

**Identificación de sustratos proteicos en células humanas
para proteínas ROP cinasas de *Toxoplasma gondii*.**

Ailan Farid Arenas, Lic Biol, Msc

Director: Jorge Enrique Gomez-Marin, MD, PhD

**Doctorado en Ciencias Biomédicas
Universidad del Quindío 05/2017**

RESUMEN

Introducción: *Toxoplasma* secreta unas proteínas conocidas como ROP cinasas; (ROPs) las cuales son importantes para establecer la supervivencia y el crecimiento del parásito en el interior de la célula hospedera. Se ha evidenciado que el complejo ROP5/ROP18 secretado por *Toxoplasma*, es el mayor efector relacionado con virulencia en ratones; este complejo fosforila específicamente proteínas GTPasas inducidas por interferón (IRGs). No hay evidencia si este complejo u otras ROP cinasas están implicadas en el desarrollo de la toxoplasmosis humana. **Objetivo:** Evidenciar sustratos humanos para las proteínas cinasas ROP11, ROP39 ROP5 y ROP18 de *Toxoplasma gondii* en una línea celular humana. **Metodología 1^a:** diseñamos un algoritmo llamado MSCA (*Multiple Spectral Comparison Alignment*) para la búsqueda de interacciones entre proteínas (*Toxoplasma* y Humano). **2^a:** las proteínas recombinantes ROP11, ROP39, y GBP5 se clonaron en pGEX4T1 y se expresaron en *E. coli* ROSSETTA DE3; con estas proteínas se realizaron ensayos de *Pull-down Mass spectrometry* (MS) y *Pull-down Western blot* (WB). **2^b:** utilizando el sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H) realizamos ensayos de interacción proteína-proteína entre ROPs y GBPs humanas (Guanylate binding proteins). **2^c:** nosotros comparamos los niveles de pro-IL1 β en PBMCs humanos infectados *ex vivo* con *Toxoplasma* cepa RH o RH Δ ROP18. **Resultados 1^a:** MSCA propone las interacciones ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2, ROP39-ROP5, hGBP5-ROP5 y hGBP5-ROP18-. **2^a:** las interacciones ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2 y ROP39-ROP5 fueron confirmadas por *Pull-down MS*. **2^b:** observamos las interacciones hGBP5-ROP18 y hGBP5-ROP5- por Y2H. Se confirmaron las interacciones ROP39-ROP5 y ROP5-GBP5 por *Pull-down-WB*. **2^c:** Observamos mayor cantidad de pro-IL1 β en PBMCs infectadas con RH Δ ROP18. **Conclusiones:** las interacciones ROP39-ROP5 y hGBP5-ROP5 fueron confirmadas por 2 técnicas diferentes. Sugerimos que ROP5 interacciona con GBP5 humana y esta interacción podría alterar la activación del inflamosoma dependiente de ROP18 en PBMCs humanos. **Palabras clave:** *Toxoplasma gondii*, ROP5, *Pull-down*, GBP5. Interacción proteína-proteína

Summary

Background: *Toxoplasma* secretes proteins known as ROP kinases; (ROPs) which are important for establishing the survival and growth of the parasite within the host cell. It has been shown that the *Toxoplasma* ROP5/ROP18 complex is the major effector related to virulence in mice. This complex specifically phosphorylates interferon-induced GTPases (IRGs). There is no evidence whether this complex or other ROP kinases are involved in the development of human toxoplasmosis. **Aim:** To search human substrates for *Toxoplasma gondii* ROP11, ROP39 ROP5 and ROP18 in a human cell line. **Methodology 1^a:** We designed an algorithm called MSCA (Multiple Spectral Comparison Alignment) for the search of interactions between proteins (*Toxoplasma* and Human). **2^a:** recombinant proteins ROP11, ROP39, and GBP5 were cloned into pGEX4T1 and expressed in *E. coli* ROSSETTA DE3; with these proteins we performed *Pull-down* assays either with mass spectrometry (MS) or Western blot (WB). **2^b:** yeast 2 hybrids (Y2H) protein-protein interaction screening was performed between some ROPs and human GBPs 1-5. **2^c:** pro-IL1 β levels were compared in human PBMCs infected *ex-vivo* with *Toxoplasmas* RH or RH Δ ROP18. **Results 1^a:** MSCA proposed the interactions ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2, ROP39-ROP5, hGBP5-ROP5, and hGBP5-ROP18. **2^a** the interactions ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2, and ROP39-ROP5 were confirmed by *Pull-down* MS. **2^b:** the interactions hGBP5-ROP18 and hGBP5-ROP5 were observed in the yeast 2 hybrid (Y2H) screening interaction. The interactions ROP39-ROP5 and hGBP5-ROP5 were confirmed by *Pull-down*-WB. **2^c:** we observed a greater amount of pro-IL1 β in human cells infected with RH Δ ROP18 than RH. **Conclusions:** ROP39-ROP5 and hGBP5-ROP5 interactions were confirmed by two different techniques. We model that ROP5 interacts with human GBP5 and this interaction could alter the activation of the NLRP3-inflamosome in human PBMCs in a ROP18-dependent manner.

Key words: *Toxoplasma gondii*, ROP5, *Pull-down* assay, GBP5. Protein-protein interactions.

Tabla de contenido.

I. Introducción.

II. Marco Conceptual.

II.1. Generalidades *Toxoplasma gondii*.

II.2. Mecanismo de invasión.

II.3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

II.4. Toxoplasmosis.

II.5. Toxoplasmosis ocular en Colombia.

II.7. Cinasas.

II.8. ROP cinasas en *Toxoplasma gondii*.

II.9. Genes de virulencia en *T.gondii*.

II.10. Superfamilia de GTPasas inducidas por interferón y *Toxoplasma gondii*.

II.11. Inflamosoma.

II.12. GBPs y activación del inflamosoma.

III. Planteamiento del Problema.

IV. Objetivo.

V. Materiales y Métodos.

V.1. Método computacional.

V.3. Diseño de plásmidos Sintéticos.

V.4. Diseño de cebadores.

V.5. Extracción de RNA de células Hela y RT-PCR.

V.6. Digestión y ligación.

V.7. Transformación en *E. coli* (DH5 α) y *E. coli* ROSSETTA (DE3).

V.8. Purificación proteínas recombinantes GST-ROP39, GST-ROP11 y GST-hGBP5.

V.8. *Pull-down*.

V.9. Sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).

V.10. Western blot.

V.12. Selección de muestras de individuos con toxoplasmosis.

V.13. Diagnóstico serológico de anticuerpos anti-toxoplasma.

V.14. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y estímulos celulares.

V.15. ELISA de captura para la cuantificación de citocinas.

V.16. Medición de pro-IL-1 β por Western Blot.

V.17. Análisis estadístico.

VI. Resultados.

- VI.1.** El algoritmo MSCA sugiere que GBPs son posibles sustratos para ROP18 y ROP5 en humanos.
- VI.2.** ROP11 y ROP39 poseen similares perfiles de expresión a los factores de virulencia ROP16 y ROP18.
- VI.3.** MSCA sugiere a SLC3A2, ANXA6 como posibles sustratos para ROP11.
- VI.4.** MSCA sugiere a IRGd, ROP 5, SHMT2 como posibles sustratos para ROP39.
- VI.5.** Purificación por cromatografía de afinidad de GST-ROP11.
- VI.6.** Purificación por cromatografía líquida de afinidad de GST-ROP39.
- VI.7.** Purificación por cromatografía líquida de afinidad de GST-hGBP5.
- VI.8.** *Pull-down* y espectrometría de masas evidencian las interacciones GST-ROP11- SLC3A2 y GST-ROP11-ANXA6.
- VI.9.** *Pull-down* y espectrometría de masas evidencian las interacciones GST-ROP39-ROP5 y GST-ROP39-SHMT2.
- VI.10.** *Pull-down* y Western Blot confirmó la interacción ROP39-ROP5.
- VI.11.** GBP5h es evidenciado como un posible sustrato para ROP5A y ROP18 utilizando el sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).
- VI.12.** *Pull-down* y Western blot confirman la interacción entre hGBP5-ROP5.
- VI.13.** la cepa de *Toxoplasma* RH knockout para ROP18 muestra una mayor inducción de la concentración de IL-1 β inmadura (pro-IL1 β) comparado con *Toxoplasma* RH en PBMCs humanos.

VII. Discusión.

- VII.1.** MSCA predijo las interacciones ROP11-SLC3A2 y ROP11-ANXA6, y éstas fueron comprobadas por *Pull-down* MS.
- VII.2.** MSCA predijo la interacción ROP39-SHMT2 y fue comprobada por *Pull-down* MS.
- VII.3.** MSCA predijo las interacciones ROP39-IRGd y ROP39-ROP5, y esta última fue comprobada por *Pull-down* WB.
- VII.4.** MSCA predijo las interacciones ROP18-hGBP5 y ROP5-hGBP5; éstas fueron confirmada por Y2H y *Pull-down* WB.
- VII.5.** Modelo del desenlace de la interacción hGBP5-ROP5.

VIII. Conclusiones.

IX. Perspectivas.

X. Referencias.

XI. Anexos.

Anexo 7: Arenas AF, Salcedo GE, Montoya AM, Gomez-Marin JE. MSCA: a spectral comparison algorithm between time series to identify protein-protein interactions. BMC Bioinformatics. 2015; 16:152. doi: 10.1186/s12859-015-0599-8.

Lista de Figuras.

Figura 1: modelo cinético de invasión de *Toxoplasma gondii*

Figura 2: ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Figura 3: Esquema de *Toxoplasma gondii*

Figura 4: perfiles de expresión de las proteínas ROP11 y ROP39

Figura 5: SDS-PAGE: Purificación de GST-ROP11 (RH) por cromatografía de afinidad.

Figura 6: SDS-PAGE: Purificación de GST-ROP39 (RH) por cromatografía líquida de afinidad. GSTRAP.

Figura 7: SDS-PAGE: Purificación de GST-hGBP5 por cromatografía líquida de afinidad GSTRAP.

Figura 8: *Pull-down screening* GST-ROP11.

Figura 9: *Pull-down Screening* GST-ROP39.

Figura 10: *Pull-down Western Blot. Bait:* GST-ROP39.

Figura 11: Tamizaje de interacciones proteína-proteína por Y2H entre ROP5A/B/C y ROP18 vs GBPs 1-5.

Figura 12: *Pull-down* western blot utilizando como *bait* GST-GBP5.

Figura 13: Índice de producción de IL1 β en sobrenadantes de PBMCS.

Figura 14: concentración de pro-IL1 β en lisados de PBMCS capturada por Western blot.

Figura 15: Hipótesis del desenlace de la interacción ROP5-hGBP5 en cepas virulentas de *Toxoplasma*.

Lista de Tablas.

Tabla 1: Resultados de la secuenciación por espectrometría de masas para el *Pull-down* con GST-ROP11.

Tabla 2: Resultados de la secuenciación por espectrometría de masas para el *Pull-down* con GST-ROP39.

Tabla 3: Resumen interacciones ROP s-GBPs observadas en el sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).

Tabla 4: Resumen interacciones positivas para ROP cinasas de *Toxoplasma gondii* Tipo I.

Abreviaciones

ATF6 β : Factor activador de la transcripción 6

GBP: proteína de unión a guanilato

GRA: Granules dense proteins (proteínas secretadas por los gránulos densos)

HFF: Human foreskin fibroblast (fibroblastos humanos).

IL1 β : interleuquina 1 beta

INF γ : Interferón gamma

IRG: GTPasas relacionadas con la inmunidad

IRGa6: GTPasas relacionadas con la inmunidad a 6

MEF: Mouse embryonic fibroblast (fibroblastos embrionarios de ratón.)

MIC: Microneme protein (proteínas secretadas por los micronemas)

MOI: Multiplicidad de la infección

MSCA: Multiple Spectral Comparison Alignment.

NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: células asesinas naturales

NLR: receptores similares a NOD

NOD: Proteína de Dominio de Oligomerización Nucleotídico 1

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

ROP: Ropthrie proteins (proteínas secretadas por las roptrias)

Δ ROP18: Cepa RH de *Toxoplasma gondii* knockout para ROP18

VP: Vacuola parasitofora (PV: Parasitophorous vacuole).

WB: western blot.

Y2H: sistema de 2 híbridos en levadura.

HAP1: línea celular de cáncer mieloide humano.

A549: adenocarcinoma humano de células epiteliales alveolares basales.

OD: Densidad óptica. (Turbidimetría en espectrofotómetro a 600nm)

I. INTRODUCCIÓN.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta un amplio espectro de hospederos vertebrados incluyendo los humanos. Esta infección, es generalmente asintomática en individuos inmunocompetentes y presenta una prevalencia a nivel mundial del 30% [Montoya & Liesenfeld, 2004]. La razón por la cual algunas personas que se infectan con *Toxoplasma*, padecen síntomas y otros no, es poco entendido [Cañón-Franco, et al. 2014].

Se conocen los factores del parásito que juegan un papel muy importante en la supervivencia y proliferación en los hospederos en que mejor se ha adaptado, que son los roedores. En este contexto, se ha determinado que un único locus en el cromosoma VIIa controla las diferencias de virulencia entre las cepas altamente virulentas Tipo I y las cepas avirulentas Tipo III en ratón [Taylor, et al. 2006].

Las proteínas ROP cinasas (ROPs) están involucradas con estos rasgos de virulencia para este hospedero, siendo el complejo ROP5/ROP18 las proteínas que contribuyen mayormente a las diferencias fenotípicas entre las cepas altamente virulentas Tipo I, las de virulencia intermedia tipo II y las avirulentas tipo III [Taylor, et al. 2006].

La mayoría de los aislados suramericanos de *Toxoplasma gondii* contienen el alelo de ROP18 similar al tipo I. A pesar del descubrimiento de estos marcadores de virulencia en ratón, solo un trabajo reporta una correlación entre la ausencia de una secuencia de inserción en el promotor del alelo de ROP18 (característica de cepas virulentas Tipo I) con la respuesta ocular inflamatoria severa en individuos con toxoplasmosis ocular [Sánchez, et al. 2014].

Las GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGs) han logrado explicar la resistencia a la infección y evitar la muerte de ratones infectados por cepas avirulentas de *Toxoplasma*. Es así como pocos minutos después de transcurrida la infección por cepas avirulentas las IRGs inducidas por IFN γ se acumulan en la membrana de la vacuola parasitofora (VP), vesiculando la VP y eliminando el

parásito [Könen-Waisman & Howard, 2007; Steinfeldt, et al. 2010; Fleckenstein, et al. 2012].

La acumulación de las IRGs y la eliminación de los parásitos en macrófagos es bloqueada por la proteína ROP18 de parásitos virulentos tipo I, la cual fosforila IRGs específicas, lo que previene la asociación de éstas con la VP [Steinfeldt, et al. 2010; Fentress, et al. 2010]. Del mismo modo, ha sido demostrado que la pseudocinasa ROP5 de *Toxoplasma* regula las cinasas ROP18 y ROP17 las cuales controlan la virulencia aguda en ratón [Etheridge, et al. 2014]. Sin embargo, ni la proteína ROP18, y tampoco ROP5 afectan marcadamente la supervivencia de células humanas estimuladas con IFN γ , las cuales no poseen genes 47KDa IRGs [Niedelman, et al. 2012]. Por lo que se ha sugerido que las proteínas ROP18 y ROP5 han evolucionado específicamente para bloquear las IRGs y es poco probable que tengan otros efectos en otras especies que no tengan el sistema IRG, como los humanos [Niedelman, et al. 2012].

Aunque las 47 KDa IRGs están prácticamente ausentes en humanos (sólo dos genes hIRGM y hIRGc están presentes en humanos), 7 miembros de la familia relacionada de 65 KDa GBPs (Proteínas de unión a guanilato) las podemos encontrar en humanos [Kim, et al. 2012]. Éstas proteínas están implicadas en la resistencia del hospedero contra diferentes patógenos [MacMicking, 2012]. En el modelo murino las cepas virulentas de *Toxoplasma gondii* evitan el reclutamiento de las GBPs en la VP y esta inhibición está mediada por las proteínas ROP18 y ROP5, lo cual evita la citotoxicidad mediada por IFN γ [Selleck, et al. 2013]. Se ha encontrado acumulación de mGBP1 y mGBP2 en la VP de parásitos (tipo II y III). También se ha encontrado que mGBP2 y mGBP5 se co-localizan con mGBP1 en células infectadas por *Toxoplasma gondii* [Virreira, et al. 2011]. Sin embargo, se ha reportado que la hGBP1 ya sea endógena o expresada ectópicamente falla en asociarse con la VP en células humanas infectadas por patógenos como *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella typhimurium* y *Toxoplasma gondii*; pero, hGBP1 sí puede restringir la replicación temprana de *T. gondii* [Johnston, et al. 2016].

Se ha reportado que GBPs, pueden activar el inflamosoma NLRP3 un complejo proteínico implicado en la activación de Caspasa-1 y la subsecuente maduración de IL-1 β . Esta activación es dependiente de GBP5 en respuesta contra bacterias como *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* [Shenoy, et al. 2012]. Así mismo, en macrófagos murinos se ha demostrado que la GBP2 es requerida para la maduración de IL1 β y IL18, y para la activación de muerte celular en respuesta a *Salmonella* [Meunier, et al. 2014]. Interesantemente, *Toxoplasma* es un activador de los inflamosomas NLRP1 y NLRP3 *in-vivo*, donde la producción de IL1 β madura es dependiente de Caspasa-1 y de la proteína adaptadora del inflamosoma ASC [Gov, et al 2013; Gorfú, et al. 2014].

El papel de las proteínas ROP cinasas en el desenlace de la infección humana por *Toxoplasma* es desconocida. Trabajos computacionales previos sugieren a las GBPs como posibles sustratos humanos para ROP cinasas de *Toxoplasma gondii* [Arenas, et al. 2015].

Dado que ROP18 y ROP5 son los alelos de *Toxoplasma* que más correlacionan con virulencia en casi todas las cepas; en este trabajo buscamos evidenciar por métodos bioquímicos si existen proteínas humanas que sean sustratos de ROP5, ROP18, ROP11 y ROP39; también buscamos si ROP18 interfiere en la activación del inflamosoma en células humanas. Esta información sería de gran importancia para entender mecanismos de infección que emplea este parásito en el hospedador humano.

I. MARCO CONCEPTUAL.

II.1 Generalidades *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado responsable de causar la Toxoplasmosis. Taxonómicamente, *T. gondii* se agrupa con los coccidios, un grupo muy diverso de organismos que incluyen otros parásitos de gran importancia médica y veterinaria como *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Babesia* y *Neospora*, entre otros.

Aunque este grupo de parásitos tienen en común muchas características de su estructura celular, a diferencia de la gran mayoría de coccidios los estadios infecciosos de *T. gondii* pueden invadir y replicarse en las células nucleadas de casi cualquier mamífero incluyendo al hombre, y es en este último donde el parásito puede causar la toxoplasmosis humana [Dubremetz, 1998]. De acuerdo a datos de prevalencia serológica la toxoplasmosis es una de las infecciones humanas más comunes en el mundo. En cuanto a las manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis, aunque generalmente es asintomática, la infección por este parásito puede causar lesiones oculares en hospederos inmunocompetentes, e incluso la muerte en pacientes inmunodeficientes y en el feto cuando se trata de infecciones congénitas. *T. gondii* también es considerado como un patógeno de transmisión alimentaria generando importantes pérdidas económicas a nivel global [Hoffmann, et al. 2012].

II.2 Mecanismo de Invasión.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado lo que indica que solo puede realizar su replicación en el interior de las células de su hospedador. La infección por *Toxoplasma* es una invasión activa dirigida directamente por el parásito mismo, este proceso es llevado a cabo por una descarga secuencial de proteínas a partir de sus organelos secretores llamados micronemas, roptrias y gránulos densos [Sibley, 2004]. Las proteínas secretadas por los micronemas (MICs) están involucradas en la adherencia y penetración inicial sobre la membrana de la célula hospedadora, mientras que las proteínas secretadas por las roptrias (ROPs) y los gránulos densos (GRAs) transforman el interior del hospedador en un ambiente óptimo para el crecimiento del parásito. El resultado final es la formación de un compartimento llamado vacuola parasitofora (VP) en el citoplasma de la célula invadida, y una vez allí, *Toxoplasma* queda parcialmente protegido del ambiente hostil del citoplasma de su hospedador [Carruthers & Boothroyd, 2007] (Figura 1).

En los últimos años *Toxoplasma* se ha convertido en un modelo experimental muy eficiente para llevar a cabo estudios de biología celular e inmunología de

Apicomplexas en ratón “*Mus musculus*” (especialmente de las líneas BALB/c y C57BL/6) y en diferentes líneas celulares como las (MEFs) y la línea celular humana (HFF) [Pfefferkorn, et al. 1977]. Esto se debe a que es un organismo fácil de propagar en laboratorio tanto en cultivo celular como en ratones, además es relativamente fácil de manipular genéticamente. Con esta información se ha podido entender el papel de varias proteínas importantes en la invasión y sobrevivencia del parásito, obteniendo un modelo de infección altamente detallado.

