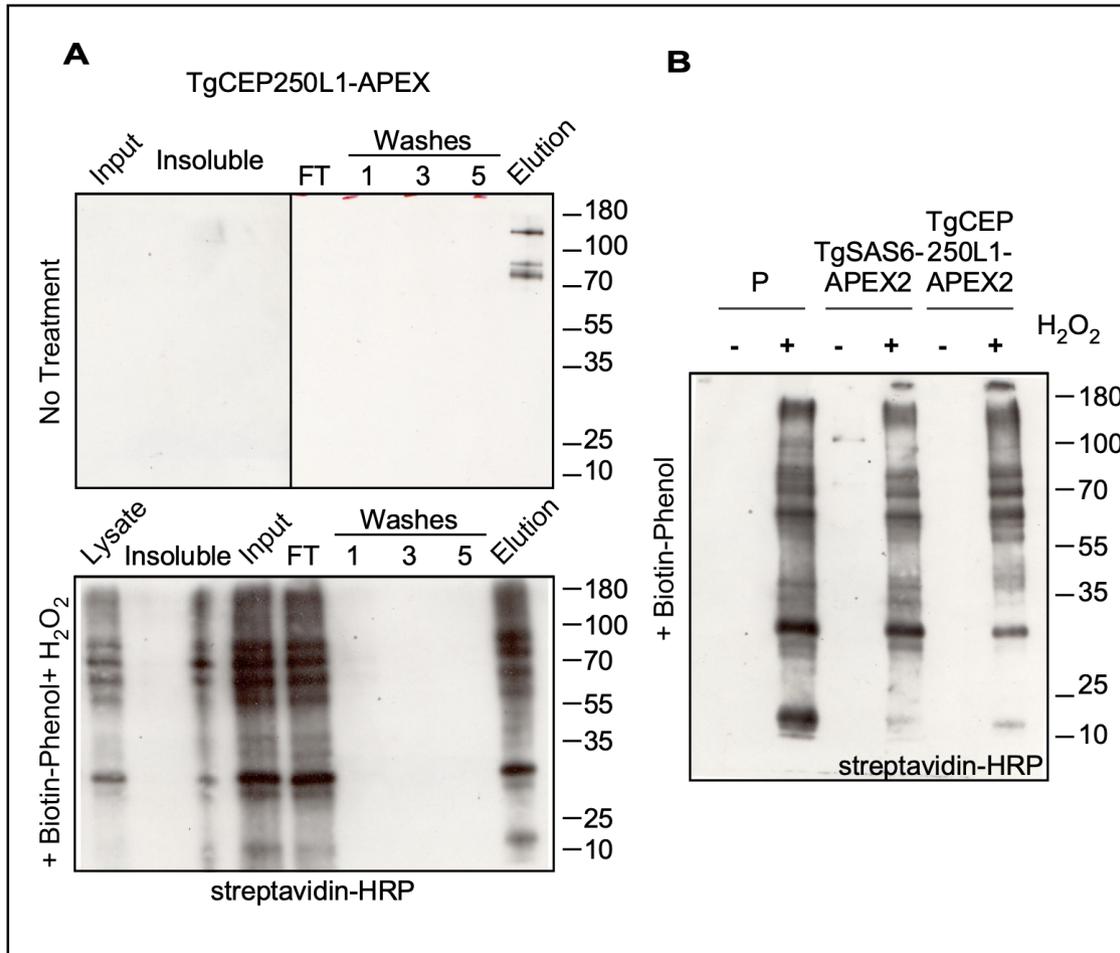


Figura. (VI). 2. **Resultados de ensayos de biotilación observados por Western-blot.** (A) Western-blot de Co-Inmunoprecipitación de población TgCEP250L1-APEX2 con tratamiento con Biotina fenol (BP) y Peróxido según se indica. (B) Western-blot de las eluciones con tratamiento según se indica para TgSAS6-APEX2, TgCEP250L1-APEX2 y WT. Nótese que *T. gondii* expresa únicamente dos proteínas naturalmente biotiniladas, ambas de alto peso molecular (100 kDa aproximadamente). Por favor notar que: P hace referencia a parental strain (cepa parental), FT es flow through (eluido), Washes (lavados), Lysate (lisados), Insoluble (Insolubles).

6.2.3 Selección de candidatos centrosomales

Las muestras obtenidas de las purificaciones de TgSAS6-APEX2 y TgCEP250L1-APEX2 tratadas con el protocolo de marcado y por ensayos de co- inmunoprecipitación con TgSAS6-HA fueron enviadas al Institut Pasteur de Lille para ser analizadas por espectrometría de masa (MALDI-TOF). Los candidatos fueron posteriormente filtrados y seleccionados, tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Finalmente, seleccionamos 20

candidatos (siguiendo los criterios descritos en materiales y métodos) para su posterior validación, que se especifican en la Tabla 1.

Tabla (V) 1. Lista de 20 candidatos centrosomales a validar.

Código genes candidato	Anotación	Esencialidad	Ensayo (Figura 3)	Homólogo en CB <i>T. brucei</i>
TGGT1_30 1440	Calcium-dependent protein kinase CDPK1	Esencial	d	si
TGGT1_26 3070	CMGC kinase, CK2 family	Esencial	d	si
TGGT1_21 0408	HMG (high mobility group) box domain-containing protein	Esencial	a,c,e	no
TGGT1_29 3190	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	Esencial	e	no
TGGT1_21 7680	Hypothetical protein	Esencial	d	si
TGGT1_25 0820	Hypothetical protein	Esencial	c	no
TGGT1_24 3690	Hypothetical protein	Esencial	d, (+)SAS6 HA	no

TGGT1_22 4900	Putative adenylate kinase	Esencial	d	si
TGGT1_29 3630	Hypothetical protein	Esencial	c,(+)SA S6HA	si
TGGT1_28 5210	Hypothetical protein CEP120	Esencial	(+) SAS6HA	si
TGGT1_20 0360	Hypothetical protein	no esencial	a,b	no
TGGT1_21 2860	Hypothetical protein	Esencial	d	si
TGGT1_31 1410	putative M phase phosphoprot ein MPP10	Esencial	(+) SAS6HA	no
TGGT1_31 5140	WD domain, G-beta repeat- containing protein	Esencial	d, (+)SAS6 HA	no
TGGT1_23 7250	Hypothetical protein	Esencial	d, (+)SAS6 HA	no
TGGT1_21 7530	Hypothetical protein	Esencial	d, (+)SAS6 HA	no
TGGT1_26 5330	putative cell- cycle- associated protein kinase GSK	Esencial	e	no

TGGT1_27 0320	Protein phosphatase 2C domain- containing protein	Esencial	d	si
TGGT1_28 9320	Putative casein kinase I	Esencial	d	si
TGGT1_25 8970	Hypothetical protein	Esencial	d, (+)SAS6 HA	no

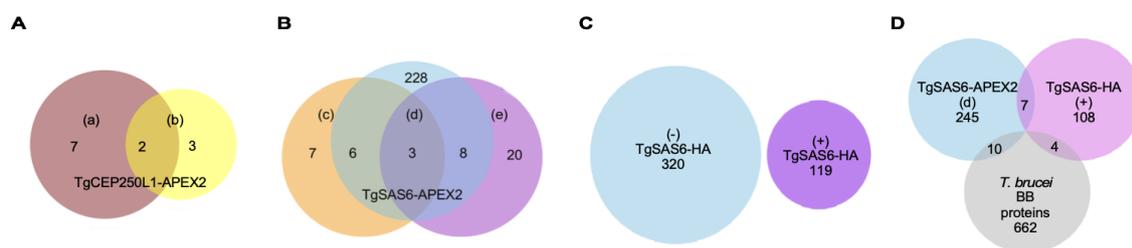


Figura. (VI). 3. **Diagramas de Venn que reflejan los resultados ensayos proteómica.** (A) Diagrama de Venn de los datos obtenidos por espectrometría de masa de las proteínas obtenidas por ensayo de biotilización en TgCEP250L1-APEX2 (B) Diagrama de Venn de los datos obtenidos por espectrometría de masa de las proteínas obtenidas por ensayo de biotilización en TgSAS6-APEX2. (C) Diagrama de Venn de los datos obtenidos por espectrometría de masa de las proteínas obtenidas en el CoIP con SAS6-HA y en el ensayo (d) de TgSAS6-APEX2 y de las proteínas pertenecientes al cuerpo basal de *T. brucei*. Los criterios de selección y la metodología utilizada para la generación de los diagramas están descritas en la sección de materiales y métodos de este capítulo.

6.3 Conclusiones

Mediante la utilización de la tecnología de CRISPR-Cas9 se logró generar dos poblaciones mutantes clonales con inserción de APEX2 en el locus endógeno de TgSAS6 y TgCEP250L1. Previamente en nuestro laboratorio se habían realizado experiencias en el uso de la biotina-ligasa promiscua BirA*. Si bien BirA* hubiese sido una alternativa viable para aproximar nuestros objetivos, optamos por la utilización de APEX2 ya que la biotinilación de proteínas proximales, a diferencia de BirA que utiliza biotina endógena, puede controlarse a través del agregado exógeno de su sustrato biotinafenol. Ambos enfoques resultan ideales para su utilización en *T. gondii* ya que este presenta solo dos proteínas naturalmente biotinizadas, por lo que la presencia de otras proteínas biotinizadas puede distinguirse fácilmente mediante diferentes enfoques como western blot, inmunofluorescencia indirecta, y espectrometría de masa. Anteriormente, la utilización de APEX2 en un enfoque similar al aquí propuesto había sido utilizado tanto en *T. gondii* como en otros organismos, casi exclusivamente para la caracterización de proteínas mitocondriales. Esto se debe a que APEX2 requiere la presencia de grupos hemo para su función. Es así, que gran parte del trabajo aquí presentado consistió en optimizar un protocolo que resultara en biotinilación detectable en los parásitos mutantes. En base a ese protocolo se obtuvo un potencial proteoma del centrosoma de *T. gondii* que será validado en futuros proyectos en el laboratorio. No obstante, pudimos observar la marcación de varias proteínas biotinizadas en el control negativo (cepa parental, tratada, figura 2B, (+)). Creemos que esto se debe a la presencia de otras peroxidasas endógenas capaces de catalizar la biotinilación de proteínas proximales bajo las condiciones experimentales, o a contaminación con proteínas que se biotinilan de manera más marcada en la célula hospedera también por acción de peroxidasas. Teniendo esto en cuenta, optamos por criterios estrictos a la hora de seleccionar posibles candidatos a validar. Un hito en este proyecto fue el desarrollo de un script en R que automatizó la selección de candidatos evitando así posibles sesgos en la elección. Utilizando este script pudimos detectar dentro de nuestro “proteoma centrosomal filtrado” proteínas centrosomales como centrina 1 y el homólogo de CEP120 en *T. gondii*. Si bien

centrina 1 no fue incluida en nuestra selección final, ya que su localización se conoce, y por tanto no se muestran dentro de los resultados, refuerzan la noción de que el interactoma identificado está al menos enriquecido específicamente en proteínas potencialmente centrosomales. Un aspecto destacable del interactoma centrosomal obtenido es que se encuentra enriquecido en proteínas hipotéticas, quinasas y fosfatasas, y en proteínas que presentan alta homología a proteínas centrosomales conocidas, como CEP120. Este potencial interactoma resulta de interés, ya que uno de los objetivos planteados en esta tesis es identificar los catalizadores y reguladores de la biogénesis del centrosoma y sus estructuras asociadas. Entendemos que probablemente, estos catalizadores se presenten en forma de quinasas y/o fosfatasas, ya que la fosforilación y desfosforilación, junto con la degradación ciclo-celular específica, de proteínas blanco son los mecanismos por excelencia utilizados por las células eucariotas en la regulación de la génesis de organelos durante la división celular. Por otro lado, si bien no existen en las proteínas hipotéticas dominios característicos que permitan generar hipótesis sobre sus posibles funciones, es interesante destacar que un importante porcentaje de estas presentan homología con proteínas que se localizan en el cuerpo basal de *Trypanosoma brucei*, el agente etiológico de la enfermedad del sueño. Durante el transcurso de esta tesis intentamos validar el proteoma obtenido utilizando técnicas de biología molecular para “marcar u etiquetar” de forma endógena los genes de las proteínas candidatas obtenidas, sin éxito. Dentro de las diferentes causas que puedan estar involucradas con el fracaso, sabemos que ciertos modelos de genes de interés estaban mal anotados, como fue el caso concreto de TgCEP120. Por este conjunto de peripecias y siguiendo la lógica de identificar principios evolutivamente conservados en eucariotas unicelulares decidimos realizar la validación de la localización de las proteínas homólogas en *T. brucei*.

6.4 Materiales y Métodos

6.4.1 Generación de las cepas TgCEP250L1-APEX2 y TgSAS6-APEX2

Para la generación de las cepas TgCEP250L1-APEX2-FLAG y TgSAS6-APEX2-FLAG, se siguió el protocolo para la generación de vectores para etiquetar los genes por homología simple descritos en [6]. Brevemente, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región 3' de dichos genes utilizando los cebadores específicos que se muestran en la Tabla 1. El producto de PCR obtenido en cada caso fue tratado con T4 polimerasa (Invitrogen) y dGTPs (Invitrogen). Por otra parte se linearizó el vector pLic-APEX2-FLAG (cedido a nuestro laboratorio por el laboratorio del Dr. Boris Striepen, University of Pennsylvania) con la enzima de restricción PacI (New England Biolabs) y se trató con T4 polimerasa y dCTPs. Finalmente se procedió a la inserción de la región 3' de los genes (TgCEP250L1 y TgSAS6) en el vector de pLICAPEX2-FLAG por clonación independiente de ligación (LIC) [7]. Asimismo, anteriormente se había obtenido el vector pLIC-SAS6-3HA utilizando en este caso el vector pLIC-3HA, estas cepas habían sido generadas por la Dra. María Eugenia Francia previo a mi ingreso al laboratorio. Por otra parte, se clonaron de las guías específicas para TgSAS6 y TgCEP250L1 en el vector pSAG1-CAS9-GFP sgUPRT (Addgene 54467), utilizando el kit Q5 mutagénesis (New England Biolabs) y los primers que se muestran en la Tabla 1. Tanto los vectores pSAG1-CAS9-GFP sgUPRT como los pLIC fueron transformados en bacterias competentes, seleccionados, crecidos en medio con selección y purificados por Maxiprep usando el kit "PureLink-Quick Plasmid maxiprep" (Invitrogen). Para la generación de mutantes, los vectores generados se linearizaron con KpnI (New England Biolabs) y transfectaron siguiendo protocolos estándar. Brevemente, 5.0×10^7 parásitos de la cepa RHTATi/ $\Delta ku80$ de *T. gondii* [9] fueron diluidos en 700 μ l de citomix y co-transfectados con 50 μ g del vector LIC y pSAG1_Cas9_GFP_sg correspondiente, utilizando un electroporador BTX 600, utilizando un pulso de 2,5 kV y 24 ohms. Los parásitos fueron seleccionados con

cloranfenicol por dos semanas, y clonados por dilución límite. Los parásitos expresando SAS6-3HA fueron generados por mi tutora durante su doctorado [5].

Tabla (VI). 2. Lista de primers utilizados en la estrategia de clonación en pLIC y de screening

Nombre	Secuencia
Clonación en los vectores pLIC	
SAS6_LIC F	5'TACTTCCAATCCAATTTAATGCACTCTGATGAGAACATCTCTCG AAGAAGG'3
SAS6_LIC R	5'TCCTCCACTTCCAATTTTAGCACGCGGCTGTCGCGCCGCCGA GCTC'3
CEP250L 1_LICF	5'TACTTCCAATCCAATTTAATGCAGAGAGACCGAAGGAATACAG AT ATCTGG'3
CEP250L 1_LICR	5'TCCTCCACTTCCAATTTTAGCTCGCCCCGAAAGCGACGACTTT CCC'3
Clonación guías en pSAG1-CAS9-GFP sgUPRT	
SAS6_gui aF	5'GCGAATGGAAGAGTCCTAACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC'3
CEP250L 1_guiaF	5'GCCTTGTCGAAGATCCCAATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC '3
Reverse genérico	5' AACTTGACATCC CCATTT AC'3
Screening de poblaciones TgCEP250L1-APEX2 ,TgSAS6-APEX2	
CEP250L 1_LICF	5'TACTTCCAATCCAATTTAATGCAGAGAGACCGAAGGAATACAG ATATCTGG'3
SAS6_LIC F	5'TCCTCCACTTCCAATTTTAGCACGCGGCTGTCGCGCCGCCGA GC C'3

6.4.2 Ensayos de biotilación de proteínas fusionadas a APEX2

El protocolo utilizado para la biotilización fue gentilmente brindado por el equipo del Dr. Giel Van-Dooren y puesto a punto en nuestro laboratorio. El mismo es una adaptación del protocolo publicado [8]. A partir de un cultivo de células VERO infectadas conteniendo 30 millones de parásitos de las cepas con la proteína fusionada a APEX2, se despegó, se pasó por una jeringa y se filtraron (con filtros de 3 μm , para separar los parásitos de los restos celulares) los cultivos. Se centrifugó a 300 rcf por 10 minutos y se lavó el pellet con PBS. Luego se resuspendió el pellet en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), hemina (1X concentración final) y Biotina fenol (1mM concentración final) incubando a 37 °C durante 1 hora. La mitad de la solución con los parásitos tratados con biotina-fenol fueron tratados con peróxido de hidrógeno (concentración final 1 mM, por 45 segundos). Los parásitos tratados con peróxido de hidrógeno y los no tratados, fueron tratados con la solución "Quencher" (10 mM Azida de sodio, 10 mM de Ascorbato de sodio, 5 mM de Trolox en DMSO) por triplicado con centrifugación de 12000 g por 30 segundos. Y por último se realizó un lavado con PBS y congeló el pellet de parásitos obtenidos a -80°C. La biotilación exitosa de las proteínas proximales de TgSAS6 y TgCEP250L1 se comprobó en primera instancia por western blot. Brevemente, los parásitos obtenidos de acuerdo al protocolo de biotilación fueron tratados con buffer de lisis (Tris 200 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, Tritón X-100 1%, Na₂HPO₄ 2,5 mM, B-Glicerolfosfato 1mM, NaVO₄ 1 mM, Leucepeptina 1 ug/ml). Al extracto obtenido se le midieron las proteínas totales usando la metodología de Bradford, de modo tal que en las diferentes muestras se sembraran la misma cantidad total de proteínas. Los extractos obtenidos fueron tratados con buffer de carga Laemmli y calentados a 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron sembradas en un gel de SDS-Page 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con estreptavidina fusionada a HRP (Thermo-fisher) en la concentración de 1:500 en 2% de albúmina bovina en PBS. El revelado fue realizado utilizando el kit de ECL (Sigma- Aldrich).

Ensayos de precipitación de las proteínas biotiniladas:

El pellet obtenido de acuerdo a lo explicado anteriormente fue resuspendido e incubado con buffer de lisis (con agregado fresco de DNAsa I y de Inhibidor de proteasa) durante media hora en hielo. Luego se sonicó dos veces durante 15 segundos a 30 % de amplitud. Se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a 4°C y se filtró el sobrenadante con filtros de 3 µm (para eliminar parásitos que no se hayan lisado). El sobrenadante se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en agua ultrapura. A partir de la misma cantidad de proteínas totales, se incubó el extracto obtenido con beads magnéticos de estreptavidina (Invitrogen) overnight a 4°C, con rotación constante. Luego de la incubación, los beads fueron lavados con 500 µl de buffer de lisis, 5 veces, por 10 minutos a temperatura de 4°C, y eludidas incubando los beads a 100 °C en buffer de carga Laemmli durante 10 minutos. Se realizaron los mismos tratamientos sobre la cepa parental (control negativo). Las muestras obtenidas fueron enviadas para los ensayos de espectrometría de masa en la Unidad de Proteómica del Institut Pasteur de Lille, Francia.

6.4.3 Espectrometría de masa

Todos los ensayos de proteómica fueron caracterizados utilizando espectrometría de masa MALDI-TOF. Brevemente; se utilizó el Sistema de UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) para la separación de las proteínas digeridas. Los péptidos fueron automáticamente separados en una columna de fase reversa C18 comercial (75µm × 150 mm, 2µm de tamaño de partícula, PepMap 100 RSLC column, Thermo Fisher Scientific, a temperatura de 35°C). La corrida fue realizada durante 4 minutos a 5 µL/min, con dos fases móviles : A (98% H₂O, 2% ACN, 0.1% FA) y B (0.1% FA en ACN) a un flujo de 300 nL/min. La separación por gradiente fue de 3 minutos a 5 % B, 37 minutos desde 5%B a 30% de B, 5 minutos a 80% de B y mantenida 5 minutos más. La columna fue equilibrada por 10 minutos con 5% buffer B antes de la siguiente muestra. Los péptidos eluidos de la columna C18 fueron analizados en el equipo Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). El voltaje fue de 1,9 kV y la temperatura

de capilaridad fue de 27,5°C. Los escaneos completos de MS fueron adquiridos en el analizador de masa Orbitrap por encima del rango de m/z 300-1200 con una resolución de 35,000 (m/z 200). Los valores “target” fueron 5.00E + 05.

6.4.4 Análisis de datos y generación de tablas y gráficos

El análisis de datos se realizó mediante la generación de un script en el paquete R (utilizando la función “ %>% filter” presente en el paquete dplyr), y el criterio de filtrado de los resultados fue un ratio de 2/1 de enriquecimiento frente al control negativo (población mutante tratada con biotina-fenol pero sin peróxido de hidrógeno) y frente a la cepa parental tratada con biotina-fenol y peróxido de hidrógeno. Luego la lista fue filtrada de forma manual, teniendo como criterio esencialidad de los genes determinada en la evaluación a gran escala de esencialidad de genes de acuerdo a la cita [9], y su ortología con proteínas de localización conocida al cuerpo basal de *T. brucei* [9]

El script de R utilizado es el siguiente:

```
APEX_todos <- read.table("TodosAPEX.txt",header = T,sep = "\t")
my_data_APEXTODOS <- (APEX_todos)
my_data_APEXTODOS
Sas6apex_prueba26_3 <- read.table("Sas6_26_3.txt",header=T,sep="\t")
my_data_SAS6APEX_26_3 <- (Sas6apex_prueba26_3)
> my_data_SAS6APEX_26_3
my_data_SAS6APEX_26_3 %>% filter(HCCOH/Control >=2)
positivos_SAS6APEX_26_3 <- my_data %>% filter(HCCOH/Control >=2)
negativosSAS6APEX_26_3 <- my_data %>% filter(Control/HCCOH >=2)
Sas6HA <- read.table("SAS6HA.txt",header=T,sep="\t")
my_data_HA <- (Sas6HA)
> my_data_HA
positivos_HA <- my_data_HA %>% filter(Sas6.HA.1/Control.1
>=2,Sas6.HA.1/Control.2 >=2)
```

Los diagramas de Venn de la Figura 3 fueron obtenidos utilizando la función euler() del paquete eulerr en el software R studio.

6.4 Objetivo 2: Validación del proteoma adquirido en *Trypanosoma brucei*

6.4.1 Introducción

6.4.1.1 Taxonomía de *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei es un protozooario flagelado descrito por primera vez por David Bruce en 1895 a quien debe su nombre [10]. *Trypanosoma brucei* pertenece al reino Protista, al filo Euglenozoa, a la clase Kinetoplastida, al Orden Trypanosomatida, a la Familia Trypanosomatidae y al Género Trypanosoma. Los protozoarios agrupados en la clase Kinetoplastida se caracterizan por presentar un solo flagelo y una masa de ADN mitocondrial característica denominada Kinetoplasto. Se pueden distinguir 3 subespecies de *T. brucei*: *T. brucei brucei* que solo provoca enfermedad en animales y *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense* que pueden infectar humanos. En humanos, *T. brucei* reside primero en la sangre y la piel antes de invadir el sistema nervioso central, donde causa síntomas neurológicos. Aunque la THA se acerca a su eliminación, la infección del ganado sigue siendo un importante problema socioeconómico en especial en países de África. Este parásito es el causante de la debilitante y a menudo mortal enfermedad del sueño (trypanosomiasis africana humana, TAH). El ciclo de vida de *T. brucei* involucra al menos dos hospederos: un hospedero mamífero y el vector [10]. El vector es la mosca tse-tsé, una mosca característica del África meridional. Durante el ciclo de vida de este parásito, dependiendo del hospedero donde se aloje, desarrolla diferentes estadios. Más precisamente en el vector desarrolla 7 estadios y en los hospederos mamíferos otros 3 estadios adicionales [10]. El ciclo de vida de *T. brucei* se “inicia” cuando el vector se alimenta de sangre de animales infectados con este parásito. La forma de vida infectante para el vector es la forma denominada “Stumpy”. Las formas de vida procíclicas en sus diferentes variantes se generan al ingresar al sistema digestivo de la mosca, donde luego migran a las glándulas salivales donde se desarrolla la forma infectante para los hospederos mamíferos [10]. El

ciclo se completa cuando el vector infectado inyecta formas metacíclicas (forma infectante para hospederos mamíferos) de *T. brucei* en hospederos mamíferos [10]. Este ciclo de vida se muestra de forma esquemática en la Figura 4.

