



Laboratorio de Parasitología Molecular IIB-INTECH

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús
UNSAM/CONICET

IIB-INTECH
Cmo Circunvalación Km 6
Chascomús (7130)
Prov. Buenos Aires
Tel: 02241 430323
Fax: 02241 424048

Integrantes del grupo de investigación

Verónica Cóceres coceres@intech.gov.ar;
Maximiliano de Napoli mdenapoli@intech.gov.ar
Maria M. Corvi mcorvi@intech.gov.ar
Carolina Dalmasso carolinadal@intech.gov.ar
Maria J. Figueras
Lis Alomar
Silvina Bogado
Gustavo Ortiz
Laura Vanagas
Sergio O. Angel sangel@intech.gov.ar

Áreas temáticas y perfiles de la investigación: Investigación básica sobre Toxoplasmosis y Neosporosis

Evolución histórica de las actividades del grupo y logros alcanzados

En junio de 1996 me incorporé a la carrera del investigador del CONICET. Las principales líneas de grupo se relacionaron con el desarrollo de proteínas recombinantes del *T. gondii* para su uso en sistemas de diagnóstico y para el diseño de una vacuna multiantigénica. En el primer caso demostramos la posibilidad de algunos antígenos para el desarrollo de un sistema que permita diferenciar a los pacientes con infecciones agudas de crónicas, y de detección de infección congénita, en ambos casos de suma relevancia. Respecto a los trabajos de inmunización, se obtuvieron resultados interesantes con los antígenos rop2, Gra4, Gra7 y TgPI de *T. gondii*, el último clonado y caracterizado por nosotros. Estos estudios fueron llevados a cabo por a la doctoranda en ese momento, Valentina Martin, quien siguió con dicha línea como Investigadora Asistente siendo ahora Adjunta. También se comenzó un trabajo en colaboración con la Dra. Marina Clemente para expresar antígenos del *T. gondii* en plantas. Se expresó exitosamente el antígeno SAG1 y Gra4 en forma transiente, demostrándose su utilidad en conferir.

Con el objetivo de expandir las líneas de trabajos comenzamos a profundizar en estudios más básicos. Entre ellos el relacionado a la chaperona Hsp20, proteína de la película de *T. gondii* y *Neospora caninum*.

Líneas actuales de investigación

Nuestros avances han permitido encontrar una serie de proteínas relacionadas al proceso de diferenciación, regulación epigenética de la expresión génica y de la invasión. Todas estas proteínas pueden tener roles relevantes en estos procesos y son candidatas a convertirse en nuevos blancos terapéuticos por ellas mismas o por alguna proteína asociada a ellas.



Hsp90 (María J. Figueras, Lis Alomar)

En el caso de la proteína Hsp90, de la cuál está en trámite su patente para uso como blanco de drogas en toxoplasmosis, existen indicios de un rol de importancia en la diferenciación del parásito, a su vez proceso de gran relevancia en la patogenicidad de *T. gondii*. Sin embargo todavía no conocemos el mecanismo de acción de esta proteína que la hace relevante para la diferenciación. La presencia de la chaperona Hsp90 y su cochaperona p23 en el núcleo de los bradizoitos, hace suponer también que su rol puede estar asociado a su traslocación nuclear. Como primer paso para definir al heterocomplejo-Hsp90 de *T. gondii* se realizó un rastreo en el banco de datos (www.toxodb.org). Se pudieron identificar todas las proteínas (Hip, hop, ydj1, p23) que estarían formando parte de este complejo. Mediante ensayos de colP-Western blot se pudo apreciar la interacción de todas las co-chaperonas con Hsp90. Asimismo, p23 estaría formando un complejo con hsp90 diferente al que lo hace Hip. Esto es coherente con el hecho de que durante el ciclo Hsp70/Hsp90 Hip se une tempranamente a este ciclo, mientras que p23 lo hace en el complejo maduro, cuando las proteínas Hip, hop, hsp70 e Ydj1 se desensamblan, dejando la proteína cliente y p23 en complejo con hsp90. También se realizaron ensayos de IFI en taquizoitos y bradizoitos intracelulares, obtenidos in vitro. Las proteínas Hip, hop e Ydj1 tienen una marcación puramente citoplásmica en taquizoitos y bradizoitos. El anticuerpo anti-p23 marca el citoplasma en taquizoitos y en citoplasma más una marcación leve en núcleo en el estadio de bradizoito, acompañando la marcación de la Hsp90. Finalmente en ensayos de colP-espectrometría de masa se pudieron detectar 49 interactores de Hsp90/p23 en taquizoitos y bradizoitos, pudiendo establecer junto a la base de datos de *Plasmodium* y de mamíferos un interactoma de Hsp90/p23 para *T. gondii*. Una proteína cliente de Hsp90 de interés es la denominada Sgt1, que esta implicada en el ciclo celular. Mediante análisis in silico en la base de datos de *Toxoplasma* www.toxodb.org, encontramos el gen completo de "sgt1" del parásito. Para su caracterización molecular se diseñaron primers específicos para obtener el dominio SGS de sgt1 en *T. gondii*, el cual fue clonado, expresado y purificado desde bacterias. Se obtuvieron anticuerpos y se analizaron por Western blot y por inmunofluorescencia, observándose en este último una marcación granular a lo largo del parásito.