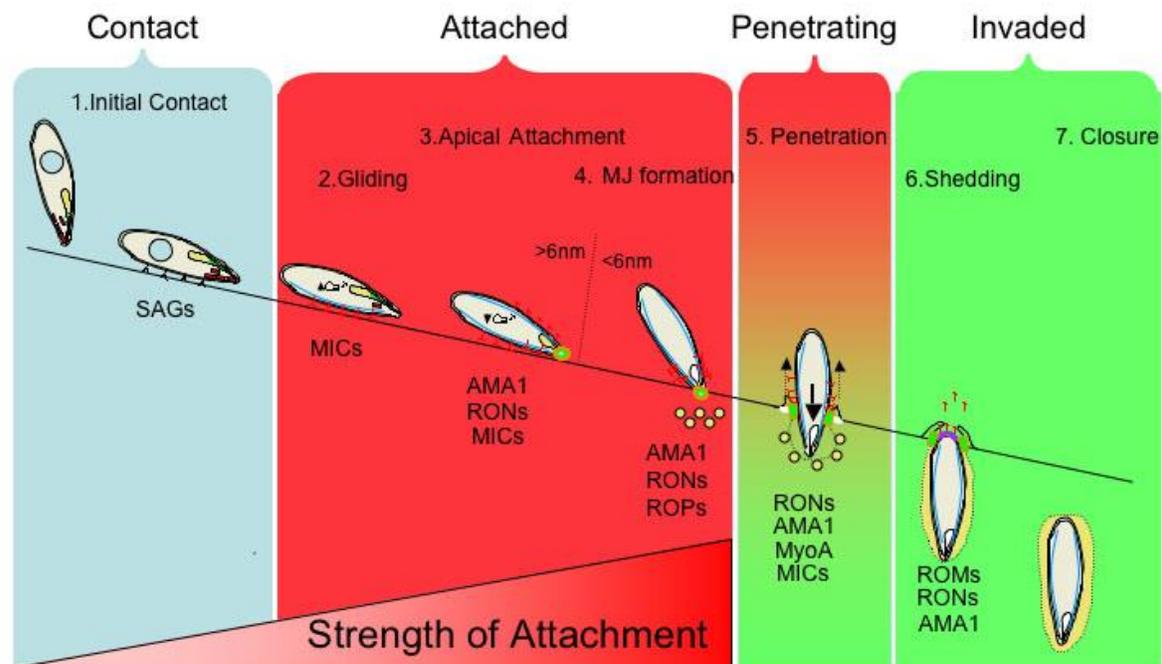


Figura 1: modelo cinético de invasión de *Toxoplasma gondii*. Tomado de (<http://www.biostat.jhsph.edu/~bkafsack/Bioinformatics/>) Kinetic Modeling of *Toxoplasma* Invasion. Autor: Kafsack Felix Caesar Ph.D. **Contacto:** el parásito hace un débil contacto con la membrana y la matriz-extracelular de las células del hospedador, proceso realizado mayormente por proteínas de superficie SAGs (Surface antigen groups). **Adherencia:** parásitos hacen un contacto más fuerte, proteínas MICs y AMA1 (*Apical Membrane Antigen 1*) son las más plausibles de contribuir en este proceso. Estas proteínas también contribuyen para generar 2 movimientos que son compartidos solo por los parásitos Apicomplexas el *Gliding Motility* y el *Moving Junction* (MJ), proceso que también es liderado por las proteínas

F-actina, miosina A (MyoA) y una alta contribución del motor actina-miosina del parásito [Egarter. et al, 2014]. **Penetración:** *Toxoplasma* activamente a través del MJ y la secreción de proteínas remodeladoras como PLA2 (fosfolipasas A2) y serinas proteasas como las RONS logra pasar la membrana del hospedador, pero tomando parte de esta. **Vertimiento de proteínas ROPs y cierre del proceso:** Una vez que *Toxoplasma* logra entrar al citoplasma celular éste remodela la membrana exterior que tomó del hospedero con proteínas ROPs y GRAs. Este compartimento tiene el nombre de vacuola parasitofora (VP). Desde ahí *Toxoplasma* empieza su ciclo lítico [Black & Boothroyd, 2000]

II.3 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Durante el ciclo de vida de *T. gondii* pueden observarse tres formas infecciosas: los taquizoítos: los cuales se dividen en forma clonal en los hospederos intermediarios. Los bradizoítos: se encuentran normalmente como quistes en los tejidos de los hospederos intermediarios y se transmiten por carnivorismo entre estos mismos. Los esporozoítos: son secretados como ooquistes en las heces de los felinos. Estos estadios dan lugar a un ciclo de vida que consta de 2 fases: una fase de reproducción sexual (en los felinos) y otra asexual (en células nucleadas de los hospederos intermediarios) [Dubey, 1998]. La fase sexual comienza con la gametogonia, un proceso que se da en el intestino delgado de los felinos y que genera microgametos y macrogametos que al fusionarse forman un cigoto que luego pasa a ser el ooquiste. Los ooquistes son liberados al ambiente por medio de las heces de los felinos, es ahí donde ellos esporulan y realizan meiosis. Aquí empieza la fase asexual del ciclo de vida cuando un organismo que sirva como hospedero intermediario ingiere los ooquistes que luego liberan los esporozoítos (haploides) en el aparato digestivo de este individuo (Figura 2).

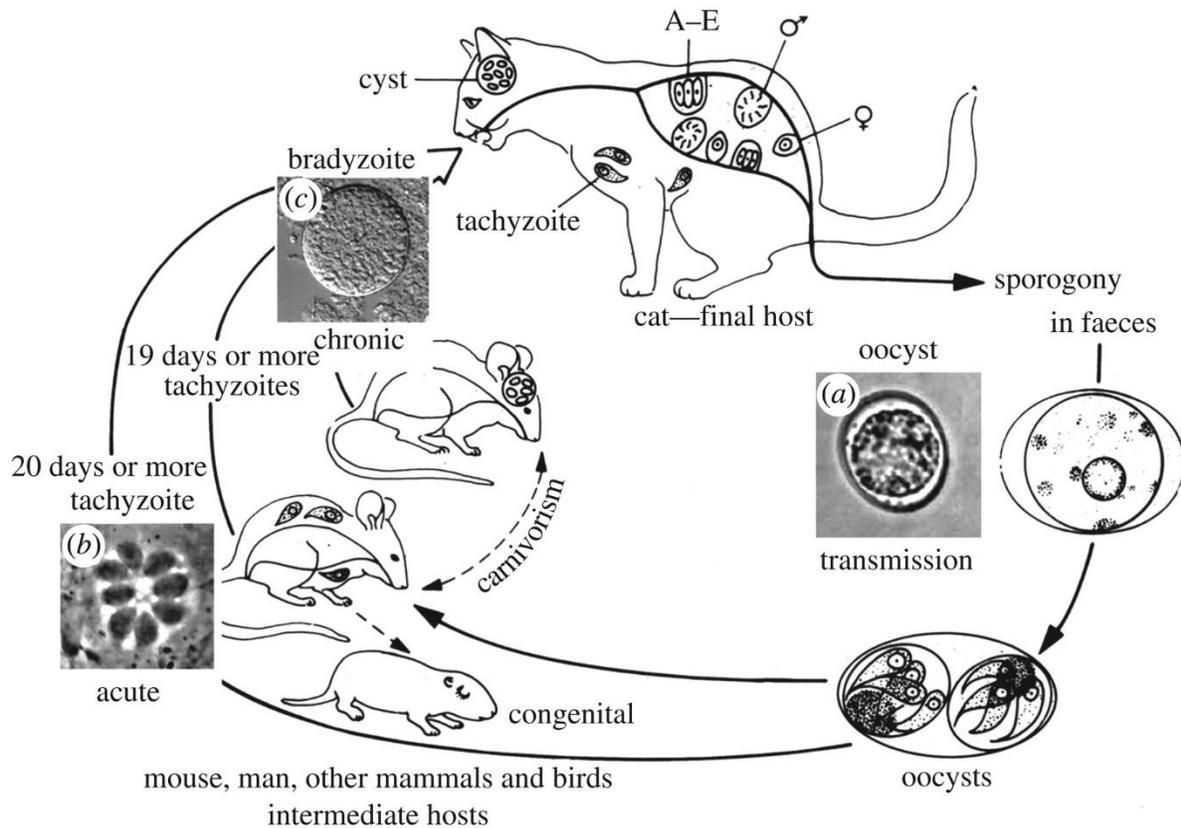


Figura 2: ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado de [Sibley, et al. 2009], pero previamente adaptado de [Frenkel, 1973]. La fase sexual solo ocurre en el intestino del gato, el cual excreta los ooquistes al ambiente (a); estos ooquistes sufren una esporogonia dando lugar a los esporozoítos. En A-E se muestran las etapas del desarrollo dentro de las células nucleadas de los hospedadores. Los ooquistes son altamente resistentes al ambiente externo y es en este estadio que los hospederos intermediarios adquieren el parásito. Durante la infección aguda rápidamente los parásitos proliferan y se diseminan en forma de taquizoítos (b). Los bradizoítos son las formas latentes contenidas en los tejidos de los hospederos especialmente en musculo y cerebro (c), dando lugar a las infecciones crónicas a largo plazo; este estadio es la forma de transmisión asexual del parásito por carnivorismo entre los hospederos intermediarios y el definitivo.

II.4 Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una de las enfermedades zoonóticas más conocida y más extendida en todo el mundo, posiblemente se originó primero en especies de vida silvestre y posteriormente pasó a estar bien establecida como una enfermedad humana. La toxoplasmosis está recibiendo cada vez más atención como parte de las enfermedades emergentes. Esta se trasmite a humanos por el consumo de agua que puede estar contaminada con ooquistes, o por la ingestión de quistes tisulares especialmente en carne de consumo humano. Esta enfermedad también causa problemas en otras especies tanto domésticas como salvajes en todo el mundo. La infección por *Toxoplasma gondii* es altamente prevalente en humanos, se asume que un tercio de la población mundial ha estado expuesta a este parásito [Dalimi & Abdoli, 2012]. Aunque las infecciones por *T. gondii* son usualmente asintomáticas en personas inmunocomprometidas o inmunocompetentes, éstas pueden causar lesiones graves a nivel ocular y cerebral.

II.5 Toxoplasmosis ocular en Colombia

La infección por *Toxoplasma* es una causa principal de discapacidad visual en numerosos países, siendo responsable del 30 al 50% de los casos de uveítis en pacientes inmunocompetentes [Arevalo, et al. 2010]. La toxoplasmosis ocular (TO) es un riesgo potencial para personas con diagnóstico previo de toxoplasmosis adquirida y congénita [Gilbert & Stanford, 2000]. La incidencia de la toxoplasmosis ocular se ha estimado en Colombia y específicamente para la región del Quindío en 3 casos por cada 100.000 habitantes por año [De la Torre, et al. 2009a], mientras que, en la población europea, específicamente en Gran Bretaña, se ha estimado en 0,4 casos por cada 100.000 habitantes por año [Gilbert, et al. 1999].

Estudios en Colombia evidenciaron que el 5,5% de la población del departamento del Quindío presentaba cicatrices retinocoroidales resultantes de previas infecciones postnatales adquiridas, y un 20% de este grupo presentaba reducción de la capacidad visual [De la Torre, et al. 2007; De la Torre, et al. 2009a]. En un estudio retrospectivo sobre uveítis realizado en 693 pacientes colombianos, 417 fueron diagnosticados como casos definidos de uveítis, siendo la toxoplasmosis la

causa más frecuente con 276 casos (39,8%) seguido de la uveítis idiopática y toxocariasis [De la Torre, et al. 2009b].

En investigaciones recientes se observan sorprendentes diferencias entre los casos clínicos de Europa y América del Sur, en términos de las tasas de transmisión de toxoplasmosis congénita, probabilidad de sufrir síntomas de toxoplasmosis ocular [Gilbert, et al. 2008; Thiebaut, et al. 2007], gravedad de la inflamación ocular [Dodds, et al. 2008] y niveles de anticuerpos intraoculares [Garweg, et al. 2004]. Se observó entonces que los casos más graves se encuentran en pacientes colombianos, cuando se compara con pacientes de Europa [De la Torre, et al. 2013].

II.6 Estructura poblacional de *Toxoplasma gondii*

Debido a que *Toxoplasma gondii* es haploide y una cepa puede generar tanto microgametos como macrogametos es muy probable la endogamia, ya que la vasta mayoría de hospederos intermediarios albergan quistes de una única cepa [Sibley, et al. 2009]. Sin embargo, en raras ocasiones los félicos se pueden infectar con dos cepas diferentes de *Toxoplasma*, dando lugar a una recombinación sexual en la que se pueden generar hasta 1000 millones de ooquistes estables [Herrmann, et al. 2012]. Los animales que consumen estos ooquistes pueden funcionar como un agente de selección para los genotipos más exitosos. En Europa y Norteamérica la mayoría de los aislados de humanos y animales domesticados pertenecen a tres linajes clonales, llamados Tipo I, II y III. Dependiendo del tipo de cepa de ratón utilizada, se considera que la cepa de *Toxoplasma* más virulenta son Tipo I con una dosis letal de ($DL_{100} = 1$ parásito), mientras que las cepas Tipo II y III poseen dosis letal ($DL_{50} > 10^3$ parásitos) [Sibley & Ajioka, 2008; Sibley & Boothroyd, 1992].

Los genotipos que no pertenecen a los 3 principales linajes son predominantes en Suramérica [Dardé, 2004; Khan, et al. 2006; Pena, et al. 2008]. Recientemente, un análisis filogenético de múltiples cepas de *Toxoplasma gondii* de diferentes continentes agrupó las cepas en 11 haplogrupos, incluyendo las cepas tipo I, II y III. Remarcablemente, los tres principales linajes clonales, así como muchas de las cepas menos comunes o “atípicas”, parecen ser el resultado de la mezcla de cuatro

genotipos ancestrales, lo que resulta en el limitado polimorfismo alélico entre esas cepas [Khan, et al. 2007].

Parte de la variabilidad en el desarrollo de la enfermedad en las infecciones humanas puede ser debida al tipo de cepa que ocasiona la infección [De-la-Torre, et al. 2013; Sanchez, et al. 2014]. En Norteamérica y Europa la mayoría de casos humanos son ocasionados por cepas tipo II [Sibley & Ajioka, 2008; Sibley & Boothroyd, 1992]. Las infecciones con cepas tipo III parecen ser más comunes en animales, y en general parecen no estar asociadas con enfermedad [Sibley & Ajioka, 2008]. Mientras que las cepas tipo I se han encontrado en casos de toxoplasmosis congénita severa y en pacientes con HIV [Boothroyd & Grigg, 2002]. Interesantemente, en Suramérica se ha reportado una elevada seroprevalencia en casos de toxoplasmosis ocular [Roberts & McLeod, 1999; Grigg, et al. 2001; De-la-Torre, et al. 2013] y una respuesta predominante tipo Th2 ha sido relacionada con características clínicas más severas en individuos con toxoplasmosis ocular infectados con cepas tipo I/III [De-la-Torre, et al. 2014].

II.7 *Cinasas*

Los eventos de fosforilación son indispensables para la mayor parte de los procesos celulares. Esos eventos son catalizados por enzimas conocidas como cinasas [Endicott, et al. 2012]. Las cinasas transfieren el grupo γ -fosforil del ATP a su proteína diana, alterando su conformación estructural/funcional. Este proceso es conocido como fosforilación y es reversible por acción de fosfatasas, las cuales remueven el grupo fosforil de las proteínas [Blagden & Bono, 2005].

Las cinasas han sido divididas en dos grandes grupos de acuerdo al aminoácido que fosforilan: serina-cinasa si fosforila un amino ácido de serina, treonin-cinasa si fosforila un amino ácido de treonina o tirosina-cinasa si fosforila tirosina. Las serina/treonina cinasas (S/T) son proteínas altamente conservadas dentro de los eucariotas y han sido agrupadas en grandes familias basadas en la conservación de la secuencia sobretodo del dominio cinasa [Endicott, et al. 2012; Knighton, et al. 1991]. En general las Serina/Treonina cinasas contienen 12 subdominios, dentro de

una estructura compuesta por un lóbulo N, una región bisagra y un lóbulo C. El lóbulo N está compuesto principalmente por láminas- β , involucrado principalmente en la unión y orientación del ATP. El lóbulo C está formado principalmente por α -hélices y es el responsable de la unión del sustrato y la fosfo-transferencia. Los dos lóbulos están unidos por la región de la bisagra que incluye una gran α -hélice conocida como α C hélice [Hanks & Hunter, 1995].

II.8 ROP cinasas en *Toxoplasma gondii*

Los Apicomplexas son organismos que contienen un sistema de organelos apicales llamado el complejo apical (Figura 3), compuesto por micronemas, roptrías y gránulos densos [Morrissette & Sibley, 2002]. En el inicio de la invasión a la célula hospedera el contenido de las roptrías es inyectado dentro del citoplasma del hospedero y algunas se reinsertan en la vacuola parasitófora que protege al parásito del ambiente intracelular del hospedador [Boothroyd & Dubremetz, 2008]. Una vez allí, las proteínas del parásito pueden alterar los mecanismos de señalización y defensa de la célula hospedera e intervenir en el reclutamiento de organelos de la célula infectada [Hunter & Sibley, 2012].

El perfil proteómico de las roptrías de *T. gondii* y el análisis genómico de las secuencias revelan que muchas de las proteínas secretadas por este parásito son fosfatasas, proteasas y un grupo de cinasas [Bradley, et al. 2005; El Hajj, et al. 2006]. Este grupo de proteínas cinasas se les conoce como familia de las ROP cinasas o familia ROP2, en referencia al miembro representativo de la familia [El Hajj, et al. 2006; Peixoto, et al. 2010]. Se asume que existen aproximadamente 50 ROP cinasas, las cuales, algunas de ellas están involucradas en la virulencia y en la alteración de la transcripción de genes en la célula hospedera [Peixoto, et al. 2010; Hunter & Sibley, 2012; Bradley & Sibley, 2007]. Dentro de estas proteínas se incluye la ROP18, clave en la virulencia y crecimiento del parásito, la cual una vez secretada se reubica en la membrana de la vacuola parasitófora (VP). ROP5 y ROP17 otras proteínas asociadas a la VP contribuyen junto a ROP18 en el bloqueo de la respuesta inmune del hospedero [Behnke, et al. 2012; Etheridge, et al. 2014].

Además, ha sido identificada como un factor importante que contribuye a las diferencias entre cepas de *T. gondii* en términos de virulencia [Saeij, et al. 2006]. Sus niveles de expresión son más elevados en las cepas tipo I y II, confiriéndoles un fenotipo de mayor virulencia en ratón; mientras que para las cepas tipo III catalogadas como avirulentas, poseen bajos niveles de expresión de algunas ROPs en este mismo modelo [Taylor, et al. 2010]. Así mismo, se ha encontrado que ROP18 de la cepa tipo I fosforila el factor (ATF6 β) que está ubicado en el retículo endoplásmico (RE) del hospedero, causando su desestabilización y su consecuente degradación dependiente de proteosoma, afectando de esta manera el proceso de presentación antigénica, en el cual se encuentra involucrado ATF6 β [Yamamoto, et al. 2011].

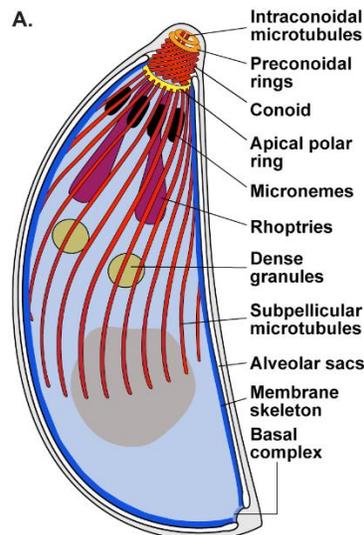


Figura 3: Esquema de *Toxoplasma gondii* representando los componentes estructurales del complejo apical, la película celular y los orgánulos secretores. Tomado de [Katris, et al. 2014].

II.9 Genes de virulencia en *T. gondii*

Los mecanismos de replicación y supervivencia de *Toxoplasma* en el interior de las células del modelo ratón y en cultivo celular se encuentran descrito en buen detalle, pero no conocemos como funcionan estos mecanismos en cuanto a la persistencia

y la multiplicación del parásito en el contexto humano. Existe una buena cantidad de evidencia acerca de genes de virulencia de *Toxoplasma* relacionados con la supervivencia del parásito en el interior del hospedador. En la estructura genética de *Toxoplasma*, los alelos a los cuales se les ha atribuido mayor potencial de virulencia, son los siguientes: el alelo que codifica la proteína ROP18, que es una cinasa activa y los alelos para las isoformas que codifican a ROP5, que son pseudocinasas. Ambas proteínas son secretadas por las roptrias al interior del citoplasma celular y cooperativamente inhiben las proteínas IRGs (GTPasas inducidas por interferón) las cuales son activadas por el INF γ y son la respuesta activa anti-toxoplasma en ratones [Fentress, et al. 2010; Steinfeldt, et al. 2010; Niedelman, et al. 2012; Behnke, et al. 2012]. Estas IRGs pueden destruir la membrana de la vacuola parasitofora (VP) que conduce finalmente a la destrucción del parásito desde adentro de la célula [Martens, et al. 2005]. Otro factor de virulencia importante es la proteína ROP16 la cual también es una cinasa activa que fosforila los factores de transcripción STAT y modula las vías de señalización inmunológicas del huésped [Saeij, et al. 2006; Saeij, et al. 2007; Yamamoto, et al. 2009; Ong, et al. 2010; Rosowski & Saeij, 2012]. La proteína secretada por los gránulos densos de toxoplasma GRA15 activa al factor de transcripción NF κ B [Rosowski, et al. 2011]. Otra cinasa activa secretada por las roptrias denominada ROP38 puede activar diferentes genes de la vía de señalización por cinasas MAP [Peixoto, et al. 2010]. Por lo anterior, la combinación alélica precisa de estos efectores secretados por toxoplasma determina su capacidad de virulencia y la estrategia de modulación de las rutas de señalización del hospedador. Los efectos de ROP18 y ROP5 han sido mejor observados en modelo ratón, los efectos de GRA15 y ROP16 fueron observados en modelos celulares como las líneas HFF (human foreskin fibroblast) y macrófagos [Saeij, et al. 2007; Yamamoto, et al. 2009; Rosowski, et al. 2011; Ong, et al. 2011]. Esto sugiere que existen adaptaciones co-evolutivas en cuanto a las estrategias de modulación-evasión y supervivencia del parásito en el interior de la célula huésped, específicamente entre los genes de virulencia de *Toxoplasma* y los genes de resistencia de los hospederos intermediarios.

II.10 Superfamilia de GTPasas inducidas por interferón y *Toxoplasma gondii*

Se han reportado cerca de 47 miembros de la superfamilia de GTPasas inducidas por interferón en ratones y humanos [Kim, et al. 2011]. Cada una de las cuales puede ser agrupada en una de las cuatro subfamilias con base en su paralogía o a su masa molecular. Estas son las IRGs (21-47 KDa), las GBPs (65-73 KDa), Proteínas de resistencia a Myxoma (MX) (72-82 KDa) y las muy grandes GTPasas inducibles (VLIGs/GVINs) [MacMicking, 2004; Martens & Howard, 2006]. Todas las GTPasas inducidas por interferón con excepción de proteínas de resistencia a Myxoma (MX), son transcriptas en respuesta a interferones tipo I (IFN- α/β), tipo II (IFN γ) y tipo III (IFN λ) [Kim, et al. 2011; Klamp, et al. 2003; Degrandi, et al. 2007]. Varios estudios en ratones han identificado un mecanismo esencial dependiente de IFN γ e independiente de iNOS para controlar a *Toxoplasma gondii*. Este mecanismo está mediado por un grupo de GTPasas inducidas por IFN γ llamadas GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGs), ya que ratones deficientes de *Irgm3* que producen cantidades normales de IFN γ no pueden controlar la replicación del parásito [Taylor, et al. 2004]. Varios miembros de esta familia son requeridos para la resistencia contra *Toxoplasma gondii* y otros patógenos intracelulares, pero se requieren IRGs específicas para cada patógeno, lo que indica la diversidad de funciones de esta familia [Singh, et al. 2006]. Sin embargo, mientras que se han identificado cerca de 23 IRGs en ratón, el genoma humano solo contiene dos genes para IRG, y su expresión no es inducida por interferón [Taylor, et al. 2004].