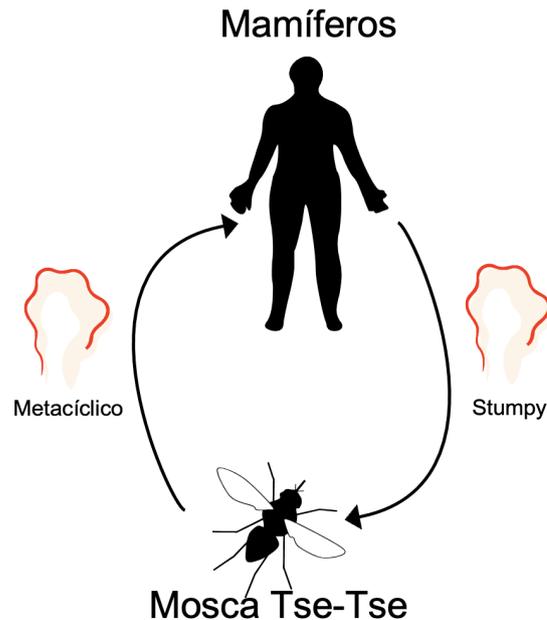


Figura. (VI). 4. **Ciclo de vida *T. brucei***. A lo largo del ciclo de vida de este parásito, siete formas de vida se desarrollan en el vector y otras tres más en los diferentes hospederos mamíferos. El ciclo de vida de *T. brucei* se “inicia” cuando el vector se alimenta de sangre de animales infectados con este parásito. La forma de vida infectante para el vector es la forma denominada “Stumpy”. El parásito al ingresar al sistema digestivo de la mosca desarrolla las formas de vida procíclicas en sus diferentes variantes, hasta luego migrar a las glándulas salivales donde desarrolla la forma infectante para los hospederos mamíferos [10]. El ciclo se completa cuando el vector infectado inyecta formas metacíclicas (forma infectante para hospederos mamíferos) de *T. brucei* en hospederos mamíferos no infectados [10].

6.4.1.2 Cuerpo basal en *T. brucei*

Los centriolos (Ce) constituyen los principales centros organizadores de microtúbulos (MTOC) de muchas células eucariotas. Actúan como cuerpos basales (BB), nucleando microtúbulos para formar cilios o flagelos, organelos sensoriales y móviles importantes para una amplia gama de funciones biológicas. Los defectos en las proteínas centriolares afectan a la división celular y a la función flagelar de los parásitos protozoarios. Muchos homólogos conservados de componentes reguladores y estructurales conocidos de Ce y BB

de vertebrados están ausentes en los parásitos trypanosomátidos, lo que plantea interrogantes sobre sus mecanismos de ensamblaje, mantenimiento y función. *T. brucei* posee un único flagelo y lo conserva durante todo su ciclo celular. El flagelo es ensamblado a partir de la estructura del cuerpo basal, que contiene dos barriles de microtúbulos ortogonales entre sí. Estos barriles de microtúbulos presentan diferencias estructurales que les permiten ser distinguidos entre sí [11]. Se considera que existe un cuerpo basal maduro (mBB) y uno inmaduro (pBB). El mBB es desde donde se origina el flagelo. Desde el punto de vista estructural el mBB presenta dos regiones. Una región proximal con una conformación de 9+0 tripletes de microtúbulos y una zona de transición en la región distal, con una conformación de 9+2 dobletes de microtúbulos. Esta última región es seguida por un axonema con la conformación típica de 9+2 tripletes de microtúbulos [11]. Luego de la replicación del cuerpo basal, el pBB original pasa a ser el mBB del nuevo cuerpo basal originado y desde donde se ensambla el nuevo flagelo. Todo este proceso de replicación ocurre sin desarmar el flagelo original [35].

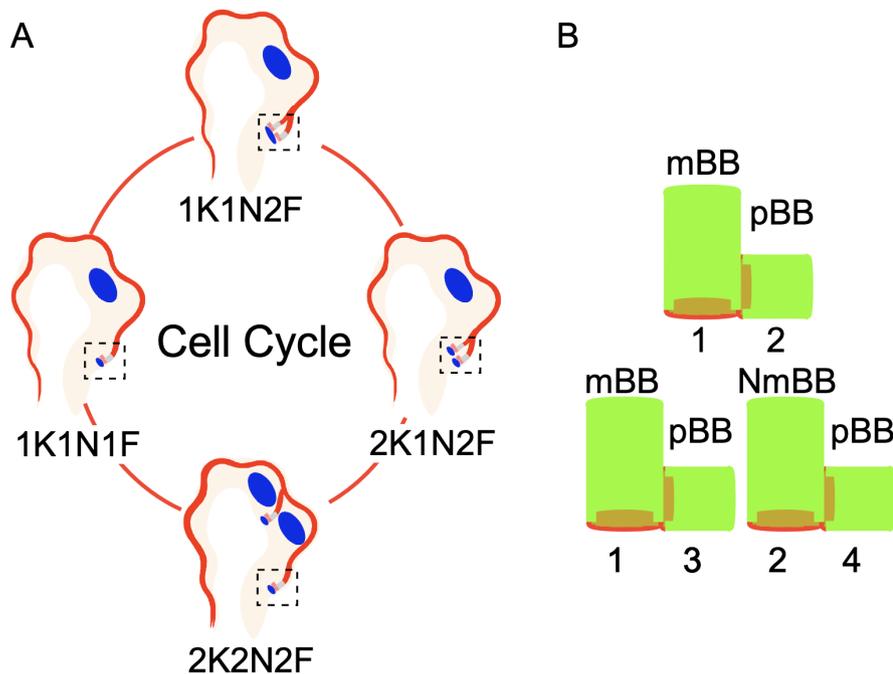


Figura. (VI). 5. **Ciclo de celular de *T. brucei* y replicación del Cuerpo basal.** (A) ciclo celular de *T. brucei*, indicando los diferentes estadios por los que pasa hasta completar la citocinesis. Notar que la replicación de los cuerpos basales ocurre sin desarmar el flagelo. B)

Representación esquemática de la estructura de los cuerpos basales. Los diferentes números indican la “antigüedad de los cuerpos basales”, cuanto más grande en número más joven.

6.5 Resultados

6.5.1 Obtención de las cepas TbCEP120A, TbCEP120B y Tb927.10.3130

Con el objetivo de validar la localización de las proteínas identificadas utilizando estudios bioinformáticos en *T. brucei*, se obtuvieron las siguientes cepas: TbCEP120A, TbCEP120B y Tb 927.10.3130. Todas las poblaciones se obtuvieron clonales y estables. Se comprobó la expresión de una única proteína de fusión en cada cepa, siendo ésta del peso molecular esperado (para TbCEP120B-mNG-3Ty de 115 kDa y para Tb927.10.3130-mNG-3Ty 120 kDa) se comprobaron por western blot. Finalmente, la correcta localización de las proteínas de fusión al cuerpo basal se observó por inmunofluorescencia indirecta. En suma, se logró generar exitosamente las proteínas de fusión propuestas para la realización de este proyecto y se validó la localización predicha de estas proteínas. Con el objetivo de ahondar en la localización específica de cada una de estas proteínas dentro del cuerpo basal, y su dinámica a lo largo del ciclo celular realizamos Microscopía de ultraestructura de expansión (Fig. 7). Se observó que la localización de TbCEP120A (Tb927.7.6250) es en una zona en el extremo distal de los centriolos, y que está presente en ambos centriolos, y en cuerpos basales durante la división celular (Fig. 7 y 8). El patrón de localización de TbCEP120A se asemeja al de un anillo, lo cual podría indicar una posible asociación de esta proteína con los microtúbulos del centriolo o alguna estructura aledaña. En cuanto a la localización de TbCEP120B (Tb927.11.8920), se observó que, al igual que su homólogo, esta proteína se ubica en una zona distal, y que está presente en ambos cuerpos basales durante todo el ciclo celular (Fig. 9).

Tb927.10.103130 por su parte presenta una localización dinámica que varía a medida que el ciclo celular avanza como se observa en las Figuras 10,11 y 12. La localización dinámica de Tb927.10.103130 implica que esta proteína al iniciar el ciclo celular con un parásito monoflagelado, se encuentra en ambos barriles

de microtúbulos del cuerpo basal. Luego en el barril del cuerpo basal más joven, una vez duplicado el flagelo, esta proteína se encuentra en el cuerpo basal maduro del flagelo más antiguo. A continuación, Tb927.10.103130 pasa a encontrarse en ambos cuerpos basales antiguos para finalmente terminar el ciclo celular en ambos cuerpos basales de cada flagelo.

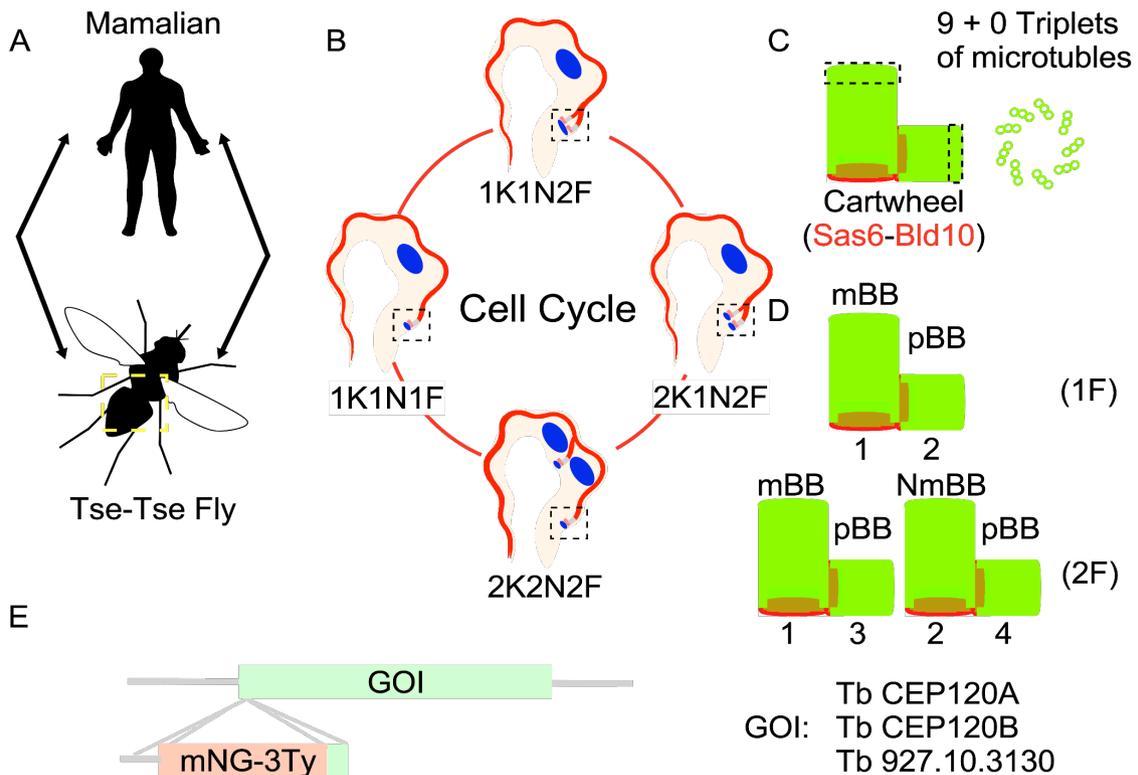


Figura. (VI). 6. **Representación esquemática del ciclo de vida de *T. brucei* y la estrategia utilizada durante este trabajo.** (A) Representación esquemática del ciclo de vida de *T. brucei*. La forma de vida estudiada en este trabajo es la forma denominada procicla, desarrollada en insectos. (B) Representación esquemática de la progresión del ciclo celular, mostrando las diferentes etapas de la replicación nuclear y kDNA. (C) Representación esquemática de la estructura del cuerpo basal de *T. brucei*. Los centriolos están constituidos por un juego de 9 tripletes de microtúbulos, la estructura de “cartwheel” se muestra en gris. (D) Representación esquemática de los cuerpos basales durante la replicación. Vale destacar que el cuerpo basal maduro (mBB) se lo representa como BB1 y el nuevo cuerpo basal maduro (nmBB) como BB2. El nuevo cuerpo basal maduro era el precursor del cuerpo basal del antiguo flagelo. BB3 y BB4 son cuerpos pro-basales. (E) Representación esquemática de la estrategia utilizada para la generación de las cepas transgénicas. Se usó recombinación homóloga para generar proteína de fusión usando el “tag” “Ty” en N terminal.

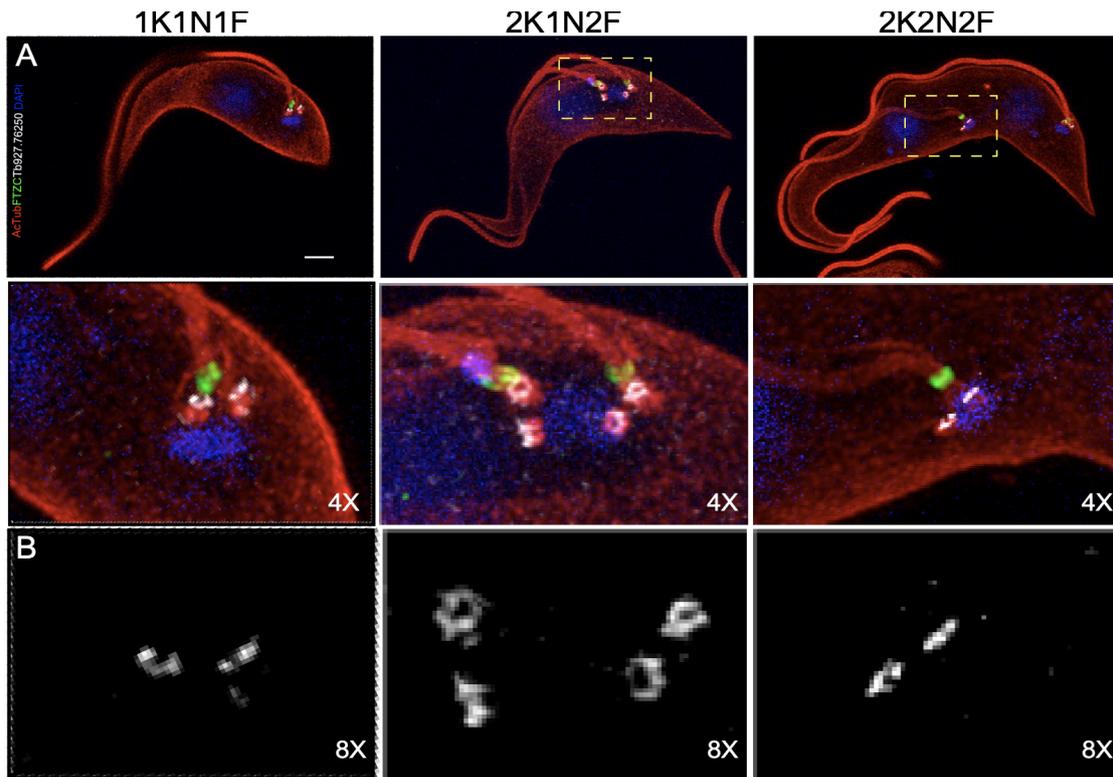


Figura. (VI). 7. **Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120A a través de la división celular.** TbCEP120A está marcada con anticuerpo anti-ty (blanco), los cuerpos basales y las estructuras que contienen tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (rojo), la zona de transición flagelar (FTZC) con un anticuerpo anti-FTZC y el ADN nuclear y kDNA con DAPI (azul). TbCEP120A tiene la misma localización a medida que avanza el ciclo celular. La escala corresponde a 1 μ m.

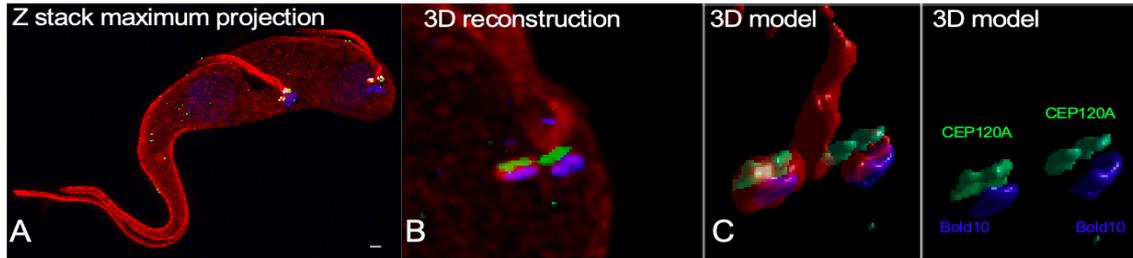


Figura. (VI). 8. **Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120A en modelo tridimensional.** (A) Proyección de máxima intensidad en el eje de las Z de una microscopía de expansión de ultraestructura que abarca todo el parásito. TbCEP120A están marcadas con un anticuerpo anti-ty (blanco), los cuerpos basales y la estructura de tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (rojo), la estructura de “cartwheel” del cuerpo basal con un anticuerpo anti-Bld10 (verde) y el kDNA y el núcleo con DAPI (Azul). (B) Reconstrucción 3D. TbCEP120A está marcada con un anticuerpo anti-ty (verde), los cuerpos basales y las estructuras de tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (rojo), la estructura de “cartwheel” del cuerpo basal con un anticuerpo anti-Bld10 (azul). (C) Modelo 3D utilizando la reconstrucción 3D presente en B). La localización de TbCEP120A es distal a la base del cuerpo basal. La escala corresponde a 1 μ m.

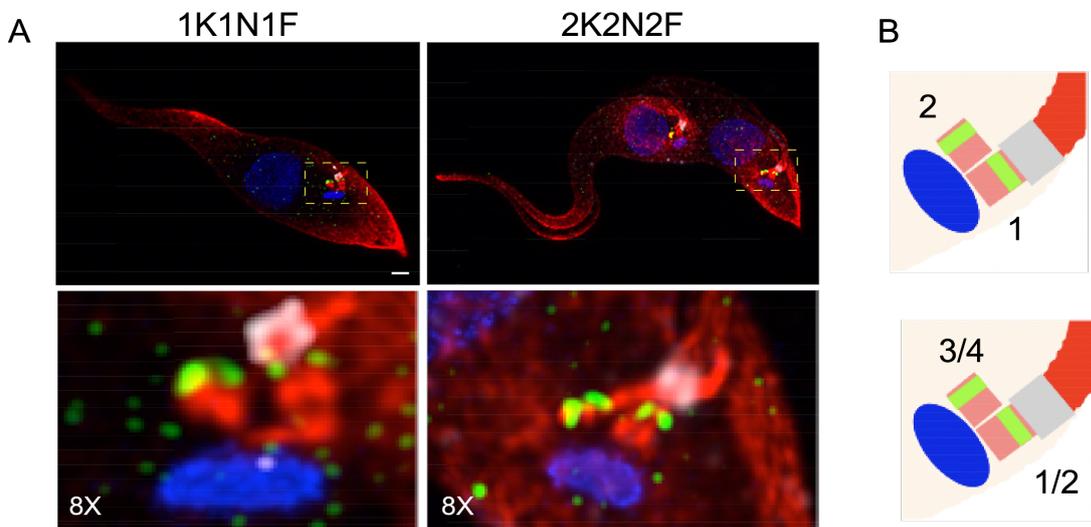


Figura. (VI). 9. **Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120B a través de la división celular.** (A) La microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de TbCEP120B a través de la división celular. TbCEP120B está marcada con un anticuerpo anti-ty (verde), los cuerpos basales y la estructura de tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (rojo), la zona de transición flagelar (FTZC) con un anticuerpo anti-(FTZC) (gris) y el ADN nuclear como el del kinetoplasto con DAPI (azul). Se puede observar que TbCEP120 B se localiza en la parte distal del cuerpo basal (B) Representación esquemática de la localización de TbCEP120B durante la interfase y la mitosis. TbCEP120B tiene la misma localización que el progreso del ciclo celular. La escala corresponde a 1 μ m.

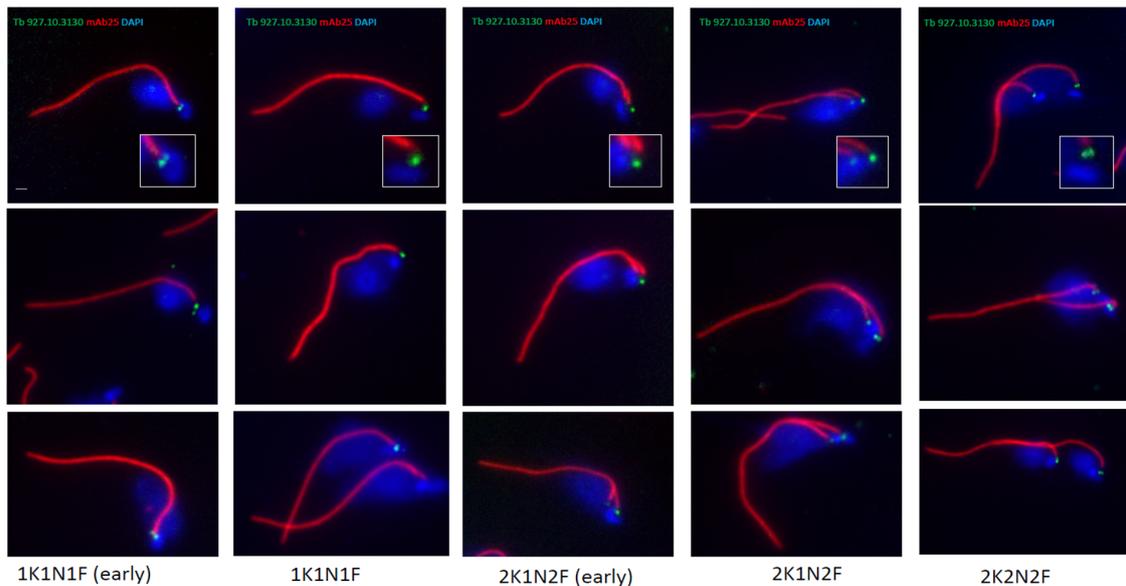


Figura. (VI). 10. **Inmunofluorescencia indirecta de células tratadas con detergente expresando Tb927.10.3130::mNG en diferentes fases del ciclo celular.** La señal de mNG (fusionada a la proteína de interés) con DAPI y el anticuerpo mAb25 como se indica. La escala corresponde a 1 μ m.

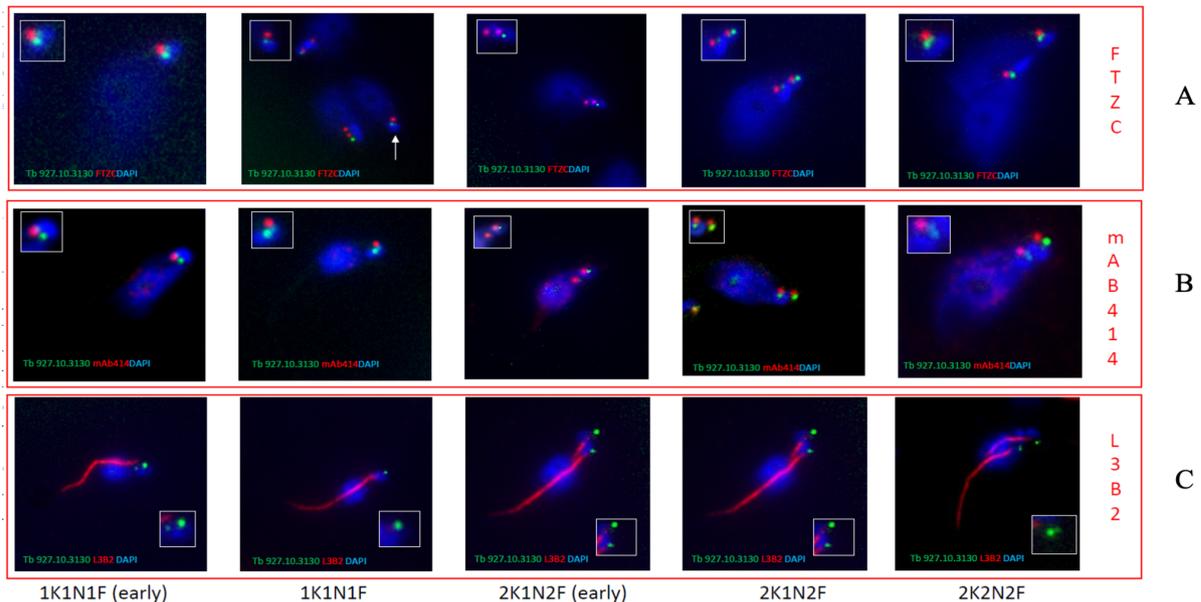


Figura. (VI). 11. **Inmunofluorescencia indirecta de células que expresan Tb927.10.3130::mNG en diferentes fases del ciclo celular.** (A) La señal mNG (fusionada a la proteína de interés) con DAPI y el anticuerpo anti-FTZC como se indica. (B) IFI de células tratadas con detergente: La señal mNG (fusionada a la proteína de interés) con DAPI y el anticuerpo mAb414 como se indica. (C) La señal mNG (fusionada a la proteína de interés) con DAPI y el anticuerpo anti-L3B2 como se indica. Las barras de escala corresponden a 1 μ m respectivamente.