Hsp28 (Lis Alomar y Gustavo Ortiz)

Otra proteína que podría estar relacionada con la diferenciación del parásito es la chaperona Hsp28. Esta está localizada en la mitocondria. En *T. gondii* la mitocondria es funcional mientras el parásito se encuentra fuera de la célula hospedadora, disminuyendo su actividad en el taquizoito intracelular hasta dejando de ser funcional en el bradizoito, basándose la generación de ATP en la glicólisis y fermentación en este último estadio. El estrés con antimicina A, droga que bloquea la cadena respiratoria, induce la formación de bradizoitos. Estudios bioquímicos en colaboración con el Dr. Johannes Buchner (Universidad de Munchen, Alemania) evidenciaron que Hsp28 tiene actividad chaperona y además por microscopía electrónica que forma grandes estructuras oligoméricas. En nuestros experimentos, el tratamiento de los taquizoitos extracelulares con antimicina A produce un incremento en la expresión de Hsp28 y la catalasa del parásito. La inducción a una mayor expresión de Hsp28 es específica de esa chaperona ya que este estrés no altera o disminuye la expresión de otras chaperonas. En cambio, el sometimiento de los parásitos a estrés térmico aumenta la expresión de mRNA de Hsp28, Hsp20 y Hsp29.

Epigenética (Carolina Dalmaso, Silvina Bogado, Laura Vanagas)

Durante la diferenciación se activan y apagan genes en forma secuencial. Dada la dificultad de encontrar con un amplio repertorio de factores de transcripción se piensa que un aspecto importante en la regulación de la transcripción de genes asociados a desarrollo puede estar dado por mecanismos epigenéticos. Recientemente, nuestro laboratorio identificó la presencia de una variante para la familia H2B en *T. gondii*. Este aspecto es novedoso ya que no existen variantes de H2Bs (H2Bv) en eucariotas superiores, a excepción de algunas que solo se expresan en gonadas. Por otro lado, se encontraron tres H2A en el genoma de *T. gondii*: H2A1, H2AX y H2AZ. Se obtuvieron anticuerpos específicos para cada



una. Estos se utilizaron en ensayos de Western blot de histonas purificadas, revelando que las tres H2As se encuentran presentes en taquizoitos y que H2AZ es la minoritaria. El estudio de los niveles de transcripto en taquizoitos y bradizoitos *in vitro* por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) mostró que la expresión de *h2ax* aumenta en la diferenciación. Esta histona también incrementa su expresión ante daño oxidativo, acorde con su función asociada a la reparación del ADN. Sin embargo, el hallazgo más interesante es observar que la histona H2Bv dimeriza con H2AZ pero no con H2AX. A su vez H2AZ y H2Bv predominan en regiones promotoras de genes activos mientras que H2AX predomina en promotores de genes inactivos o regiones genómicas silentes.

Hsp20 (Maria Corvi, Maximiliano De Napoli, Verónica Cóceres)

Una de las líneas más interesantes que surgieron en los últimos años en el laboratorio se relaciona al estudio de la chaperona Hsp20. *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* son parásitos protozoos del phylum Apicomplexa emparentados filogenéticamente. Dentro de las proteínas con altos niveles de identidad que están presentes en ambos parásitos se encuentra esta chaperona. La proteína Hsp20 está presente en la película del parásito, la cual está formada por la membrana plasmática y el complejo interno de membranas (IMC). En el IMC está anclado el glideosoma, complejo de proteínas involucradas en el movimiento por deslizamiento (gliding) característico de los apicomplexos. La misma maquinaria involucrada en el gliding participa de la invasión a la célula hospedadora. Esta proteína está conservada en el phylum apicomplexa. De hecho, los anticuerpos generados contra Hsp20 de *T. gondii* reaccionan contra la chaperona Hsp20 de *N. caninum*. Este anticuerpo marca la superficie del taquizoito de *N. caninum* en forma similar al de *T. gondii* y mediante extracción con detergentes muestra estar localizada tanto en el IMC como en la fracción de membrana plasmática en ambos parásitos. La localización en membranas se confirmó mediante la incubación de taquizoitos en presencia de glicerol 1% y posterior ensayo de localización subcelular. La preincubación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* con anticuerpos anti-Hsp20 producidos en conejo bloquean la infección de monocapas de fibroblastos; dicho anticuerpo también demostró alterar significativamente el mecanismo de deslizamiento. Empleando sueros humanos de mujeres embarazadas con infección toxoplásmica hemos visto que estos reaccionan fuertemente contra esta proteína, especialmente los de alto título. Purificando por afinidad a los mismos, y empleándolos en ensayos *in vitro* pudimos observar que estos también consiguieron bloquear la invasión y el gliding. Finalmente pudimos comprobar que la Hsp20 deja un rastro durante el gliding como otras proteínas de superficie, y además, se relocaliza ubicándose en una cara del parásito en movimiento, cubriendo también el polo basal. En conclusión, nuestros resultados indicarían que Hsp20 podría ser un buen candidato para la generación de una vacuna multiantigénica y/o constituir un posible blanco terapéutico en ambos parásitos. Actualmente hemos generado un mutante por delección en *T. gondii* que está siendo caracterizada. .