Las proteínas de unión a guanilato p65 (GBPs) son otra familia de enzimas implicadas en la inmunidad contra patógenos intracelulares, y la expresión de GBPs puede ser inducida por IFN γ en células humanas y de ratón [Vestal & Jeyaratnam, 2011]. Las GBPs pertenecen a la súper familia dinamina, y como otros miembros de esta súper familia, se ha demostrado su habilidad para oligomerizarse, realizar funciones enzimáticas e interactuar con membranas. Las (GBPs) pueden

localizarse en las vacuolas que contienen *Salmonella enterica*, *Chlamydia trachomatis*, y *T. gondii* [Kim, et al. 2012].

II.11 Inflamosoma

El inflamosoma es un complejo multiproteico que hace parte del sistema inmune innato. Éstos contienen proteínas “censoras” que responden cuando detectan señales de varios microorganismos y señales de daño en el ambiente intracelular y funcionan por la activación de caspasa-1, una enzima que media el clivaje y la liberación de citocinas proinflamatorias como IL1 β e IL18 [Gorfu, et al. 2014].

II.12 GBPs y activación del inflamosoma

Esfuerzos iniciales se enfocaron en estudiar la contribución de cada GBP humana o de ratón en la activación canónica del inflamosoma. Shenoy et al. 2012 a través de ARN pequeños de interferencia identificaron dos ortólogos, la GBP5 humana y su contraparte en ratón (67% de identidad en sus aminoácidos), las cuales son necesarias para la activación del inflamosoma NLRP3. También se observó en ratones GBP5^{-/-} defectos en la activación del inflamosoma dependiente de IFN γ (procesamiento de caspasa-1, y liberación de IL1 β e IL18) en respuesta a ligandos activadores del inflamosoma como LPS [Shenoy, et al. 2012]. Trabajos subsecuentes han verificado que NLRP3 es más dependiente de GBPs en células activadas por IFN γ , que en células no activadas [Man, et al. 2015; Finethy, et al. 2015; Meunier, et al. 2015]; presumiblemente porque el IFN γ induce la expresión de las GBPs [Kim, et al. 2011; Degrandi, et al. 2007]. Notablemente, los defectos en el inflamosoma mediados por GBP5 son independientes de la especie hospedera (humanos o ratón) o del componente genético entre las cepas de ratón [Fernandes-Alnemri, et al. 2009]. En ratones GBP5^{-/-} también se ha encontrado un aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas que requieren de caspasa-1, como es el caso de la infección por diferentes especies de *Listeria* y *Francisella* [Shenoy, et al. 2012; Man, et al. 2015; Meunier, et al. 2015].

Remarcablemente, se han encontrado deficiencias dependientes de GBP5 en la activación del inflamosoma en macrófagos, en respuesta a agentes activadores estériles del NLRP3 (como sales de urato monosódico, aluminio y adyuvantes de saponina como el Q21) [Shenoy, et al. 2012; Meunier, et al. 2014; Man, et al. 2015; Meunier, et al. 2015]. Por lo tanto, se ha planteado que la GBP5 actúa como un reóstato para el inflamosoma en respuesta a PAMPs, pero no a DAMPs *in-vivo* [Kim, et al. 2012].

Así mismo, estudios con macrófagos murinos derivados de medula ósea deficientes de GBP2, demostraron el requerimiento de la GBP2 para la producción de IL1 β , IL18 y factores de muerte celular en respuesta a diferentes especies de *Salmonella* [Coutermarsh-Ott, et al. 2016]. GBP2 junto a GBP5, también han sido identificados como cofactores de la inmunidad dependiente de AIM2 en contra de *Francisella novicida* [Meunier, et al. 2015; Man, et al. 2015]. El mecanismo de activación del inflamosoma NLRP3 implica que la GBP5 inducida por IFN γ ayuda al ensamblaje del inflamosoma NLRP3 en respuesta a los PAMPs de bacterias que han sido secretados dentro del citosol. Estas señales son acompañadas por el flujo de potasio (K⁺) y la movilización de la GBP5 tetrámerica que se une vía el dominio G (GD) con el dominio pirin del NLRP3, para iniciar el ensamble del complejo inflamosoma con la proteína adaptadora ASC, que a su vez ayuda a la unión del complejo NLRP3 con el zimógeno de la procaspasa-1. Este ensamblaje dependiente de GBP5 conduce finalmente a la auto proteólisis de Caspasa 1 y por consiguiente a la activación por clivaje de la IL1 β e IL18 [Shenoy, et al. 2012].

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

T. gondii es un parasito altamente exitoso debido a los mecanismos de supervivencia que este establece en el interior de la célula que invade. Este parásito tiene la capacidad de modular y evadir mecanismos inmunológicos del hospedero,

a través de la secreción de ciertas proteínas que interactúan a su vez con proteínas que hacen parte de los sistemas de protección de su hospedador.

Entre las proteínas de *Toxoplasma* que han sido identificadas como los más importantes efectores que controlan la respuesta anti-parasitaria del hospedador en el modelo de infección en ratón, están las proteínas cinasas de roptrias ROP18 y ROP5, que interactúan directamente con el sistema dependiente de IFN γ IRG-GBPs.

Arenas, et al. 2015 desarrollaron un programa bioinformático basado en la comparación de la información espectral de proteínas para sugerir nuevas interacciones proteína-proteína. Este programa se aplicó para la búsqueda de interacciones entre ROPs de *Toxoplasma gondii* y proteínas humanas. El programa sugiere a las GBPs humanas como sustratos para ROP5 y ROP18.

Hasta ahora no se ha descrito ni confirmado si estos factores de virulencia encontrado en ratón tienen un papel en la infección a células humanas. Tampoco se conocen los mecanismos moleculares ni las proteínas efectoras de *Toxoplasma* (proteínas cinasas de roptrias) que podrían interactuar con proteínas humanas.

Dado que ROP18 y ROP5 son los alelos de *Toxoplasma* que más correlacionan con virulencia en la mayoría de cepas en ratón; en este trabajo buscamos evidenciar por métodos bioquímicos si existen proteínas humanas que sean sustratos de ROP5, ROP18, ROP11 y ROP39; también buscamos saber si ROP18 interfiere en la activación del inflamosoma en células humanas.

IV. OBJETIVO

Objetivo general

Identificar sustratos para las proteínas ROP5, ROP18, ROP11, ROP39 y hGBP5 en una línea celular humana (Hela) y en lisados de *Toxoplasma*.

V. MATERIALES Y METODOS.

V.1. Método computacional

Para la predicción de sustratos humanos para las proteínas ROPs se desarrolló un algoritmo de comparación de proteínas, al cual llamamos MSCA (Multiple Spectral Comparison Alignment)

El algoritmo consiste entonces en tomar la secuencia primaria de cada proteína y transformarlas en series numérica basadas en diferentes características fisicoquímicas de los aminoácidos, teniendo ahora proteínas como series numéricas estas son susceptibles de ser analizadas por métodos de información espectral como la transformada directa de Fourier (TDF); esta técnica tiene la capacidad de encontrar patrones de repetición en la series y generar un periodograma, el cual lleva toda la información de la serie; Entonces si dos periodogramas correspondientes a dos proteínas son similares en alguna parte de sus periodogramas, significa que las dos proteínas están relacionadas y que esa relación puede ser funcional, estructural o de interacción [6-7].

La manera como el programa MSCA arroja los resultados es semejante a la herramienta BLAST en el cual tenemos una secuencia pregunta (*query*) y la comparamos contra todas las secuencias de una base de datos previamente construida; el algoritmo entonces relaciona mi secuencia pregunta por su parecido espectral con las demás proteínas de la base de datos; las proteínas son ubicadas en una lista descendente de acuerdo al valor de probabilidad del parecido espectral a la secuencia pregunta.

Los pasos del algoritmo son:

- 1- Todas las proteínas bajo análisis están contenidas en un archivo de texto (.txt) en formato FASTA (nuestra secuencia pregunta es la última proteína del archivo); cada proteína del archivo es transformada a una serie numérica de acuerdo a un índice fisicoquímico particular.
- 2- Cada serie es entonces traducida a su espectro de frecuencia por una TRF (transformada rápida de Fourier).
- 3- La función de densidad espectral de nuestra proteína pregunta es entonces comparada por una prueba de igualdad de espectros con cada función de densidad espectral de cada proteína de la base de datos.
- 4- La probabilidad promedio (*p-value*) de cada periodograma es depositada en una matriz de disimilaridad y se ordenan los datos de acuerdo a la probabilidad del parecido espectral entre la secuencia pregunta y todas las proteínas de la base de datos. Observar detalles en [Arenas, et al 2015].

V.2. Mantenimiento de Células HFF y de Taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH, RH Δ ROP18 y RH Δ ROP5

La línea celular HFF (fibroblastos de prepucio humano) de crecimiento en adherencia se propagó en medio DMEM, suplementado al 10% con suero fetal bovino y penicilina/ estreptomycin (1 μ g/ml) en cajas de cultivo de 25 cm. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Los Taquizoítos de la cepa RH, RH Δ ROP18* y RH Δ ROP5*, se mantuvieron y se propagaron en esta línea celular bajo las mismas condiciones. Cuando las células HFF alcanzaron una confluencia del 100% se realizaron dos lavados con solución salina, se digirió con 150 μ L de tripsina 1X y se paró la reacción con 1ml de DMEM, suplementado al 10% con suero fetal bovino. Las células se recuperaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 7 minutos.

* RH Δ ROP18 es la cepa RH (tipo I) pero el gen ROP18 es ausente (knock-out completo). Fenotípicamente esta cepa mutante es moderadamente atenuada, con una menor tasa de mortalidad y de crecimiento comparada con el RH normal en

ratones BALB/c. RH Δ ROP18: DL₅₀=100. [Yamamoto, et al. 2011; Behnke, et al. 2015]

* RH Δ ROP5 es también cepa RH, pero con la ausencia de todos los alelos para ROP5 (ROP5A/B/C) (knock-out completo). Este mutante es considerablemente atenuada RH Δ ROP5: DL₅₀ \geq 10⁶. [Behnke, et al. 2015].

V.3. Diseño de plásmidos Sintéticos.

Las secuencias para ROP11 y ROP39 (alelos tipo I) fueron sintetizadas por la compañía DNA 2.0 (www.atum.bio) e insertadas en el vector Pj414R39dSP que contiene las siguientes características: promotor T7, resistencia a la ampicilina, ORF (secuencia codificante) de ROP39 o ROP11 ambos sin péptido señal, sitio de unión a ribosoma (RBS), sitio de reconocimiento 6xHis en el C-terminal, origen de replicación y uso de codón optimizado para *Escherichia coli*. Los constructos fueron secuenciados para verificar el correcto marco de lectura DNA 2.0 (www.atum.bio).

Las secuencias de ROP11 y ROP39 fueron subclonadas a partir del vector Pj414R39dSP en el vector pGEX4T1 utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I (NEB: New England Biolabs). Solo se trasladó la ORF de ROP11 y ROP39 al vector pGEX4T1; este vector contiene características similares al vector Pj414R39Dsp; la diferencia es que la etiqueta de purificación e identificación es GST (glutación S-transferasa) en la posición N-terminal de la ORF.

V.4. Diseño de cebadores

Todos los cebadores fueron sintetizados por GATC Biotech (gatc-biotech.com, Alemania).

Los cebadores utilizados para amplificar ROP11, ROP39 y hGBP5 e insertarlos en el vector pGEX4T1 (para la producción de proteínas recombinantes fusionadas a GST, fw: directo, bw: reverso) fueron los siguientes, (se subrayan las secuencias de restricción para cada enzima):

ROP11fw: 5' GGATCCAGTGCAACTCACCACCATGCAGTG 3' *Bam*HI
 ROP11bw: 5' GCGGCCGCCGTA^TCTTCCCCGTCACGGGGTAG 3' *Not*I
 ROP39fw: 5' GGATCCCTGCTGGACCGCGTTCTG 3' *Bam*HI
 ROP39bw: 5' GCGGCCGCCTTAAACGATGCTCTCACGCAAC 3' *Not*I

hgbp5fw: 5' GGATCCGCTTTAGAGATCCACATGTCAGACCC 3' BamHI
 hgbp5bw: 5' GCGGCCGCTTTAGAGTAAAACACATGGATCATCGTTATTAACAGTC 3' NotI

Los siguientes cebadores se usaron para amplificar las GBPs humanas del 1 al 5 e insertar cada una en el vector de activación pGADT7 (AD) y en el vector de unión al ADN pGBKT7 (BD) que son los dos componentes del sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).

hGBP1fw: 5' CATATGGCATCAGAGATCCACATGACAGGC 3' NdeI
 hGBP1bw: 5' GAATTCTAGCTTATGGTACATGCCTTTCGTCG 3' EcoRI
 hGBP2fw: 5' CCCGGGTATGGCTCCAGAGATCAACTTGCC 3' XmaI
 hGBP2bw: 5' GGATCCTAGAGTATGTTACATATTGGCTCCAATGATTTGC 3' BamHI
 hGBP3fw: 5' CATATGGCTCCAGAGATCCACATGACAGGC 3' NdeI
 hGBP3bw: 5' GGATCCTAGATCTTTAGCTTATGCGACATATATCTCTTGG 3' BamHI
 hGBP4fw: 5' CCCGGGTATGGGTGAGAGAACTCTTCACGC 3' XmaI
 hGBP4bw: 5' GGATCCTAAATACGTGAGCCAAGATATTTTGTCCCTAC 3' BamHI
 hGBP5fw: 5' CATATGGCTTTAGAGATCCACATGTCAGACCC 3' NdeI
 hGBP5bw: 5' GGATCCTAGAGTAAAACACATGGATCATCGTTATTAACAGTC 3' BamHI

Todas las enzimas fueron revisadas que no cortaran en sus respectivas secuencias codificantes, utilizando el programa NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) BioLabs New England.

V.5. Extracción de RNA de células Hela y RT-PCR

Para la amplificación de las ORF de cada GBP, se purificó ARN mensajero a partir de 20 millones de células Hela previamente estimuladas por 24 horas con IFN γ utilizando TRIZOL "TRI Reagent de Sigma cat: T9424 siguiendo las recomendaciones del fabricante". Las secuencias para las GBPs, se amplificaron por RT-PCR utilizando el sistema SuperScript™ III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, cat: 12574035).

La reacción para RT-PCR SuperScript™ III se hizo en un solo tubo de PCR. 25 μ L Búfer de reacción 2X, 2 μ L del templado de RNA (100 ng/ μ L), 1 μ L de cada cebador sentido y anti-sentido (10 nm cada uno), y 1 μ L del mix de enzimas SuperScript™ III RT y Platinum® Taq High Fidelity. Todo se llevó a un volumen final de 50 μ L con H $_2$ O destilada y libre de nucleasas.

El programa de amplificación utilizado fue: Primer ciclo de retro-transcripción: 58°C por 30 min y luego 2 min a 94°C. La amplificación se realizó corriendo 30 ciclos: denaturación a 94°C por 10 seg; alineamiento de primers a 58°C por 30 seg y extensión 68°C por 2 min. Se realizó un último ciclo final de extensión de 68°C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1%.

V.6. Digestión y ligación en los vectores pGEX4T1, pGADT7 y pGBKT7

Digestión: los productos de RT-PCR de las GBPs 1-5 fueron purificados con el sistema Zymoclean gel DNA recovery Kit (Zymo Research Catalog: D4002). Estos productos junto con los vectores pGEX4T1, pGADT7 y pGBKT7 fueron doblemente digeridos toda la noche a 37°C con las respectivas enzimas de restricción (las enzimas utilizadas se observan en el punto V.4). El protocolo se realizó de la siguiente manera: i) para la digestión de los vectores se empleó: 1 µL (10 unidades) de cada enzima de restricción, 1 µL de cada vector (la concentración de los vectores fue de 1 µg/µL), 5 µL 1x CutSmart búfer (NEB), y se completó con H₂O ultra pura hasta 50 µL. ii) para los insertos se utilizaron: 8 µL de producto de PCR purificado, 1 µL de cada enzima de restricción y 5 µL de 1x CutSmart búfer (NEB); se completó con H₂O ultra pura hasta 50 µL. Los insertos y vectores luego de la digestión se visualizaron en gel de agarosa al 1%. Se puede utilizar la doble digestión en la misma reacción, debido a que todas las enzimas funcionan con búfer universal CutSmart búfer (NEB).

Ligación: Teniendo en cuenta la relación de 1 de vector por 4 de producto de PCR, se tomó 1 µL de vector y 2 o 3 µL de inserto y se ligó con 2 µL de búfer de ligación T4 (10X) y 1 µL de enzima T4 DNA ligase (NEB) (la relación vector/producto se hace de acuerdo a la intensidad del brillo del bromuro de etidio en el gel de agarosa y los tamaños de ambos, vector y producto de PCR). Todo se llevó a volumen final de 20 µL con H₂O ultra pura. Las ligaciones se incubaron a 16°C toda la noche. Bajo este mismo protocolo se ligaron los insertos ROP11, ROP39 y hGBP5 al vector pGEX4T1. Así mismo se ligaron los insertos ROP5A, ROP5B, ROP5C, ROP18, ROP17, ROP39 y ROP11 a los vectores pGADT7 y pGBKT7. “Las secuencias para

ROP5A, ROP5B, ROP5C, ROP18 y ROP17 fueron obtenidos por PCR a partir de una librería de ARN mensajero de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*".

V.7. Transformación en *E. coli* (DH5 α) y *E. coli* ROSSETTA (DE3).

Todos los constructos obtenidos fueron utilizados para transformar células competentes *E. coli* (DH5 α) y ROSSETTA™(DE3) pLysS; DE3 fue utilizada para la expresión de las proteínas recombinantes con los constructos en pGEX4T1. ROSSETTA tiene la capacidad de expresar ARNt poco frecuentes en *E. coli* y son expresados por la resistencia al cloranfenicol. Un volumen de 50 μ L de células *E. coli* ROSSETTA (DE3) químicamente competentes fueron transformadas con aproximadamente 1 μ g/ μ L de cada constructo; se mezcló suavemente y se dejó en hielo por 30 min. Luego se generó choque térmico de 42°C por 1 min y se dejó en hielo nuevamente. A cada tubo se agregaron 400 μ L de medio LB y se dejó en agitación a 200 rpm por 1 hora a 37°C. Luego se sembraron en cajas de Petri con agar LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml. Colonias positivas fueron seleccionadas en medio LB overnight a 37°C. Purificación de plásmidos de cada colonia crecida se realizó con el sistema Zippy plasmid miniprep kit (Zymo Research Catalog: D4020). Los plásmidos purificados fueron secuenciados por GATC Biotech germany (gatc-biotech.com) para verificar que la secuencia codificante estuviera correcta.

V.8. Purificación de las proteínas recombinantes GST-ROP39, GST-ROP11 y GST-hGBP5.

Células competentes de *Escherichia coli* ROSSETTA™(DE3) pLysS fueron transformadas con los constructos GST-ROP39, GST-ROP11 y GST-hGBP5 (el vector pGEX4T1 posee el tag de fusión GST Glutation S-Transferase). Se crecieron entonces 4 litros de medio LB a partir de 100 ml de medio LB conteniendo bacterias transformadas con cada uno de los constructos. Los medios con bacterias fueron suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina y de cloranfenicol. Estos fueron incubados a 37°C en agitación constante a 200 rpm, y se calculó la concentración de bacterias por turbidimetría en espectrofotómetro a 600 nm, hasta lograr una densidad óptica (OD) de 0,7; A partir de allí se le agregó 100 μ l a 1 molar del inductor

IPTG para obtener una concentración final de 0,1mili-molar de IPTG por litro de bacterias. Luego las bacterias fueron crecidas a 25°C toda la noche.

Los botones de sedimentación de bacterias fueron obtenidos por centrifugación a 5.000 g por 30 min y luego fueron resuspendidos en PBS y DTT (Dithiothreitol) 2mM pH 7,4 con un coctel inhibidor de proteasas de Roche (catalogo: 05 056 489 001). Las bacterias fueron lisadas tres veces por prensa francesa a 20 PSI. La lisis se centrifugó a 20,000 g por 35 min y se recuperó el sobrenadante. Estos sobrenadantes que contienen las proteínas recombinantes fueron purificados en condiciones semi-denaturantes, utilizando el sistema de cromatografía líquida ÄKTA con columnas de GS-TRAP (columnas de afinidad de glutatión sefarosa GE Healthcare). Se utilizó como tampón de unión a la columna GS-TRAP (PBS/DTT 2 mM pH 7,4 con concentración final de Triton X-114 del 1%). El tampón de elución fue (PBS/DTT 2mM pH 7,4 con 10 mM glutatión reducido a pH 7,4). El proceso de purificación se realizó a 4°C en rotación constante. La presencia y pureza de las proteínas purificadas fueron determinadas por SDS-PAGE al 10%.

V.9. Pull-down

Primero, las proteínas recombinantes fueron concentradas y amortiguadas por centrifugación en filtros Amicon Ultra-4 30K (Millipore) con búfer PBS 7,4 y 2 mM DTT, con la finalidad de eliminar las trazas de glutatión en las proteínas purificadas.

Perlas de glutatión sefarosa 4D (Cat: 17-0756-01) fueron lavadas cuatro veces en búfer frío de PBS pH 7,4 y DTT 2mM por centrifugación a 13,500 g por 30 seg a 4°C.

Funcionalización de las perlas de sefarosa a los cebos (Baits) GST-ROP11, GST-ROP39 y hGBP5: 100 µL de perlas lavadas fueron incubadas por 2 horas en 400 µL de búfer PBS pH 7,4 y DTT 2 mM con las proteínas recombinantes (cebos) GST-ROP39, GST-ROP11, GST-hGBP5 y los respectivos controles de GST en agitación constante a 4°C (se utilizaron 100 µL de perlas por cada *Pull-down* y se tuvo en cuenta que cada control de GST tuviera una concentración similar a las proteínas recombinantes que fue de 50 µg/ml). Luego de la incubación, las perlas

fucionalizadas con los cebos fueron lavadas 4 veces en búfer frío de PBS pH 7,4 y DTT 2 mM por centrifugación a 13,500 g por 30 segundos a 4°C (con la finalidad de eliminar interacciones inespecíficas con las perlas de glutatión sefarosa).

Preparación de las proteínas presas (*Preys*): Los lisados celulares de Hela, MEFs y *Toxoplasma* se obtuvieron de la siguiente manera: 20 millones de células Hela, MEFs o Taquizoitos de *Toxoplasma*, fueron utilizadas para cada reacción de *Pull-down*; Hela y MEFs fueron pre-estimuladas con 100 unidades de IFN γ por 24 horas respectivamente. Se utilizaron 20 millones de Taquizoitos para cada reacción de *Pull-down* (también se utilizaron la misma cantidad de parásitos y células para los controles con GST solo). Las células fueron lisadas con 200 μ L búfer de lisis (150mM NaCl, 20 mM Tris/HCL (pH 7,6), 5 mM MgCl₂ y 0,1% detergente Nonidet-P40, coctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 10 μ g/ml, por 1 hora a 4°C en agitación constante. Luego se centrifugó a 14,000 g por 30 seg a 4°C y se tomaron los sobrenadantes que contenían las proteínas presas.