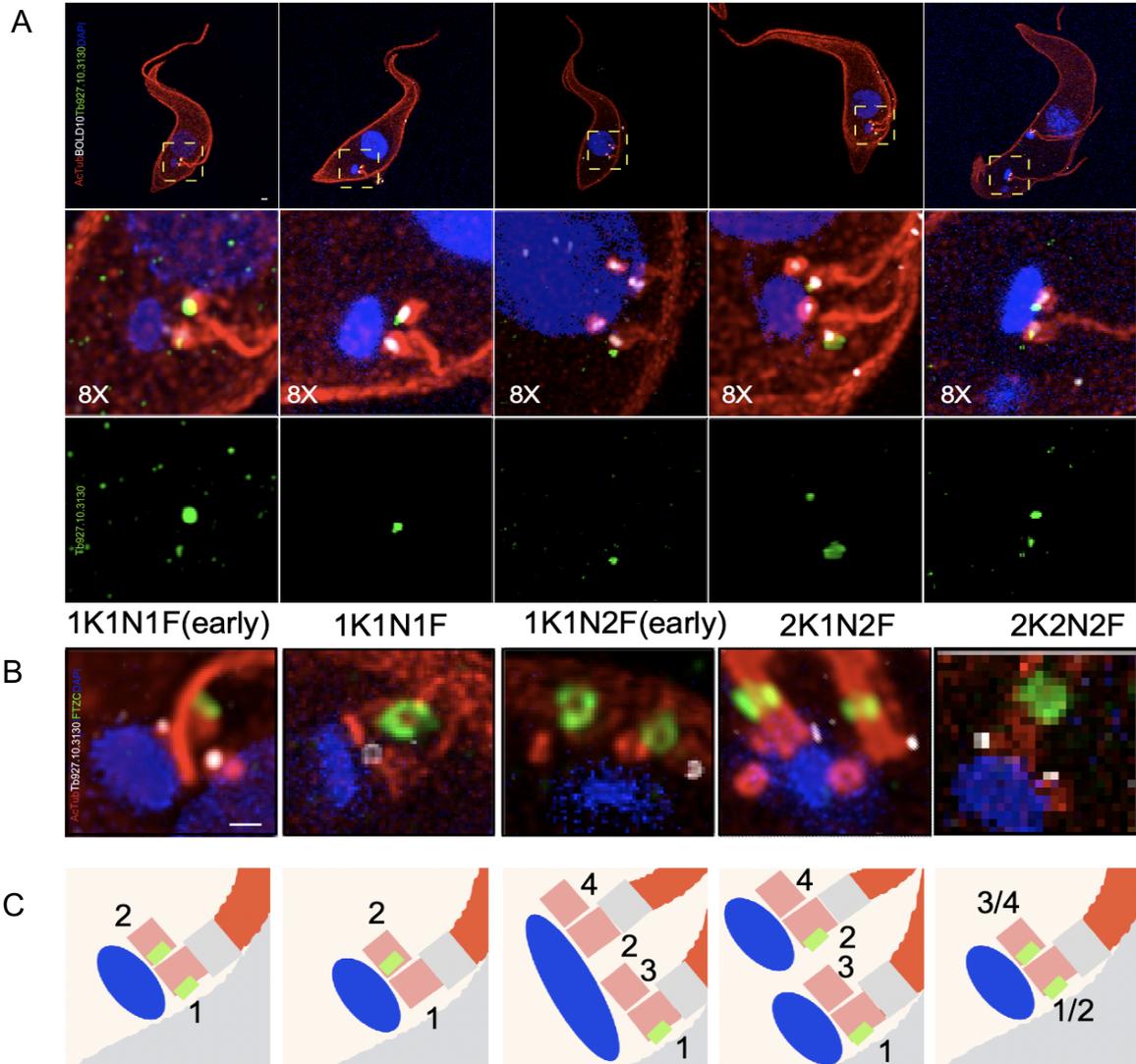


Figura. (VI). 12. **Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de Tb927.10.3130 a través de la división celular.** (A) Microscopía de expansión de ultraestructura revela la localización de Tb927.10.3130 a través de la división celular. Tb927.10.3130 está marcado con un anticuerpo anti-ty (verde), los cuerpos basales y las estructuras que contienen tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada;(rojo), la estructura de “Cartwheel” del cuerpo basal con un anticuerpo anti-Bld10 (gris) y el ADN del Kinetoplasto y nuclear con DAPI (azul). Tb927.10.3130 muestra una localización dinámica a través del ciclo celular. (B) Imágenes de microscopía de expansión de ultraestructura de la región del cuerpo basal de *Trypanosoma brucei*. Tb927.10.3130 está marcada con un anticuerpo anti-ty (blanco), los cuerpos basales y las estructuras que contienen tubulina acetilada con un anticuerpo anti-tubulina acetilada(rojo), la zona de transición flagelar (FTZC) está marcada con un anticuerpo anti-FTZC (verde) y ADN del kinetoplasto y el nuclear con DAPI (azul). La barra de escala es de 500 nm. (C) Representación esquemática de la localización de Tb927.10.3130 a lo largo del ciclo celular. En rojo los flagelos, en rosa los cuerpos basales (marcados con los números según su

edad relativa), en gris la zona de transición flagelar y en azul el ADN. Las barras de escala corresponden a 1 μm respectivamente.

6.6 Conclusiones:

Tanto TbCEP120A, como TbCEP120B y Tb927.10.3130 presentan localización en el cuerpo basal de *T. brucei*. TbCEP120A y TbCEP120B presentan la localización esperada en cada uno de los barriles del cuerpo basal por ser homólogas de CEP120. CEP120 en humanos se encuentra en las paredes centriolares de los cuerpos basales y centrosomas [12], coincidentemente con la localización que describimos en este capítulo para sus homologas en *T. brucei*. Tb927.10.3130 presenta una localización dinámica a lo largo del ciclo celular. Esta localización altamente dinámica puede implicar una posible función de esta proteína como -de alguna forma- un “reloj del ciclo celular”. Si bien se intentó la generación de cepas que pudieran interferir con la expresión de estas proteínas utilizando ARN de interferencia, las mismas no funcionaron correctamente ya que las proteínas no sufrían degradación. Por tanto, resta determinar la función de las tres proteínas, así como determinar la localización y función de sus homólogos respectivos en *T. gondii*.

6.7 Materiales y Métodos

6.7.1 Cultivo celular de *Trypanosoma brucei*:

Todas las líneas celulares eran derivadas de la cepa 427 de *T. brucei* y cultivadas en medio SDM 79SDM79 suplementado con hemina y 10% de suero fetal bovino.

6.7.2 Generación de las cepas Tb927.76250-3mNg-Ty(CEP120A), Tb927.11.8920-3mNg-Ty (CEP120B) y Tb 927.10.3130- 3mNg-Ty

El marcaje endógeno en N-terminal de las proteínas Tb927.11.8920, Tb927.10.3130 y Tb927.927.76250 se llevó a cabo mediante la integración directa en el gen correspondiente, según lo descrito en la cita [13], de un fragmento de ADN obtenido por PCR obtenido utilizando 100 nucleótidos de cebador directo que contiene los últimos 80 nucleótidos de la secuencia codificante 3' del gen de interés seguido de pPOTv6 específico 20 nucleótidos, y 100 nucleótidos de cebador inverso que contiene 80 nucleótidos de la 3' UTR del gen de interés seguido de pPOTv6puro vector 20 nucleótidos. Este fragmento de PCR contiene 2 epítopes Ty fusionados en marco con el gen codificante para mNeonGreen y un casete de selección que genera resistencia a puromicina. La transfección se consiguió mediante nucleofección de células de *T. brucei* con 5 µg de fragmento de PCR purificado utilizando el programa X-014 del aparato Nucleofector AMAXA (Lonza), tal y como se ha descrito previamente [14]. Como resultado, la expresión de la proteína marcada con fluorescencia verde mNeonGreen N-terminal está bajo el control de la región endógena 3' no traducida de la LRRC56. Las líneas celulares transgénicas se obtuvieron tras selección con puromicina obteniéndose poblaciones clonales por dilución límite.

6.7.3 Microscopía de inmunofluorescencia

1×10^7 células /mL de formas procíclica de *T. brucei* fueron concentradas por centrifugación a 2400 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron en medio SDM79 sin suero y se centrifugaron a 2400 rpm, 5 min a

temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 120 μ l de SDM 79SDM79 y 40 μ l del resuspendido se extendieron sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (Thermoscientific, Menzel-Gläser) dejando que las células se adhirieran durante 10 minutos en una cámara húmeda. Las células se trataron con detergente tras añadir 70 μ l de NP40 al 0,4% en solución tampón PEM (2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 0,1 M Pipes, pH 6,9) durante 5 min, en cámara húmeda, se lavaron brevemente en PBS y se fijaron con metanol frío (-20°C). Para la fijación con metanol, las células se lavaron brevemente en PBS después de adherirlas a portaobjetos de poli-L-lisina, se secaron al aire y se fijaron en metanol a -20°C durante 5 min. Antes de la incubación con anticuerpos, las células se rehidrataron durante 15 minutos a temperatura ambiente con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incubaron en cámara húmeda utilizando los siguientes anticuerpos primarios: ratón mAb 25 (que marca el flagelo en toda su extensión)(mAb 25; dilución 1:10) conejo anti-FTZC (que reconoce la zona de transición flagelar) (dilución 1:1000), YL1/2 anti-tubulina tirosinada en fibras de transición (dilución 1:100), mAb 414 ratón anti-complejo nucleoporo (utilizado como proxy de los cuerpos basales)(mAb 414; dilución 1:200) y mAb L3B2 (que reconoce la porción distal del flagelo) ratón (mAb L3B2; dilución 1:10). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios IgG2a o IgG1 anti-ratón conjugado con Cy5 (dilución 1:400; Sigma-Aldrich), e IgG anti-conejo Alexa fluor 647 (dilución 1:400; Sigma-Aldrich). diluidos 1:400 en PBS que contenía BSA al 0,1%. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min, se montaron con reactivo *Slowfade* que contenía DAPI (Invitrogen). Los portaobjetos se almacenaron a -20°C o se observaron inmediatamente con un microscopio DMI4000 (Leica) con un objetivo 100x (NA 1,4) utilizando una cámara scMOS PRIZM95B (Photometrics) con una EL6000 (Leica) como fuente de luz. La adquisición de imágenes se realizó con el software Micromanager y las imágenes se analizaron con ImageJ.

6.7.4 Microscopía de Ultraestructura de Expansión (U-ExM)

La microscopía de expansión de la ultraestructura (UExM) se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito en el capítulo 1 sin modificaciones [14]. Todas

las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM800 con un objetivo Plan-Apochromat 63x/ 1.40 oil. Todas las imágenes se adquirieron y procesaron utilizando el software Zeiss ZEN blue edition v2.0. A todas las imágenes se las deconvolucionó utilizando Huygens Professional v19.10.0p2 64b (Scientific Volume Imaging, Países Bajos). Todos los anticuerpos se diluyeron en 3% de BSA-PBS de acuerdo a lo indicado. Se utilizaron las siguientes diluciones: Anti-Tubulina acetilada (Sigma, catalog no. T7451) (1:500), Anti-Ty (Generado in House en Laboratorio de Philippe Bastin, Institut Pasteur de París)(1:50), Anti-BldBLD10 (1:500), Anti-FTZC (Generado in House en Laboratorio de Philippe Bastin, Institut Pasteur de Paris) (1:500).

6.8 Bibliografía

1. Francia ME, Striepen B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol.* 2 de enero de 2014;12:125.
2. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLoS Biol.* 2012;10(12).
3. de Leon JC, Scheumann N, Beatty W, Beck JR, Tran JQ, Yau C, et al. A sas-6-like protein suggests that the Toxoplasma conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot Cell.* 2013;12(7):1009-19.
4. Tomasina R, Gonzalez FC, Martins-Duarte ÉS, Bastin P, Gissot M, Francia ME. Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in *Toxoplasma gondii*. Soldati-Favre D, editor. *mBio.* el 7 de septiembre de 2022;e01859-22.
5. Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLoS Biol.* 2015;13(3):1-29.
6. Huynh MH, Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell.* 2009;8(4):530-9.
7. Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* 1990;18(20):6069-74.
8. Hung V, Udeshi ND, Lam SS, Loh KH, Cox KJ, Pedram K, et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. 2016;2.
9. Dean S, Sunter JD, Wheeler RJ. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol.* 1 de febrero de 2017;33(2):80-2
10. Keith R. Matthews; The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 15 January 2005; 118 (2): 283–290.
11. Vaughan, S., Gull, K. Basal body structure and cell cycle-dependent biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Cilia* 5, 5 (2015)
12. Tsai JJ, Hsu WB, Liu JH, Chang CW, Tang TK. CEP120 interacts with

C2CD3 and Talpid3 and is required for centriole appendage assembly and ciliogenesis. *Sci Rep.* el 15 de abril de 2019;9(1):6037

13. Dean S, Sunter J, Wheeler RJ, Hodgkinson I, Gluenz E, Gull K. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biol.* 2015;5(1).
14. Kalichava A, Ochsenreiter T. Ultrastructure expansion microscopy in *Trypanosoma brucei*. *Open Biol.* 2021;11(10):210132.

CAPÍTULO 7.0 Discusión general

Los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado aportan al entendimiento de la biología del centrosoma en *T. gondii*. Este organelo juega un papel crucial en la coordinación de la división celular en este parásito. El centrosoma de *T. gondii* presenta una estructura dinámica a lo largo del ciclo celular que, se ha postulado en diversos trabajos, mediante la separación del mismo en diferentes dominios proteicos (al menos en tres), le permitiría realizar la compleja coordinación de su división celular. Esta segregación en dominios es quizás quien le permite realizar en paralelo los diferentes eventos que involucran la división celular de forma coordinada [1-4]. Al momento de iniciar mi tesis doctoral el modelo centrosomal de *T. gondii* se encontraba desde el punto de vista estructural- sub caracterizado, producto principalmente de las limitaciones de resolución de las técnicas de microscopía utilizadas [3]. En el transcurso de esta tesis doctoral, hemos podido visitar la localización de componentes centrosomales conocidos con un poder de resolución sin precedentes. Aportando al campo, la generación de un modelo centrosomal de este parásito con el mayor nivel de detalle hasta la fecha. Pasando de un modelo centrosomal con incógnitas grandes como la localización de los centriolos en relación a sus diferentes componentes, a un modelo que contesta esa pregunta y aporta una localización fina de otros componentes centrosomales entre sí. Por otro lado, hemos podido descifrar el rol de TgCEP250L1 en la homeostasis centrosomal, en la supervivencia del parásito y en la división del mismo. Pudimos concluir que TgCEP250L1 es esencial para la supervivencia de los taquizoítos y que su función está vinculada con la formación o en la estabilidad del huso mitótico. Esta información nos aproxima al entendimiento del inner core y su función; teniendo en cuenta que TgCEP250L1 es la única proteína conocida al momento que presenta una localización única en este dominio centrosomal. Por otro lado, se evaluó el rol de TgSAS6 en la biogénesis y homeostasis centrosomal, como también en la supervivencia de los parásitos. Mostramos que TgSAS6 se encuentra en la base de los centriolos a lo largo de todo el ciclo celular y que los centriolos persisten, en ausencia de TgSAS6. Se pudo concluir que TgSAS6 no

es esencial para la supervivencia de los taquizoítos. Nuestros datos sugieren que podrían existir rutas de biogénesis centriolares divergentes en *T. gondii*, las cuales posiblemente difieren de aquellas caracterizadas en células eucariotas superiores. Vale destacar que como se mencionó anteriormente el genoma de *T. gondii* presenta dos genes con homología al gen humano de SAS6 (HS-SAS6): TgSAS6 presente en centrosoma del parásito [2] y TgSAS6L presente en el anillo polar apical (APR por sus siglas en inglés) [5]. Una hipótesis factible puede ser que TgSAS6L compense funcionalmente la pérdida de TgSAS6 en los mutantes. Sin embargo, como se describió previamente en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, utilizando predicciones *in silico*, sumado a los datos empíricos de localización de TgSAS6L en el extremo distal del parásito, todo indicaría que esto sea poco probable. Además se tiene que tener en cuenta que TgSAS6L carece de los dominios coiled-coil característicos del C-terminal de HS-SAS6, tan importantes en la generación de la estructura del cartwheel [6]. Mientras que TgSAS6 en cambio presenta alta homología en el extremo N-Terminal con el HS-SAS6 y presenta los dominios coiled-coil característicos del C-terminal. Una pregunta válida que queda sin resolver es qué sucede con la localización del pool proteico de TgSAS6L en el contexto de la depleción de TgSAS6. Por último, en esta tesis se pudo obtener un proteoma centrosomal enriquecido en proteínas hipotéticas, quinasas y fosfatasas. Este potencial proteoma resulta de interés, ya que uno de los objetivos planteados al inicio de esta tesis era identificar los catalizadores y reguladores de la biogénesis del centrosoma y sus estructuras asociadas. Entendemos que probablemente, estos catalizadores se presenten en forma de quinasas y/o fosfatasas, ya que la fosforilación y desfosforilación, junto con la degradación ciclo-celular específica, de proteínas blanco son los mecanismos por excelencia utilizados por las células eucariotas en la regulación de la génesis de organelos durante la división celular. Por otro lado, si bien no existen en las proteínas hipotéticas dominios característicos que permitan generar hipótesis sobre sus posibles funciones, es interesante destacar que un importante porcentaje de estas presentan homología con proteínas que se localizan en el cuerpo basal de *Trypanosoma brucei*, el agente etiológico de la enfermedad del sueño. Durante esta tesis pudimos validar la localización de tres de estas proteínas de cuerpo basal en *T.*

brucei. Tanto TbCEP120A, como TbCEP120B y Tb 927.10.3130 presentan localización en el cuerpo basal de *T. brucei*. TbCEP120A y TbCEP120B presentan la localización esperada en cada uno de los barriles del cuerpo basal por ser homólogas de CEP120, mientras que Tb927.10.3130 presenta una localización dinámica a lo largo del ciclo celular. Si bien se intentó la generación de cepas que pudieran interferir con la expresión de estas proteínas utilizando ARN de interferencia, las mismas no funcionaron correctamente ya que las proteínas no sufrían degradación. Por tanto, resta determinar la función de las tres proteínas, así como determinar la localización y función de sus homólogos respectivos en *T. gondii*.

CAPÍTULO 8.0 Conclusiones

1. Se profundizó en la localización relativa de componentes centrosomales conocidos, contribuyendo a la generación de un modelo centrosomal de este parásito utilizando datos de microscopía con el mayor nivel de detalle publicado hasta la fecha.
2. TgCEP250L1 es esencial para la supervivencia de los taquizoítos y su función está vinculada con la formación o en la estabilidad del huso mitótico.
3. TgSAS6 se encuentra en la base de los centriolos a lo largo de todo el ciclo celular y no es esencial para la supervivencia de los taquizoítos. En ausencia de TgSAS6, los centriolos persisten.
4. Se obtuvo un proteoma centrosomal, enriquecido en proteínas hipotéticas, quinasas y fosfatasa del que se seleccionaron veinte proteínas ocho de estas proteínas presentan homología a proteínas de cuerpo basal en *T. brucei*.
5. Se evaluó la localización de tres proteínas hipotéticas en *T. brucei*, comprobando su localización en cuerpo basal.

CAPÍTULO 9.0 Perspectivas

Durante mi tesis de doctorado he podido abarcar una pequeñísima - ínfima- parte de algunos aspectos de este organelo tan fascinante como es el centrosoma en *T. gondii*. A lo largo de mi tesis doctoral múltiples preguntas biológicas, nacidas de la curiosidad a raíz de los diferentes experimentos, resultados y resultados negativos (en especial de estos últimos) fueron surgiendo y con esto, múltiples experimentos por revisar, hacer y validar. En primer lugar, en cuanto al entendimiento del rol de TgSAS6 en la biogénesis centrosomal, las preguntas a contestar son muchas, la primera pregunta a responder sería si existe redundancia funcional con TgSAS6L o no. De no existir redundancia funcional, habría que evaluar con técnicas de microscopía de mayor resolución como microscopía electrónica de transmisión (TEM), o microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM por sus siglas en inglés) la geometría de los centriolos en el contexto del knock down de TgSAS6. Cabe la posibilidad de que los centriolos observados en el contexto del knock down de TgSAS6 no cumplan con la geometría esperada. Esta posibilidad se evaluará en futuros proyectos del laboratorio.

En segundo lugar, restan por validar los datos experimentales obtenidos del “pequeño proteoma centrosomal”. En este sentido se destacan de la lista obtenida TgCEP120 (validada su localización en *T. brucei*) y la quinasa TGGT1_265330 (quinasa 17 de la tabla 1- capítulo 4) una quinasa con patrón de ciclo celular y con localización centrosomal demostrada en una tesis doctoral del año 2019 del grupo del Dr. Sebastien Besteiro en Montpellier, Francia y sugerida también por el Dr. Mathieu Gissot como proteína centrosomal según su patrón de expresión desencadenado por un factor de transcripción que se activa en fase S, momento en el que se duplican los centriolos. Resta validar la función de ambas proteínas en *T. gondii* y su rol -si es que poseen- en torno al

centrosoma de este parásito. En este sentido, proyectos que continúan en el laboratorio tienen como objetivo el mapeo fino de la localización de la proteína codificada por TGGT1_265330 y el estudio de su función. En tercer lugar, resta por avanzar en el estudio de las proteínas homólogas en *T. brucei*. Si bien se intentó comprender el rol de las 3 proteínas estudiadas con la generación de las cepas (TbCEP120A, TbCEP120B y Tb. 927.10.3130) que pudieran interferir con la expresión de estas proteínas utilizando ARN de interferencia, las mismas no funcionaron correctamente ya que las proteínas no sufrían degradación. Se presenta como una alternativa prometedora el reciente desarrollo de la estrategia de degradación condicional en *T. brucei*.

9.1 Bibliografía

1. Courjol F, Gissot M. A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* junio de 2018;20(6):e12832.
2. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLOS Biol.* el 11 de diciembre de 2012;10(12):e1001444.
3. Suvorova ES, Francia M, Striepen B, White MW. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLOS Biol.* el 3 de marzo de 2015;13(3):e1002093.
4. Tomasina R, Gonzalez FC, Martins-Duarte ÉS, Bastin P, Gissot M, Francia ME. Separate To Operate: the Centriole-Free Inner Core of the Centrosome Regulates the Assembly of the Intranuclear Spindle in *Toxoplasma gondii*. Soldati-Favre D, editor. *mBio.* el 7 de septiembre de 2022;e01859-22.
5. de Leon JC, Scheumann N, Beatty W, Beck JR, Tran JQ, Yau C, et al. A SAS-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot Cell.* julio de 2013;12(7):1009–19.
6. Nakazawa Y, Hiraki M, Kamiya R, Hirono M. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr Biol CB.* el 18 de diciembre de 2007;17(24):2169–74.

CAPÍTULO 10.0 Anexos



Review

Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp.

Ramiro Tomasina ^{1,2}, Fabiana C. González ^{1,2} and Maria E. Francia ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay; rtomasina@pasteur.edu.uy (R.T.); fcgonzalez@pasteur.edu.uy (F.C.G.)

² Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay

* Correspondence: mfrancia@pasteur.edu.uy

Abstract: Microtubule organizing centers (MTOCs) perform critical cellular tasks by nucleating, stabilizing, and anchoring microtubule's minus ends. These capacities impact tremendously a wide array of cellular functions ranging from ascribing cell shape to orchestrating cell division and generating motile structures, among others. The phylum Apicomplexa comprises over 6000 single-celled obligate intracellular parasitic species. Many of the apicomplexan are well known pathogens such as *Toxoplasma gondii* and the *Plasmodium* species, causative agents of toxoplasmosis and malaria, respectively. Microtubule organization in these parasites is critical for organizing the cortical cytoskeleton, enabling host cell penetration and the positioning of large organelles, driving cell division and directing the formation of flagella in sexual life stages. Apicomplexans are a prime example of MTOC diversity displaying multiple functional and structural MTOCs combinations within a single species. This diversity can only be fully understood in light of each organism's specific MT nucleation requirements and their evolutionary history. Insight into apicomplexan MTOCs had traditionally been limited to classical ultrastructural work by transmission electron microscopy. However, in the past few years, a large body of molecular insight has emerged. In this work we describe the latest insights into nuclear MTOC biology in two major human and animal disease causing Apicomplexans: *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp.