Finalmente, para los experimentos de *Pull-down* se mezclaron en tubos eppendorf de 1,5 ml, 100 μ L de perlas fucionalizadas con cada una de las GST-proteínas recombinantes (cebos), 400 μ L de búfer PBS pH 7,4 con DTT 2mM y 200 μ L del respectivo lisado (Hela, MEFs o Toxo) (presas). La concentración final de todas las proteínas recombinantes fue de aproximadamente 50 μ g/ml a volumen final de la mezcla de *Pull-down* de 700 μ L. Toda la mezcla se encubo a 4°C en rotación constante toda la noche. Posteriormente se realizaron 5 lavados con búfer de lisis sin detergente (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,6), 5 mM MgCl₂) a 13,500 g por 30 seg a 4°C.

Las interacciones fueron eluidas de las perlas con 50 μ L de 2x Laemmli sample búfer, y calentadas por 10 min a 95°C. Todas las muestras obtenidas del proceso de *Pull-down* fueron visualizadas en SDS-PAGE teñido con nitrato de plata.

V.10. Sistema 2 híbridos en levadura (*Y2H*).

Una vez obtenidos los constructos pGADT7-hGBPs, pGADT7-ROPs, pGBKT7-hGBPs y pGBKT7-ROPs; éstos fueron utilizados para co-transformar levaduras

Saccharomyces cerevisiae cepa PJ69-4 α con 1 μ g de plásmido de ambos constructos (pGADT7 y pGBKT7 conteniendo los genes indicados GBPs y ROPs). La co-transformación se realizó con búfer de transformación (40% polietilenglicol 3350, 0,2M de LiAc, 0,5 mg/ml de ADN de transformación y 0,1M de DTT) en constante agitación por 30 min a 45°C. Las levaduras co-transformadas fueron seleccionadas en platos con agar sólido doble carentes de los aminoácidos leucina y triptófano (SD/-Leu/-Trp). Las colonias que crecieron en este medio (colonias co-transformadas) fueron repicadas en platos con medio agar triple carente de los aminoácidos leucina, triptófano e histidina (SD/-Leu/-Trp/-His) conteniendo además 3-amino-1,2,4-triazole 0,5mM.

V.11. Western blot

Los anticuerpos usados en el *Pull-down* western blot fueron: anticuerpo monoclonal 3E2 hecho en ratón contra todas isoformas ROP5A/B/C [Leriche & Dubremetz, 1991]. Anticuerpo monoclonal (3.1.2 y 2.4.21) hecho en rata contra GRA7 (No publicado). Anticuerpo anti GST (GE Catalogo: 2745770V). Utilizamos como anticuerpo secundario, anticuerpo anti ratón y anti rata marcado con HRP (peroxidasa de rabano); como sustrato de revelación quimioluminisciente utilizamos el sistema SuperSignal west pico (Thermo scientific catalogo: 34080).

V.12. Selección de muestras de individuos con toxoplasmosis.

Las muestras de sangre total que se incluyeron en el estudio fueron recolectadas en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío y en la Clínica Barraquer de la ciudad de Bogotá, con la respectiva firma del consentimiento informado y almacenadas en tubos de 4 ml con EDTA. Se incluyeron tres grupos: i) negativos para *Toxoplasma* (pruebas de anticuerpos en suero IgM e IgG negativos), ii) individuos crónicos-asintomáticos (IgM negativos e IgG positiva para *Toxoplasma*) con examen al fondo de ojo sin lesión en retina, iii) individuos con toxoplasmosis ocular diagnosticados previamente por el médico del Centro de Salud de la Universidad del Quindío (cicatriz ocular más prueba en sangre de IgG anti *Toxoplasma* positivo) o de la Clínica Barraquer (prueba de carga de anticuerpos suero/humor acuoso positiva con índice<2) o PCR positivo para el gen B1 o

secuencia de repetición RE (GenBank accession number AF146527) de *Toxoplasma* en humor acuoso).

V.13. Diagnóstico serológico de anticuerpos anti-toxoplasma.

La prueba serológica para *T. gondii* fue realizada con una ELISA comercial Toxo IgG e IgM [Human.de-Germany].

V.14. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y estímulos celulares.

Para cada muestra de sangre se realizó el aislamiento de PBMCs mediante un gradiente de densidad con el reactivo Histopaque®-1077 (Sigma®, 10771). Estas células fueron resuspendidas en RPMI 1640 (Gibco, 11875-093) suplementado con penicilina-estreptomicina (1 µg/ml) (Gibco®, 15070), y posteriormente se realizó el conteo en hemocitómetro y se determinó la viabilidad con azul tripano.

Se cultivaron 1×10^6 PBMCs en 1ml de RPMI en placas de 24 pozos, con los siguientes estímulos por triplicado: como control positivo: 10 µg/ml de Concanavalina A (Sigma, C27275). Como control negativo se utilizó RPMI. Se realizó el estímulo con las cepas *Toxoplasma gondii* RH y RHΔROP18 con un MOI (multiplicidad de la infección) de 2 parásitos por 1 célula. Luego de 24 horas, el cultivo de PBMCs se centrifugó a 2.500 g, por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se preservaron en alícuotas a -80°C para la posterior medición de citocinas y el precipitado se utilizó para medir la cantidad de pro-IL1β por western Blot. Todas las condiciones del experimento se realizaron por duplicado.

V.15. ELISA de captura para la medición de IL1β.

Los niveles de citocinas en los sobrenadantes provenientes del cultivo de PBMCs con los diferentes estímulos se midieron a través de una ELISA de captura comercial para IL1β (negativos para *Toxoplasma* n= 5, crónicos asintomáticos n= 8, toxoplasmosis ocular n= 7) con el sistema Human IL1β - ELISA MAX™ Deluxe de Biolegend® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Debido a la alta variabilidad en la producción de las citocinas en los sobrenadantes de PBMCs estimulados entre los diferentes individuos, se realizó un índice de producción de IL1 β , el cual corresponde al cociente entre la producción de IL1 β inducida con la cepa RH Δ ROP18 sobre la producción de IL1 β inducida con la cepa RH. RH Δ ROP18/RH=1 significa que no existen diferencias en la producción de IL1 β por el efecto de la cepa mutante y la salvaje. RH Δ ROP18/RH<1 significa que hay mayor producción de IL1 β por efecto de la cepa salvaje RH. RH Δ ROP18/RH>1 significa que hay mayor producción de IL1 β por efecto de la cepa mutante RH Δ ROP18.

V.16. Medición de pro-IL-1 β por Western Blot.

Los precipitados de PBMCs de tres individuos por grupo clínico, estimulados previamente, fueron lavados con DPBS (Lonza®, 17-512Q) y centrifugados a 2.500 g a 4°C por 5 minutos. Cada precipitado de células se resuspendió en búfer RIPA (Amresco®, N653), con inhibidor de proteasas (Amresco®, M221) e inhibidor de fosfatasas (Sigma®, P0044). Los lisados se incubaron durante 15 minutos, 4°C en agitación y finalmente se centrifugaron a 18.000 g durante 20 minutos, 4°C. Los lisados fueron almacenados en alícuotas a -80°C.

La medición de la concentración de proteínas en cada uno de los lisados se realizó con el método del ácido bicinonínico (BCA), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (Amresco®, 0332). Todos los lisados se llevaron a la misma concentración con PBS pH 7,4, se desnaturalizaron con tampón Laemmli 5x (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromo fenol, 0,125 M Tris-HCl) y se incubaron 10 minutos, 95°C.

Posteriormente se realizó la separación de las proteínas de cada uno de los lisados a través de electroforesis en un SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE healthcare® 10600007) con el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo de BioRad®. Luego, se realizó una tinción de Ponceau 1% para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana.

La membrana se bloqueó durante una hora con TBST 1X y BSA (Amresco®, 0332) al 3%. Luego se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti IL1 β 1:200 hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology® H-153, SC-7884) y con anti β -Actina 1:3.000 hecho en raton (Ambion®, AM4302) que fue utilizado como control. Ambos anticuerpos fueron diluidos en TBST 1X y BSA (Amresco®, 0332) al 3%. Luego se incubó la membrana durante 1 hora con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo 1:30.000 (Sigma®, A3687) y anti-IgG de ratón 1:30.000 (Sigma®, A3562), ambos hechos en cabra y conjugados a fosfatasa alcalina. Los anticuerpos se diluyeron en TBST 1X y BSA (Amresco®, 0332) al 3% y finalmente el Western blot se reveló con BCIP/NTB (Invitrogen®, 100002902). La reacción se detuvo a los 10 minutos con TBST 1X. Se realizó una cuantificación relativa por densitometría en el programa IMAGEJ.

V.17. Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos con el test de normalidad Shapiro-Wilk. debido al tamaño de la muestra y a que los datos no presentaban una distribución normal, los índices de citocinas entre los tres diferentes grupos clínicos se realizó bajo un test de Kruskal-Wallis. Finalmente, la comparación entre dos grupos clínicos del índice de citocinas se realizó con la prueba Mann-Whitney. El análisis de datos fue realizado en el paquete estadístico GraphPad Prism v6.01.

VI. RESULTADOS.

VI.1. *El algoritmo MSCA sugiere que las GBPs humanas (guanylate binding proteins) son posibles sustratos de ROP18 y ROP5.*

El programa computacional MSCA fue previamente evaluado y arrojó una agudeza sensibilidad y especificidad del 70% y 80% respectivamente para predecir interacciones proteína-proteína [observar Arenas, et al. 2015]. Para estos análisis tomamos las secuencias de aminoácidos de 1.264 proteínas, las cuales sabíamos de antemano que son inducidas por IFN γ , debido a que ésta es la principal citocina

que genera resistencia a toxoplasma [Yarovinsky, 2014]. De acuerdo a los resultados sugeridos por el programa, se pudo predecir que ROP18 y ROP5 poseen la mejor relación espectral con las familias IRGs, GBPs y factores de transcripción de la familia SMAD y CREB. Se pueden observar las interacciones ROP18-IRG6a bajo el descriptor EIIP (*Electron Ion Interaction Potential*) y ROP5-IRG6a con los descriptores P001 y P1 (*polarizabilidad*). Ver Anexos 1 y 2.

VI.2. *ROP11 y ROP39 poseen perfiles de expresión similares a los factores de virulencia ROP16 y ROP18.*

Nosotros buscamos evidenciar si otras ROP cinasas diferentes a ROP18 y ROP5 podrían interactuar con factores importantes del hospedero; para esto comparamos los niveles de expresión de RNA mensajero de los genes ROP11 y ROP39 con la cinética de expresión de los genes ROP16 y ROP18 los cuales están relacionadas con virulencia en *T. gondii*. Podemos observar que los perfiles de ROP11 y ROP39 son muy similares a los efectores ROP16 y ROP18 (Figura 4). ROP39 es identificado con el gen id TGGT1_262050 para la cepa tipo 1 (GT1) en TOXODB (www.toxodb.org); éste gen se localiza en el cromosoma VIIIb, donde también se encuentran varios genes relacionados con virulencia tales como ROP18 y ROP16, además posee un péptido señal y es considerada una cinasa activa por conservar los aminoácidos catalíticos característicos de actividad cinasa (toxodb.org/toxo/app/record/gene/TGGT1_262050) [Talevich & Kannan. 2013]. ROP11 se identifica con el gen id TGGT1_227810, posee péptido señal, se localiza en el cromosoma X y se asume como una cinasa activa, aunque su triada catalítica se asume incompleta (toxodb.org/toxo/app/record/gene/TGGT1_227810) [Talevich & Kannan. 2013]. La suma de esta información nos sugiere que ROP11 y ROP39 pueden ser candidatos interesantes para evaluar su función *in-vitro*.

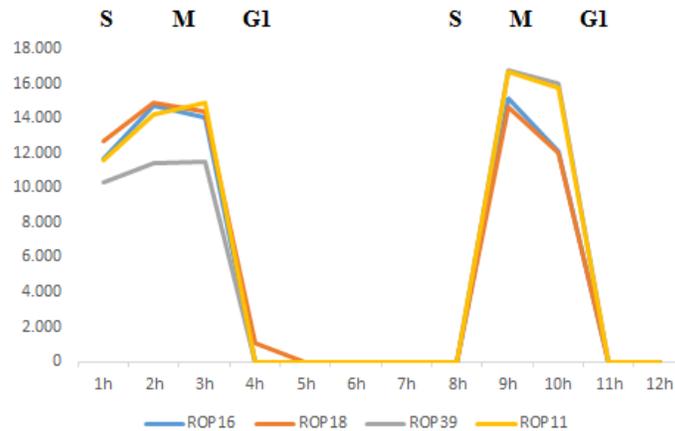


Figura 4: perfiles de expresión de las proteínas ROP11, ROP39, ROP16 y ROP18 en el ciclo celular de *Toxoplasma gondii* por 12 horas infectando células HFF. Los perfiles de expresión fueron tomados de gene expression omnibus (GEO) Series GSE19092. (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19092) [Behnke, et al. 2010].

VI.3. MSCA sugiere a SLC3A2, ANXA6 como posibles sustratos para ROP11

Aplicando nuestro algoritmo utilizando como secuencia pregunta a ROP11, observamos que las proteínas más frecuentes ubicadas en el ranking de las 25 primeras proteínas con relación a la secuencia preguntan y bajo 11 descriptores fueron: SLC3A2 (*Solute Carrier Family 3 Member 2*) con 6 apariciones, ANXA6 (*Annexin A6*) con 4 apariciones y hGBP5 también con 2 apariciones (ver anexo 3).

VI.4. MSCA sugiere a IRGd, ROP5 y SHMT2 como posibles sustratos para ROP39.

Para el caso de ROP39 observamos que las proteínas más frecuentes fueron: IRGd (*Interferon gamma inducible d*) con 7 apariciones, ROP5 también con 7 apariciones y SHMT2 (*Serine Hydroxymethyltransferase 2*) con 6 apariciones (ver anexo 4).

VI.5. Purificación por cromatografía de afinidad de GST-ROP11.

Para confirmar las anteriores interacciones propuestas por medio del programa computacional MSCA; se diseñó el constructo GST-ROP11 en el vector pGEX4T1

con el cual se transformaron bacterias competentes *E. coli* ROSSETTA (DE3) inducidas por 24 horas a 25°C con 0,1M de IPTG a partir de una densidad óptica de 0,7. Se obtuvo un pellet a partir de 4 litros de bacterias y este fue lisado por ultrasonido. Posteriormente la proteína recombinante fue purificada por gravedad en columna de glutatión sefarosa 4B y se eluyó con búfer 10 mM glutatión reducido. El proceso de purificación fue confirmado por SDS-PAGE al 10% (para más detalles observar materiales y métodos). Con este proceso metodológico logramos purificar la proteína recombinante GST-ROP11. Observamos una banda clara en las eluciones en un peso molecular esperado de aproximadamente 76 KDa. El peso de ROP11 sin péptido señal es de 54,6 KDa más 21 KDa de la proteína de fusión GST (75,6 KDa). Obtuvimos una concentración final de GST-ROP11 de 0,2 mg/ml (Figura 5).

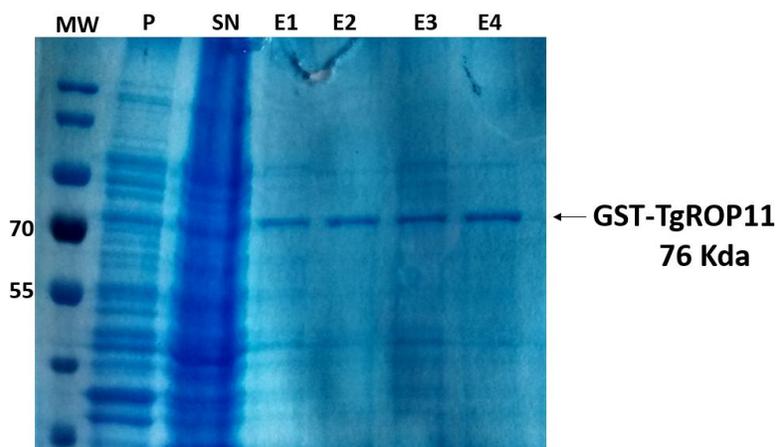


Figura 5: SDS-PAGE: Purificación de GST-ROP11 por cromatografía de afinidad. Expresión en *E. coli* ROSSETTA, 24 horas post inducción, OD: 0,7, 0,1mM IPTG, 25°C; vector utilizado pGEX4T1; Tag GST. Purificación con columna de glutatión sefarosa 4B; elución por gravedad con búfer 10 mM glutatión reducida. MW: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). P: lisado del pellet bacteriano. SN: sobrenadante. E1-E4: eluciones (ultra-centrifugadas 10×10^7 g, por 30 minutos). GST-ROP11 concentración final 0,2 mg/ml. ROP11: 54,6 KDa; GST: 21 KDa (total 75,6 KDa).

VI.6. Purificación por cromatografía líquida de afinidad de GST-ROP39.

Para obtener la proteína recombinante GST-ROP39 se realizó un proceso de expresión similar a GST-ROP11, pero esta vez el pellet obtenido de los 4 litros de medio con bacterias fue lisado por prensa francesa a 20 PSI y luego la proteína recombinante fue purificada por el sistema de cromatografía líquida ÄKTA utilizando columnas de GS-TRAP. Con este proceso logramos la purificación de GST-ROP39, observando una banda clara e intensa en un peso esperado de 71 KDa. ROP39: 50 KDa y GST: 21 KDa (total 71 KDa). Obtuvimos una concentración final de GST-ROP39 de 0,36 mg/ml (Figura 6).

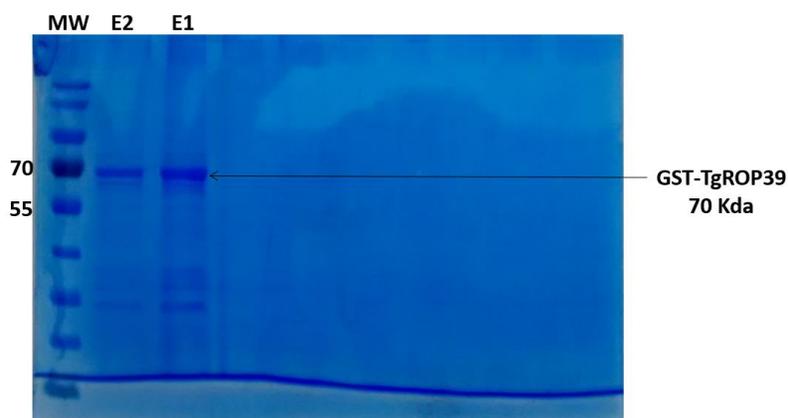


Figura 6: SDS-PAGE: Purificación de GST-ROP39 (RH) por cromatografía líquida de afinidad GSTRAP. Expresión en *E. coli* ROSSETTA, 24 horas post inducción, OD: 0,7, 0,1mM IPTG, 25°C; vector utilizado pGEX4T1; Tag: GST. Purificación con GSTRAP; elución con búfer 10 mM glutatión reducido. MW: Marcador de peso molecular *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas, USA). E1-E2: eluciones (ultra-centrifugadas 10×10^7 g, por 30 minutos). GST-ROP39 concentración final 0,36 mg/ml. ROP39 50 KDa + GST 21 KDa (total 71 KDa).

VI.7. Purificación por cromatografía líquida de afinidad de GST-hGBP5.

Utilizando el mismo proceso de purificación para GST-ROP39, también logramos purificar la proteína recombinante GST-hGBP5; observamos un peso esperado de 89 KDa. hGBP5: 68 KDa y GST 21 KDa (total 89 KDa). Se obtuvo una concentración final 0,87 mg/ml (Figura 7).

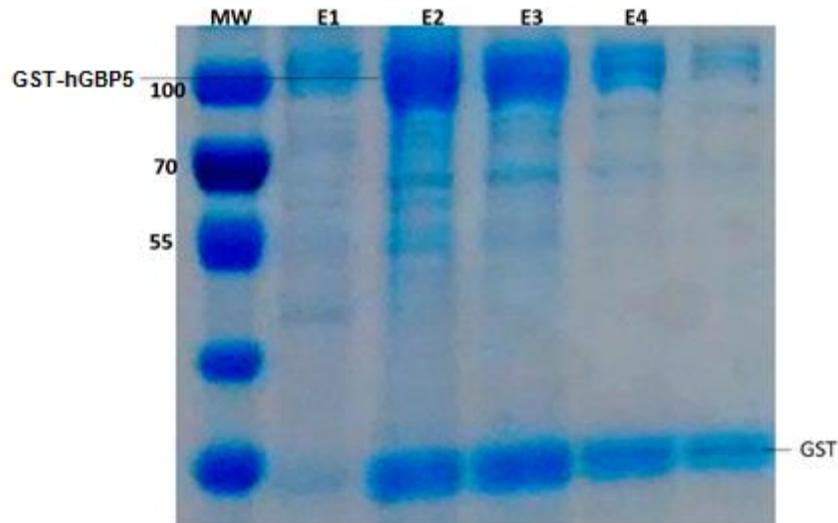


Figura 7: SDS-PAGE: Purificación de GST-hGBP5 por cromatografía líquida de afinidad GSTRAP. Expresión en *E. coli* ROSSETTA, 24 horas post inducción, OD: 0,7, 0,1mM IPTG, 25°C; vector utilizado pGEX4T1; Tag: GST. Purificación con GSTRAP; elusion con búfer 10 mM glutation reducido. MW: Marcador de peso molecular *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas). E: eluciones (ultra-centrifugadas 10×10^7 g, por 30 minutos). GST-hGBP5 concentración final 0,87 mg/ml. hGBP5 68 KDa + GST 21 KDa (total 90 KDa).

VI.8. *Pull-down y espectrometría de masas evidencian las interacciones GST-ROP11- SLC3A2 y GST-ROP11-ANXA6*

Nosotros utilizamos la proteína recombinante GST-ROP11 como cebo (*bait*) para realizar un tamizaje de interacciones sobre lisados de *T. gondii* y lisados de células humanas Hela y de ratón (MEFs) estimulados previamente con IFN γ (presas). GST-ROP11 fue amortiguada en PBS y DTT 2 mM por centrifugación con la finalidad de eliminar de la proteína el glutatión reducido. 150 μ L de GST-ROP11 a 0,2 mg/ml fue nuevamente fusionada a 100 μ L de perlas de glutatión Sefarosa 4B y se agregaron

200 μ L de cada uno de los lisados de humano, ratón y *T. gondii*. Cada lisado lleva un control de interacción con GST purificada (presas) a una concentración similar de la proteína recombinante (observar materiales y métodos). Cada Pull-down fue corrido en SDS-PAGE y teñido con nitrato de plata. Se observó la banda para GST-ROP11 en el peso esperado de 76 KDa, que no se observa en los controles con GST (cebos); también se observan las bandas de GST en el fondo del gel, lo cual nos indica que tanto el *bait* de GST-ROP11 y el *bait* control GST se unieron a la fase inmóvil de glutatión sefarosa. Obtuvimos entonces 4 bandas únicas que no fueron observadas en su respectivo control con GST, estas son: banda 1 y 4 en los lisados de células Hela estimulada con INF γ , banda 3 en Hela no estimulados, banda 5 en lisados de *Toxoplasma* y banda 2 en el control de GST (Figura 8).