Keywords: microtubule organizing center; centrosome; centriolar plaque; *Plasmodium*; *Toxoplasma gondii*; ultrastructure expansion microscopy



Citation: Tomasina, R.; González, F.C.; Francia, M.E. Structural and Functional Insights into the Microtubule Organizing Centers of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2503. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122503>

Academic Editors: Anna Olivieri, Gaelle Lentini and Joana Santos

Received: 1 November 2021

Accepted: 23 November 2021

Published: 3 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Invariably, microtubule organizing centers (MTOCs) perform critical cellular tasks by nucleating, stabilizing, and anchoring microtubule's (MT) minus ends. These capacities are required for a wide array of functions, including ascribing cells with their characteristic shape and polarity, influencing resistance to mechanical forces, organizing the mitotic spindle, or acting as basal bodies (BBs) positioning and contributing to the nucleation and motility of cilia and flagella, and in this way, impacting intracellular transport, signaling, and cellular differentiation. The fascinating biology of MTOCs, and their role in cellular life, health, and disease has attracted scientists since the late 1800s [1]. A remarkable landmark in MTOC research history is Theodore Boveri's monograph 'Ueber die Natur der Centrosomen' written in the 1900s. His initial observations of mitotically dividing fertilized eggs of the nematode *Parascaris equorum* (then *Ascaris megalcephala*) established that the formation of mitotic spindles was controlled by a cellular organelle which persisted, replicated, and was inherited. His coining of the term "centrosome" in 1887 [2] sparked the interest for this structure which has provided, since, over 120 years of wonderland for microscopists and cell biologists.

In the best studied higher eukaryote systems—such as humans and other animals—the centrosome performs the majority of the MTOC aforementioned functions. Animal

centrosomes are characterized by the presence of two MT-based barrels known as centrioles. Centrioles are precisely organized. Centriolar MTs organize following a nine-fold radial symmetry determined by a foundational structure known as the cartwheel. The cartwheel is a structure formed onto a pre-existing centriole (a “mother” centriole), guided by the self-assembling properties of the Spindle assembly abnormal protein 6 homolog (SAS6) [3–9]. SAS6 interacts with other proteins, such as SCL-interrupting locus protein (STIL) and CEP135 to complete the cartwheel structure defining the geometric arrangement of the nine MT triplets. These triplets are each made up of a complete MT (A-tubule) and two incomplete tubules (named B and C). Precisely controlled MT polymerization completes the centriole cylindrical structure. The length of the centriolar MTs growing apically from the cartwheel is tightly regulated and cell-type specific [10].

MT nucleation by the human centrosome occurs at all times. During interphase, the centrosome organizes the cell’s cortical cytoskeleton. During cell division, MT organization is focused on the mitotic spindle. A complex matrix of proteins, known as the pericentriolar material (PCM), are orderly layered onto the centrioles. The PCM ascribes centrioles with their capacity for MT nucleation (reviewed in [11]). The PCM’s ability to nucleate MTs is supported on multiple proteins out of which gamma-tubulin, the gamma-tubulin ring complex, and their transient interactors along the cell cycle, play pivotal roles in catalyzing and regulating the MT nucleation process [12].

It should be noted that in spite of the human centrosomes being by far the most intensely studied and the best understood both structurally and functionally (largely owed to their preponderant role in underlying genetic conditions such as infertility, cancer, and ciliopathies), their structure and organization is by no means the most representative found in nature. In fact, MT nucleation does not require centrosomes bearing bona fide centrioles; it can occur centriole-independent even in humans [13].

The phylum Apicomplexa comprises over 6000 single-celled parasitic protozoan species. Many of the apicomplexans are well known pathogens, causing immense morbidity and mortality both in humans and animals. *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., and *Cryptosporidium* spp., are causative agents of toxoplasmosis, malaria, and cryptosporidiosis, respectively. Invariably all species within the phylum are obligate intracellular parasites, exhibiting multiple life stages—all happening within the host cells of definitive and intermediate hosts.

MTs organization in apicomplexan parasites encompasses organizing the cortical cytoskeleton, required to enable host cell penetration and the positioning of large organelles [14,15], as well as cell division and the formation of flagella in certain life stages.

Intracellular life is attained by active invasion. Active invasion implies the formation of a tight junction, which literally describes the intimate contact formed between the host cell plasma membrane and the parasite membrane. The tight junction constricts the parasite as it enters the cell, closing behind the parasite as invasion completes, thus avoiding the lysis of the infected cell. This invasion mechanism requires a robust cytoskeleton capable of penetrating the cell and withstanding mechanical forces experienced by the parasite as it enters. Proper cytoskeleton assembly is also required for motility. Apicomplexans have achieved such cortical MT stability by organizing a corset of subpellicular MTs which twirl around the cell body and extending through two thirds of the cell length. In conjunction with a specialized membranous system, this corset provides the required mechanical resistance as well as flexibility, allowing these parasites to invade our cells.

The subpellicular MTs in *T. gondii* and *Plasmodium* species are organized by ring-shaped MTOCs located at the cell apex, known as the apical polar ring (APR) [16–24]. In addition to the complexity of cortical MT organization during asexual development, the apicomplexan parasites also undergo sexual differentiation into macro and microgametes. While asexual stages are aflagellated, microgametes formed during sexual differentiation display flagella; mature *Plasmodium* sperm have a single flagellum organized by a centriole-like structure composed of nine single A-type tubules (complete

MTs) and no central tube, embedded in an electron-dense mass. *T. gondii* microgametes, on the other hand, display two flagella, and the structure of their originating BB remains debatable [25,26].

Whether BBs derive from a repurposed MTOC previously present in the asexual stages or distinct MTOCs are assembled de novo, is also unclear. However, recent data has shed light onto the process in *Plasmodium*. *Plasmodium* simultaneously forms eight flagellated sperm cells [25,27,28]. Isotropic parasite expansion combined with whole proteome labeling (Pan-UExM) allowed visualization of the BB formation kinetics with unprecedented temporal resolution. BBs were shown to simultaneously form from a deuterostome-like structure (an MTOC originating proteinaceous matrix devoid of centrioles). In addition, a proteinaceous matrix was found linking the newly formed BBs with the nuclear MTOC, thereby physically linking both MTOCs in these cells [29]. Partly owed to the life stage's experimental inaccessibility in the cat's gut, the route of BB biogenesis in the *T. gondii* male gametes is poorly understood. However, new technical breakthroughs allowing microgamete formation in vitro will likely expedite our understanding of the process in the coming years [26,30,31].

Apicomplexa divide by divergent mechanisms (recently reviewed in [32]) (Figure 1A,B). A diversity of sexual and asexual cell division modes are used by these parasites to proliferate. With a few notable exceptions within the phylum (e.g., *Babesia*—dividing by binary fission; *Theileria* spp.—dividing by hitchhiking on the host cell's division apparatus) apicomplexan parasites can follow three division modes: endopolygony, endodyogony, and schizogony. These modes vary in the extent to which chromosome replication is followed by nuclear mitosis and cytokinesis. In endopolygony, chromosomes are replicated several times before the nucleus undergoes mitosis. Mitosis is then followed by parceling of multiple nuclei simultaneously into tens of daughter cells. In endodyogony, each nuclear division cycle (encompassing DNA replication and nuclear mitosis) is followed by daughter cell formation and cytokinesis (Figure 1A). Finally, in schizogony, nuclei undergo asynchronous DNA synthesis and mitosis, followed by a final round of synchronized mitoses coordinated with the simultaneous formation of several dozen daughter cells (Figure 1B). Remarkably, *T. gondii* divides by all three mechanisms as it transitions through its different life forms in different hosts (reviewed in [26,32–34]).

Each of these three modes of division encompass specific MT nucleation requirements. However, all modes pose similar challenging settings for MT nucleation from a standpoint of topological constraints. In all cases, chromosome segregation occurs by semi-closed mitosis, in the presence of a visibly unchanged nuclear envelope and undetectable chromatin condensation [35–37]. In addition, nuclear division occurs at one point or another in synchrony with daughter cell cortical microtubule cytoskeleton formation. The latter occurs de novo—at the mother cell surface in schizogony or at the mother cell cytosol in endopolygony and endodyogony [32]. The MTOCs for each forming daughter cell (i.e., an APR) must be precisely positioned and in concordance with the number of full chromosomal complements present at the mother cell at the time of daughter cell formation. Apicomplexans have solved this conundrum by separately controlling nuclear events and daughter cell formation evolving two functionally related and physically connected, albeit distinct, microtubule organizing centers [38].

Apicomplexans are a prime example of MTOC diversity and multiplicity of functional combinations within a single species. In this work we describe the latest insights into nuclear MTOC biology in two major human and animal disease causing Apicomplexans: *T. gondii* and *Plasmodium* spp.

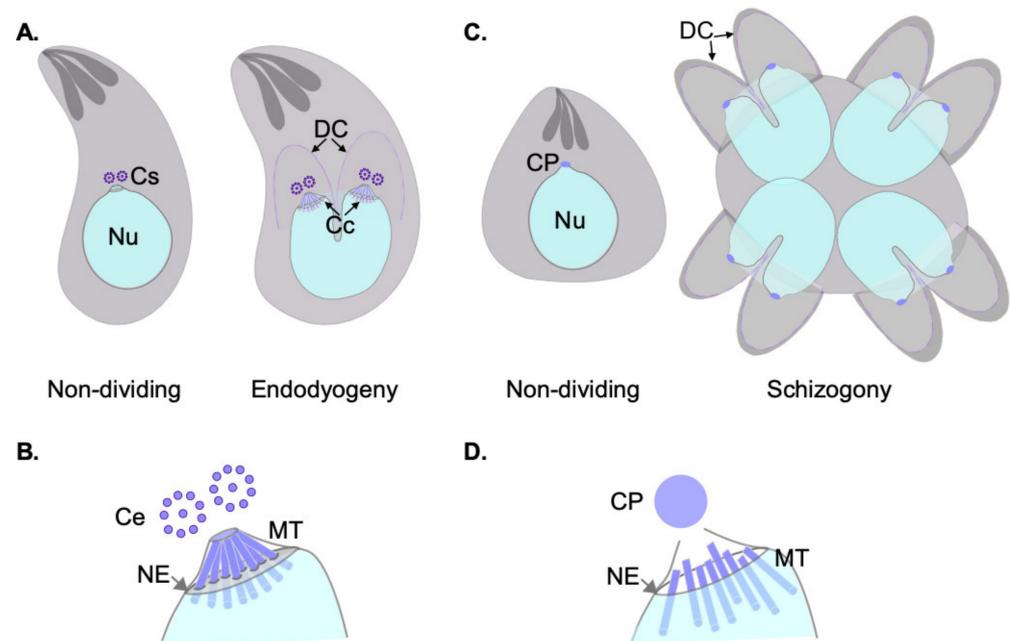


Figure 1. Cell division modes and nuclear MTOCs of asexually dividing *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* parasites. (A) Schematic representation of a *T. gondii*'s tachyzoites non-dividing and going through its cell division mechanism of endodyogeny, as indicated. Note that the intra-nuclear spindle is only assembled during division, while an elaboration of the nuclear envelope (marking the site of centrocone protrusion during cell division) is observable in non-dividing parasites. Ce; centrioles, are shown in purple. Nu; nucleus, Cs; centrosome, DC; daughter cells, Cc; centrocone. (B) Schematic representation of the centriole morphology, and the intra-nuclear spindle formed during *T. gondii* division. Note that microtubules (MT) are nucleated within the centrocone, a structure contained within the nuclear envelope (NE). MTs go through pores of the NE. (C) Schematic representation of asexual stage of *Plasmodium* spp. both non-dividing and dividing by schizogony, as indicated. Note the centriolar plaque (CP), the nuclear MTOC lies in the proximity of the nucleus in all stages. (D) Schematic representation of the centriolar plaque (CP). Microtubules (MTs) are nucleated during division in *Plasmodium* spp. at a region within the nuclear envelope (NE) devoid of chromatin, and physically distinct from the CP which lies outside the nucleus.

2. Nuclear Division Organization by MTOCS of *T. gondii* and *Plasmodium*: Structural and Functional Insight

Centrosomal architecture in Apicomplexan parasites is highly diverse and has been repeatedly referred to as being highly divergent. The latter holds true in reference to the centrosomal architecture of animals. Notable differences exist even amongst the centrosomes of *T. gondii* and the *Plasmodium* spp.; the most outstanding one being that *T. gondii* bears MT-barrel based centrioles while *Plasmodium* species do not.

Schizogonic cell division in blood-stage *Plasmodium* encompasses asynchronous mitoses of multiple co-existing nuclei in a shared mother cell cytosol. Each individual nucleus controls its own MT nucleation requirements by bearing its own MTOC. The nuclear MTOC in *Plasmodium* was originally named the “centriolar plaque” (CP) and is also referred to in the literature as the “kinetic center”. The CP was originally identified as an electron dense focus, proposed to be embedded in the nuclear envelope, and in close connection to a nuclear pore [27,35,39]. The CP was later shown to be home to many bona fide centrosomal proteins including centrin and gamma-tubulin, and to house MT nucleation capacity [40,41].

During asexual development, blood-stage *Plasmodium* nuclei undergo dynamic changes of their nuclear MTs. Non-dividing nuclei bear a single CP, and intranuclear MTs. The latter form a “hemi-spindle” composed of a handful (~5) of bundled individual MTs. The hemi-spindle extends from the single CP to the opposite side of the nucleus. Upon the

onset of S-phase, or DNA replication, the hemi-spindle retracts. This is followed by CP duplication and the formation of a mitotic spindle. At this point, the spindle presumably connects to the chromosome's kinetochores, but also keeps the CPs interconnected by extended MTs spanning the nucleus. An illustrative transmitted electron micrograph of the spindle at this stage is shown in [35]. More recently, this spindle has been visualized by fluorescence microscopy, and the term “interpolar” spindle coined [42].

Early transmission electron microscopy work in *P. berghei* looking into sporogony—the mode of division used by the sporozoites life stage, present at the mosquitoes' salivary glands—defined the interpolar spindle as consisting of three distinct MT populations: the MTs spanning the duplicated CPs, the ones contacting the kinetochores, and MTs extending from one CP to a point beyond the equatorial plane of the spindle of unknown function [43]. As sister chromatids separate, and karyokinesis advances, the interpolar spindle retracts, and nuclear fission occurs.

The advent of immunofluorescence, in the early 90s, allowed further resolving the dynamic changes undergone by MTs in *P. falciparum*. Using anti-tubulin antibodies, it was shown that while the majority of spindles exist in 180° configurations, the interpolar spindle can exist in a variety of other configurations which are nonetheless productive [22]. Spindle elongation was observable as chromatids separated from each other. It was also shown that the spindle evolves into a hemi-spindle upon sister chromatid separation, followed by an accumulation of nuclear diffuse tubulin staining. This suggests that the spindle-derived hemi-spindle disassembles following mitosis, and that no mitotic-derived spindle persists beyond mitosis [22].

More recently, ultrastructure expansion microscopy (UEX) in *P. falciparum* has allowed a (literal) closer look into MT dynamics using fluorescent markers. In addition to providing an approximate four-fold increase in resolution, the co-staining of MTs and a membrane stain (BODIPY), allowed for the first time the concomitant visualization of MT and nuclear envelope dynamics [42]. Concurrent observation of both MT and the NE is critical to understanding each structure's role in DNA segregation during closed mitosis.

The spindle pole body (SPB) of yeast is a multilayered structure either embedded in the nuclear envelope (in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*) or inserted into the nuclear envelope prior to mitosis (fission yeast, e.g., *Schizosaccharomyces pombe*). In either case, the SPB is not only responsible for nuclear MT nucleation during mitosis, but also organizes the cortical cytoskeleton. Like the CP in *Plasmodium*, SPBs are devoid of centrioles. Given its localization, apposed to the nuclear envelope, and the lack of *bona fide* centrioles, the CP has often been modeled after the yeast SPB. However, recent insights from UEX, stimulated emission depletion (STED) microscopy, and correlative light electron microscopy (CLEM) has further revealed that nucleation of microtubules resides within a chromatin free sub-compartment within the nucleus, distal to the location of Centrin, a CP component, and proximal to a nuclear pore marker (Nup313) [44]. This study has clearly established that whereas the CP is at the poles of the mitotic spindle, the CP is extranuclear, and MT nucleation capacity resides at a protein-dense region internal to the nucleus, but devoid of chromatin (Figure 1D).

Importantly, centromeres—the chromosomes' regions onto which the kinetochore assembles—have been precisely mapped in *P. falciparum*. The histone variants PfCENH3, the prime molecular marker of centromeres, and PfH2A.Z, occupy a 4–4.5 kb region of similar size and sequence composition in all *P. falciparum* chromosomes. Immunofluorescence assay of PfCENH3 revealed that centromeres undergo dynamic changes in localization during division. In stages ranging from early trophozoites to mature schizonts, centromeres cluster to a single nuclear location proximal to the CP prior to and during mitosis and cytokinesis. However, centromeres dissociate soon after invasion in ring stages, whereby multiple PfCENH3 foci per nucleus are observed [45]. Strikingly, however, the centromere

clustering localization during mitosis does not coincide with the central region of the spindle. This region of the spindle has been regarded as a metaphase plate. Instead, centromeres seem to cluster at the base of the chromatin-free region from which MTs are nucleated during mitosis (see in [44]). This implies that either there is a short spindle at the site of centromere clustering—undetectable by various microscopy techniques—or that centromeres could be segregated by connecting to the nuclear envelope. Finally, it is possible that regions other than the centromeric chromatin bear physical connections to the nuclear envelope or the various spindles assembled throughout the life of the nucleus. Combining UExM, with centromere and MT markers, as well as BODIPY to visualize the nuclear envelope, should clarify this matter.

Much of our understanding of MTOC biology has come from analyzing their structural and functional variability in light of what has been described in humans or in other better studied model species such as yeast. Many studies have focused efforts in describing presence/absence of human centrosomal components in other eukaryotes. However, as mentioned above, these MTOCs represent only a minute fraction of the diversity present in nature.

Contrary to the plethora of information available for the yeast SPB (whose all 18 protein components have been mapped and localized [46]), or the human centrosome (whose proteome has been identified even with spatial resolution [47,48]) information of the molecular make-up of the CP is scarce. To our knowledge, no systematic identification of CP components has been pursued. In fact, only a handful of molecular components have been definitely localized to the CP structure, and even fewer have been functionally validated (Table 1).

Table 1. *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* homologs of mammalian centrosomal proteins.

Gene ID	<i>T. gondii</i> Gene ID (TGME49_)	<i>P. falciparum</i> Gene ID (Pf3D7)	Role in <i>T. gondii</i> Survival	Role in <i>Plasmodium</i> Survival
SAS-4/C-PAP	258710	1458500	Essential by HTF	Not essential by HTS
CEP120	285210	-	Not essential by HTS	-
CEP76	226610	-	Not essential by HTS	-
POC1	216880	0826700	Essential by HTS	Essential by HTS
SAS6	306430	0607600	Not essential by HTS	Not essential by HTS
SAS6L	301420	1316400	Essential by SGKO [49]	Not essential by HTS
CEP135	-	0626500	-	Not essential by HTS
Centrin 1	247230	0107000	Essential by HTS	Not data available
Centrin 2	250340	1446600	Likely Essential by SGKO [50]	Not essential by HTS
Centrin 3	260670	1027700	Essential by HTS	Not essential by HTS
Centrin 4	237490	1105500	Not essential by HTS	Not essential by SGKO [51]
Sfi1	274000	-	Essential by SGKO [52]	-
CEP164	314358	-	Essential by HTS	-
CEP170	201790	1307800	Essential by HTS	Not essential by HTS
CEP110	211430	1032800	Not essential by HTS	Essential by HTS
kif24	287160	1245100	Not essential by HTS	Not essential by HTS

Table 1. Cont.

Gene ID	<i>T. gondii</i> Gene ID (TGME49_)	<i>P. falciparum</i> Gene ID (Pf3D7)	Role in <i>T. gondii</i> Survival	Role in <i>Plasmodium</i> Survival
EB1	227650	0307300	Not essential by SGKO [53]	Not essential by HTS
CEP250	212880	-	Essential by SGKO [54]	-
CEP250L1	290620	-	Essential by HTS	-
PP1	310700	1414400	Essential by HTS	Essential by SGKO [55]
Nek2/NimA	292140	1228300	Essential by SGKO [56]	Not essential by HTS
LLRC45	209830	-	Not essential by HTS	-
CEP72	233940	1347800	Not essential by HTS	Essential by HTS
CEP131	205590	-	Not essential by HTS	-

Adapted from [57]. HTS: high throughput CRISPR-Cas9 mutagenesis-based screening; SGKO: single gene knockout.

Plasmodium's genome seems to lack homologs of many of the well-known centrosomal proteins. Proteins like Spindle and centriole-associated protein 1 (SPICE), CEP192, CEP63, CEP152, Spindle assembly abnormal protein 5 (SAS-5), CP110, Centrobin, POC5, C2CD3, Ofd1, Polo-like kinase -1 (PIK-1), and PIK-4 are not present in the genome of this parasite. Cep135 (also known as Bld10) interacts with SAS6 to assemble the centriolar cartwheel in animals and *Drosophila*. Interestingly, despite not displaying centrioles, *Plasmodium* encodes for a homolog of Cep135 (in *P. falciparum*; encoded by PfML01_060030300) and SAS6 [58,59]. It is plausible, however, that instead of forming the CP, these proteins could participate in basal body formation during gametogenesis.

Centrin and γ -tubulin are the prime markers identifying the CP structure [60]. While the latter plays a role in MT nucleation, the former belongs to a family of EF-hand containing Calcium binding proteins, shown to play pivotal roles in centrosome duplication and segregation in other systems [61]. The *Plasmodium* genome encodes for at least four Centrin-related proteins, whereby Centrin1 and Centrin3 are paralogues of mammalian centrans, and Centrin2 and Centrin4 are alveolate-specific [62]. Both Centrin2 and Centrin3 have been shown to localize at the CP by immuno-EM and confocal microscopy [62] in *P. falciparum*. In the rodent malaria species *P. berghei*, Centrin4 was shown by super resolution structured illumination microscopy (SIM) to dynamically change its localization, from cytoplasmic outside of mitosis, to the CP during nuclear division [51]. In addition, PbCen4 was shown to associate with all other Centrans (PbCen1, 2 and 3); however, its role remains unclear, as its genetic abrogation had no effect on parasite cell division [51].

Akin to *Plasmodium* species, *T. gondii* asexual stages bear two distinct MTOCs; the APR and the centrosome [63]. The APR nucleates the subpellicular microtubules responsible for the parasite shape and motility. The centrosome nucleates the spindle microtubules crucial for mitosis [17,19–24]. The *T. gondii* centrosome is formed by two centrioles. Centrioles in this species are parallel to each other and are much shorter than their animal counterparts; centrioles in *T. gondii* are at the limit of optical resolution measuring approximately 250 nm length and width [20,33,64] (Figure 2B). The *T. gondii* centrioles display the characteristic centriolar nine-fold radial symmetry but are composed of single microtubules and a central tube. Single microtubule centrioles are rather rare in nature, but *T. gondii* is not exclusive in this respect. Centrioles of one-cell embryos of *Caenorhabditis elegans* display a comparable morphology [9,65]. However, single microtubule centrioles are associated with a lack of delta- and epsilon-tubulin coding genes in this species [66]. Conspicuously, both tubulin family members are easily identifiable in the *T. gondii* genome [67] but are presumably

not expressed in asexual stages as they are undetectable in transcriptomic and proteomic analyses [67].

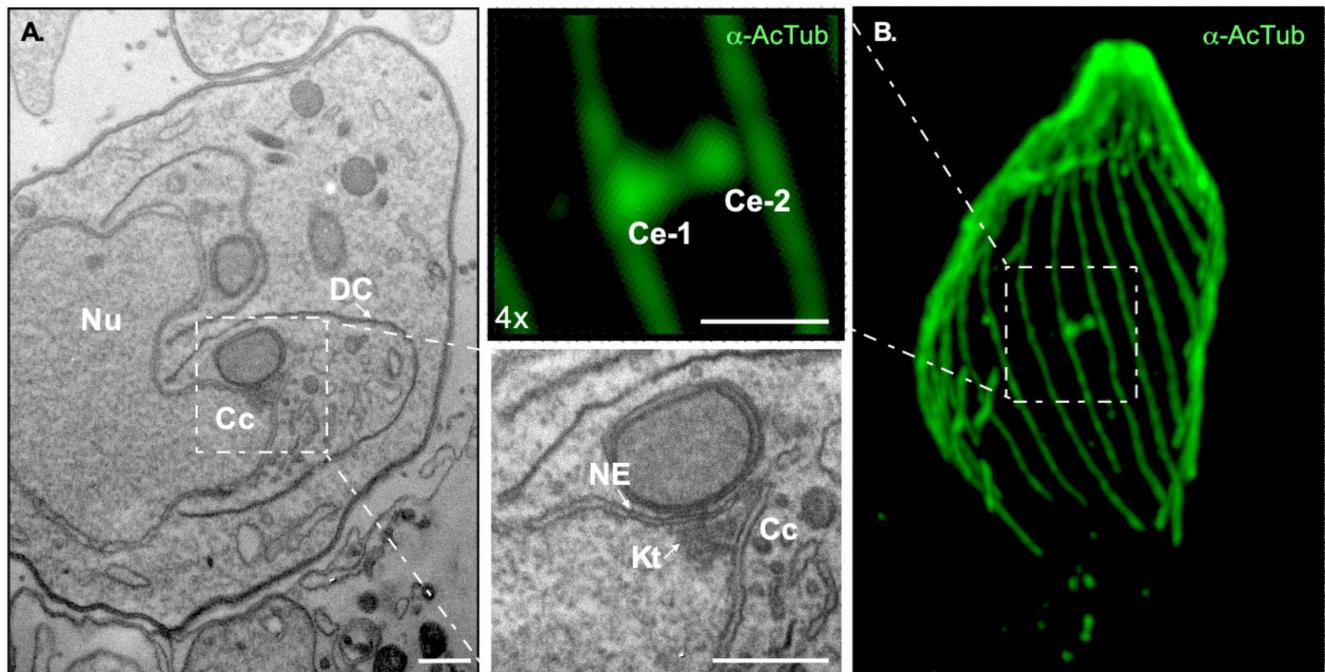


Figure 2. High resolution images of MTOC associated structures in *Toxoplasma gondii*. (A) Transmission electron micrograph of dividing *T. gondii*'s tachyzoites by endodyogeny. The centrocone (Cc), the dividing nucleus (Nu) in the process of segregation into two daughter cells (DC) are observable. The inset shows a detailed overview of the nuclear envelope (NE) forming the centrocone (Cc) and the kinetochores (Kt). (B) Confocal microscopy image of ultrastructure-expanded non-dividing *T. gondii*'s tachyzoite labeled with anti-acetylated Tubulin, as indicated. Note that using this technique the pair of centrioles (Ce1 and Ce2) forming the centrosome in this parasite are observable and can be resolved. Scale = 500 nm in all cases.

Pioneer transmission electron microscopy experiments dating to the early 60s identified an electron dense structure in asexually dividing tachyzoites which was first called the E-body; “E” referred to the endodyogeny mode of division used by the parasite [68]. Due to its high electron density, the E-body was initially thought to contain DNA. As the E-body changed morphology during division, the authors proposed this to be the factor which could “instigate” endodyogeny [68]. Dubremetz, Kalley, and Hammond re coined the structure under the term “centrocone,” as it is referred to nowadays [64]. The E-body or centrocone is a conical elaboration outlined by an outwards folding of the nuclear envelope (Figures 1C and 2A). It is always positioned adjacent to the centrosome. Microtubules of the mitotic spindle are housed within the centrocone during mitosis penetrating the nuclear envelope through pores, contacting the kinetochores. This structure was later shown to be conserved in other related apicomplexans, such as *Eimeria* [64,69].

A protein carrying multiple membrane occupation and recognition nexus (MORN) motifs was shown to localize to ring structures at the apical and posterior end of the parasites, and to the centrocone [70]. This marker has allowed dynamic visualization of the structure, defining that the structure persists, but varies, throughout the cell cycle. At the start of mitosis, when centrosomes have not detectably separated yet, the centrocone noticeably protrudes from the nuclear envelope. It then duplicates and segregates along with the centrosome to two distinct, albeit adjacent, sites of the nucleus.

Akin to what was previously described for *Plasmodium*, the centrosome is apposed to a nuclear pore (Figure 1C). Centromeres of *T. gondii* cluster at the nuclear periphery permanently, at a location intimately related to that of the centrosome. MTs of the mitotic spindle are not present outside of mitosis. Centromere sequestration to the nuclear enve-

lope in *T. gondii* is mediated by peripherally associated components of the nuclear pore complex [71].

In consonance for what has been described for *Plasmodium*, the *T. gondii* genome lacks homologs to many well-known centrosomal proteins. Protein coding genes for Spindle and centriole-associated protein 1 (SPICE), CEP135, CEP192, CEP63, CEP152, Spindle assembly abnormal protein 5 (SAS-5), CP110, Centrobin, POC5, C2CD3, Ofd1, Polo-like kinase -1 (PIK-1), and PIK-4 are absent from the genome (Table 1) [52,57,67,72]. Nonetheless, reciprocal BLAST searches in the genome, using the human centrosomal components as reference, have identified a number of relatively well conserved homologs. For example, homologs of SAS6, Centrin 1 thru 4, Centrin binding protein (Sfi1), and CEP250 have been not only identified in silico, but also validated as expressed proteins with centrosomal localization in *T. gondii* (Table 1).

As outlined above, SAS6 is a widely conserved centrosomal protein involved in ascribing centrioles with their characteristic morphology by means of assembling the centriolar cartwheel [3–9]. *T. gondii* bears two homologs of SAS6; TgSAS6 and TgSAS6-Like [49]. Interestingly though they are both located at MTOCs in *T. gondii*'s asexual stages, TgSAS6 is a centrosomal protein while TgSAS6L locates close to the APR [49]. Conspicuously, observation of a canonical cartwheel at the proximal end of centrioles has not been reported in *T. gondii*. The functional role of TgSAS6 at the centrosome remains unexplored. TgSAS6L is not essential for parasite survival. However, its characterization led the authors to propose that the apical MTOC likely evolved from a flagellar nucleating BB [49]. This model is further supported by additional lines of evidence; for example, *T. gondii* has repurposed the algal derived striated fiber assembling (SFAs) to connect the centrosome to the apical MTOC. SFA proteins normally function anchoring BBs [73], but in *T. gondii* they serve to position the daughter cell's APR during division [38].

Three centrin homologs have been identified and characterized in *T. gondii*; all of which localize to the centrosome [74]. In addition, Centrin2 localizes to the APR and to the parasite's basal end. Centrin3 localizes also to the conoid [74]. BLAST searches for additional Centrin homologs identify an additional homolog, bearing the most similarity to PfCen4 in *T. gondii* (TgME49_237490) [57]. Though no expression of the putative TgCen4 is detectable in the asexual life forms of *T. gondii*, high levels of the transcript are detectable in sexual stages [75]. This expression pattern could reflect the involvement of the putative TgCen4 in BB biology. BBs may be either "recycled" or de novo assembled in male gametes of *T. gondii* [26]. It is plausible that either of these processes requires use of a different/specialized protein set than those found in asexual centrosomes. However, this hypothesis awaits experimental validation.

Centrin-binding proteins—Sfi—are yeast SPB proteins important for its replication [76]. In *T. gondii*, Suvorova and collaborators identified a centrin-binding protein homolog denominated TgSfi1 [52]. TgSfi1 localizes at the centrosome next to TgCentrin1 [52]. Interestingly this protein does not have a homolog in *Plasmodium*. However, a protein bearing a centrin binding motif has been identified. It has been proposed that the latter might play an akin function to that of TgSfi1, despite its lack of sequence conservation [52].

Centrosomal associated protein 250, also known as Cep250 or c-Nap1 (for centrosomal Nek associated protein), plays a role in maintaining centriole junction within the centrosome until the onset of mitosis in animals. A complex interplay of phosphorylation and dephosphorylation of Cep250 either prevents or triggers centriole disjunction in a cell-cycle dependent fashion [77]. Characteristically, human Cep250 bears four coiled-coiled domains. In *T. gondii*, Suvorova and collaborators identified TgCep250 (TGME49_212880) as a protein bearing seven predicted coiled-coiled regions—two of which display high similarity to that of HsCep250. Additionally, TgCep250-Like-1 was identified (TgCep250L1; TGME49_290620). This protein bears a single coiled-coiled domain but bears little homology to either HsCep250 or TgCep250 beyond this domain [52].

Fine localization by super-resolution microscopy of multiple protein components of the centrosome led to the proposition of a bi-modal *T. gondii* centrosome organization [52].

An outer core and an inner core were defined based on two distinct protein localizations with respect to the nucleus. The outer core faces the cytosol, while the inner core faces the nucleus. The outer core bears TgSas6, TgCentrin1, and TgSfi1. Hence, this core is thought to contain the atypical pair of centrioles described in *T. gondii*. However, this has not been formally shown. TgCep250 has been shown to localize to both the outer and inner cores, while TgCep250L1 localizes exclusively to the inner core. In addition, the centrosomal protein CEP530 has been recently shown to localize “in between” cores defining then a third location within the centrosome [78].

Functional insight on the role of the outer core has come from analyzing the functions of both TgCep250 and TgSfi1. TgCep250 has been described as required for keeping the outer core and the inner core connected during centrosomal replication [54]. Mutants of this protein display a dysregulation of inner and outer core replication, whereby the outer core over duplicates with respect to the inner core. Parasites displaying this phenotype fail to properly segregate the nucleus and lose the synchrony between nuclear mitosis and daughter cell formation [54]. Conversely, a temperature sensitive mutant bearing a non-synonymous point mutation in the TgSfi1 coding gene over-duplicates the inner core of the centrosome, whilst the outer core remains unduplicated. Consequently, this mutant exhibits profound cell division defects and fails to properly segregate its chromatin [52]. In both mutants, daughter cell assembly is severely impaired, displaying a characteristic drop in the number of daughter cells formed, and reinforcing the notion that outer core proteins play a pivotal role in orchestrating daughter cell formation.

Much less is understood about the inner core. This core has only been shown to house TgCep250 and TgCep250L1. The function of Cep250L1 has not been deciphered, hence, the precise role of the inner core remains ill-understood.

The mechanisms of MT nucleation by the *T. gondii* centrosome are not well understood. Characteristic electron density, corresponding to the PCM surrounding the centrioles, is not observable by electron microscopy in *T. gondii*. Consistently, homologs to many of the defining PCM core proteins in animals, such CEP192, pericentrin, and CDK5RAP2 are seemingly absent from the *T. gondii* genome [57] (Table 1). However, it should be noted that these searches are at best limited by our anthropocentric approach to the question; even many of the homologs that we do find are only distantly related to their animal counterparts.

Although the molecular players governing MT nucleation and spindle formation remain poorly defined, an intranuclear spindle has been clearly shown to be nucleated from the area surrounding the centrosome. Spindle microtubules are clearly observable within the centrocone (Figure 1C) [35,71,79,80]. This intranuclear spindle follows a cell cycle pattern originating from the centrosome and growing towards the nucleus. The first step in the mitotic spindle formation entails recruitment of tubulin to the centrocone [53,70]. This recruitment takes place at the end of G1 prior to the centrosome duplication [53]. As the cell cycle progresses, the spindle grows reaching the chromosomes [33,71,81].

Recent work identified a homolog of the microtubule plus end-binding protein EB1, known for its function as a mitotic spindle microtubule stabilizing factor in many systems [82]. TgEB1 has further allowed visualization of the dynamics of the mitotic spindle. TgEB1 localizes to the nucleus outside of division and quickly re-localizes to the centrocone region upon entry into M phase, coinciding with the time of spindle formation [53]. Mutants of this protein display lagging chromosomes, reinforcing the notion that a healthy spindle is required for proper chromosome segregation in these parasites.

On the other hand, though PCM components are missing, proteins known to play pivotal roles in centrosomal MT nucleation have been identified. Importantly, γ -tubulin has been localized to centrioles, and more recently, finely mapped to the outer core [52,67]. In most organisms, MT nucleation is carried out by γ -tubulin complexes, or γ -TuSC. In animals, multiple γ -TuSCs assemble with other proteins into γ -tubulin ring complexes (γ -TuRCs) [83]. However, γ -Tusc have been shown to suffice for MT nucleation in some species [84]. The *T. gondii* genome encodes for GCP4, but not for GCP5 and GCP6 of the

γ -TuRC ring complex [57]. It is possible that MT nucleation could be orchestrated by the assembly of γ -TusC ring instead of γ -TuRC ring [57].

3. Nuclear Division Organization by MTOCs of *T. gondii* and *Plasmodium*: Insight into Regulatory Networks

Understanding the mechanism involved in the replication of the MTOC are crucial to coming closer to the molecular clues behind the speedy and flexible cell division of apicomplexan parasites.

In animal cells, new centriole biogenesis occurs at the onset of S-phase. The process is catalyzed by the phosphorylation of STIL by a polo-like kinase known as PLK4 [85]. This phosphorylation is “permitted” only upon S-phase entry when an inhibitory phosphorylation by CDK1/CyclinB is relieved in STIL [86]. Phosphorylated STIL can recruit SAS6 to the mother centriole wall to initiate new cartwheel formation. The interaction between SAS6 and CEP135 allows cartwheel stabilization and interaction with MTs which will form the centriole barrels [87].

Once the centrosome has replicated, pre-existing centrioles remain attached to each other through a physical linker formed by a multi-protein complex (involving CEP250/C-nap1 and rootletin). The dissolution of this link is critical to allow semi-conservative centrosome segregation to opposing poles, whereby each centrosome will be formed by a mother (old) and a (new) daughter centriole. Cep250 is the substrate of Nek2A, a kinase that belongs to the group of NIMA-related kinases family. In mammalian cells, Nek2A is substrate of an additional kinase called Mst-2, and of Protein Phosphatase 1 (PP1). In addition, Mst2’s activity is positively regulated by PLK-1. Phosphorylated Mst-2 phosphorylates Nek2A, which subsequently phosphorylates Cep250 inducing centrosome disjunction. Nek2A is dephosphorylated by PP1, reversing the process.

In *P. falciparum*, four Neks have been identified. PfNek-2 and PfNek-4 were shown to be essential for sexual development in the mosquito vector and consistently, are only expressed in the gametocyte stage. PfNek-1 is expressed both in male gametocytes and during asexual stages [88–90]. Interestingly, observation of PfNek1’s localization by immunofluorescence assays in asexually replicating *P. falciparum* revealed that it localizes to dots near the nucleus at the ring and schizont stages, but switches to a more diffuse cytoplasmic localization in trophozoites [88] PfNek-1 was shown to in vitro phosphorylate Pfmep-2, an atypical *P. falciparum* MAPK homolog [90].

Conversely, seven Neks have been identified in *T. gondii* [91]. TgNek-2 thru 7 remain unexplored. However, TgNek-1 was shown to localize at the centrosome at G1/S; the time of centrosome duplication in *T. gondii* [56]. In accordance with its predicted role, a mutant of TgNek-1 exhibits a single centrosome in asexually dividing parasites. This presumably corresponds to a centrosome whose disjunction is inhibited [56]. Interestingly, the CEP250 homologs (TgCEP250) is not a substrate of TgNek-1 [54]. Given TgNek-1’s localization at the outer core, and TgCEP250L1 localization to the inner core, TgCEP250L1 is likely not a substrate of TgNek-1 either. Analysis mapping phosphoproteome changes in the background of a TgNek-1 mutant could be informative as to the underlying cell-cycle regulated mechanisms of centriole junction and disjunction in *T. gondii*.

A single PP1 homolog has been identified in each *T. gondii*, *P. berghei*, and *P. falciparum* [92–97]. Given their critical role in controlling proliferation in other organisms PP1 homologs in apicomplexans have been put forward as promising drug targets to block parasite division.

The PP1 holoenzyme is conformed by a catalytic subunit highly conserved denominated protein phosphatase 1 catalytic subunit (PP1c), which forms a complex with different regulatory subunits. The diversity of regulatory subunits that modulates PP1c phosphatase activity is such that a “binding code” for PP1c has been proposed, whereby the different combination of these subunits creates holoenzymes with unique properties [98]. In fact, most of the PP1c surfaces are interaction interfaces with different proteins. This, in turn, limits PP1c evolutionary rate, making it one of the most highly conserved enzymes amongst eukaryotic lineages [99]. It should be noted that PP1 plays numerous roles other than

limiting centrosome separation in many organisms, however, discussing those extends well beyond the scope of this review.

Interactions of PP1c with different players control its spatio-temporal activity. One such interaction, relevant to centrosome disjunction, is that of PP1c with its specific inhibitor. The “Inhibitor 2” (I-2) is a cell-cycle regulated PP1c inhibitor which is specifically expressed in S and M phases. In animal cells, this protein localization to the pericentriolar area, coincides with an increase in the kinase activity of the Nek2A-Mst2-PP1 complex (i.e., an inhibition of the phosphatase activity of PP1) [100]. An I-2 homolog has been shown to exist in *T. gondii* and is named TgI2. TgI2 was shown to inhibit TgPP1’s phosphatase activity in vitro. This inhibition is critically dependent on TgI2’s SILK and RVxF motifs, a feature conserved in the higher eukaryotes I-2s [101]. In addition, A leucine-rich repeat protein family, TgLRR1, binds TgPP1 within the nucleus. This interaction, assayed using recombinant proteins, was shown to inhibit TgPP1’s phosphatase activity in *Xenopus* oocytes, overriding the G2/M cell cycle checkpoint in this system [102]. Overall, TgPP1 is predicted to play a pivotal role in controlling cell cycle progression, likely through a prominent role in centrosome duplication. Though its phosphatase activity has been shown to be critically dependent on TgPP1’s interactions with its specific inhibitor TgI2, and its binding partner TgLRR1 (which likely limits its activity at the centrosome by compartmentalizing it to the nucleus), nothing is known about its substrates nor about its in vivo interaction with TgNek1. Elucidating these critical aspects of TgPP1’s life could shed light onto ill-understood, yet critical, aspects of centrosome biology in *T. gondii*.

In *P. berghei*, live-cell and ultrastructural imaging, showed recently that PbPP1 cyclically localizes to the proximity of the nucleus, at a position apposed to that of NDC80, a marker of *Plasmodium*’s kinetochores [55]. This localization coincides with the start of DNA synthesis/S-phase. Immunofluorescence assays revealed similar localization dynamics of the PP1 homolog in *P. falciparum* whereby a diffuse cytoplasmic and more intense foci near the nucleus could be observed [103]. Interestingly, both PfLRR1 and Pfl-2 homologs have been identified, suggesting that the players involved in regulating PP1’s activity at the centrosome in higher eukaryotes could be conserved in *Plasmodium* [104]. However, though a number of studies have focused on shedding light onto PP1’s functions in gametogenesis, egress and host–parasite interactions [105], through conditional mutagenesis, RNA-seq and proteomics, whether PP1 plays any role in *Plasmodium*’s CP biology remains to be determined.

The coordinated and timely onset of successive cell cycle stages is largely controlled by Cyclin-dependent kinases (CDKs) in mammalian cells. Many of the CDKs control cell cycle progression by means of what are known as “checkpoints”. Bona fide cell cycle progression check points—as defined by the stalling of one process when another one has not progressed properly—are seemingly absent in *T. gondii*. This phenomenon has been repeatedly documented by phenotypic characterization of cell division mutants. An illustrative example is the mutant of the kinetochore protein TgNdc80. TgNdc80 conditional knock-down parasites lose the connection between the nucleus and the centrosome. In these mutants, the nucleus “falls off” the mother cell, whilst it continues on with daughter cell assembly [106]. On the flip side, mutants who lose the connection between the centrosome and the MTOC guiding daughter cell assembly, are able to undergo mitosis normally [38]. Instead of checkpoints, temporally coinciding mutual physical tethers are assembled onto the centrosome. Proper spatial and temporal co-organization of cell division events is ensured in this fashion [38,54].

Nonetheless, a number of Cdk-related kinases (Crks; TPK2, TgCrk1, TgCrk2, TgCrk4, TgCrk5, and TgCrk6) and in some cases their partner cyclins, have been identified and characterized in *T. gondii* [107–109]. TgCrk6 and TgCrk4 are required for progression through S-phase and mitosis. These CRKs have been proposed to partake in the regulation of spindle assembly and centrosome duplication, respectively. Their cyclin partners have not been identified, nor have their substrates been deciphered.

Seven CRKs have been identified in *Plasmodium* (PK5, PK6, Mrk1, Crk-1, Crk-3, Crk-5, and Crk-4) [110,111], as well as four cyclins (Cyc1, Soc2, Cyc3, and Cyc4) [112,113]. CRK5 interacts with cyclin SOC2. Together, these proteins have been shown to play a role in licensing DNA replication. Consistently, a *P. berghei* mutant of CRK5 exhibits fewer nuclear poles, no chromatin condensation, fails to undergo cytokinesis or form flagella [114]. Pfpk6 is also proposed to regulate S phase entry, however, its precise function and its interactors remain unknown [115]. To our knowledge, which CRK/Cyclin pairs are specifically involved in catalyzing spindle formation or CP duplication in *Plasmodium* have not been identified.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a conserved family of protein kinases that regulate signal transduction, proliferation, and development in eukaryotes. The genome of *T. gondii* encodes for three MAP-related kinases; MAPKL1, MAPK2, and ERK7. ERK7 has been shown to be involved in APR homeostasis and biogenesis [116]. Conditional null parasites for this protein exhibit a striking phenotype whereby conoid assembly is completely abrogated. On the other hand, both MAPKL1 and MAPK2 have been implicated in the regulation of centrosome duplication. A temperature sensitive mutant of MAPKL1 over-duplicates the centrosome at restrictive temperature, leading to the assembly of an aberrant number of daughter cells [52]. TgMAPKL1's substrates, however, remain unidentified. On the other hand, conditional degradation of MAPK2 renders parasites unable to duplicate their centrosomes, complete DNA replication, and initiate daughter cell budding. However, prior to succumbing, MAPK2 mutant parasites continue to grow and replicate their mitochondria, Golgi apparatus and plastid-like organelle, the apicoplast [117]. The latter two are known to segregate with the centrosome. Nonetheless, MAPK2 does not localize at the centrosome, for which its function is likely exerted upstream of centrosome duplication and mitosis.

Aurora-related kinases are a family of serine/threonine kinases well known for critically regulating cell cycle progression in many organisms. *P. falciparum* and *T. gondii* each bear three homologs of these kinases [118,119]. In *P. falciparum* these kinases are denominated: Pfkark-1,-2,-3 and in *T. gondii*: TgArk-1,-2,3 [118,120]. *T. gondii*'s Ark1-3 have been experimentally addressed and all are functionally related to licensing events of the cell cycle [118,121]. TgArk-1 has been proposed to play a role in the duplication of the spindle pole and the inner core of the centrosome [121]. TgArk-2 is the only of three that is not essential for tachyzoite replication [118]. Although it localizes at the intranuclear mitotic spindle, mutants of TgArk-2 are able to proliferate normally [118]. TgArk-3 localizes at the outer core of the centrosome and has been linked with regulation of the budding process, as mutants for this protein fail to assemble daughter cells and complete cytokinesis [52,121].

Three ARK homologs have been identified in *P. falciparum*; Pfkark-1, -2, -3. Of these, Pfkark1 has been experimentally explored. Pfkark-1 has been shown to be essential in blood stages for parasite's survival, and it has been shown to functionally interact with Pfnk-1 [120,122]. Pfkark-1 localizes at the spindle poles during mitosis. In metazoans, Aurora A localizes at the spindle during nuclear division [120]. Given its cell cycle stage dependent localization to the spindle, Pfkark-1 has been proposed as the functional homolog of Aurora A [120]. Much less is known about Pfkark-2: where it localizes, whether it follows a cell cycle-dependent pattern of localization, and its functions/substrates, remain undetermined [120]. In vitro assays showed Pfkark-2 preference for myelin basic protein [123]. Finally, Pfkark-3 displays a perinuclear localization and is expressed at the onset of S phase [123]. All three Pfkarks are essential for blood stage parasite survival [123].

4. Closing Remarks

Though MTOC structures in Apicomplexa have captivated the interests of electron microscopists since the 60s, several limitations have precluded the identification of their molecular makeup. Mechanistic studies have been limited both by the minute sizes of the structures, and the difficulty in their purification: a characteristic inherent to their multiple connections to rather stable and resistant cytoskeletal structures. This has precluded the

extended use of proteomic-based approaches for identification of centrosomal/CP proteins in either species.

In addition, the fast cell cycles of apicomplexan parasites preclude the detailed study of the various short-lived cell cycle stages of asexual proliferation, and the transitions between asexual and sexual life forms. For example, in asexually replicating *T. gondii* and *Plasmodium*, centrosome/CP duplication occurs at the onset of S-phase; a stage reckoned to last about half an hour in a 6 h cell division cycle. In asynchronous growing cultures of *T. gondii*, only a minute fraction of all parasites will be at this stage, making the study of the process a literal “needle in a haystack” kind of a challenge.