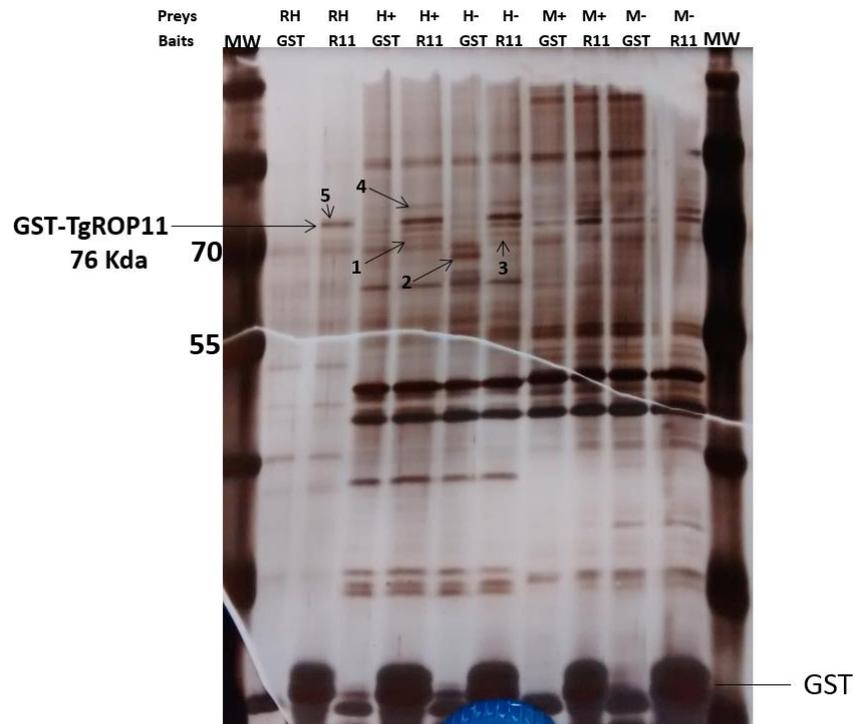


Figura 8: Pull-down screening GST-ROP11: SDS-PAGE teñido con plata. Cebo (*Bait*): GST-ROP11(50 μ g/ml concentración final en el Pull-down); control *bait*: GST. *Preys*: lisado de *Toxoplasma* (RH), células Hela y MEFs (20 millones cada una) pre estimuladas con 100 unidades INF γ por 24 horas (H+ y M+ respectivamente) o no

estimuladas (H- y M-). MW: Marcador de peso molecular Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). El *pull-down* se realizó toda la noche a 4°C, en rotación constante a 80 rpm.

Las 5 bandas fueron cortadas del gel y luego secuenciadas por *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS) en el Core Facility Proteomics (CFP) Universidad de Freiburg (Alemania) (www.zbsa.uni-freiburg.de/core_fac/Proteomics). Se resalta el hallazgo en los resultados de secuenciamiento de la presencia de péptidos de las proteínas SLC3A2 y ANXA6 previamente identificadas por el programa MSCA (Tabla 1).

Cebos (Baits)	GST-ROP11	GST	GST-ROP11	GST-ROP11				
presas (Preys)	Hela + IFN γ (1)	Hela (2)	Hela (3)	Hela + IFN γ (4)	# de proteínas	Péptidos unicos	FP	interacciones
	0	0	0	HSPA9	5	21		Stress-70 kDa
	HSPA1A	0	HSPA1A	0	4	20		Heat shock 70 kDa
Myosin	Myosin	Myosin	Myosin	Myosin	19	20	X	
Cytoskeleton-associated	0	CKAP4	0	0	1	10	X	
Heat shock cognate 71 kDa	HSPA8	0	HSPA8	HSPA8	13	5	X	
Heat shock 70 kDa	HSPA6	0	HSPA6	0	6	5		
	0	0	SLC3A2	SLC3A2	11	4		Solute Carrier Family 3 Member 2
S100A9	0	0	S100A9	0	1	4		
Trifunctional enzyme	0	0	0	HADHA	2	4		
Zinc-alpha-2-glycoprotein	0	0	AZGP1	0	2	3		
Heat shock protein 75 kDa	0	0	0	TRAP1	4	3		
Histidine-rich glycoprotein	HRG	HRG	HRG	HRG	1	3	X	
nuclear ribonucleoprotein	0	0	0	HNRNPM	9	3		
Dermcidin	0	DCD	DCD	0	2	3	X	
Suprabasin	0	0	SBSN	0	3	3		
	ANXA6	0	ANXA6	0	5	2		AnnexinA6
Polyadenylate-binding	0	0	0	PABPC1	17	2		
calcium channel	0	0	CACNA1E	0	7	2		

Cebos (Bait)	GST-ROP11			
Presas (Prey)	RH (5)	# of proteínas	Péptidos Unicos	Interacciones
	BIP	1	26	Chaperonin protein BiP
Heat shock protein 80	HSP80	1	22	
Heat shock protein 70	HSP70	1	3	
	AMA1	1	2	Apical membrane antigen
Uncharacterized protein	UNC	1	2	
ROP11	ROP11	5	31	

Tabla 1: Resultados de la secuenciación por espectrometría de masas para el *Pull-down* con GST-ROP11. *Bait:* GST-ROP11 y control de interacción: GST. *Prey:* lisados de *Toxoplasma* y células Hela pre estimuladas con 100 unidades de IFN γ por 24 horas, o no estimuladas. Los números en paréntesis corresponden a las bandas cortadas del SDS-PAGE teñido con plata de la Figura 8. FP. Falsos positivos. En rojo son verdaderos positivos que interactúan con GST-ROP11 observados en 2 experimentos de *Pull-down* MS.

VI.9. Pull-down y espectrometría de masas evidencian las interacciones GST-ROP39-ROP5 y GST-ROP39-SHMT2

Un protocolo de *Pull-down* similar al anterior realizado para encontrar candidatos de interacción para GST-ROP11 se aplicó para buscar los candidatos para GST-ROP39. Observamos entonces una banda de 71 KDa que corresponde al peso esperado de GST-ROP39; esta banda sólo se observa en el carril donde la cebo es ROP39. También se observa la banda de GST en todos los carriles en la parte inferior del gel; lo cual indica que GST-ROP39 se adhirió a la fase inmóvil de glutatión sefarosa en el experimento de *Pull-down* (Figura 9). Obtuvimos entonces 4 bandas relevantes que solo son observables para los cebos (*baits*) de ROP39 y no para los respectivos controles de GST. Tenemos entonces 2 bandas para lisados de *Toxoplasma* (banda 1 y 2), como también 2 bandas para lisados de Hela estimulada con INF γ (bandas 3 y 4) (Figura 9).

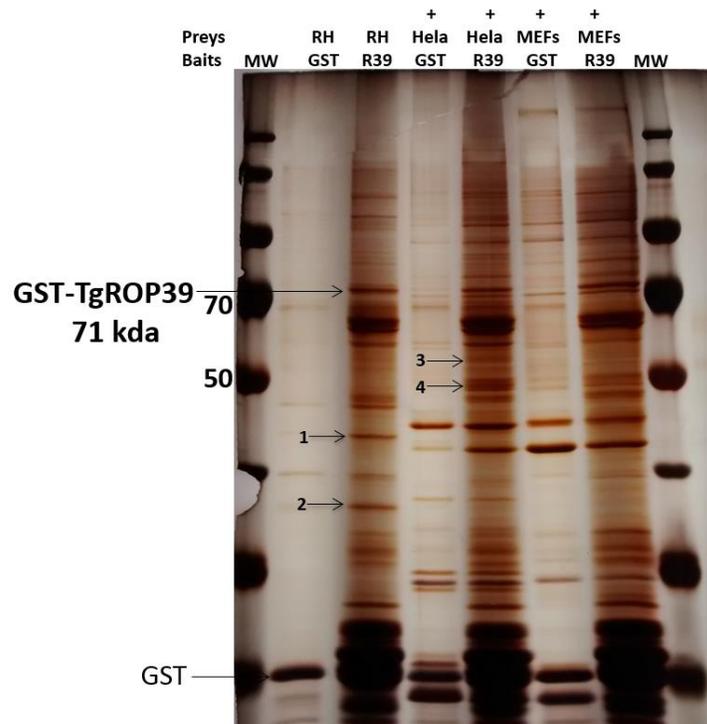


Figura 9: *Pull-down screening* GST-ROP39: SDS-PAGE teñido con plata. Cebo: GST-ROP39 (50 μ g/ml concentración final en el Pull-down); control cebo: GST. Presas: lisado de *Toxoplasma* (RH), células Hela y MEFs (20 millones cada una)

pre estimuladas con 100 unidades IFN γ por 24 horas (H+ y M+ respectivamente) o no estimuladas (H- y M-). MW: Marcador de peso molecular *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas). *Pull-down* toda la noche a 4°C, rotación constante a 80rpm.

Las 4 bandas obtenidas fueron entonces cortadas del gel y enviadas para secuenciación por LC-MS. Aquí también resaltamos el hallazgo de 2 candidatos previamente sugeridos por el programa MCSA, se trata de la proteína humana SHMT2 encontrada en la interacción *in-vitro* con lisados de células Hela estimulada con IFN γ y aún más interesante es la presencia de ROP5 como interactor para ROP39 (Tabla 2). También se encontraron 7 péptidos pertenecientes a ROP39, lo que nos indica que la proteína usada como cebo es efectivamente ROP39 (Tabla 2).

Cebo (Baits)	GST-ROP39	GST-ROP39	GST-ROP39	GST-ROP39				
Presas (Preys)	RH (1)	RH s (2)	Hela + IFN γ (3)	Hela + IFN γ (4)	# de Proteínas	Péptidos unicos	FP	Interacciones
Fibrinogen	FGA	FGA	FGA	FGA	2	7	x	
Fibrinogen gamma	FGG	FGG	FGG	FGG	6	6	x	
Nesprin-2	0	0	0	SYNE2	9	2		
Fibrinogen beta	FGB	FGB	FGB	FGB	2	6	X	
Myosin6	MYH6	MYH6	MYH6	MYH6	8	8	X	
	0	0	CCT8	CCT8	4	2		T-complex protein 1 sub theta
Actin	ACTA1	0	ACTA1	ACTA1	6	1	X	
Tubulin beta	0	0	TUBB	TUBB	12	6	X	
Junction plakoglobin	0	0	0	JUP	1	2		
Tubulin beta-4B chain	0	0	TUBB4B	TUBB4B	6	2	X	
Rhoptry Kinase 39	TgROP39	TgROP39	0	0	1	7		
ATP synthase	0	0	ATP5A1	ATP5A1	10	11		
RuvB-like 1	0	0	RUVBL1	RUVBL1	6	13		
Tubulin beta-3 chain	0	0	TUBB3	0	8	4		
Nucleosome assembly	0	0	NAP1L1	NAP1L1	20	2		
	0	0	SHMT2	SHMT2	7	6		Serine hydroxymethyl transferase
Tubulin beta-4A	0	0	TUBB4A	TUB4A	1	1	X	
Elongation factor 1	0	0	EEF1A1P5	EEF1A1P5	4	2	X	
	0	0	LMNA	LMNA	7	5		Prelamin
	0	0	DYNC1LI2	DYNC1LI2	4	2		dynein
Chaperonin BiP	TgBiP	TgBiP			12	2		
	0	0	ADCK4	0	8	2		aarF protein kinase 4
Heat shock 70	0	0	HSPA1A	0	4	1		
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0	0	PHGDH	PHGDH	2	2		
TOXO Actin	TgACTIN	0	0	0	9	7		
Ribosomal protein RPL4	TgRPL4	0	0	0	1	7		
initiation factor 4A	TgEIF4A2	0	0	0	6	2		
GADPH	TgGAPDH	TgGAPDH	0	0	5	4		
Protein S100-A7	S100A7	0	0	S100A7	1	3		
Rhoptry Protein 5A	TgROP5	TgROP5	0	0	2	2		TgROP5
Calmodulin-like protein 5	0	0	0	CALML5	1	3		
Caspase 14	0	0	0	CASP14	1	3		
Keratin	0	0	0	KRT6B	5	1		
Tubulin beta-6	0	0	0	TUBB6	11	8	X	
Tubulin beta-2A	0	0	0	TUBB2A	2	1	X	
Thymidine phosphorylase	0	0	0	TYMP	3	6		
GAPDH	0	TgGAPDH	0	0	1	4		
Desmoplakin	0	0	0	DSP	2	5		
Uridine 5-monophosphate synthase	0	0	0	UMPS	8	4		
Elongation factor 1-gamma	0	0	0	EEF1G	2	4		
	0	TgPP2C	0	0	1	3		Serine-threonine phosphatase 2C
Nicotinate phosphoribosyltransferase	0	0	0	NAPRT1	8	3		
Nucleosome assembly	0	0	0	NAP1L4	10	1		
ATP synthase	0	TgATP5B	0	0	4	2		
Protein transport protein Sec61	0	TgSec61	0	0	1	2		
Protein S100-A9	0	0	0	S100A9	1	2		
Elongation factor 2	0	0	0	EEF2	1	2		
Serine palmitoyltransferase 1	0	0	0	SPTLC1	1	2		
nuclear ribonucleoprotein M	0	0	0	HNRNPM	5	2		
Desmoglein-1	0	0	0	DSG1	1	2		

Tabla 2: Resultados de la secuenciación por espectrometría de masas para el *Pull-down* con GST-ROP39. *Cebo:* GST-ROP39. *Presas:* lisados de *Toxoplasma* y células Hela pre estimuladas con 100 unids de IFN γ por 24 horas. Los números en paréntesis corresponden a las bandas cortadas del SDS-PAGE teñido con plata de la Figura 9. FP: Falsos positivos. En rojo son verdaderos positivos que interactúan con GST-ROP39 observados en 2 experimentos de *Pull-down* MS.

Dados los resultados obtenidos en ambos experimentos de *Pull-down* para la búsqueda de candidatos de interacción para GST-ROP11 y GST-ROP39, la interacción más relevante encontrada fue ROP39-ROP5 la cual también fue observada en las aproximaciones bioinformáticas (ver anexo 4).

VI.10. *Pull-down Western Blot confirma la interacción ROP39-ROP5.*

Debido a que el resultado más relevante obtenido por *pull-down* y espectrometría de masas fue ROP39-ROP5, nosotros quisimos corroborar nuevamente esta interacción por medio de *pull-down* utilizando ROP39 como cebo, pero evidenciar la interacción con ROP5 (presa) por medio de western blot (WB). Similar al proceso de *pull-down* realizado anteriormente, GST-ROP39 fue unida otra vez a perlas de glutatión sefarosa y luego incubada con lisados celulares de *Toxoplasma* RH y *Toxoplasma* tipo II (ME49). Posteriormente las eluciones obtenidas fueron corridas en SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa; el western blot fue entonces realizado utilizando un anticuerpo específico anti-ROP5 (anticuerpo obsequiado por el Dr. Tobias Steinfeld, Freiburg University, Alemania). Nosotros logramos confirmar nuevamente la interacción ROP39-ROP5, observando una única banda en el peso esperado para ROP5 en las eluciones para RH (Figura 10).

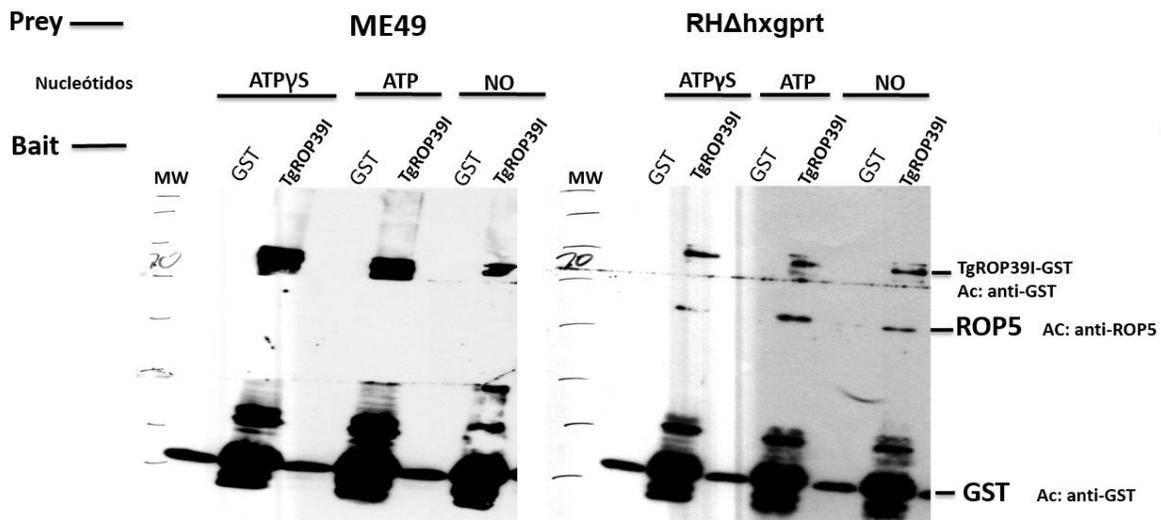


Figura 10: *Pull-down Western Blot.* Bait: GST-ROP39 (50 µg/ml concentración final en el pull-down). Bait control: GST. Preys: 2×10^6 parásitos lisados de las cepas

RH Δ hxgprt o ME49. Se captura ROP5 como interactor para ROP39 solo en lisados de RH Δ hxgprt. Nucleótidos (2 mM). Ac: anticuerpos. MW: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). *Pull-down* toda la noche a 4°C, rotación constante 80 rpm.

También observamos la banda perteneciente a GST-ROP39 en la parte superior de la membrana, y la banda de GST sola en la parte inferior de la membrana; esta captura se realizó utilizando el anticuerpo anti-GST (Figura 10). De manera llamativa se observa que la banda de ROP5 sólo aparece en los lisados para RH Δ hxgprt y no para ME49, lo que sugiere que la interacción ROP39-ROP5 es dependiente del tipo de cepa de *Toxoplasma*.

VI.11. *GBP5h es evidenciado como un posible sustrato para ROP5A y ROP18 utilizando el sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).*

Debido a que los resultados bioinformáticos sugirieron que las GBPs humanas podrían interactuar con ROP cinasas de *T. gondii*, nosotros diseñamos una estrategia basada en el sistema de 2 híbridos en levadura para la búsqueda de interacciones específicas entre ROPs cinasas y GBPs humanas. Los genes para los alelos ROP5A, ROP5B, ROP5C, ROP18, ROP17, ROP11 y ROP39 fueron clonados cada uno en la posición C-terminal del dominio de activación Gal4 en el vector pGADT7 (AD) y también en el vector que expresa el dominio de unión al ADN Gal4 en pGBKT7 (BD). Los genes para GBPs humana del 1 al 5 fueron amplificados por RT-PCR a partir de 2×10^6 células Hela previamente estimuladas con 100 unidades de IFN γ por 24 horas. GBPs del 1 al 5 fueron también clonados cada una en ambos vectores pGADT7 y pGBKT7 en la posición C-terminal de los dominios de activación (AD) y unión al ADN (BD) Gal4. Realizamos un tamizaje de interacción de cada ROP con cada una de las GBPs en 2 direcciones AD-ROPs vs BD-GBPs y AD-GBPs vs BD-ROPs para un tamizaje total de 70 interacciones (ver materiales y métodos). El crecimiento de las colonias reporteras en medio selectivo, nos permitió evidenciar la interacción proteína-proteína. Logramos evidenciar por este método las interacciones entre los alelos ROP5A-hGBP5, ROP5C-hGBP5 y ROP18-hGBP5 no observamos crecimiento de colonias en los controles negativos que eran

levaduras transformadas con un solo constructo conteniendo ROP o hGBP (Figura 11).

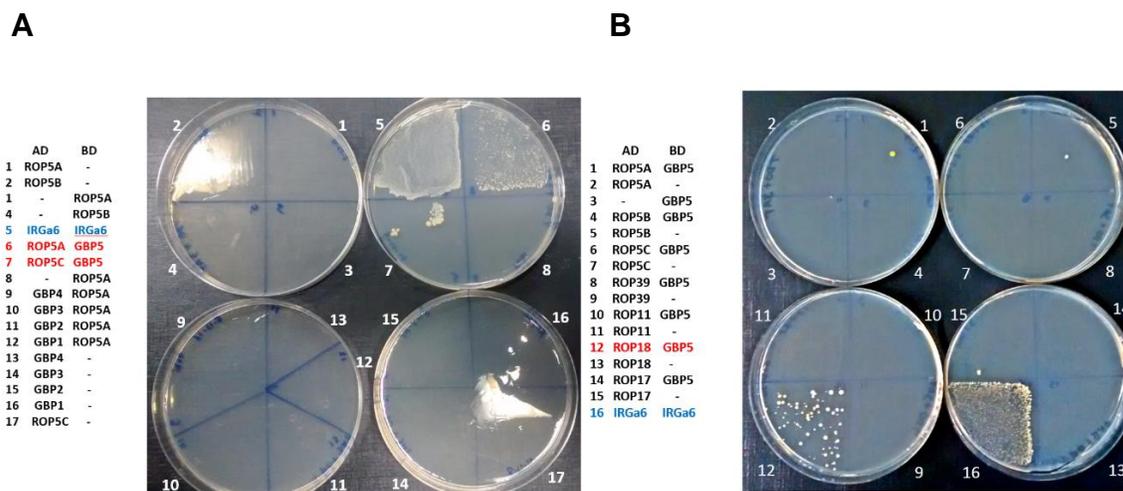


Figura 11: Tamizaje de interacciones proteína -proteína, lo cual se demuestra por la aparición de colonias en el medio, por la técnica de Y2H a los 12 días post inoculación, entre ROP5A/B/C y ROP18 vs GBPs 1-5. **A:** Se presentaron interacciones entre **ROP5A-hGBP5** y **ROP5C-hGBP5** (señalado en rojo, cuadrantes 6 y 7). El cuadrante 5 (señalado en texto en azul) corresponde al control positivo. **B:** se observa la interacción **ROP18-hGBP5** a los 7 días post inoculación. Las levaduras crecieron en medio TDO (triple deficiente Ade- His- Trp-). OD: 0,3. AD: Dominio de activación del vector pGADT7. BD: Dominio de unión del vector pGBKT7. CONTROL: control positivo de interacción IRGa6-IRGa6 (azul). Control negativo: transformación de la levadura con solo un vector (-: ausencia del vector).