Cell cycle synchronization tools have tremendously increased our capacity to discern the events taking place in the mitosis of human cells. Synchronization tools based on differential osmotic stress of schizont stages are available for *Plasmodium* blood-stages. These tools, however, only enrich for ring stages and scalability of in vitro cultures remains a challenge. Cell cycle synchronization tools, which do not significantly modify the biology of the parasite and maintain synchrony for a significant period, have not been reported for use in *T. gondii*.

The puzzle of the various regulatory networks linking the different synchronous events of cell division in apicomplexans, has only recently started to come together. However, again, the various life forms and complex regulatory networks operating simultaneously in asynchronously growing parasites, transitioning between asexual and sexual cycles, makes the puzzle seem like an unapproachable challenge.

However, many of these limitations began to be relieved with the widespread access to efficient mutagenesis tools, super-resolution optical microscopy, and the application of extremely high-resolution electron microscopy techniques (such as Cryo-electron tomography and Correlative Light EM). More recently, the advent of UExM has democratized the access to higher resolution optical microscopy and fluorescence imaging [124,125]. The latter will most likely become the technique of choice in less well funded settings where access to state of the art super resolution microscopy is limited. Together, these techniques have expedited progress in our molecular understanding of MTOCs and their associated structures in the last few years, particularly impacting our understanding of *Plasmodium*'s CP role in MT nucleation and *T. gondii*'s centrosome organization. In addition, tools to in vitro trigger the development of sexual stages of *T. gondii*, allowing unprecedented access to flagella-forming stages (i.e., basal body biology!), are now available [30,31].

We envision that the next few years will see multiple breakthrough studies solving the fascinating puzzle of MTOC biology in *T. gondii* and *Plasmodium*, bringing us closer to both understanding the intricacies of these parasites' basic biology, and devising new strategies to interfere with their most destructive power; their ability to proliferate within us.

Author Contributions: Conceptualization, R.T. and M.E.F.; writing—original draft preparation, R.T., F.C.G. and M.E.F.; writing—review and editing, R.T., F.C.G. and M.E.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work at the Institut Pasteur de Montevideo is supported by an Institutional grant by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM -COF 03/11). Work in the Laboratory of Apicomplexan Biology is funded by grants to MF by Banco de Seguros del Estado, CSIC I+D 2019-15, and ACIP-RIIP 76-2017. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: R.T. and F.C.G. are students of the PEDECIBA-Biología graduate program. R.T. is funded by an ANII doctoral fellowship. M.E.F. is a PEDECIBA-Biología and Sistema Nacional de Investigadores researcher. The authors would like to thank the Transmission Electron Microscopy facility at the School of Sciences, Universidad de la República, and to the Advanced Bioimaging Unit at Institut Pasteur Montevideo, for their assistance in image acquisition.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Scheer, U. Historical roots of centrosome research: Discovery of Boveri's microscope slides in Würzburg. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130469. [[CrossRef](#)]
2. Boveri, T. Ueber den Antheil des Spermatozoon an der Teilung des Eies. *Sitzungsber. Ges. Morph. Physiol.* **1887**, *3*, 151–164.
3. Banterle, N.; Nievergelt, A.P.; de Buhr, S.; Hatzopoulos, G.N.; Brillard, C.; Andany, S.; Hübscher, T.; Sorgenfrei, F.; Schwarz, U.S.; Gräter, F.; et al. Surface-catalyzed SAS-6 self-assembly directs centriole formation through kinetic and structural mechanisms [Preprint]. *Biophysics* **2020**. [[CrossRef](#)]
4. Culver, B.P.; Meehl, J.B.; Giddings, T.H., Jr.; Winey, M. The two SAS-6 homologs in *Tetrahymena thermophila* have distinct functions in basal body assembly. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1865–1877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dammermann, A.; Müller-Reichert, T.; Pelletier, L.; Habermann, B.; Desai, A.; Oegema, K. Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 815–829. [[CrossRef](#)]
6. Gopalakrishnan, J.; Guichard, P.; Smith, A.H.; Schwarz, H.; Agard, D.A.; Marco, S.; Avidor-Reiss, T. Self-assembling SAS-6 Multimer Is a Core Centriole Building Block. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8759–8770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kitagawa, D.; Vakonakis, I.; Olieric, N.; Hilbert, M.; Keller, D.; Olieric, V.; Bortfeld, M.; Erat, M.C.; Flückiger, I.; Gönczy, P.; et al. Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* **2011**, *144*, 364–375. [[CrossRef](#)]
8. Leidel, S.; Delattre, M.; Cerutti, L.; Baumer, K.; Gönczy, P. SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 115–125. [[CrossRef](#)]
9. Pelletier, L.; O'Toole, E.; Schwager, A.; Hyman, A.A.; Müller-Reichert, T. Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2006**, *444*, 619–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Slep, K.C. The Secret of Centriole Length: Keep a LID on It. *Dev. Cell* **2016**, *37*, 293–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Woodruff, J.B.; Wueseke, O.; Hyman, A.A. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Teixidó-Travesa, N.; Roig, J.; Lüders, J. The where, when and how of microtubule nucleation—One ring to rule them all. *J. Cell Sci.* **2012**, *125 Pt 19*, 4445–4456. [[CrossRef](#)]
13. Sanchez, A.D.; Feldman, J.L. Microtubule-organizing centers: From the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *44*, 93–101. [[CrossRef](#)]
14. Kudryashev, M.; Lepper, S.; Stanway, R.; Bohn, S.; Baumeister, W.; Cyrklaff, M.; Frischknecht, F. Positioning of large organelles by a membrane-associated cytoskeleton in *Plasmodium* sporozoites. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 362–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Striepen, B.; Crawford, M.J.; Shaw, M.K.; Tilney, L.G.; Seeber, F.; Roos, D.S. The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1423–1434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Harding, C.R.; Frischknecht, F. The Riveting Cellular Structures of Apicomplexan Parasites. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 979–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hepler, P.K.; Huff, C.G.; Sprinz, H. The fine structure of the exoerythrocytic stages of *Plasmodium fallax*. *J. Cell Biol.* **1966**, *30*, 333–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Katris, N.J.; van Dooren, G.G.; McMillan, P.J.; Hanssen, E.; Tilley, L.; Waller, R.F. The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004074. [[CrossRef](#)]
19. Morrissette, N.S.; Sibley, L.D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 21–38. [[CrossRef](#)]
20. Morrissette, N.S.; Sibley, L.D. Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* **2002**, *115 Pt 5*, 1017–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Nichols, B.A.; Chiappino, M.L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **1987**, *34*, 217–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Read, M.; Sherwin, T.; Holloway, S.P.; Gull, K.; Hyde, J.E. Microtubular organization visualized by immuno-fluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in *Plasmodium falciparum* and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. *Parasitology* **1993**, *106 Pt 3*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Russell, D.G.; Burns, R.G. The polar ring of coccidian sporozoites: A unique microtubule-organizing centre. *J. Cell Sci.* **1984**, *65*, 193–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tran, J.Q.; de Leon, J.C.; Li, C.; Huynh, M.-H.; Beatty, W.; Morrissette, N.S. RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton* **2010**, *67*, 586–598. [[CrossRef](#)]
25. Francia, M.E.; Dubremetz, J.-F.; Morrissette, N.S. Basal body structure and composition in the apicomplexans *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Cilia* **2015**, *5*, 3. [[CrossRef](#)]

26. Tomasina, R.; Francia, M.E. The Structural and Molecular Underpinnings of Gametogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 608291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sinden, R.E.; Canning, E.U.; Spain, B.; Garnham, P.C.C. Gametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*: A transmission electron microscope study. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **1976**, *193*, 55–76. [[CrossRef](#)]
28. Sinden, R.E.; Smalley, M.E. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: The cell-cycle. *Parasitology* **1979**, *79*, 277–296. [[CrossRef](#)]
29. Rashpa, R.; Brochet, M. Ultrastructure expansion microscopy of *Plasmodium* gametocytes reveals the molecular architecture of a microtubule organisation centre coordinating mitosis with axoneme assembly [Preprint]. *Microbiology* **2021**. [[CrossRef](#)]
30. Farhat, D.C.; Swale, C.; Dard, C.; Cannella, D.; Ortet, P.; Barakat, M.; Sindikubwabo, F.; Belmudes, L.; De Bock, P.-J.; Couté, Y.; et al. A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 570–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Martorelli Di Genova, B.; Wilson, S.K.; Dubey, J.P.; Knoll, L.J. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gubbels, M.-J.; Coppens, I.; Zarringhalam, K.; Duraisingh, M.T.; Engelberg, K. The Modular Circuitry of Apicomplexan Cell Division Plasticity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 670049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Francia, M.E.; Striepen, B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 125–136. [[CrossRef](#)]
34. Striepen, B.; Jordan, C.N.; Reiff, S.; van Dooren, G.G. Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aikawa, M.; Beaudoin, R.L. Studies on nuclear division of a malarial parasite under pyrimethamine treatment. *J. Cell Biol.* **1968**, *39*, 749–754. [[CrossRef](#)]
36. Canning, E.U.; Sinden, R.E. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* **1973**, *67*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vivier, E.; Vickers, K. Divisions nucléaires chez les protozoaires. *Actual. Protozool.* **1974**, *1*, 161–177.
38. Francia, M.E.; Jordan, C.N.; Patel, J.D.; Sheiner, L.; Demery, J.L.; Fellows, J.D.; de Leon, J.C.; Morrissette, N.S.; Dubremetz, J.-F.; Striepen, B. Cell Division in Apicomplexan Parasites Is Organized by a Homolog of the Striated Rootlet Fiber of Algal Flagella. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001444. [[CrossRef](#)]
39. Aikawa, M. The Fine Structure of the Erythrocytic Stages of Three Avian Malarial Parasites, *Plasmodium fallax*, *P. lophurae*, and *P. cathemerium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1966**, *15*, 449–471. [[CrossRef](#)]
40. Arnot, D.E.; Ronander, E.; Bengtsson, D.C. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 71–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gerald, N.; Mahajan, B.; Kumar, S. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 474–482. [[CrossRef](#)]
42. Liffner, B.; Absalon, S. Expansion microscopy reveals *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites undergo anaphase with a chromatin bridge in the absence of mini-chromosome maintenance complex binding protein. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
43. Schrével, J.; Asfaux-Foucher, G.; Bafort, J.M. Etude ultrastructurale des mitoses multiples au cours de la sporogonie du *Plasmodium b. berghei* [Ultrastructural study of multiple mitoses during sporogony of *Plasmodium b. berghei*. *J. Ultrastruct. Res.* **1977**, *59*, 332–350. [[CrossRef](#)]
44. Simon, C.S.; Voß, Y.; Funaya, C.; Machado, M.; Penning, A.; Klaschka, D.; Cyrklaff, M.; Kim, J.; Ganter, M.; Guizetti, J. An extended DNA-free intranuclear compartment organizes centrosomal microtubules in *Plasmodium falciparum*. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
45. Hoeijmakers, W.A.M.; Flueck, C.; François, K.-J.; Smits, A.H.; Wetzel, J.; Volz, J.C.; Cowman, A.F.; Voss, T.; Stunnenberg, H.G.; Bártfai, R. Centromeres of *P. falciparum*. *Cell Microbiol.* **2012**, *14*, 1391–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Seybold, C.; Schiebel, E. Spindle pole bodies. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, R858–R860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Andersen, J.S.; Wilkinson, C.J.; Mayor, T.; Mortensen, P.; Nigg, E.A.; Mann, M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **2003**, *426*, 570–574. [[CrossRef](#)]
48. Danielsson, F.; Mahdessian, D.; Axelsson, U.; Sullivan, D.; Uhlén, M.; Andersen, J.S.; Thul, P.J.; Lundberg, E. Spatial Characterization of the Human Centrosome Proteome Opens Up New Horizons for a Small but Versatile Organelle. *Proteomics* **2020**, *20*, 1900361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. De Leon, J.C.; Scheumann, N.; Beatty, W.; Beck, J.R.; Tran, J.Q.; Yau, C.; Bradley, P.J.; Gull, K.; Wickstead, B.; Morrissette, N.S. A SAS-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 1009–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Leung, J.M.; Liu, J.; Wetzel, L.A.; Hu, K. Centrin2 from the human parasite *Toxoplasma gondii* is required for its invasion and intracellular replication. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs228791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Roques, M.; Stanway, R.R.; Rea, E.I.; Markus, R.; Brady, D.; Holder, A.A.; Guttery, D.S.; Tewari, R. *Plasmodium* centrin PbcEN-4 localizes to the putative MTOC and is dispensable for malaria parasite proliferation. *Biol. Open* **2019**, *8*, bio036822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Suvorova, E.S.; Francia, M.; Striepen, B.; White, M.W. A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Chen, C.-T.; Kelly, M.; de Leon, J.; Nwagbara, B.; Ebbert, P.; Ferguson, D.J.P.; Lowery, L.A.; Morrissette, N.; Gubbels, M.-J. Compartmentalized *Toxoplasma* EB1 bundles spindle microtubules to secure accurate chromosome segregation. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 4562–4576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chen, C.-T.; Gubbels, M.-J. TgCep250 is dynamically processed through the division cycle and is essential for structural integrity of the *Toxoplasma* centrosome. *Mol. Biol. Cell* **2019**, *30*, 1160–1169. [[CrossRef](#)]
55. Zeeshan, M.; Pandey, R.; Subudhi, A.K.; Ferguson, D.J.P.; Kaur, G.; Rashpa, R.; Nugmanova, R.; Brady, D.; Bottrill, A.R.; Vaughan, S.; et al. Protein phosphatase 1 regulates atypical mitotic and meiotic division in *Plasmodium* sexual stages. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 760. [[CrossRef](#)]
56. Chen, C.-T.; Gubbels, M.-J. The *Toxoplasma gondii* centrosome is the platform for internal daughter budding as revealed by a Nek1 kinase mutant. *J. Cell Sci.* **2013**, *126 Pt 15*, 3344–3355. [[CrossRef](#)]
57. Morlon-Guyot, J.; Francia, M.E.; Dubremetz, J.-F.; Daher, W. Towards a molecular architecture of the centrosome in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton* **2017**, *74*, 55–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Carvalho-Santos, Z.; Machado, P.; Branco, P.; Tavares-Cadete, F.; Rodrigues-Martins, A.; Pereira-Leal, J.B.; Betten-court-Dias, M. Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell Sci.* **2010**, *123 Pt 9*, 1414–1426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Marques, S.R.; Ramakrishnan, C.; Carzaniga, R.; Blagborough, A.M.; Delves, M.J.; Talman, A.M.; Sinden, R.E. An essential role of the basal body protein SAS-6 in *Plasmodium* male gamete development and malaria transmission. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 191–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fowler, R.E.; Smith, A.M.; Whitehorn, J.; Williams, I.T.; Bannister, L.H.; Mitchell, G.H. Microtubule associated motor proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *117*, 187–200. [[CrossRef](#)]
61. Azimzadeh, J.; Bornens, M. Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 2139–2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Lee, V.D.; Huang, B. Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11039. [[CrossRef](#)]
63. Morrissette, N.; Gubbels, M.-J. Chapter 13—The *Toxoplasma* Cytoskeleton: Structures, Proteins and Processes. In *Toxoplasma Gondii*, 2nd ed.; Weiss, E.L.M., Kim, K., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 455–503. [[CrossRef](#)]
64. Dubremetz, J.-F. L'ultrastructure du centriole et du centrocone chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Étude au cours de la schizogonie. *J. Microsc.* **1971**, *23*, 453–458.
65. O'Toole, E.T.; McDonald, K.L.; Mäntler, J.; McIntosh, J.R.; Hyman, A.A.; Müller-Reichert, T. Morphologically distinct microtubule ends in the mitotic centrosome of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 451–456. [[CrossRef](#)]
66. Wang, J.T.; Kong, D.; Hoerner, C.R.; Loncarek, J.; Stearns, T. Centriole triplet microtubules are required for stable centriole formation and inheritance in human cells. *eLife* **2017**, *6*, e29061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Morrissette, N. Targeting *Toxoplasma* tubules: Tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 2–12. [[CrossRef](#)]
68. Van der Zypen, E.; Piekarski, G. Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. A morphological analysis. *Z. Parasitenkd.* **1967**, *29*, 15–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kelley, G.L.; Hammond, D.M. Fine structural aspects of early development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in cultured cells. *Z. Parasitenkd.* **1972**, *38*, 271–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gubbels, M.-J.; Vaishnav, S.; Boot, N.; Dubremetz, J.-F.; Striepen, B. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2236–2245. [[CrossRef](#)]
71. Francia, M.E.; Bhavsar, S.; Ting, L.-M.; Croken, M.M.; Kim, K.; Dubremetz, J.-F.; Striepen, B. A Homolog of Structural Maintenance of Chromosome 1 Is a Persistent Centromeric Protein Which Associates with Nuclear Pore Components in *Toxoplasma gondii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 295. [[CrossRef](#)]
72. Hodges, M.E.; Scheumann, N.; Wickstead, B.; Langdale, J.A.; Gull, K. Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1407–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Lechtreck, K.-F.; Rostmann, J.; Grunow, A. Analysis of *Chlamydomonas* SF-assembly by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J. Cell Sci.* **2002**, *115 Pt 7*, 1511–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Hu, K.; Johnson, J.; Florens, L.; Fraunholz, M.; Suravajjala, S.; DiLullo, C.; Yates, J.; Roos, D.S.; Murray, J.M. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ramakrishnan, C.; Maier, S.; Walker, R.A.; Rehauer, H.; Joekel, D.E.; Winiger, R.R.; Basso, W.U.; Grigg, M.E.; Hehl, A.B.; Deplazes, P.; et al. An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of *Toxoplasma gondii* by cats. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1474. [[CrossRef](#)]
76. Kilmartin, J.V. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1211–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Hardy, T.; Lee, M.; Hames, R.S.; Prosser, S.L.; Cheary, D.-M.; Samant, M.D.; Schultz, F.; Baxter, J.E.; Rhee, K.; Fry, A.M. Multisite phosphorylation of C-Nap1 releases it from Cep135 to trigger centrosome disjunction. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2493–2506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Courjol, F.; Gissot, M. A coiled-coil protein is required for coordination of karyokinesis and cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12832. [[CrossRef](#)]
79. Aikawa, M.; Huff, C.G.; Sprinz, H. Fine structure of the asexual stages of *Plasmodium elongatum*. *J. Cell Biol.* **1967**, *34*, 229–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Dubremetz, J.F. Ultrastructural study of schizogonic mitosis in the coccidian, *Eimeria necatrix* (Johnson 1930). *J. Ultrastruct. Res.* **1973**, *42*, 354–376. [[CrossRef](#)]
81. Brooks, C.F.; Francia, M.E.; Gissot, M.; Croken, M.M.; Kim, K.; Striepen, B. *Toxoplasma gondii* sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3767. [[CrossRef](#)]
82. Galjart, N. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, R528–R537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Kollman, J.M.; Polka, J.K.; Zelter, A.; Davis, T.N.; Agard, D.A. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature* **2010**, *466*, 879–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Vérollet, C.; Colombié, N.; Daubon, T.; Bourbon, H.-M.; Wright, M.; Raynaud-Messina, B. *Drosophila melanogaster* γ -TuRC is dispensable for targeting γ -tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 517–528. [[CrossRef](#)]
85. Bettencourt-Dias, M.; Rodrigues-Martins, A.; Carpenter, L.; Riparbelli, M.; Lehmann, L.; Gatt, M.K.; Carmo, N.; Balloux, F.; Callaini, G.; Glover, D.M. SAK/PLK4 Is Required for Centriole Duplication and Flagella Development. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 2199–2207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Zitouni, S.; Francia, M.E.; Leal, F.; Montenegro Gouveia, S.; Nabais, C.; Duarte, P.; Gilberto, S.; Brito, D.; Moyer, T.; Kan-dels-Lewis, S.; et al. CDK1 Prevents Unscheduled PLK4-STIL Complex Assembly in Centriole Biogenesis. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 1127–1137. [[CrossRef](#)]
87. Lin, Y.-C.; Chang, C.-W.; Hsu, W.-B.; Tang, C.-J.C.; Lin, Y.-N.; Chou, E.-J.; Wu, C.-T.; Tang, T.K. Human microcephaly protein CEP135 binds to hSAS-6 and CPAP, and is required for centriole assembly. *EMBO J.* **2013**, *32*, 1141–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Dorin-Semblat, D.; Schmitt, S.; Semblat, J.-P.; Sicard, A.; Reininger, L.; Goldring, D.; Patterson, S.; Quashie, N.; Chakrabarti, D.; Meijer, L.; et al. *Plasmodium falciparum* NIMA-related kinase Pfnek-1: Sex specificity and assessment of essentiality for the erythrocytic asexual cycle. *Microbiology* **2011**, *157 Pt 10*, 2785–2794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Reininger, L.; Tewari, R.; Fennell, C.; Holland, Z.; Goldring, D.; Ranford-Cartwright, L.; Billker, O.; Doerig, C. An essential role for the Plasmodium Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20858–20868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dorin, D.; Le Roch, K.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Parzy, D.; Poulet, P.; Meijer, L.; Doerig, C. Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *9*, 2600–2608. [[CrossRef](#)]
91. Peixoto, L.; Chen, F.; Harb, O.S.; Davis, P.H.; Beiting, D.P.; Brownback, C.S.; Ouloguem, D.; Roos, D.S. Integrative Genomic Approaches Highlight a Family of Parasite-Specific Kinases that Regulate Host Responses. *Cell Host Microbe* **2010**, *8*, 208–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bhattacharyya, M.K.; Hong, Z.; Kongkasuriyachai, D.; Kumar, N. *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 739–747. [[CrossRef](#)]
93. Delorme, V.; Garcia, A.; Cayla, X.; Tardieux, I. A role for *Toxoplasma gondii* type 1 ser/thr protein phosphatase in host cell invasion. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 271–278. [[CrossRef](#)]
94. Guttery, D.S.; Poulin, B.; Ramaprasad, A.; Wall, R.J.; Ferguson, D.J.P.; Brady, D.; Patzewitz, E.-M.; Whipple, S.; Straschil, U.; Wright, M.H.; et al. Genome-wide functional analysis of *Plasmodium* protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 128–140. [[CrossRef](#)]
95. Hollin, T.; De Witte, C.; Fréville, A.; Guerrero, I.C.; Chhuon, C.; Saliou, J.-M.; Herbert, F.; Pierrot, C.; Khalife, J. Essential role of GEXP15, a specific Protein Phosphatase type 1 partner, in *Plasmodium berghei* in asexual erythrocytic proliferation and transmission. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007973. [[CrossRef](#)]
96. Khalife, J.; Fréville, A.; Gnanon, B.; Pierrot, C. The Multifaceted Role of Protein Phosphatase 1 in *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* **2021**, *37*, 154–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Yang, C.; Arrizabalaga, G. The serine/threonine phosphatases of apicomplexan parasites. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Heroes, E.; Lesage, B.; Görnemann, J.; Beullens, M.; Van Meervelt, L.; Bollen, M. The PP1 binding code: A molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J.* **2013**, *280*, 584–595. [[CrossRef](#)]
99. Moorhead, G.B.G.; De Wever, V.; Templeton, G.; Kerk, D. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem. J.* **2008**, *417*, 401–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Eto, M.; Elliott, E.; Prickett, T.D.; Brautigan, D.L. Inhibitor-2 Regulates Protein Phosphatase-1 Complexed with NimA-related Kinase to Induce Centrosome Separation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44013–44020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Deveuve, Q.; Lesage, K.; Mouveaux, T.; Gissot, M. The *Toxoplasma gondii* inhibitor-2 regulates protein phosphatase 1 activity through multiple motifs. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 2417–2426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Daher, W.; Oria, G.; Fauquenoy, S.; Cailliau, K.; Browaeys, E.; Tomavo, S.; Khalife, J. A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1606–1617. [[CrossRef](#)]
103. Paul, A.S.; Miliu, A.; Paulo, J.A.; Goldberg, J.M.; Bonilla, A.M.; Berry, L.; Seveno, M.; Braun-Breton, C.; Kosber, A.L.; Els-worth, B.; et al. Co-option of *Plasmodium falciparum* PP1 for egress from host erythrocytes. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