La interacción ROP5A-hGBP5 fue confirmada en tres diferentes experimentos con el sistema de 2 híbridos en levadura. La interacción ROP5C-hGBP5 fue solamente evidenciada una vez más en tres repeticiones y ROP18-hGBP5 fue confirmada dos veces más en 3 experimentos (Tabla 3 y Anexo 6). También observamos las interacciones ROP17-hGBP5, pero sólo en dos experimentos de 4. Asimismo, las interacciones ROP11-hGBP5 y ROP39-hGBP5 en dos y un experimento,

respectivamente, entre las 4 repeticiones realizadas (Tabla 3 y ver Anexo 6). De acuerdo con la técnica (Y2H) podemos sugerir que las interacciones verdaderas positivas serían solamente ROP5A-hGBP5 y ROP18-hGBP5. Aunque se observaron también las interacciones ROP5C-hGBP5, ROP17-hGBP5 ROP11-hGBP5 y ROP39-hGBP5, estas presentaron muy bajo número de colonias lo que nos sugiere que estas interacciones pueden ser falsos positivos (ver Tabla 3).

	GBP1	GBP2	GBP3	GBP4	GBP5
ROP5A	0	0	0	0	++++
ROP5B	0	0	0	0	0
ROP5C	0	0	0	0	+ - + -
ROP11	0	0	0	0	+ + - -
ROP17	0	0	0	0	+ + - -
ROP18	0	0	0	0	+++ -
ROP39	0	0	0	0	+

■ Verdadera interacción ROP5A-hGBP5 y ROP18-hGBP5

■ Interacción débil o falso positivo

+: Numero de repeticiones con interacción positiva

-: No se observa interacción

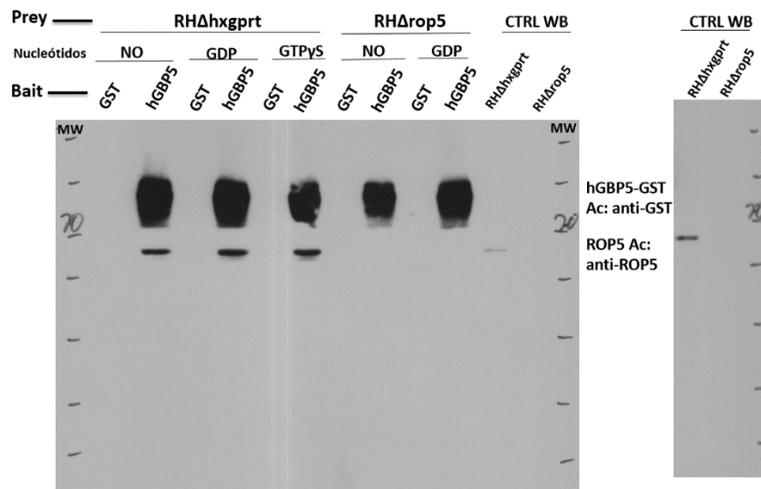
Tabla 3: Resumen de las interacciones ROPs vs hGBPs observadas por el sistema de 2 híbridos en levadura (Y2H).

VI.12. *Pull-down* y *western blot* confirman la interacción entre ROP5-hGBP5.

Debido a que en los ensayos de Y2H observamos interacción entre algunos alelos de ROP5 y la GBP5 humana, nosotros quisimos corroborar por otra técnica bioquímica esta interacción. Como también contábamos con la GST-GBP5 purificada previamente (Figura 6), realizamos entonces un ensayo de *Pull-down* utilizando a GST-GBP5 como cebo y lisados de *Toxoplasma* como presas (*preys*). GST-GBP5 fue unida a perlas de glutatión sefarosa y luego incubada toda la noche con lisados celulares de *Toxoplasma* RH (WT), RH Δ ROP5 (knockout para todos los alelos de ROP5) y *Toxoplasma* tipo II (ME49). Las eluciones obtenidas fueron

corridas en SDS-PAGE y el western blot fue realizado utilizando un anticuerpo anti-ROP5. Nosotros logramos nuevamente corroborar por una segunda técnica bioquímica la interacción ROP5-hGBP5 observando una única banda en el peso esperado, utilizando el anticuerpo anti-ROP5 y no se observaron bandas en los controles de GST, ni tampoco se observó la banda ROP5 en el lisado control de $RH\Delta rop5$ (Figura 12A). De manera interesante se observó la interacción sólo en las eluciones de RH y no con los lisados de ME49, lo que sugiere una interacción específica al tipo de cepa y también se capturó GRA7 (Figura 12B).

A



B

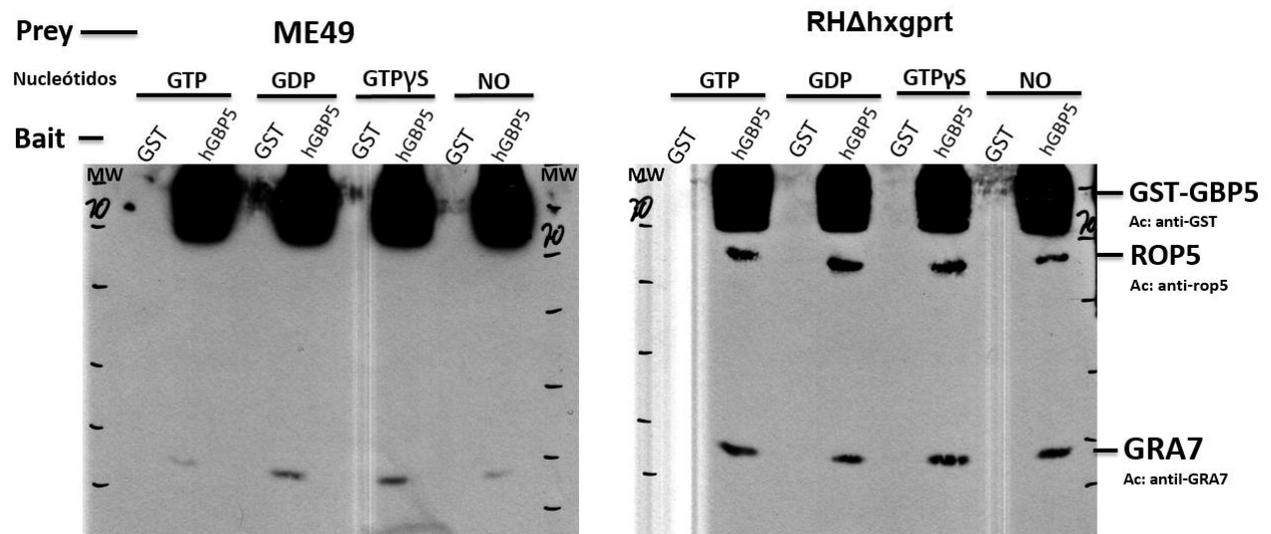


Figura 12: *Pull-down* western blot utilizando como cebo GST-GBP5 y como presas lisados de *Toxoplasma*. **A:** *bait:* GST-GBP5, *bait* control: GST, *Preys:* Lisados *Toxoplasma* RH Δ hxgprt y RH Δ rop5. Se captura ROP5 como interactor para hGBP5 en lisados de RH Δ hxgprt. **B:** *bait:* GST-GBP5, *bait* control: GST. *Preys:* Lisados *Toxoplasma* RH Δ hxgprt y ME49. Se capturó ROP5 y GRA7 como interactor para hGBP5 en lisados de RH Δ hxgprt. Todos los lisados (*preys*) se realizaron a partir de 2×10^6 parásitos. Cada *Pull-down* se realizó en 100 μ l sefarosa 4B. Concentración final del control *bait* (GST) y del *bait* GST-hGBP5 fue de 50 μ g/ml para cada *Pull-down*.

VI.13. *Toxoplasma RH knockout para ROP18 muestra una mayor concentración de IL1 β inmadura (pro-IL1 β) comparado con Toxoplasma RH en PBMCs humanos.*

Nuestro más importante hallazgo es la interacción de GBP5 con uno de los dos principales factores de virulencia para *Toxoplasma* el cual es ROP5. Esta pseudocinasa estabiliza la cinasa activa ROP18 para fosforilar a la proteína IRG6a y así evadir la respuesta anti-*Toxoplasma* del hospedador murino. Como no se conoce el papel directo de ROP5 y ROP18 en la infección en humanos, nosotros examinamos el papel de ROP18 en la maduración de IL1 β como un marcador de activación del inflamósoma en células humanas PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) aisladas de tres grupos de pacientes con diferentes características de toxoplasmosis (no reactivo, crónico y ocular). Nosotros comparamos el índice de producción de IL1 β en el sobrenadante de cultivos de PBMCs de cada individuo estimulados *ex-vivo* con las cepas de *Toxoplasma* RH y RH Δ ROP18. Nosotros observamos diferencias en el índice de producción de IL1 β (Δ ROP18/RH) en PBMCs del grupo control no reactivo y del grupo con toxoplasmosis ocular (Figura 13).

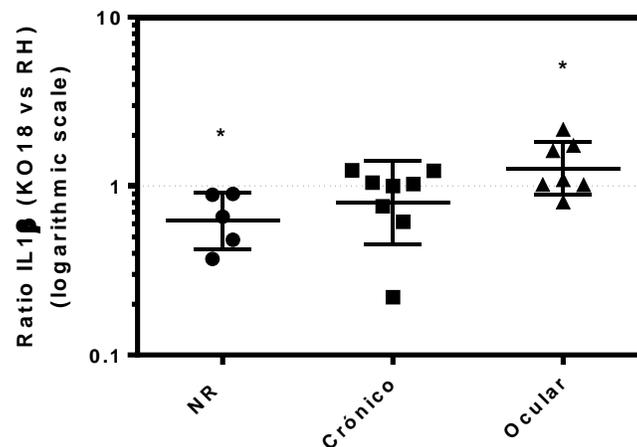


Figura 13: Índice de producción de IL1 β en sobrenadantes de PBMCs de individuos pertenecientes a 3 grupos clínicos de toxoplasmosis estimulados con RH Δ ROP18 vs RH. NR: No reactivo para *Toxoplasma gondii* n=5. Crónico: toxoplasmosis crónica asintomática n=8 y Ocular: toxoplasmosis ocular n=7, *p<0,05. MOI 1:2 (1 célula por 2 parásitos), 24 horas post infección. RH Δ ROP18/RH= 1, significa que no existen diferencias en la producción de IL1 β por efectos de la cepa mutante y salvaje sobre los PBMCs. RH Δ ROP18/RH<1 significa que hay mayor producción de IL1 β por efecto de la cepa salvaje (RH). RH Δ ROP18/RH>1 significa que hay mayor producción de IL1 β por efecto de la cepa mutante (RH Δ ROP18).

Teniendo en cuenta la relación Δ ROP18/RH, se observó en PBMCs de personas no reactivas (NR) una mayor producción de IL1 β cuando se estimuló con RH (Δ ROP18/RH<1 en los 5 pacientes) con un índice medio de 0,6 IC 95% (0,4 – 0,9). En el caso de PBMCs provenientes de pacientes con toxoplasmosis ocular curiosamente se observa una mayor producción de IL1 β por parte del parásito Δ ROP18 (Δ ROP18/RH>1 en 4 de 7 pacientes) índice medio de 1,4 IC 95% (0,9 – 1,8). No se observaron claras diferencias en los PBMCs de pacientes crónicos; aunque 3 de 8 pacientes mostraron mayor producción de IL1 β estimulados con RH (Δ ROP18/RH<1) (Figura 13). Este experimento muestra cierta intervención por parte del gen ROP18 de *Toxoplasma* en la producción de IL1 β en células humanas.

Debido a la alta variabilidad encontrada en la producción de IL1 β por los diferentes pacientes y para aclarar aún más el efecto directo de ROP18 sobre la producción de IL1 β nosotros realizamos una prueba ELISA para medir la producción de pro-IL1 β luego del estímulo con parásito vivo de la cepa RH y parásitos knock-out para ROP18 (Δ ROP18) y también corroboramos la producción de pro-IL1 β por western blot en PBMCs de tres pacientes por cada grupo (no reactivos, crónicos y con toxoplasmosis ocular). Se utilizó el índice de pro-IL1 β / β -actina para comparar los estímulos con las cepas Δ ROP18 vs RH. Encontramos que la producción de pro-IL1 β son mayores en los lisados de PBMCs en los tres grupos clínicos estimulados con la cepa Δ ROP18 en comparación con la producción de pro-IL1 β estimulados con la cepa RH (Figura 14). En los PBMCs de pacientes crónicos se observó una menor producción de pro-IL1 β comparado con β -actina, pero aun así se observa una mayor producción de pro-IL1 β (normalizada con β -actina) en células estimuladas con la cepa Δ ROP18 con índice medio de 0,67 IC 95 % (0,52 - 0,83) comparado con la cepa RH con índice medio 0,32 IC 95% (0,26 – 0,37). El western blot corrobora la mayor concentración de pro-IL1 β en dos pacientes crónicos comparada con la estimulación por RH; del mismo modo no se evidenció pro-IL1 β en los PBMCs control sin estímulo; la diferencia entre RH Δ ROP18 vs RH fue estadísticamente significativa $p < 0,05$ (Figura 14A). Para los PBMCs de los pacientes con toxoplasmosis ocular también observamos menor producción de pro-IL1 β con respecto a β -actina, pero se encontró mayor producción de pro-IL1 β (normalizada con β -actina) cuando comparábamos Δ ROP18 con índice medio de 0,915 IC 95% (0,87 - 1,1) vs RH con índice medio 0,36 IC 95% (0,25 – 0,47) $p < 0,05$. Esta diferencia no fue claramente observada por western blot (Figura 14B). Por último, en PBMCs de pacientes no reactivos se observa mayor producción de pro-IL1 β con respecto a β -actina; aunque se observaron claras diferencias en el western blot, la diferencia por ELISA no fue estadísticamente significativa para pro-IL1 β al comparar Δ ROP18 con índice medio 1,57 IC 95 % (0,72 – 2,3) vs RH índice medio 1,2 IC 95% (0,69 – 1,34) $p > 0,05$ (Figura 14 C). Este resultado sugiere la intervención de ROP18 en la maduración de pro-IL1 β , debido a que se observa mayor concentración de pro-IL1 β cuando se estimula células humanas con parásitos

carentes de ROP18 y se observa menos concentración de pro-IL1 β cuando se infecta con *Toxoplasma* completo. Esta diferencia en la producción de pro-IL1 β después de los estímulos fue independiente del grupo clínico.

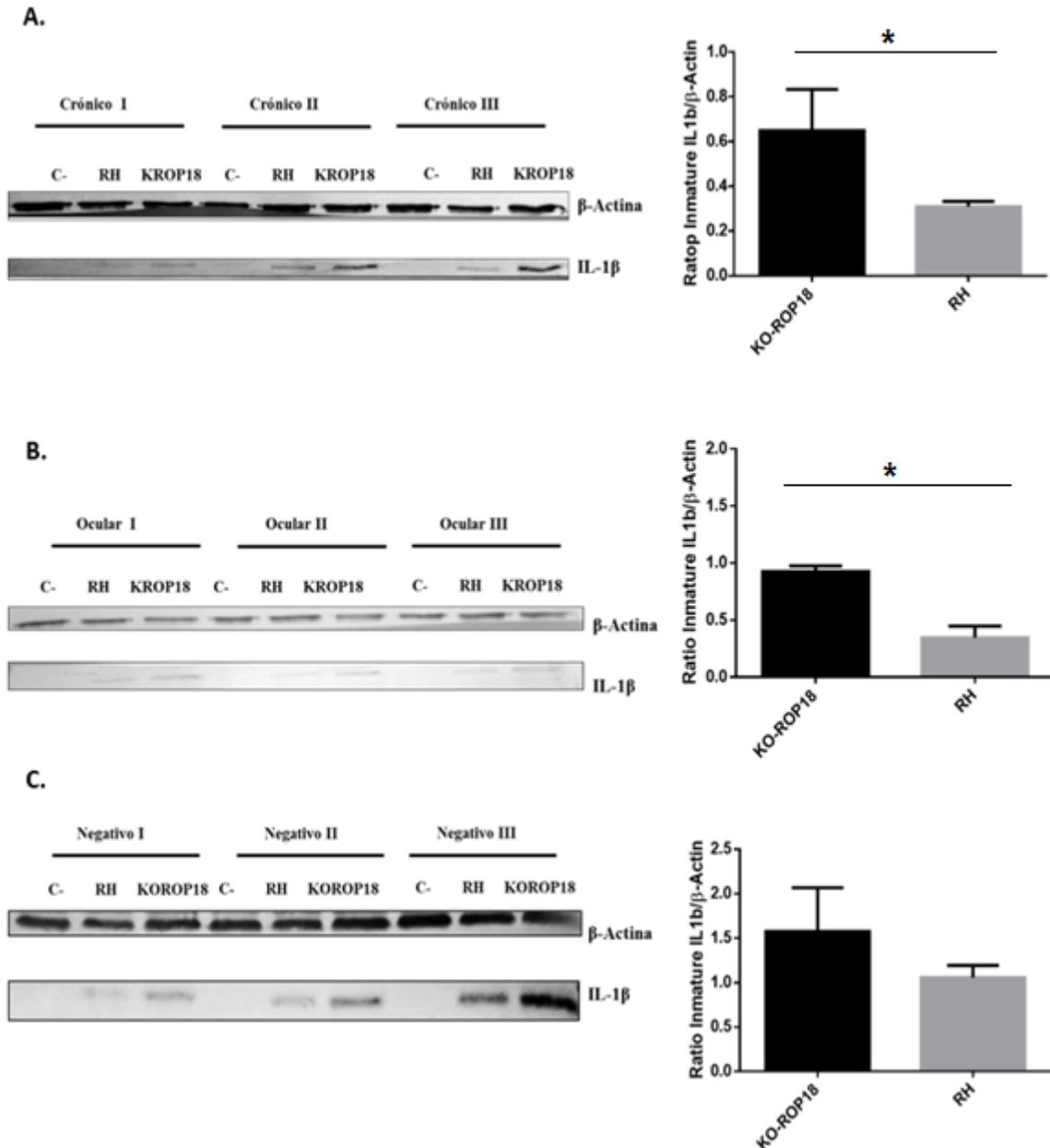


Figura 14: Producción de pro-IL1 β en lisados de PBMCs capturada por Western blot (panel izquierdo), e índice de pro-IL1 β / β -actina observado por Elisa (panel derecho) previamente estimulados con *Toxoplasma gondii* (RH) y RH Δ ROP18. **A.** Toxoplasmosis crónica asintomática (Crónico n= 3). **B.** Toxoplasmosis ocular

(Ocular n = 3). **C.** No reactivos para toxoplasma (negativo n = 3). * $p < 0,05$. MOI 1:2 (1 célula por 2 parásitos) 24 horas post infección. Relación pro-IL1 β / β -Actin = 1, significa que no hay diferencias en la producción de pro-IL1 β y β -Actin en PBMCs estimulados con las cepas RH Δ ROP18 o RH. pro-IL1 β / β -Actin < 1 significa que hay mayor concentración de β -Actin con respecto a pro-IL1 β . pro-IL1 β / β -Actin > 1 significa que hay mayor concentración de pro-IL1 β con respecto a β -Actin.

VII. DISCUSION.

VII.1. *MSCA predijo las interacciones ROP11-SLC3A2 y ROP11-ANXA6, y éstas fueron comprobadas por pull-down MS.*

Nosotros encontramos que ROP11 interacciona con SLC3A2 y ANXA6. SLC3A2 es una proteína transmembranal de la superficie celular que juega un papel importante en la regulación de los niveles del calcio intracelular y como transportador de aminoácidos [Prager, et al. 2007]. Interesantemente, SLC3A2 también fue propuesto como un interactor para la proteína ROP18 a través de un tamizaje por la técnica de dos híbridos en levadura (Y2H) [Cheng, et al. 2012]. Annexin A6 es una proteína calcio dependiente que se une a fosfolípidos de membrana; los miembros de la familia Annexin se reportan como relacionados a procesos de membrana como exocitosis y endocitosis [Lizarbe, et al. 2013]. Aunque no hay reportes que involucren a Annexin A6 en toxoplasmosis, existe un reporte que implica a Annexin A1 como un regulador endógeno de inflamación en toxoplasmosis ocular. Se observó un incremento en la expresión de ANXA1 en células epiteliales pigmentarias de retina humana (RPE) previamente infectadas *in-vitro* en diferentes horas con taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) [Mimura, et al. 2012].

En el resultado de la secuenciación por MS para las interacciones con ROP11 (Tabla 1), también se encontraron las proteínas de choque térmico HSPA1, HSPA8 y HSPA6 con la mayor cantidad de péptidos y proteínas únicas en el análisis. Interesantemente, estas tres proteínas junto con SLC3A2 y ANXA6 se han encontrado sobre expresadas en el cerebro de personas con encefalitis por

Toxoplasma [Sahu, et al. 2014]. Es posible que debido a la alta cantidad de proteínas de choque térmico que contiene el proteoma celular, sobre todo en casos de estrés, sea la causa de observar estas proteínas en nuestro *pull-down* MS. Aunque otras proteínas aparecen en la secuenciación de las bandas obtenidas luego del experimento de *pull-down*, nosotros asumimos varias de éstas como falsos positivos, debido a que también fueron detectadas en el control de interacción de GST (ver Tabla 1). Nosotros asumimos como posibles verdaderos positivos a los candidatos que aparezcan en al menos dos experimentos de *pull-down* y que no aparezcan en el control con GST. SLC3A2 y ANXA6 parecen ser las proteínas más plausibles de interacción con ROP11, aunque no hay reportes de una participación directa de estas proteínas en toxoplasmosis humana.

Para las interacciones de ROP11 con lisados de toxoplasma, curiosamente se observa a la proteína AMA1 (*Apical membrane antigen 1*) el cual es un componente esencial del complejo multi-proteico que permite la motilidad y penetración del parásito a su célula hospedadora (*moving junction*) [Crawford, et al. 2013]. Aunque éste es un proceso vital en *Toxoplasma* no se reporta relación de proteínas con actividad cinasa en la motilidad y adherencia de *Toxoplasma gondii* a su célula hospedadora. Observamos también 31 péptidos únicos de ROP11 en la secuenciación de la muestra 5 (ver Figura 8 y Tabla 1), esto nos indica que la cebo (*bait*) es efectivamente ROP11. Otras proteínas del lisado de *Toxoplasma* se observaron cómo interactores para ROP11, pero no hay información que las vincule a procesos importantes en la biología del parásito.

VII.2. MSCA predijo la interacción ROP39-SHMT2 y fue comprobada por Pull-down MS.

Nosotros encontramos la interacción entre ROP39 y SHMT2 (Serin-hidroximetiltransferasa 2), ver Tabla 2, la cual es una enzima mitocondrial dependiente de fosfato piridoxal que cataliza la reacción reversible de serina y tetrahidrofolato a glicina y 5,10-metilentetrahidrofolato. Esta reacción es la causante de la síntesis de glicina [Schirch & Szebenyi, 2005]. En apicomplexos como *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* y *Theileria* SHMT2 es importante en el

metabolismo del folato, debido a que el 5,10-metilentetrahidrofolato es sustrato de la enzima timidilato sintasa que en su catálisis genera nucleótidos de timidina (dTMP) a partir de (dUMP) para la síntesis de ADN [Read, et al. 2010]. PfSHMT parece ser indispensable en *P. falciparum* [Pornthanakasem, et al. 2012]. No hay evidencia de la participación de SHMT2 humana en el contexto de la toxoplasmosis.