104. Pierrot, C.; Zhang, X.; Zanghi, G.; Fréville, A.; Rebollo, A.; Khalife, J. Peptides derived from *Plasmodium falciparum* leucine-rich repeat 1 bind to serine/threonine phosphatase type 1 and inhibit parasite growth in vitro. *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *12*, 85–88. [[CrossRef](#)]
105. Gnanon, B.; Fréville, A.; Cailliau, K.; Leroy, C.; De Witte, C.; Tulasne, D.; Martoriarti, A.; Jung, V.; Guerrero, I.C.; Marion, S.; et al. *Plasmodium* pseudo-Tyrosine Kinase-like binds PP1 and SERA5 and is exported to host erythrocytes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8120. [[CrossRef](#)]
106. Farrell, M.; Gubbels, M.-J. The *Toxoplasma gondii* kinetochore is required for centrosome association with the centrocone (spindle pole). *Cell. Microbiol.* **2014**, *16*, 78–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Khan, F.; Tang, J.; Qin, C.L.; Kim, K. Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 321–332. [[CrossRef](#)]
108. Alvarez, C.A.; Suvorova, E.S. Checkpoints of apicomplexan cell division identified in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Naumov, A.; Kratzer, S.; Ting, L.M.; Kim, K.; Suvorova, E.S.; White, M.W. The *Toxoplasma* Centrocone Houses Cell Cycle Regulatory Factors. *mBio* **2017**, *8*, e00579-17. [[CrossRef](#)]
110. Deshmukh, A.S.; Agarwal, M.; Dhar, S.K. Regulation of DNA replication proteins in parasitic protozoans: Possible role of CDK-like kinases. *Curr. Genet.* **2016**, *62*, 481–486. [[CrossRef](#)]
111. Ganter, M.; Goldberg, J.M.; Dvorin, J.D.; Paulo, J.A.; King, J.G.; Tripathi, A.K.; Paul, A.S.; Yang, J.; Coppens, I.; Jiang, R.H.Y.; et al. *Plasmodium falciparum* CRK4 directs continuous rounds of DNA replication during schizogony. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17017. [[CrossRef](#)]
112. Matthews, H.; Duffy, C.W.; Merrick, C.J. Checks and balances? DNA replication and the cell cycle in *Plasmodium*. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Roques, M.; Wall, R.J.; Douglass, A.P.; Ramaprasad, A.; Ferguson, D.J.P.; Kaindama, M.L.; Brusini, L.; Joshi, N.; Rchiad, Z.; Brady, D.; et al. *Plasmodium* P-Type Cyclin CYC3 Modulates Endomitotic Growth during Oocyst Development in Mosquitoes. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Balestra, A.C.; Zeeshan, M.; Rea, E.; Pasquarello, C.; Brusini, L.; Mourier, T.; Subudhi, A.K.; Klages, N.; Arboit, P.; Pandey, R.; et al. A divergent cyclin/cyclin-dependent kinase complex controls the atypical replication of a malaria parasite during gametogony and trans-mission. *eLife* **2020**, *9*, e56474. [[CrossRef](#)]
115. Bracchi-Ricard, V.; Barik, S.; Delvecchio, C.; Doerig, C.; Chakrabarti, R.; Chakrabarti, D. Pfk6, a novel cy-clin-dependent kinase/mitogen-activated protein kinase-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2000**, *347 Pt 1*, 255–263. [[CrossRef](#)]
116. Pacheco, N.D.S.; Tosetti, N.; Krishnan, A.; Haase, R.; Soldati-Favre, D. Revisiting the Role of *Toxoplasma gondii* ERK7 in the Maintenance and Stability of the Apical Complex. *mBio* **2021**, *12*, e02057-21. [[CrossRef](#)]
117. Hu, X.; O'Shaughnessy, W.J.; Beraki, T.G.; Reese, M.L. Loss of the Conserved Alveolate Kinase MAPK2 Decouples *Toxoplasma* Cell Growth from Cell Division. *mBio* **2020**, *11*, e02517-20. [[CrossRef](#)]
118. Berry, L.; Chen, C.-T.; Reininger, L.; Carvalho, T.G.; El Hajj, H.; Morlon-Guyot, J.; Bordat, Y.; Lebrun, M.; Gubbels, M.-J.; Doerig, C.; et al. The conserved apicomplexan Aurora kinase TgArk3 is involved in endodyogeny, duplication rate and parasite virulence. *Cell. Microbiol.* **2016**, *18*, 1106–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Solyakov, L.; Halbert, J.; Alam, M.M.; Semblat, J.-P.; Dorin-Semblat, D.; Reininger, L.; Bottrill, A.R.; Mistry, S.; Abdi, A.; Fennell, C.; et al. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Reininger, L.; Wilkes, J.M.; Bourgade, H.; Miranda-Saavedra, D.; Doerig, C. An essential Aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogony. *Mol. Microbiol.* **2011**, *79*, 205–221. [[CrossRef](#)]
121. Berry, L.; Chen, C.-T.; Francia, M.E.; Guerin, A.; Graindorge, A.; Saliou, J.-M.; Grandmougin, M.; Wein, S.; Bechara, C.; Morlon-Guyot, J.; et al. *Toxoplasma gondii* chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: A prerequisite for productive endodyogeny. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 4417–4443. [[CrossRef](#)]
122. Morahan, B.J.; Abrie, C.; Al-Hasani, K.; Batty, M.B.; Corey, V.; Cowell, A.N.; Niemand, J.; Winzeler, E.A.; Birkholtz, L.-M.; Doerig, C.; et al. Human Aurora kinase inhibitor Hesperadin reveals epistatic interaction between *Plasmodium falciparum* PfArk1 and PfNek1 kinases. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 701. [[CrossRef](#)]
123. Carvalho, T.G.; Doerig, C.; Reininger, L. Nima- and Aurora-related kinases of malaria parasites. *Inhib. Protein Kinases* **2013**, *1834*, 1336–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Guizetti, J.; Frischknecht, F. Apicomplexans: A conoid ring unites them all. *PLoS Biol.* **2021**, *19*, e3001105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Bertiaux, E.; Balestra, A.C.; Bournonville, L.; Louvel, V.; Maco, B.; Soldati-Favre, D.; Brochet, M.; Guichard, P.; Hamel, V. Expansion microscopy provides new insights into the cytoskeleton of malaria parasites including the conservation of a conoid. *PLoS Biol.* **2021**, *19*, e3001020. [[CrossRef](#)]



The Structural and Molecular Underpinnings of Gametogenesis in *Toxoplasma gondii*

Ramiro Tomasina¹ and María E. Francia^{1,2*}

¹ Laboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ² Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay

OPEN ACCESS

Edited by:

Karine Gaelle Le Roch,
University of California, Riverside,
United States

Reviewed by:

William J. Sullivan,
Indiana University Bloomington,
United States
Joseph Stone Doggett,
VA Portland Health Care System,
United States

*Correspondence:

María E. Francia
mfrancia@pasteur.edu.uy

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 19 September 2020

Accepted: 04 November 2020

Published: 07 December 2020

Citation:

Tomasina R and Francia ME (2020)
The Structural and Molecular
Underpinnings of Gametogenesis
in *Toxoplasma gondii*.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:608291.
doi: 10.3389/fcimb.2020.608291

Toxoplasma gondii is a widely prevalent protozoan parasite member of the phylum Apicomplexa. It causes disease in humans with clinical outcomes ranging from an asymptomatic manifestation to eye disease to reproductive failure and neurological symptoms. In farm animals, and particularly in sheep, toxoplasmosis costs the industry millions by profoundly affecting their reproductive potential. As do all the parasites in the phylum, *T. gondii* parasites go through sexual and asexual replication in the context of an heteroxenic life cycle involving members of the Felidae family and any warm-blooded vertebrate as definitive and intermediate hosts, respectively. During sexual replication, merozoites differentiate into female and male gametes; their combination gives rise to a zygotes which evolve into sporozoites that encyst and are shed in cat's feces as environmentally resistant oocysts. During zygote formation *T. gondii* parasites are diploid providing the parasite with a window of opportunity for genetic admixture making this a key step in the generation of genetic diversity. In addition, oocyst formation and shedding are central to dissemination and environmental contamination with infectious parasite forms. In this minireview we summarize the current state of the art on the process of gametogenesis. We discuss the unique structures of macro and microgametes, an insight acquired through classical techniques, as well as the more recently attained molecular understanding of the routes leading up to these life forms by *in vitro* and *in vivo* systems. We pose a number of unanswered questions and discuss these in the context of the latest findings on molecular cues mediating stage switching, and the implication for the field of newly available *in vitro* tools.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, sexual cycle, molecular cues, sexual differentiation, parasite dissemination

INTRODUCTION

Infecting about a third of the world's population *Toxoplasma gondii* is a widely prevalent protozoan parasite, member of the phylum Apicomplexa, and the etiological agent of toxoplasmosis (Dubey, 2013; Torgerson and Mastroiacovo, 2013; Sherri et al., 2017). Its success as a pathogen is partly owed to its proficiency in invading virtually any nucleated cell in an immense range of warm-blooded hosts, ranging from humans and farm animals, to birds and marine species. Its main mechanism of pathogenesis is a consequence of its obligate intracellular lifestyle, which inevitably culminates in the

lysis of the infected cell as the parasite replicates and expands. Notwithstanding, its ability to persist without killing the host is owed to its ability to switch from a fast dividing, disease-causing form, known as the tachyzoite, to a slow dividing, encysted/latent form, known as the bradyzoite. While the former is responsible for acute toxoplasmosis, the latter can persist chronically in its host. Acute toxoplasmosis most notably causes reproductive failure in humans, but it can also cause a range of clinical manifestations from eye to neurological disease in chronically infected immunocompromised individuals. Ocular toxoplasmosis is also frequent in congenitally or chronically infected immunocompetent individuals (Commodaro et al., 2009). In farm animals, and particularly in sheep, toxoplasmosis costs the industry millions by affecting reproductive outcomes (Dubey et al., 2020). Likewise, toxoplasmosis has been shown to greatly affect sensitive populations of wild animals, with particular effects on marine life and devastating ecological outcomes (Shapiro et al., 2019). A common route of infection for humans and other carnivores is the consumption of undercooked meat infected with bradyzoites lodged as cysts in skeletal muscle or the brain (Pinto-Ferreira et al., 2019). Vertical transmission is also possible when the infection is acquired by a naive host during pregnancy. Transmission is also possible by the serendipitous interaction with infective oocysts, shed by feline species in their feces.

Felines are *T. gondii*'s definitive host, whereby the parasite undergoes its sexual cycle. Sexual differentiation entails the formation of macro and a microgametes, and zygote formation can occur upon their combination. This process is key to the generation of genetic diversity as this is the only stage at which genetic admixing can occur as any other zoite life stage of this parasite is haploid. Equally important, this process is central to dissemination, as a single felid can shed hundreds of millions of oocysts, and these are stable in the environment for at least a year. The annual oocyst burden has been estimated to range from 3 to 434 oocysts per square foot in different community surveys in the United States. Oocyst burden is concentrated in areas where cats preferably defecate, this is places with loose soil, such as gardens, children's play areas, and sandboxes (Torrey and Yolken, 2013). An astonishing example of how potentially harmful oocysts can be in the environment is showcased by the toxoplasmosis epidemic in sea otters in coastal California. Infectious oocysts shed by domestic cats, located many miles away, are dragged along by the river that flows into the otter's natural aquatic habitat (Miller et al., 2002; Conrad et al., 2005; Shapiro et al., 2012; Vanwormer et al., 2013). Close to 9% of their mortality can be ascribed to meningoencephalitis caused by *Toxoplasma* (Thomas and Cole, 1996; Shapiro et al., 2019).

Understanding the biology of the life forms that precede the formation of infective oocyst, is, in addition to a fascinating ill-understood source of biological data, central to developing efficient intervention strategies to prevent their formation and spread. Here, we review the current state of the art on gametogenesis, integrating the plethora of fantastic structural insight acquired through classical microscopy with exciting new molecular insights provided by *in vitro* and *in vivo* systems on the molecular cues facilitating stage switching.

THE LIFE STAGES OF TOXOPLASMA GONDII

The life forms of *T. gondii* can be generally grouped in two; the ones that replicate clonally and those that are generated by combination of gametes.

The asexually or clonally replicating forms develop in warm-blooded intermediate hosts whereby two distinct forms can be identified; the tachyzoite and the bradyzoite. The tachyzoite is a highly proliferative form commonly associated with acute infection, reactivation, and vertical transmission. The bradyzoite, on the other hand, is a latent, albeit metabolically active, slow growing encysted form. Bradyzoites are commonly associated with the chronic stages of toxoplasmosis, persistence, immune evasion, and are refractory to currently available anti-toxoplasmosis pharmacotherapies (Weiss and Kim, 2000; Lyons et al., 2002; Dzierzinski et al., 2004; Sullivan and Jeffers, 2012; Knoll et al., 2013; Watts et al., 2015; Sinai et al., 2017; Cerutti et al., 2020). Evasion is mediated by cell type tropism and sequestration to immune-privileged sites such as the brain and skeletal muscle, as well as the process of encystation (Sullivan and Jeffers, 2012; Knoll et al., 2013). Both tachyzoites and bradyzoites follow a cell division scheme known as endodyogeny consisting of a single round of DNA replication by semi-closed nuclear mitosis. The internal assembly of two daughter cells occurs concomitantly with nuclear mitosis, inside the mother cell (Francia and Striepen, 2014; White and Suvorova, 2018; Gubbels et al., 2020). Tachyzoite cell division is rapid, generating two new cells per mother cell every 6–8 h. Bradyzoites instead divide slower but can assemble and sustain between 1000–2000 bradyzoites per cyst (Weiss and Kim, 2000; Knoll et al., 2013).

When a feline eats undercooked meat infected with a cyst containing bradyzoites, most commonly from an infected mouse, the parasite can gain access to the definitive host's gastrointestinal tract [Figure 1A (Dubey, 2006)]. Here, it can develop into either one of two life-forms: the tachyzoite or a merozoite. As in other hosts, tachyzoites can disseminate throughout the feline body and switch to bradyzoite residing in immune-privileged sites. However, clinical signs of toxoplasmosis are rarely observed in cats. The disease is more likely to occur in cats with suppressed immune systems, including young kittens and cats with feline leukemia virus (FeLV) or feline immunodeficiency virus (FIV). Toxoplasmosis is more severe in transplacentally infected kittens which can develop a variety of clinical manifestations ranging from hepatitis to cholangiohepatitis, pneumonia, and encephalitis (Dubey and Carpenter, 1993a; Dubey and Carpenter, 1993b; Webb et al., 2005; Calero-Berna and Gennari, 2019). More frequently, however, bradyzoites will differentiate into merozoites within the feline enterocytes (Figures 1B, C) (Frenkel, 1973; Dubey et al., 1998; Weiss and Kim, 2000; Webb et al., 2005; Dubey, 2009; Dubey, 2013). This transformation initiates with several rounds of rapid asexual expansion within the intestinal epithelium as merozoites, initiating the sexual replication track.

While tachyzoites invade and replicate extra-intestinally, merozoites develop only within enterocytes. Recent work by Hehl and col. identified important gene expression differences between tachyzoites and merozoites that could underlie this cell

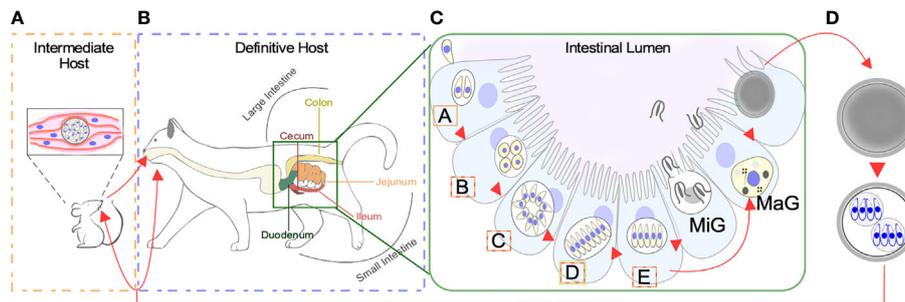


FIGURE 1 | Life Stages of *Toxoplasma gondii*. **(A)** Warm blooded animals can act as intermediate hosts. Slow dividing bradyzoites can persist both in the brain and skeletal muscle within a tissue cyst. Transmission of bradyzoites can occur through carnivorous. Intermediate hosts can be infected by sporulated oocyst contaminating the environment. **(B)** Species from the Felidae family act as definitive hosts. Infection can occur by consuming tissue cysts containing bradyzoites, or sporozoites contained within sporulated oocysts. Differentiation of bradyzoites into asexually expanding merozoites happens along the intestinal tract. **(C)** Bradyzoites will sequentially differentiate into A-E merozoites prior to giving rise to macro (MaG) and micro (MiG) gametes. The intestinal segment where each meront is found more often is color coded according to B. **(D)** Combination of MaG and MiG gives rise to a unsporulated oocysts which mature in the environment becoming sporulated, sporozoite containing, infective oocysts.

type tropism. A subset of well characterized dense-granule (GRA), microneme (MIC), and rhoptry (ROP) genes, known to be involved in attachment, invasion, and host cell modification to allow intracellular replication, are exclusively expressed in tachyzoites, and notably downregulated in merozoites. Merozoites seem to preferentially express a large subset of surface membrane proteins, known as SAG1-related sequences (SRS) for their homology to the surface antigen protein TgSag1, making them enterocyte-interaction competent (Speer and Dubey, 1998; Ferguson, 2004; Hehl et al., 2015). This is consistent with findings in *Plasmodium* whereby gamete-gamete interaction, recognition, and fertilization is mediated by a family of proteins, known as the Pfs-230-related 6-Cys adhesins, characterized by the presence of the SRS fold (Arredondo and Kappe, 2017). In addition, SRS proteins have been proposed to stimulate immune responses stimulating molecules, playing a role in intestinal inflammation and diarrhea, thereby potentially contributing to the dispersal of oocysts from felines (Hehl et al., 2015).

STRUCTURAL ASPECTS OF *T. GONDII* GAMETES AND PRE-GAMETE STAGES

Only 2 days after tissue cysts are ingested by the cat, micro and macrogametes are formed initiating the sexual cycle (Dubey et al., 1998). Our knowledge on the ultrastructure of pre-sexual stages is set on outstanding electron microscopy studies done in the 60's and 70's (Colley and Zaman, 1970; Melton and Sheffield, 1970; Pelster and Piekarski, 1971; Frenkel and Dubey, 1972; Sinden et al., 1976). Work by Dubey & Frankel systematically recorded the morphological details of five pre-gamete stages, named A to E, sequentially formed upon colonization of the epithelial cells of the small and large cat's intestine (Dubey and Frenkel, 1972) (Figures 1B, C). Of these, only D or E meronts may differentiate into sexual gametes. Type A merozoites are

readily observed, 12–18 h post infection. Their shape is round and they are commonly found singly or as a collection of 2 or 3. A meronts are commonly found in the jejunum, at the surface of the epithelium and in the lamina propria. How these meronts replicate exactly, remains elusive (Dubey and Frenkel, 1972). Type B meronts are observable 12–54 h post infection, are ovoid in shape, and commonly found in the jejunum, the ileum, at the surface of the epithelium (near the base of villi) and in the lamina propria, and more rarely in the glandular epithelium. B meronts replicate by endodyogeny and endopolygeny (Dubey and Frenkel, 1972). C meronts are observable 24–54 h post infection. Their shape is elongated, and they are found at the same locations as B meronts. C meronts are thought to replicate by schizogony following a rosette pattern (Dubey and Frenkel, 1972). Type D meronts are observable between 40 h and 15 days after infection. Their shape is elongated, and they are commonly found in the jejunum, ileum and the colon (Dubey et al., 1998). Type D meronts can be further classified in three subtypes; subtype I, found 48–72 h post infection, divides by endopolygeny and is found in groups of 2–4. Subtype II is found 3–15 days post infection, divides by schizogony and is found in groups of 5–35 merozoites. Subtype III merozoites albeit ill-defined, are thought to arise from “splitting”; a sort of modified schizogony whereby a large uninucleated cytosolic mass parcels into single meronts (Dubey and Frenkel, 1972). Finally, type E meronts appear 3–15 days after infection. Their shape is elongated, and they are commonly found in the jejunum, ileum, and seldomly in the colon. They replicate by schizogony (Dubey and Frenkel, 1972).

Upon asexual differentiation of meront type (A–E), gametogenesis is preceded by the formation of macro and micro gamonts. Gamonts are detectable 3–15 days after experimental inoculation of kittens with infective oocyst (Dubey et al., 1998). Gamonts are found throughout the small intestine, especially in the ileum. The precursor of the male gametocyte, the microgamont, is of ovoid shape and represents 2%–4% of the mature gametocyte population. Microgamonts can yield 6–21 microgametes, with a mean of 12. They are ellipsoidal,

with the nucleus occupying much of the cell body. The anterior end is a pointed structure called the perforatorium, within which reside two microtubule organizing centers (MTOCs) acting as basal bodies organizing two posterior flagella (Dubey et al., 1998; Ferguson and Dubremetz, 2013; Francia et al., 2016; Morlonguyot et al., 2017). On the other hand, macrogamonts are subspherical containing a single nucleus. Each macrogamont will give rise to a single macrogamete (Dubey and Frenkel, 1972). The cytosol of macrogamonts is populated with protein-rich wall forming bodies, polysaccharide granules and lipid droplets, which will all contribute to wall formation by sequentially releasing their content during oocyst maturation (Ferguson et al., 1975; Freppel et al., 2019). The oocyst wall starts forming within the host cell before the macrogamete is released, implying that fertilization has to take place inside the host cell (Freppel et al., 2019).

Macro and microgamete formation are not equilibrated in output. Every round of gametogenesis produces 1 macrogamete, and 15–30 microgametes. The number of macrogametes exceeds the number of microgametes by an average of 19-fold (Ferguson, 2002). Given that *T. gondii* can efficiently proliferate asexually, it has been proposed that sexual proliferation only provides a real advantage when the possibility of producing genetic diversity between different strains infecting the same feline exists. When a single strain is involved in this process, zygote formation based on fertilization has been argued as an extremely inefficient process (Ferguson, 2002). Quantification of the relative frequencies obtained from genetic crosses between two parental strains with distinct drug resistance phenotypes, suggest that sexual differentiation yields Mendelian inheritance patterns in the progeny, arguing that oocysts are only formed by fecundation (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1980). However, the only physical evidence supporting fertilization that has been generated, to our knowledge, is an electron micrograph showing several microgametes attached to an extracellular macrogamete, taken by Ferguson [Figure 4 in (Ferguson, 2002)]. Based upon this, Ferguson proposed that the ample efficiency with which oocyst are shed could be explained by the formation of oocysts from macrogametes alone through parthenogenesis (Ferguson, 2002). Though this hypothesis has not yet been experimentally tested, the unbalanced output of gametogenesis together with the long journey that every microgamete has to do to fertilize one macrogamete, has complicated the visualization of the process and its definitive understanding. Hence, how, when and where fertilization happens in the gut of the felids is still to be deciphered (Ferguson and Dubremetz, 2013).

Unsporulated oocyst are shed by cat in their feces (Figure 1D). These sporulate 1–5 days after shedding, forming a mature infection-competent oocyst. Sporulation is temperature-dependent; it is optimally efficient at temperatures closer to 25°C; delayed at temperatures lower than 15°C and inhibited at 37 or 4°C. Presence of oxygen is also required for oocyst sporulation and infectivity (Dubey et al., 1970). Each sporulated oocyst contains two sporocyst with four sporozoites each (Dubey et al., 1970). This stage is equipped with a multilayer wall that protects it from adverse environmental conditions, this being the only stage of the whole

cycle of this parasite that develops outside the host cell (Ferguson and Dubremetz, 2013) (Ferguson et al., 1975).

MOLECULAR AND STRUCTURAL LINKS BETWEEN ASEXUAL AND SEXUAL REPLICATION

From Cell Division Control to Orchestrating Motility: The Microtubule Organizing Centers of *T. gondii* in the Context of Microgamete Formation

Toxoplasma gondii assembles two flagella per cell only when differentiated to microgamete. For fertilization to take place, every microgamete leaves the host cell where it was generated, swims across the intestinal lumen, finds a host cell containing a macrogamete, crosses the cell membrane, and fecundates the macrogamete (Ferguson, 2002). Because fertilization of a macrogamete requires the microgamete to be able to move, the flagella play a pivotal role in licensing this step. Ultimately, if oocyst formation relies on fertilization, then microgamete mobility is paramount to *T. gondii*'s environmental dissemination.

The flagellar axoneme consists of 9 microtubule doublets and a central pair of microtubules, and it is nucleated from a centriole-based basal body, formed by two microtubule-based barrels known as centrioles (Dubremetz, 1971; Dubremetz, 1973; Morrissette and Sibley, 2002a; Morrissette and Sibley, 2002b; Francia et al., 2016). In related coccidian species, such as *Eimeria* and *Sarcocystis*, basal body structure has been proposed to consist of either 9 + 0 or 9 + 2 singlets microtubules, or a canonical basal body, akin to what is observed in metazoan, formed by 9 + 0 triplet microtubules. The exact basal body structure of *T. gondii* remains unclear. However, electron micrographs suggest that it could consist of a 9 + 1 singlet microtubule structure (Pelster and Piekarski, 1971; Scholtyseck et al., 1972; Vetterling et al., 1973; Ferguson et al., 1974; Mehlhorn and Heydorn, 1979; Mueller et al., 1981; Morrissette and Sibley, 2002a; Walker et al., 2013; Francia et al., 2016; Morrissette and Gubbels, 2020).

The centrosome is the main microtubule organizing center from which most basal bodies derive during flagellar assembly in other species. In *T. gondii* the centrosome of asexual stages consists of two 200 nm x 200 nm parallel centrioles with a 9 + 1 singlet microtubule geometry, a morphology that is notably distinct from canonical centrosomes and basal bodies (Dubremetz, 1971; Dubremetz, 1973; Morrissette and Sibley, 2002a; Francia and Striepen, 2014; Suvorova et al., 2015; Francia et al., 2016). Because the geometries and microtubule composition of the *T. gondii* basal body are ill-defined, it is still unclear whether it assembles from the asexual stage centrioles, or whether it is assembled *de novo*. *De novo* basal body synthesis has been proposed for *Plasmodium* sexual stages, as the asexual stages organize their asexual cell division through a “centriolar plaque” which consist of a few conserved components of other microtubule organizing centers, such as the centrosome, but lacks centrioles (Francia et al., 2016).

Canonical centriole biogenesis involves the hierarchical and sequential layout of structural components, catalyzed by

overlapping regulatory signals in coordination with cell cycle progression. In metazoan, specialized kinases, such as PLK-4, Zyg1, or PLK1 trigger the centriole assembly cascade. An evolutionary conserved and ancestral protein module (known as UNIMOD; which includes SAS-6, SAS4/CPAP, and SAS5/STIL) whose occurrence is correlated with presence or loss of centrioles has been proposed to control centriole biogenesis, and to have emerged in the LECA (last eukaryotic common ancestor). However, homologs for the kinases, STIL, and other UNIMOD components, are not encoded for in the genome of *T. gondii*. Interestingly, the genome of *T. gondii* encodes for two SAS6 homologs (de Leon et al., 2013). SAS6 is a highly conserved and it is responsible for the cartwheel assembly, crucial for establishing centriole and basal body geometry. One of the homologs is found at the centrosome (TgSAS6) while the other one, named SAS6-Like (TgSAS6L), is located at the conoid, a structure proposed to have emerged from an ancestral MTOC whose original function was to nucleate flagella (Francia et al., 2012; de Leon et al., 2013; Back et al., 2020; O'Shaughnessy et al., 2020). Indeed, de Leon, and col., showed that a SAS6L homolog localizes to the basal body of the flagellated trypanosomatid, *Trypanosoma brucei*, leading them to propose that SAS6L could exhibit a similar localization in *T. gondii* (de Leon et al., 2013).

Canonical centriole biogenesis encompasses different isoforms of tubulins (involved in microtubule nucleation). Many of the homologs of these proteins were identified in *T. gondii*, while others are seemingly missing (Suvorova et al., 2015; Morlon-guyot et al., 2017). The presence of three α - and β -tubulin isoforms genes, δ - and ϵ -tubulin, SAS6 and SAS4 coding genes, indicate that this parasite could potentially assemble a canonical 9 + 0 triplet microtubule basal body (Nagel and Boothroyd, 1988; Garreau de Loubresse et al., 2001; Dupuis-Williams et al., 2002; Dutcher et al., 2002; Marshall and Rosenbaum, 2003; Xiao et al., 2010; Ross et al., 2013). In line with this, recent work by Ramakrishnan and col. found that the protein bearing the highest degree of similarity to ϵ -tubulin present in *T. gondii* genome, (originally annotated as β 3-tubulin, but reclassified as ϵ -tubulin by Morlon-guyot et al., 2017), is indeed expressed in the enteroepithelial stages (Ramakrishnan et al., 2019).

T. gondii also encodes for a homolog of the centrosomal protein 164 (Cep164); homologs of this protein form appendages, a molecular signature that distinguishes the mother centriole from the daughter centriole in a basal body. Appendages serve to anchor the mother centriole to the membrane, enabling it to nucleate the flagellar axoneme. Though its role has not been explored, TgCEP164 could potentially be important for basal body anchoring (Morrisette, 2015; Morlon-guyot et al., 2017). Consistently, this protein does not express in aflagellated tachyzoites or bradyzoites as determined by asexual stages transcriptomic and proteomic experiments (Morlon-guyot et al., 2017). In contrast, evidence for TgCEP164 expression in enteroepithelial stages supports its functional role in sexual stages (Ramakrishnan et al., 2019).

Once flagella have been built, their maintenance requires several proteins. Intraflagellar Transport (IFT) is required to move structural and signaling components of the axoneme from the cell body to the tip and vice versa. IFTs and motor proteins such as kinesin and dynein coding genes can be identified in the

Toxoplasma gondii genome (Farhat et al., 2020). However, their role in flagellar maintenance and parasite biology has not been explored.

Where Am I? Molecular Cues Directing Gamete Formation Only in the Cat

The use of cats as experimental models has obvious ethical implications, it is costly and requires specialized animal housing facilities unavailable in the vast majority of research institutes. Notwithstanding, work done based on oocysts produced this way has been crucial in uncovering phenomena central to *T. gondii* dissemination and pathogenesis, including a plethora of structural studies (some, detailed above), as well as functional genomic and proteomic assays. Nonetheless, a long standing question in the field has been; why cats? In other words, what are the molecular cues that elicit the differentiation of *T. gondii* from bradyzoites into merozoites and then into gametocytes, exclusively at the cat's intestinal epithelia. How are these signals interpreted and translated within the parasite?

Approaching this question has been technically challenging, as in principle it requires the use of companion animals as experimental models, and the temporal resolution of distinct stages is complicated by their overlap in *in vivo* infections. However, more cost-efficient, animal-friendly alternatives have been developed allowing researchers to dive into questions that were once inaccessible. One of such milestones has been the work done on enterocyte 2D cell cultures, and the generation of 3D enteroids, as models to study the interactions between the parasite and enterocytes (Moura et al., 2009; Luu et al., 2019). Though these approaches have greatly contributed, these can only partially replicate stage conversion.

More recently, an *in vitro* approach aimed at replicating the intestinal gut environment in 2D cultures has significantly contributed in this sense. Breakthrough work by Martorelli Di Genova and colleagues, approached a long-standing mystery in the field: what is the biochemical footprint that makes felines the selected definitive host? Briefly, the authors identified that host-specificity to felines in the sexual stage is owed to the accumulation of linoleic acid, given by the lack of delta-6-desaturase activity in their intestines, (Di Genova et al., 2019). Felines are the only mammals that lack this enzyme activity in their intestines. Remarkably, inhibiting this enzyme's activity alone, and supplementing mice diet with an excess of linoleic acid, allowed them to now become *T. gondii* infectious oocyst spreaders (Di Genova et al., 2019).

The flip side of the question (i.e. what is happening within the parasite to elicit sexual differentiation)? was also recently approached and teased out. Farhat and colleagues found that a microorchidia homologue, named MORC1, assembles a complex with histone deacetylase 3 (HDAC3) and a number of apicomplexan transcription factors well known to influence stage transitions, known as ApiAP2s (Balaji et al., 2005; Farhat et al., 2020). MORC1 also regulates HAP2, a gene known to be required for macrogamete fertilization by the microgamete both in *T. gondii* and in *Plasmodium* (Liu et al., 2008; Angrisano et al., 2017; Ramakrishnan et al., 2019; Farhat et al., 2020).

Interestingly HAP2 depletion leads to oocysts that are unable to sporulate. (Ramakrishnan et al., 2019).

Though formation of oocysts was not reported, conditional depletion of MORC1 was shown to elicit *in vitro* sexual differentiation by evidencing the formation of flagellar like structures, labeled by the expression of epitope tagged PF16, an armadillo repeat protein essential for flagellar function, in tissue culture. Therefore, MORC1 was put forward as a master regulator, controlling different transcriptional programs involved in stage transitions of sexual development (Farhat et al., 2020). Consistent with its proposed role, MORC1 depletion elicits gene expression of bradyzoite specific genes, 85% of the merozoite-specific transcripts, including those coding for proteins that are important for merozoite development like GRA11a, GRA11b, and merozoite-restricted surface proteins (SRS), as well as putative flagellar and basal body assembly proteins of the microgamete; six IFTs, nine kinesins, 11 dyneins, one basal body protein, and three radial spoke proteins (Farhat et al., 2020). Furthermore, MORC1 depletion derepresses the expression of 89% oocyst specific genes and almost all proteins present in fully sporulated oocyst (Farhat et al., 2020). MORC1 depletion also triggered expression of AP2IX-9, an ApiAP2 shown to prevent merozoites from switching back to bradyzoite, keeping the unidirectionality of the sexual stage development (Farhat et al., 2020). Downregulation of the tachyzoite invasion machinery was shown to accompany these processes (Hehl et al., 2015; Farhat et al., 2020).

CLOSING REMARKS

Understanding the biochemical footprint that made felines the selected host by *T. gondii* to complete its sexual differentiation constitutes a milestone in our comprehension on the biology of

this parasite and a major technical breakthrough. The use of *in vitro* models for the study of sexual stages has opened the possibility for large scale molecular, dynamic and structural studies, avoiding the ethical considerations and technical limitations of using domestic animals as experimental models. No longer requiring the use of companion animals to quantitatively access sexual stages provides the scientific community with an unprecedented opportunity to dive into once unattainable biological questions relevant to persistence and dissemination such as those pertaining to basal body and flagellar assembly.

Understanding the molecular pathway leading up to committing to sexual stages is equally important, providing the potential of developing strategies to fight this parasite at the very origin of differentiation. These findings pave the way for generating genetically admixed strains *in vitro* opening new avenues for vaccine development, and new cell culture-based drug screening platforms for drugs aimed at sexual stages and the oocyst.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RT and MF wrote the manuscript and designed the Figure. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

RT and MF are funded by an installation grant by Banco de Seguros del Estado. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

REFERENCES

- Angrisano, F., Sala, K. A., Da, D. F., Liu, Y., Pei, J., Grishin, N. V., et al. (2017). Targeting the Conserved Fusion Loop of HAP2 Inhibits the Transmission of *Plasmodium berghei* and *falciparum*. *Cell Rep.* 47 (7), 409–423. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.024
- Arredondo, S. A., and Kappe, S. H. II (2017). The s48/45 six-cysteine proteins: mediators of interaction throughout the *Plasmodium* life cycle. *Int. J. Parasitol.* doi: 10.1016/j.ijpara.2016.10.002
- Back, P. S., O'Shaughnessy, W. J., Moon, A. S., Dewangan, P. S., Hu, X., Sha, J., et al. (2020). Ancient MAPK ERK7 is regulated by an unusual inhibitory scaffold required for *Toxoplasma* apical complex biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117 (22), 12164–73. doi: 10.1073/pnas.1921245117
- Balaji, S., Madan Babu, M., Iyer, L. M., and 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 Res.* 117 (22), 12164–12173. doi: 10.1093/nar/gki709
- Calero-Berna, R., and Gennari, S. M. (2019). Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: An update. *Front. Vet. Sci.* 6:54. doi: 10.3389/fvets.2019.00054
- Cerutti, A., Blanchard, N., and Besteiro, S. (2020). The bradyzoite: A key developmental stage for the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis. *Pathogens.* doi: 10.3390/pathogens9030234
- Colley, F. C., and Zaman, V. (1970). Observations on the endogenous stages of *Toxoplasma gondii* in the cat ileum. II. Electron microscope study. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1, 465–480.
- Commodaro, A. G., Belfort, R. N., Rizzo, L. V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier, M. N., et al. (2009). Ocular toxoplasmosis - An update and review of the literature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi: 10.1590/S0074-02762009000200030
- Conrad, P. A., Miller, M. A., Kreuder, C., James, E. R., Mazet, J., Dabritz, H., et al. (2005). Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int. J. Parasitol.* doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.002
- de Leon, J. C., Scheumann, N., Beatty, W., Beck, J. R., Tran, J. Q., Yau, C., et al. (2013). A sas-6-like protein suggests that the *Toxoplasma* conoid complex evolved from flagellar components. *Eukaryot. Cell.* doi: 10.1128/EC.00096-13
- Di Genova, B. M., Wilson, S. K., Dubey, J. P., and Knoll, L. J. (2019). Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol.* 17, 1–19. doi: 10.1371/journal.pbio.3000364
- Dubey, J., and Carpenter, J. (1993a). Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 case-1990. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1556–1566.
- Dubey, J., and Carpenter, J. (1993b). Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1546–1549.
- Dubey, J. P., and Frenkel, J. K. (1972). Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats. *J. Protozool.* 19, 155–177. doi: 10.1111/j.1550-7408.1972.tb03431.x
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* 132, 636–662. doi: 10.1084/jem.132.4.636
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–299.

- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., and Su, C. (2020). Economic and public health importance of *Toxoplasma gondii* infections in sheep: 2009–2020. *Vet. Parasitol.* 286, 109195. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109195
- Dubey, J. P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.018
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 877–882. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.01.005
- Dubey, J. P. (2013). “Chapter 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*,” in *Toxoplasma Gondii (Second Edition)*. Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 19–59. doi: 10.1016/B978-0-12-396481-6.00001-5
- Dubremetz, J. (1971). L’ultrastructure du centriole et du centrocone chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Étude au cours de la schizogonie. *J. Microsc.* 23, 453–458.
- Dubremetz, J. (1973). Ultrastructural study of schizogonic mitosis in the coccidian, *Eimeria necatrix* (Johnson 1930). *J. Ultrastruct. Res.* 42, 354–376.
- Dupuis-Williams, P., Fleury-Aubusson, A., De Loubresse, N. G., Geoffroy, H., Vayssié, L., Galvani, A., et al. (2002). Functional role of ϵ -tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* 158, 1183–1193. doi: 10.1083/jcb.200205028
- Dutcher, S. K., Morrissette, N. S., Preble, A. M., Rackley, C., and Stanga, J. (2002). ϵ -Tubulin Is an Essential Component of the Centriole. *Mol. Biol. Cell* 13, 3761–4109.
- Dziarszynski, F., Nishi, M., Ouko, L., and Roos, D. S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot. Cell* doi: 10.1128/EC.3.4.992-1003.2004
- Farhat, D. C., Swale, C., Dard, C., Cannella, D., Ortet, P., Barakat, M., et al. (2020). A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. *Nat. Microbiol.* doi: 10.1038/s41564-020-0674-4
- Ferguson, D. J. P., and Dubremetz, J. F. (2013). “Chapter 2 - The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*,” in *Toxoplasma Gondii (Second Edition)*. Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 19–59. doi: 10.1016/B978-0-12-396481-6.00002-7
- Ferguson, D. J. P., Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., and Siim, J. C. (1974). Ultrastructural Study of Early Stages of Asexual Multiplication and Microgametogony of *Toxoplasma Gondii* in the Small Intestine of the Cat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* 82 B, 167–181. doi: 10.1111/j.1699-0463.1974.tb02309.x
- Ferguson, D. J. P., Hutchison, W. M., and Siim, J. C. (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B* 83, 491–505.
- Ferguson, D. J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: Essential or optional extra? *Trends Parasitol.* 18, 351–355. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02330-9
- Ferguson, D. J. P. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* 34, 347–360. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.11.024
- Francia, M. E., and Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 125–136. doi: 10.1038/nrmicro3184
- Francia, M. E., Jordan, C. N., Patel, J. D., Sheiner, L., Demerly, J. L., Fellows, J. D., 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. doi: 10.1371/journal.pbio.1001444
- Francia, M. E., Dubremetz, J.-F., and Morrissette, N. S. (2016). Basal body structure and composition in the apicomplexans *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Cilia* 5. doi: 10.1186/s13630-016-0025-5
- Frenkel, J., and Dubey, J. (1972). Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J. Infect. Dis.* 126, 664–673.
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience* 23, 343–352. doi: 10.2307/1296513
- Freppel, W., Ferguson, D. J. P., Shapiro, K., Dubey, J. P., Puech, P. H., and Dumètre, A. (2019). Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. *Cell Surf.* doi: 10.1016/j.tcs.2018.100016
- Garreau de Loubresse, N., Ruiz, F., Beisson, J., and Klotz, C. (2001). Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol.* 2. doi: 10.1186/1471-2121-2-4
- Gubbels, M. J., Keroack, C. D., Dangoudoubyam, S., Worliczek, H. L., Paul, A. S., Bauwens, C., et al. (2020). Fussing About Fission: Defining Variety Among Mainstream and Exotic Apicomplexan Cell Division Modes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:269. doi: 10.3389/fcimb.2020.00269
- Hehl, A. B., Basso, W. U., Lippuner, C., Ramakrishnan, C., Okoniewski, M., Walker, R. A., et al. (2015). Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. *BMC Genomics* 16, 1–16. doi: 10.1186/s12864-015-1225-x
- Knoll, L. J., Tomita, T., and Weiss, L. M. (2013). “Chapter 15 - Bradyzoite Development,” in *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition*. Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 521–549. doi: 10.1016/B978-0-12-396481-6.00015-5
- Liu, Y., Tewari, R., Ning, J., Blagborough, A. M., Garbom, S., Pei, J., et al. (2008). The conserved plant sterility gene. *Genes Dev.* 22, 1051–1068. doi: 10.1101/gad.1656508.plasma
- Luu, L., Johnston, L. J., Derricott, H., Armstrong, S. D., Randle, N., Hartley, C. S., et al. (2019). An open-format enteroid culture system for interrogation of interactions between *Toxoplasma gondii* and the intestinal epithelium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi: 10.3389/fcimb.2019.00300
- Lyons, R. E., McLeod, R., and Roberts, C. W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* doi: 10.1016/S1471-4922(02)02248-1
- Marshall, W. F., and Rosenbaum, J. L. (2003). Tubulin superfamily: Giving birth to triplets. *Curr. Biol.* 13, 55–56. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01427-6
- Mehlhorn, H., and Heydorn, A. (1979). Electron microscopical study on gamogony of *Sarcocystis suis hominis* in human tissue cultures. *Z. Parasitenkd.* 58, 97–113.
- Melton, M. L., and Sheffield, H. G. (1970). *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Sci. (80-)* 167 (3919), 892–893. doi: 10.1126/science.167.3919.892
- Miller, M. A., Gardner, I. A., Kreuder, C., Paradies, D. M., Worcester, K. R., Jessup, D. A., et al. (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.* 32, 997–1006. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00069-3
- Morlon-guyot, J., Francia, M. E., Dubremetz, J., and Wassim, D. (2017). Towards a molecular architecture of the centrosome in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton* 74 (2), 55–71. doi: 10.1002/cm.21353
- Morrissette, N., and Gubbels, M.-J. (2020). “Chapter 16 - The *Toxoplasma* cytoskeleton: structures, proteins, and processes,” in *Toxoplasma gondii (Third Edition)*. Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 743–788. doi: 10.1016/b978-0-12-815041-2.00016-5
- Morrissette, N. S., and Sibley, L. D. (2002a). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21–38.
- Morrissette, N. S., and Sibley, L. D. (2002b). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 115, 1017–1025.
- Morrissette, N. (2015). Targeting *Toxoplasma* tubules: Tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell* 14, 2–12. doi: 10.1128/EC.00225-14
- Moura, M., de Amendoeira, M. R. R., and Barbosa, H. S. (2009). Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* doi: 10.1590/S0074-02762009000600007
- Mueller, B. E., Desser, S. S., and Haberkorn, A. (1981). Ultrastructure of developing gamonts of *Eimeria contorta* Haberkorn (Protozoa, Sporozoa) with emphasis on the host-parasite interface. *J. Parasitol.* 67, 487–495.
- Nagel, S. D., and Boothroyd, J. C. (1988). The α - and β -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 261–273. doi: 10.1016/0166-6851(88)90081-3
- O’Shaughnessy, W. J., Hu, X., Beraki, T., McDougal, M., and Reese, M. L. (2020). Loss of a conserved MAPK causes catastrophic failure in assembly of a specialized cilium-like structure in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* doi: 10.1091/MBC.E19-11-0607
- Pelster, B., and Piekarski, G. (1971). Elektronenmikroskopische Analyse der Mikrogametenentwicklung bei *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenkd.* 37, 267–277. doi: 10.1007/BF00259333
- Pfefferkorn, L. C., and Pfefferkorn, E. R. (1980). *Toxoplasma gondii*: Genetic recombination between drug resistant mutants. *Exp. Parasitol.* 50, 305–316. doi: 10.1016/0014-4894(80)90034-X
- Pinto-Ferreira, F., Caldart, E. T., Pasquali, A. K. S., Mitsuka-Breganó, R., Freire, R. L., and Navarro, I. T. (2019). Patterns of transmission and sources of infection in

- outbreaks of human toxoplasmosis. *Emerg. Infect. Dis.* 25 (12), 2177–2182. doi: 10.3201/eid2512.181565
- Ramakrishnan, C., Maier, S., Walker, R. A., Rehrauer, H., Joekel, D. E., Winiger, R. R., et al. (2019). An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of *Toxoplasma gondii* by cats. *Sci. Rep.* 9, 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-37671-8
- Ross, I., Clarissa, C., Giddings, T. H., and Winey, M. (2013). ϵ -tubulin is essential in *Tetrahymena thermophila* for the assembly and stability of basal bodies. *J. Cell Sci.* 126, 3441–3451. doi: 10.1242/jcs.128694
- Scholtyssek, E., Mehlhorn, H., and Hammond, D. (1972). Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups. *Z. Parasitenkd.* 38, 95–131.
- Shapiro, K., Miller, M., and Mazet, J. (2012). Temporal association between land-based runoff events and California sea otter (*Enhydra lutris nereis*) protozoal mortalities. *J. Wildl. Dis.* doi: 10.7589/0090-3558-48.2.394
- Shapiro, K., VanWormer, E., Packham, A., Dodd, E., Conrad, P. A., and Miller, M. (2019). Type X strains of *Toxoplasma gondii* are virulent for southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and present in felids from nearby watersheds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286. doi: 10.1098/rspb.2019.1334
- Sherri, H., White, M. W., and Sullivan, W. J. (2017). crossm. *mSphere* 2, 1–16.
- Sinai, A. P., Watts, E. A., Dhara, A., Murphy, R. D., Gentry, M. S., and Patwardhan, A. (2017). Activity for a “Dormant” Parasite. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 3, 175–185. doi: 10.1007/s40588-016-0045-3.Reexamining
- Sinden, R. E., Canning, E. U., and Spain, B. (1976). Gametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*: a transmission electron microscope study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 76, 55–76.
- Speer, C. A., and Dubey, J. P. (1998). Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 116, 35–42. doi: 10.1017/S0031182097001959
- Sullivan, W. J., and Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x
- Suvorova, E. S., Francia, M., Striepen, B., and White, M. W. (2015). A Novel Bipartite Centrosome Coordinates the Apicomplexan Cell Cycle. *PLoS Biol.* 13. doi: 10.1371/journal.pbio.1002093
- Thomas, N. J., and Cole, R. A. (1996). The risk of disease and threats to the wild population. Special Issue: Conservation and Management of the Southern Sea Otter. *Endanger. Species Update.*
- Torgerson, P. R., and Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* doi: 10.2471/blt.12.111732
- Torrey, E. F., and Yolken, R. H. (2013). *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol.* 29, 380–384. doi: 10.1016/j.pt.2013.06.001
- Vanwormer, E., Conrad, P. A., Miller, M. A., Melli, A. C., Carpenter, T. E., and Mazet, J. A. K. (2013). *Toxoplasma gondii*, source to sea: Higher contribution of domestic felids to terrestrial parasite loading despite lower infection prevalence. *Ecohealth.* doi: 10.1007/s10393-013-0859-x
- Vetterling, J. M., Pacheco, N. D., and Fayer, R. (1973). Fine Structure of Gametogony and Oocyst Formation in *Sarcocystis* sp. in Cell Culture. *J. Protozool.* 20, 613–621. doi: 10.1111/j.1550-7408.1973.tb03585.x
- Walker, R. A., Ferguson, D. J. P., Miller, C. M. D., and Smith, N. C. (2013). Sex and Eimeria: A molecular perspective. *Parasitology* 140, 1701–1717. doi: 10.1017/S0031182013000838
- Watts, E., Zhao, Y., Dhara, A., Eller, B., Patwardhan, A., and Sinai, A. P. (2015). Novel approaches reveal that *Toxoplasma gondii* bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo. *MBio* 6, 1–24. doi: 10.1128/mBio.01155-15
- Webb, J. A., Keller, S. L., Southorn, E. P., Armstrong, J., Allen, D. G., Peregrine, A. S., et al. (2005). Cutaneous manifestations of disseminated toxoplasmosis in an immunosuppressed dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 41, 198–202. doi: 10.5326/0410198
- Weiss, L. M., and Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.*
- White, M. W., and Suvorova, E. S. (2018). Apicomplexa Cell Cycles: Something Old, Borrowed, Lost, and New. *Trends Parasitol.* 34, 759–771. doi: 10.1016/j.pt.2018.07.006
- Xiao, H., El Bissati, K., Verdier-Pinard, P., Burd, B., Zhang, H., Kim, K., et al. (2010). Post-translational modifications to *Toxoplasma gondii* α - and β -tubulins include novel C-terminal methylation. *J. Proteome Res.* 9, 359–372. doi: 10.1021/pr900699a

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Tomasina and Francia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.