Otros candidatos interesantes fueron TYMP (Timidina fosforilasa) y UMPS (uridina 5-monofosfato sintasa), pues ambos genes participan en la ruta metabólica de pirimidinas (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00240). También se encontraron la subunidad theta del complejo T (CCT8) y la Caspasa 14 (observar Tabla 2). Aunque estos genes llaman la atención por su relevancia funcional en procesos inmunológicos y metabólicos, no existe información adicional que los involucre con procesos importantes en Toxoplasmosis.

Aunque se lograron confirmar por *Pull-down* MS las interacciones obtenidas por el programa MSCA: ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6 y ROP39-SHMT2, sería necesario realizar más experimentos para saber que tanto contribuyen estas interacciones a la infección del parásito; por ejemplo, infecciones *in-vitro* con parásitos deficientes de ROP11 o ROP39 y observar el desenlace en el crecimiento y replicación. También infectar células humanas knockout para algunos de estos genes SLC3A2, ANXA6 y SHMT2 y observar en qué medida contribuyen a la infección por *Toxoplasma*.

VII.3. *MSCA predijo las interacciones ROP39-IRGd y ROP39-ROP5, y esta última fue comprobada por Pull-down WB.*

Esta altamente demostrado que ROP5 y ROP18 interactúan con miembros de la familia IRGs del hospedador murino como IRG6a [Hermanns et al. 2016]; IRG6b y IRGb10 [Fleckenstein, et al. 2012]; e IRGb2-b1 [Lilue, et al. 2013]. Es posible que otras ROP cinasas puedan interactuar específicamente con otros miembros del sistema de defensa murino IRGs, como es sugerido en [Lilue, et al. 2013; Müller & Howard, 2016]. Nosotros observamos sólo una vez la interacción ROP39-IRGd por la técnica *Pull-down* western blot, pero no fue posible reproducirla (datos no mostrados).

Nosotros también observamos la interacción entre miembros de la familia ROP cinasa, como fue el caso de ROP39 y ROP5 (ver anexo 4, Tabla 2 y Figura 10). Nuestros resultados sugieren que ROP5 también podría regular otras ROP cinasas como por ejemplo a ROP39 para la fosforilación de otras IRGs (posiblemente IRGd).

Gran parte de las diferencias en virulencia entre las cepas de *Toxoplasma* se debe a los polimorfismos y número de copias encontrados en los genes para ROP5, existiendo mayor número de copias para las cepas del tipo II, pero siendo más virulentas las copias con los polimorfismos registrados en los tipos I y III [Behnke, et al. 2011]. A sí mismo, se ha evidenciado que el papel de ROP5 en la infección por *Toxoplasma* se debe a su capacidad de regular la actividad de otras proteínas relacionadas con virulencia como es el caso de ROP18 [Behnke, et al. 2012] y ROP17 [Etheridge, et al. 2014; Zhao and Yap, 2014]. Es posible que ROP5 tenga la capacidad de regular la actividad de otras ROP cinasa como podría ser el caso para ROP39. Aunque se observó cierta diferencia en el WB en la intensidad de ROP5 cuando se agregan los nucleótidos ATP γ S y ATP (ver Figura 10), esta diferencia no fue observable en un segundo experimento de interacción (ver Anexo 5). Interesantemente, también se observó la presencia de la proteína GRA7 en la interacción ROP39-ROP5 (ver Anexo 5); GRA7 ha sido observada como parte del complejo ROP5 y ROP18 como determinante en la fosforilación específica de IRG6a [Hermanns, et al. 2014]. Nuestro resultado podría sugerir la formación de otros complejos dependientes de ROP5, posiblemente para la regulación de la actividad de otras ROP cinasas. Este es el primer reporte de interacción de ROP5 con otra ROP cinasa diferentes a lo ya reportado para ROP18 y ROP17.

VII.4. *MSCA predijo las interacciones ROP18-GBP5 y ROP5-GBP5; estas fueron confirmada por Y2H y Pull-down WB.*

La acumulación de las IRGs en la vacuola parasitofora (VP) lleva a la destrucción de ésta y a la consecuente eliminación del parásito; pero cepas de *Toxoplasma* virulentas como las del tipo 1 pueden fosforilar por medio de ROP18 en cooperación con ROP5 y GRA7 a la proteína IRG6a evitando la acumulación de ésta en la VP.

Las interacciones ROP18-IRG6a y ROP5-IRG6a fueron demostradas por [Hermanns, et al. 2016; Reese, et al. 2014; Fleckenstein, et al. 2012]. Las interacciones ROP18-IRGb2-b1 y ROP5-IRGb2-b1 fueron observadas por 5 diferentes descriptores (observar Anexo 1 y 2). Polimorfismos en estos dos dominios b2 y b1 llevan a interacciones específicas con ROP5 polimórficas contribuyendo a la resistencia natural en ratones CIM contra *Toxoplasma*. Estas dos interacciones son sugeridas a través de procedimientos experimentales en [Lilue, et al. 2013; Müller & Howard, 2016]. Recientemente también se evidenció en experimentos *in-vitro* que ROP18 puede fosforilar el factor SMAD1 llevándolo a su degradación por proteosoma; esta interacción fue observada por [Yang, et al. 2017], la cual también se observó con el descriptor hidrofobicidad en los resultados arrojados por MSCA (ver anexo 1).

La suma de esta evidencia nos sugiere que el programa MSCA tiene la capacidad de identificar interacciones entre proteínas incluso de diferentes especies como es el caso de ROP cinasas de *Toxoplasma* e IRGs de su hospedero intermediario. El programa nos muestra al grupo de las GBPs como candidatos frecuentes observados en las predicciones (ver anexo 1 y 2) sugiriendo entonces a las GBPs como potenciales sustratos humanos para ROP5 y ROP18.

El programa MSCA sugirió a la GBP5 humana como posible interactor para ROP18 y ROP5. GBP5 es una GTPasa estimulada por IFN γ relacionada con diferentes mecanismos de defensa del hospedador, pero hasta el momento no hay evidencia del papel de GBP5 como un factor protector de la infección por *Toxoplasma* en humanos. Sí existe evidencia de la participación de las GBPs en la resistencia a *Toxoplasma* en el modelo murino, por ejemplo, hay evidencia de que GBP1m se acumula en la vacuola parasitofora dependiendo de IFN γ y del tipo de cepa infectante, ésta se acumula sólo en cepas de mediana o baja virulencia en células MEFs (fibroblastos de embriones de ratón), además la acumulación de GBP1 en la VP también depende de factores de virulencia del parásito como ROP16, ROP18 y GRA15 [Virreira, et al. 2011]. Este mismo autor demostró también que GBP1m

interactúa con GBP2m y GBP5m para acumularse sobre la VP dependiendo de la estimulación con INF γ [Virreira, et al. 2011].

Este es el primer reporte que muestra interacciones entre ROP cinasas de *Toxoplasma* y proteínas de unión a guanilato estimuladas por interferón (GBPs) (ver anexo 1 y 2; Figura 11 y 12). Este hallazgo es algo controversial debido a que hasta el momento no se ha asociado a GBPs como proteínas protectoras contra la toxoplasmosis en el contexto humano. GBPs han sido relacionadas como factores protectores contra varios patógenos como *Chlamydia* y ciertos virus [MacMicking, et al. 2012], sin embargo, para el caso de *Toxoplasma* no se observa una actividad directa al menos para ciertos tipos celulares humanos. Por ejemplo, no se observa que GBPs se acumulen sobre la vacuola parasitofora (VP) en células HFF (fibroblastos de prepucio humano) y tampoco se observó diferencias en la restricción de *Toxoplasma* cuando se compararon con una línea control HFF *knockdown* para GBP1 y GBP2 luego de inducir ambas con IFN γ [Niedelman, et al. 2013]. A diferencia de HFF, se pudo observar la acumulación de GBPs de los alelos del 1 al 5 en las VPs formadas por *Toxoplasma* en células HAP1 (línea de cáncer mielóide humano), sin embargo, no se observaron diferencias en el crecimiento del parásito cuando se comparó con una línea HAP1 *knockout* para todo el locus GBP del 1 al 7 [Ohshima, et al. 2014]. Cabe resaltar que para este experimento solo se probaron cepas de *Toxoplasma* tipo II (ME49) que es una cepa de virulencia intermedia y se ha observado al menos en el modelo ratón que la carga de GBPs sobre las vacuolas parasitoforas son dependientes del tipo de cepa [Virreira, et al. 2011]. Otro resultado interesante se observó en la línea celular A549 (adenocarcinoma humano de células epiteliales alveolares basales), donde no se observó acumulación de GBPs sobre las VPs de *Toxoplasma*, pero se requirió de GBP1 para restringir el crecimiento de *Toxoplasma* tipo II (ME49) y no del tipo I [Johnston, et al. 2016]. Siguiendo con la búsqueda de evidencia del papel de GBPs en la toxoplasmosis humana se encontró que GBP1 en células MSCs (células madre mesenquimatosas) participa en la defensa contra *T. gondii* para dos tipos de cepa RH tipo I y PLK (tipo II) comparando la tasa de inhibición del crecimiento de

Toxoplasma frente a células MSCs knockdown para cada una de las GBPs [Qin, et al. 2017].

Tanto ROP18 y ROP5 son considerados como los principales factores de virulencia en el ratón para casi todas las cepas de alta virulencia hasta ahora aisladas [Behnke, et al. 2015]. En lo que tiene que ver con relación a ROP cinasas en el papel de la infección en humanos, Niedelman, et al. 2012 comparo la infección de *Toxoplasma* no virulentos S22 (carentes del locus ROP5 virulento) versus S22 transformado con locus ROP5 virulento, encontrando que, aunque existen diferencias en la infección en el porcentaje de crecimiento entre estos dos grupos, los resultados no son significativos. No se encontró diferencia cuando se compararon los porcentajes de infección por ensayos de plaqueo entre toxoplasma tipo III (no virulento) versus *Toxoplasma* tipo III transformado con ROP18 tipo I (virulento) en células HFF [Niedelman, et al. 2012]. Estos resultados sugieren que ROP18 y posiblemente ROP5 no juegan un papel importante en virulencia, al menos en la línea celular HFF. No se reportan suficientes estudios donde se relacione el papel de ROPs en la infección a otros tipos de células humanas.

Nosotros observamos la interacción *in-vitro* para ROP5 y GBP5 humana en células Hela (Figura 11 y 12). Para esta línea celular se ha evidenciado su capacidad de restringir el crecimiento de *Toxoplasma* virulento tipo I por medio de la expresión de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) la cual degrada L-triptófano un amino ácido esencial para este parásito. Éste mecanismo de defensa es dependiente de IFN γ [Hunt, et al. 2017; Niedelman, et al. 2013]. También se ha observado que los marcadores de autofagia ubiquitina, LC3, p62 y NDP52 se acumulan en la VP de *Toxoplasma* tipo II y III cuando estos invaden células Hela, llevando a la reducción del crecimiento de estos parásitos, pero sin observar fusión con lisosomas. Este proceso también fue dependiente de IFN γ [Selleck, et al. 2015].

GBP5 ha sido asociada como un importante factor de la inmunidad autónoma celular que responde a patógenos intracelulares como *Chlamydia*, *Mycobacterium*, *Listeria* y especies de *Salmonella* [Kim, et al. 2012]. Recientemente también se encontró que GBP5 irrumpe en la infectividad viral de HIV-1 interfiriendo con el procesamiento

e incorporación de la proteína de envoltura ENV en el virion en un modelo celular con HEK293T [Krapp, et al. 2016]. Solo se ha podido determinar el papel de GBP5 como un factor importante en la infección por *Toxoplasma* en el modelo murino, demostrando que los ratones son más susceptibles a la infección por *Toxoplasma* cuando se escinde el locus del cromosoma 3 con los genes GBP2ps, GBP2, GBP1, GBP3 GBP7 y GBP5. A pesar de la importancia de estos genes en la susceptibilidad a *Toxoplasma* se sugiere que la GBP1, GBP5 y GBP7 son las más importantes después de la reconstitución individual con cada una de ellas [Yamamoto, et al. 2012]. GBP1 GBP2 y GBP5 poseen motivos CaaX en su región C-terminal, los cuales son completa o parcialmente isoprenilados para anclarse a endo-membranas o diferentes organelos con membrana en el citoplasma. En experimentos *in-vitro* se evidencia que GBP1, GBP2 y GBP5 pueden formar heterodimeros, lo cual afectaría su propia localización subcelular. Por ejemplo, GBP1 puede reclutar a GBP2 y GBP5 en su propio compartimiento celular y luego GBP5 reposiciona GBP2 [Britzen-Laurent, et al. 2010]. El papel más importante que se le atribuye a GBP5 es la capacidad para inducir el ensamblaje del complejo inflamosoma NLRP3 [Shenoy, et al. 2012]. La activación del inflamosoma lleva a la activación de la Caspasa 1 y a la posterior maduración de las citocinas proinflamatorias IL1 β e IL18, y este proceso se asocia a diferentes vías de defensa como la piroptosis.

VII.5. Modelo del desenlace de la interacción ROP5-GBP5.

La maduración de pro-IL1 β a IL1 β se da por la participación de la Caspasa 1 que a su vez es activada en el complejo GBP5-NLRP3 inflamosoma, lo que nos sugiere que posiblemente ROP18 con la ayuda de ROP5 interactúan con GBP5 activando el complejo inflamosoma y el desenlace es la mayor producción de IL1 β .

Nuestra hipótesis es que en algunas líneas celulares humanas infectadas por *Toxoplasma* virulentos, la proteína ROP5 interactúa con los heterodimeros GBP5, GBP1 y GBP2, pero específicamente con GBP5; esta interacción permitiría la intervención de ROP18 que podría interactuar con alguna de estas GBPs de una manera transitoria llevando a la activación del complejo inflamosoma (Figura 15).

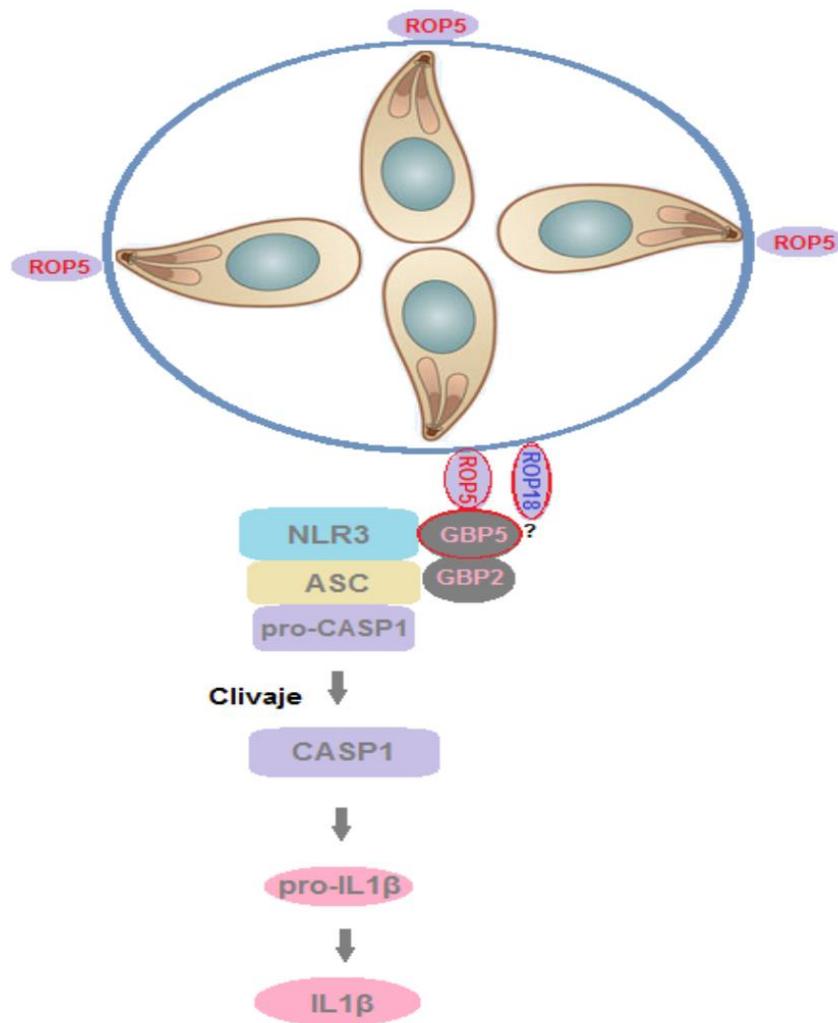


Figura 15: modelo del desenlace de la interacción ROP5-hGBP5 en cepas virulentas de *Toxoplasma*. En rojo corresponde a nuestro modelo de interacción ROP5-GBP5. La proteína GBP5 forma heterodímeros con GBP2. ROP5 interactúa con GBP5; ROP5 capacita a ROP18 para interactuar con GBPs 2 ó 5. Esta interacción interfiere complejo inflamósoma NLRP3 aumentando la maduración de IL1 β y posiblemente la activación de piroptosis. (Interacción GBP5-NLRP3 fue tomado de Kim, et al. 2016)

Por último, nosotros sugerimos que mecanismos de autofagia también podrían estar relacionados a GBP5 dado que la acumulación de éstas en las VP de *Toxoplasma* infectando HAP1 fue dependiente del componente de autofagia ATG16L1

[Ohshima, et al. 2014]. Además, diferentes marcadores de autofagia se asocian a las vacuolas infectantes en células Hela [Selleck, et al. 2015].

Los anteriores experimentos sugieren la interacción de ROP5 con GBP5 y una posible intervención en la activación del complejo inflamosoma dependiente de ROP18; aun así, se necesitan más experimentos para corroborar esta hipótesis en otras líneas celulares, por ejemplo, medir la maduración de IL1 β infectando con parásitos *knockout* para los alelos ROP5, así como también medir otros factores como actividad Caspasa 1 o marcadores de autofagia como el LC3.

En resumen, en este trabajo diseñamos un programa bioinformático llamado MSCA (*Multiple Spectral Comparison Alignment*) el cual busca similitud e interacciones entre proteínas comparando sus densidades espectrales [Arenas, et al. 2015]. Este algoritmo demostró su capacidad de encontrar al menos una interacción positiva para una base de datos de 1.250 secuencias. Este programa sugirió a las proteínas de unión a guanilato y estimuladas por IFN γ (GBPs) como posibles sustratos para proteínas ROP cinasas de *Toxoplasma gondii*. Nosotros pudimos confirmar por 2 técnicas de interacción *in-vitro Pull-down western blot* y Y2H la interacción GBP5-ROP5, siendo el primer reporte de interacción entre GBPs y ROPs en células humanas (Tabla 4). También confirmamos la interacción intra-especifica ROP5-ROP39 por *Pull-down MS* y *Pull-down western blot*, sugiriendo un nuevo papel para ROP5 (Tabla 4). Por una sola técnica (*Pull-down Mass spectrometry*) obtuvimos las interacciones ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6 y ROP39-SHMT2 y por Y2H la interacción ROP18-hGBP5, la cual consideramos debe ser confirmada por otros experimentos de interacción (Tabla 4). También sugerimos que ROP18 del tipo virulento influye en la maduración de IL1 β posiblemente dependiendo de la interacción ROP5-GBP5. Es importante anotar que el efecto final (aumento o reducción en producción de IL1 β) fue dependiente de la forma clínica, lo cual sugiere que no todas las personas responden de la misma manera a este factor de virulencia. Como la diferencia se obtuvo entre personas con lesión ocular y los que no la tenían, este hallazgo podría tener implicaciones para entender la patogénesis de esta forma de toxoplasmosis humana.

Interacciones	Programa MCSA	PULL-DOWN MASS SPECTROMETRY	YEAST 2 HYBRIDS	PULL-DOWN WESTERN BLOT
ROP5A-hGBP5	+	-	++++-	+++
ROP5C-hGBP5	+	-	+++	+++
ROP18-hGBP5	+	-	+++	-
ROP5-ROP39	+	+		++
ROP11-SLC3A2	+	++	-	-
ROP11-ANXA6	+	++	-	-

■ Interacciones positivas confirmadas por 2 experimentos diferentes.

□ Interacciones que deben ser confirmadas por otro experimento de interacción.

+: Numero de repeticiones con interacción positiva

-: No hay interacción

Tabla 4: Resumen interacciones para ROP cinasas de *Toxoplasma gondii* Tipo I.

VIII. CONCLUSIONES.

1. MSCA predijo las interacciones ROP39-ROP5, ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2, ROP5-GBP5, ROP18-GBP5.

2. Evidenciamos las interacciones ROP11-SLC3A2, ROP11-ANXA6, ROP39-SHMT2 por *Pull-down* MS, pero por una sola técnica, esto nos hace pensar que son interacciones débiles que no tendrían importancia para la interacción parásito-célula humana.

3. Evidenciamos una nueva interacción inter-especifica ROP5-ROP39 por *Pull-down* MS y *Pull-down* WB (dos técnicas). Esto sugiere que ROP5 podría ser un estabilizador de otras ROP cinasas.

4. Evidenciamos la interacción ROP5-GBP5 humana por Y2H y *Pull-down* WB (dos técnicas). Este es el primer reporte de una proteína humana estimulada por IFN γ que interactúa con el mayor factor de virulencia reportado para *Toxoplasma gondii*.

5. Se observó la interacción ROP18-GBP5 (Y2H) y se demostró que ROP18 del tipo virulento influye en la maduración de IL1 β . Es importante demostrar en futuros experimentos si esto es dependiente de la interacción ROP5-GBP5.

IX. PERSPECTIVAS.

Comprobación del desenlace de la interacción ROP5-GBP5.

Infección de células humanas GBP5KO con parásitos tipo I o II. (Medición de marcadores de inflamósoma NLPR3, Caspasa 1, IL1 β , etc.).

Infección de células humanas con parásitos RH Δ ROP5 vs RH (medición de marcadores de inflamósoma NLPR3, Caspasa 1, IL1 β , etc.).

Infección de PBMCs humanos con RH Δ ROP5 vs RH (medición de marcadores de inflamósoma NLPR3, Caspasa 1, IL1 β , etc.).

X. REFERENCIAS.

Arenas AF, Salcedo GE, Montoya AM, Gomez-Marin JE. MSCA: a spectral comparison algorithm between time series to identify protein-protein interactions. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16:152. doi:10.1186/s12859-015-0599-8.

Arevalo JF, Belfort R, Muccioli C, Espinoza JV. Ocular toxoplasmosis in the developing world. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2010; 50:57–69. doi:10.1097/IIO.0b013e3181d26bf4.

Behnke MS, Fentress SJ, Mashayekhi M, Li LX, Taylor GA, et al. The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in *Toxoplasma gondii* by Regulating the Active Kinase ROP18. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002992.

Behnke MS, Khan A, Lauron EJ, Jimah JR, Wang Q, Tolia NH, et al. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Genet.* 2015;11(8): e1005434. doi.org/10.1371/journal.pgen.1005434.

Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley LD. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(23):9631-9636. doi:10.1073/pnas.1015338108.

Behnke MS, Wootton JC, Lehmann MM, et al. Coordinated Progression through Two Subtranscriptomes Underlies the Tachyzoite Cycle of *Toxoplasma gondii*. Langsley G, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(8): e12354. doi: 10.1371/journal.pone.0012354.

Black MW, Boothroyd JC. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000; 64:607-623.

Blagden S, de Bono J. Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. *Current drug targets*. 2005;6(3): 325-335. doi:10.2174/1389450053765824.

Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(1): 79-88. doi:10.1038/nrmicro1800.

Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*. 2002;5(4): 438-442. doi:10.1016/S1369-5274(02)00349-1.

Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current Opinion in Microbiology*. 2007;10(6): 582-587. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.013.

Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, et al. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(40): 34245-34258. doi:10.1074/jbc.M504158200.

Britzen-Laurent N, Bauer M, Berton V, Fischer N, Syguda A, Reipschläger S, et al. Intracellular Trafficking of Guanylate-Binding Proteins Is Regulated by Heterodimerization in a Hierarchical Manner. *PLoS One*. 2010;5(12):e14246. doi.org/10.1371/journal.pone.0014246.

Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasites & vectors*. 2014;7: 427. doi:10.1186/1756-3305-7-427.

Carruthers V & Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10:83-89.

Cheng L, Chen Y, Chen L, Shen Y, Shen J, An R, et al. Interactions between the ROP18 kinase and host cell proteins that aid in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2012;122(3):255-60. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.02.065.

Coutermarsh-Ott SL, Doran JT, Campbell C, Williams TM, Lindsay DS, Allen IC. Caspase-11 Modulates Inflammation and Attenuates *Toxoplasma gondii* Pathogenesis. *Mediators of inflammation*. 2016;9848263. doi:10.1155/2016/9848263.

Crawford J, Tonkin ML, Grujic O, Boulanger MJ. Structural Characterization of Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) from *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(20):15644-15652. doi:10.1074/jbc.M109.092619.

Dalimi A, Abdoli A. Latent Toxoplasmosis and Human. *Iranian Journal of Parasitology*. 2012; 7:1-17.

Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 2004;40(1): 57-63.

Degrandi D, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Würthner J, Kurig S, et al. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2007;179(11): 7729-7740. doi:179/11/7729.

De-la-Torre A, Gonzalez G, Diaz-Ramirez J, Gomez-Marin JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma retinochoroiditis* in Colombia. *Am J Ophthalmol*. 2007;143: 354–356. doi.org/10.1016/j.ajo.2006.09.048.

De-la-Torre A, Lopez-Castillo CA, Gomez-Marin JE. Incidence and clinical characteristics in a Colombian cohort of ocular toxoplasmosis. *Eye (Lond)* 2009a;23: 1090–1093. doi: 10.1038/eye.2008.219.

De-la-Torre A, Lopez-Castillo CA, Rueda JC, Mantilla RD, Gomez-Marin JE, et al. Clinical patterns of uveitis in two ophthalmology centres in Bogota, Colombia. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009b; 37:458–466. doi:10.1111/j.1442-9071.2009.02082.x.

De-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine.* 2014;68(1): 23-31. doi: 10.1016/j.cyto.2014.03.005.

De-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, Gomez-Marin JE, Candolfi E. Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- γ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2013;7: e2541. doi: 10.1371/journal.pntd.0002541.

Dodds EM, Holland GN, Stanford MR, Yu F, Siu WO, et al. Intraocular inflammation associated with ocular toxoplasmosis: relationships at initial examination. *Am J Ophthalmol.* 2008; 146: 856–865. doi: 10.1016/j.ajo.2008.09.006.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitology.* 1998; 28:1019-1024.

Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 27–30.

Egarter S, Andenmatten N, Jackson AJ, Whitelaw JA, Pall G, Black JA, et al. The *Toxoplasma* Acto-MyoA Motor Complex Is Important but Not Essential for Gliding Motility and Host Cell Invasion. *PLoS ONE.* 2014; 9: e91819.

El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N, et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics.* 2006;6(21): 5773-5784. doi:10.1002/pmic.200600187.

Endicott JA, Noble MEM, Johnson LN. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 2012;81: 587-613. doi:10.1146/annurev-biochem-052410-090317.

Etheridge RD, Alaganan A, Tang K, Lou HJ, Turk BE, Sibley LD. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell host & microbe*. 2014;15(5):537-550. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.002.

Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, et al. Phosphorylation of Immunity-Related GTPases by a *Toxoplasma gondii* Secreted Kinase Promotes Macrophage Survival and Virulence. *Cell Host Microbe*. 2010; 8: 484–495. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.005.

Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009;458(7237):509-513. doi:10.1038/nature07710.

Finethy R, Jorgensen I, Haldar AK, de Zoete MR, Strowig T, Flavell RA, et al. Guanylate binding proteins enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in *Chlamydia*-infected macrophages. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4740-4749. doi:10.1128/IAI.00856-15.

Fleckenstein MC, Reese ML, Könen-Waisman S, Boothroyd JC, Howard JC, Steinfeldt T. A *Toxoplasma gondii* Pseudokinase Inhibits Host IRG Resistance Proteins. Ward GE, ed. *PLoS Biology*. 2012;10(7): e1001358. doi: 10.1371/journal.pbio.1001358.

Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience*.1973; 23:343–352.

Garweg JG, Garweg SD, Flueckiger F, Jacquier P, Boehnke M. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4593–4598. doi: 10.1128/JCM.42.10.4593-4598.2004

Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, et al. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect.* 1999; 123: 283–289.

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2: e277. doi: 10.1371/journal.pntd.0000277.

Gilbert RE, Stanford MR ¿Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol.* 2000; 84: 224–226.

Gorfu G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *mBio.* 2014;5(1). doi:10.1128/mBio.01117-13.

Gov L, Karimzadeh A, Ueno N, Lodoen MB. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *mBio.* 2013;4(4): 1-11. doi:10.1128/mBio.00255-13.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases.* 2001;184(5): 633-639. doi:10.1086/322800.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1995;9(8): 576-596. doi:7768349.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1995;9(8): 576-596.

Hermanns T, Müller UB, Könen-Waisman S, Howard JC, Steinfeldt T. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated

by the dense granule protein GRA7. *Cellular Microbiology*. 2016;18(2):244-259. doi:10.1111/cmi.12499.

Herrmann DC, Bärwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, et al. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: Generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Veterinary Research*. 2012;43(1): 39. doi:10.1186/1297-9716-43-39.

Hoffmann S, Batz MB, Morris JG, Jr. Annual cost of illness and quality adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot*. 2012; 75: 1292–1302. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-417.

Hunt NH, Too LK, Khaw LT, Guo J, Hee L, Mitchell AJ, et al. The kynurenine pathway and parasitic infections that affect CNS function. *Neuropharmacology*. 2017;112(Pt B):389-398. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.029.

Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;766-778. doi:10.1038/nrmicro2858.

Johnston AC, Piro A, Clough B, Siew M, Virreira Winter S, Coers J, et al. Human GBP1 does not localize to pathogen vacuoles but restricts *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*. 2016;18(8):1056-1064. doi:10.1111/cmi.12579.

Katris NJ, van Dooren GG, McMillan PJ, Hanssen E, Tilley L, Waller RF. The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens*. 2014;10(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1004074.

Khan a, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(37): 14872-14877. doi:10.1073/pnas.0702356104.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo L V, Belfort R, et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis,

Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(6): 942-949. doi:10.3201/eid1206.060025.

Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Bradfield CJ, MacMicking JD. IFN-inducible GTPases in Host Defense. *Cell host & microbe*. 2012;12(4):432-444. doi: 10.1016/j.chom.2012.09.007.

Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science*. 2011;332(6030): 717-721. doi:10.1126/science.1201711.

Klamp T, Boehm U, Schenk D, Pfeffer K, Howard JC. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2003;171(3):1255-1265. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1255.

Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 1991;253(5018): 407-414.

Könen-Waisman S, Howard JC. Cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii* in mouse and man. *Microbes and Infection*. 2007;9(14-15): 1652-1661. doi: 10.1016/j.micinf.2007.09.005.

Krapp C, Hotter D, Gawanbacht A, McLaren PJ, Kluge SF, Stürzel CM, et al. Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):504-14. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.019.

Leriche MA, Dubremetz JF. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;45(2):249-59.

Lilue J, Müller UB, Steinfeldt T, Howard JC. Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. Weigel D, ed. *eLife*. 2013;2: e01298. doi:10.7554/eLife.01298.

Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(2):2652-2683. doi:10.3390/ijms14022652.

MacMicking JD. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends in Immunology*. 2004; 11:601-609. doi:10.1016/j.it.2004.08.010.

MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(5):367-382. doi:10.1038/nri3210.

Man SM, Karki R, Malireddi RKS, Neale G, Vogel P, Yamamoto M, et al. The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by *Francisella* infection. *Nature Immunology*. 2015; 16:1-11. doi:10.1038/ni.3118.

Martens S, Howard J. The interferon-inducible GTPases. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006; 22:559-589.

Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, et al. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog*. 2005;1: e24.

Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*. 2014;509(7500): 366-370. Disponible en: doi:10.1038/nature13157.

Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*. 2014;509(7500): 366-370. doi:10.1038/nature13157.

Meunier E, Wallet P, Dreier RF, Costanzo S, Anton L, Rühl S, et al. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nature immunology*. 2015;16(5):476-484. doi:10.1038/ni.3119.

Mimura KK, Tedesco RC, Calabrese KS, Gil CD, Oliani SM. The involvement of anti-inflammatory protein, Annexin A1, in ocular toxoplasmosis. *Molecular Vision*. 2012; 18:1583-1593.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363(9425):1965-76. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X.

Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 2002;66(1): 21-38. doi:10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002.

Müller UB, Howard JC. The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 32:19-25. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.009.

Niedelman W, Gold DA, Rosowski EE, Sprokholt JK, Lim D, et al. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002784.

Niedelman W, Sprokholt JK, Clough B, Frickel EM, Saeij JP. Cell death of gamma interferon-stimulated human fibroblasts upon *Toxoplasma gondii* infection induces early parasite egress and limits parasite replication. *Infect Immun*. 2013;81(12):4341-9. doi:10.1128/IAI.00416-13.

Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Su Ma J, Kamiyama N, et al. Role of mouse and human autophagy proteins in IFN-gamma-induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2014;192(7):3328±35. doi:10.4049/jimmunol.1302822.

Ong YC, Boyle JP, Boothroyd JC. Strain-dependent host transcriptional responses to *Toxoplasma* infection are largely conserved in mammalian and avian hosts. *PLoS ONE*. 2011;6: e26369.

Ong YC, Reese ML and Boothroyd JC. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem*. 2010; 285: 28731-28740.

Peixoto L, Chen F, Harb OS, Davis PH, Beiting DP, et al. Integrative Genomic Approaches Highlight a Family of Parasite-Specific Kinases that Regulate Host Responses. *Cell Host Microbe*. 2010; 8: 208–218.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International journal for parasitology*. 2008;38(5): 561-569. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.004.

Pfefferkorn E, Pfefferkorn L, Colby E. Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1977; 63:158-9.

Pornthanakasem W, Kongkasuriyachai D, Uthaipibull C, Yuthavong Y, Leartsakulpanich U. Plasmodium serine hydroxymethyltransferase: indispensability and display of distinct localization. *Malaria Journal*. 2012;11:387. doi:10.1186/1475-2875-11-387.

Prager GW, Féral CC, Kim C, Han J, Ginsberg MH. CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24477-84.

Qin A, Lai DH, Liu Q, Huang W, Wu YP, Chen X, et al. Guanylate-binding protein 1 (GBP1) contributes to the immunity of human mesenchymal stromal cells against *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(6):1365-1370. doi: 10.1073/pnas.1619665114.

Read M, Müller IB, Mitchell SL, Sims PF, Hyde JE. Dynamic subcellular localization of isoforms of the folate pathway enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT) through the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 2010; 9:351. doi:10.1186/1475-2875-9-351.

Reese ML, Shah N, Boothroyd JC. The *Toxoplasma* Pseudokinase ROP5 Is an Allosteric Inhibitor of the Immunity-related GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(40):27849-27858. doi:10.1074/jbc.M114.567057.

Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology today (Personal ed.)*. 1999;15(2): 51-57.

Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med*. 2011; 208: 195–212.

Rosowski EE, Saeij JP. *Toxoplasma gondii* Clonal Strains All Inhibit STAT1 Transcriptional Activity but Polymorphic Effectors Differentially Modulate IFNgamma Induced Gene Expression and STAT1 Phosphorylation. *PLoS ONE*. 2012; 7: e51448.

Saeij JP, Boyle JP, Coller S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*. 2006; 314, 1780-1783.

Saeij JPJ, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, et al. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. 2007; 445: 324–327.

Sahu A, Kumar S, Sreenivasamurthy SK, et al. Host response profile of human brain proteome in toxoplasma encephalitis co-infected with HIV. *Clinical Proteomics*. 2014;11(1):39. doi:10.1186/1559-0275-11-39.

Sánchez V, De-la-Torre A, Gómez-Marín JE. Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. *Parasitology International*. 2014;63(2): 463-469. doi: 10.1016/j.parint.2013.10.012.

Schirch V, Szebenyi DM. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr Opin Chem Biol*. 2005 Oct;9(5):482-7.

Selleck EM, Fentress SJ, Beatty WL, Degrandi D, Pfeffer K, Iv HWV, et al. Guanylate-binding Protein 1 (Gbp1) Contributes to Cell- autonomous Immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens*. 2013; 9(4): e1003320. doi: 10.1371/journal.ppat.1003320.

Selleck EM, Orchard RC, Lassen KG, Beatty WL, Xavier RJ, Levine B, et al. A Noncanonical Autophagy Pathway Restricts *Toxoplasma gondii* Growth in a Strain-Specific Manner in IFN-gamma-Activated Human Cells. *mBio*. 2015;6(5): e01157±15. doi: 10.1128/mBio.01157-15.

Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, Kassa H, Booth CJ, Cresswell P, MacMicking JD. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science*. 2012;336(6080):481-5. doi: 10.1126/science.1217141.

Sibley LD, Ajioka JW. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual review of microbiology*. 2008;62: 329-351. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162925.

Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992;359(6390): 82-85. doi:10.1038/359082a0.

Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;364(1530): 2749-2761. doi:10.1098/rstb.2009.0087.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. 2004; 304: 248-253.

Singh SB, Davis AS, Taylor G a, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006;313(5792):1438-1441. doi:10.1126/science.1129577.

Steinfeldt T, Konen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, et al. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol*. 2010; 8: e1000576.

Talevich E, Kannan N. Structural and evolutionary adaptation of rhoptry kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. *BMC Evolutionary Biology*. 2013; 13:117. doi:10.1186/1471-2148-13-117.

Taylor GA, Feng CG, Sher A. P47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature reviews. Immunology*. 2004;4(2):100-109. doi:10.1038/nri1270.

Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. 2006;314(5806): 1776-1780. doi:10.1126/science.1133643.

Thiebaut R, Leproust S, Chene G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007; 369: 115–122.

Vestal DJ, Jeyaratnam JA. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2011;31(1): 89-97. doi:10.1089/jir.2010.0102.

Virreira Winter S, Niedelman W, Jensen KD, et al. Determinants of GBP Recruitment to *Toxoplasma gondii* Vacuoles and the Parasitic Factors That Control It. Moreno SN, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(9): e24434. doi: 10.1371/journal.pone.0024434.

Yamamoto M, Ma JS, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, et al. ATF6beta is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7): 1533-1546. doi:10.1084/jem.20101660.

Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, et al. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012;37(2):302-13.

Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H, et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain specific activation of Stat 3. *J Exp. Med*. 2009; 206: 2747-2760.

Yang Z, Hou Y, Hao T, Rho HS, Wan J, Luan Y et al. A Human Proteome Array Approach to Identifying Key Host Proteins Targeted by *Toxoplasma* Kinase ROP18. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(3):469-484. doi: 10.1074/mcp.M116.063602.

Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(2):109-21. doi: 10.1038/nri3598.

Zhao Y, Yap GS. Toxoplasma's Arms Race with the Host Interferon Response: A Ménage à Trois of ROPs. *Cell host & microbe*. 2014;15(5):517-518. doi: 10.1016/j.chom.2014.05.002.

Anexo 1: Resultados MSCA para ROP18. Se muestran las primeras 25 proteínas con la mayor similitud espectral a la proteína pregunta “ROP18”, en una base de datos de 1.264 secuencias, bajo 11 descriptores moleculares. * Interacción confirmada *in-vitro*. TF: factor de transcripción. Encontramos la interacción ROP18-hGBP5 por Y2H.

DESCRIPTORS	EIIP	IC	P001	H085	H371	HYDRO	VSC	P1	P2	SASA	NCISC
QUERY	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18	ROP18
1	TRAF6	ROP31	CEAM1	STK	ELK4	IRGb2*	AKTRACA	CREB2	TFDP1	IRGb2*	ATG13
2	ROP20	ROP20	MAP3K7	MNK2	PDCD4	SMAD1*	IRGb1*	HSF1	S6kb2	TFDP1	TM9S1
3	IRG6a*	TRAF6	GBP3	TRAF3	CK2	GBP5*	MAP3K2	PI3KRG	IRGb1*	AJUBA	MAP3K2
4	STAT4	CREB3	IKKg-nemo	AKTRACA	SHLB1	IRGC1	STK	PAK2	Sgk2	STK	IRGC1
5	NUR77	ANGL3	CDC25B	PKAalfa1	IRGM1m	SFR	AKTRACB2	Sgk2	STK	TRAF2	CREB1
6	MAP3K3	PKCZ2	P100	PKCZ2	IRGM2m	GBP6	MAP2K4	P53	TRAF2	IRGb1*	ATG7
7	TRAM	RELB	MAPK10	GBP5*	TFDP1	MNK2	MAP3K11	ROP18	AKTRACB2	AKTRACA	PI3KRG
8	CREB1A	TRAF5	MAPK13	PDCD4	TRAF3	SMAD5	CADH1	JAK2	ROP39	IRGM2m	IRGQh
9	AKTRACA	ROP17*	GBP4	MEF2C	ESAM	GBP4	MAPKAPK3	CREB1	MAP3K7	ROP39	ROP39
10	STAT3	PAK2	HIF1B	caseinkinase	BECN1	CREB4	ERBB2	TYK2	HSF1	SHLB1	SP1
11	S22A4	MAPK8	P53	CREB1A	ELK1	E2F4	TFDP1	MAP4K2	MAPKAPK2	S6kinasebeta2	B-raf
12	HIF1B	IRGM1m	IRGM2m	MAPK1	ROP31	JAK3	PKCbeta2	MAPK8	MEK1	RAF	GBP3
13	ATG10	BECN1	STK	S6kinasebeta2	caseinkinase2	Sgk12	MAPK11	ERBB2	SMAD5	Insulin factor	IRAK1
14	FOXO1	CREB3B	ATG7	GAD153	AKT2RACB2	GBP2	IKba	PDK1	MAP3K2	MAPKAPK2	ATF6beta*
15	MAP3K14	MAP3K72	RELB	AKTRACB2	MAPK13	Sgk31	caspase-9	MAP3K8	MAP3K11	HSF1	MAP3K73
16	RAC1	IIGP5	TYK11	ELF4E1B	CREB3	SQSTM	ELK1	Amyloid beta A4	CADH1	MAPKAPK3	S6kinasebeta2
17	ROP39	TIRAP	ROP39	PI3KB	TRADD	PI3KIBR5	IRGM2m	ATG13	ESAM	PKCbeta2	SMAD4
18	MAP3K72	MEF2C	ITB2	ESAM	ELF4E	CREB3B	MNK1	MAPKAPK3	E2F4	Sgk2	forkheadboxO3
19	ATG5	SMAD5	S22A4	MAPK8	CREB3B	STAT5A	P38	RIP1	Insulin GF	SMAD7	Mdm2
20	GBP6	AKT2RACbeta	E2F4	SMAD9	MADCA	P53	PKAPRKX	NOD2	AKT2RACbeta	MEK1	MAP2K2(MEK2)
21	MAP2K4	STK	AFAP1	Mdm2	ELF4E1B	STAT5B	IRGb2*	IRGb2*	ELF4B	MAPK3(ERK)	BCL9
22	SFR	PI3KRB	RP56KA5	CASP3	SMAD5	RIP1	SMAD3	ROP31	IRGQh	GBP3	JAK1
23	ATG13	ACVL1	S6kinasebeta2	ELF4B	ACVL1	CREB1	Sgk2	IRGC1	STAT2	IKba	Amyloid beta A4
24	TYK11	MNK1	EVA1A	ELK4	BCL2	MAP2K2(MEK2)	SOX2	ADA10	IRGb2*	ESAM	MAP4K3
25	MAP3K13	IRGM2m	TRAF6	SMAD5	SMAD9	TIRAP	ROP20	PKAalfa1	SRF	CADM1	ser/threN12

- ROPs
- Kinases
- IRGs GTPases
- GBPs human
- CREB TF Family
- SMAD TF

Anexo 2: Resultados MSCA para ROP5. Se muestran las primeras 25 proteínas con la mayor similitud espectral a la proteína pregunta “ROP5”, en una base de datos de 1.264 secuencias, bajo 11 descriptores moleculares. * Interacción confirmada *in-vitro*. TF: factor de transcripción. Nosotros corroboramos la interacción **ROP5-ROP39** por *Pull-down* MS y *Pull-down* WB. También confirmamos la interacción **ROP5-hGBP5** por *Pull-down* WB y Y2H

DESCRIPTORS	EIIP	IC	P001	H085	H371	HYDRO	VSC	P1	P2	SASA	NCISC
QUERY	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5	ROP5
1	ELK1	ANGL3	RXR	ROP39*	H9F1	CREB1	CREB1	TYK11	IRGb1*	CREB1	STK
2	CREB3B	S6kinasebeta1	STK	STK	SMAD5	STK	MAP2K4	GBP5*	E2F4	IRGb1*	IRGb2*
3	TFDP1	TRAF3	E2F4	ROP16	STK	caspase-9	SHLB1	MAP3K3	ATG13	SHLB1	PI3KB
4	CREB4	CREB3B	IRG6a*	MAP3K72	GBP4	ROP11	IRGb2*	IKKb	SHLB1	MAPKAPK3	PI3KRG
5	S6kinasebeta2	CDC25B	CREB1	AFAP1	IKKb	SMAD5	IRGM2m	PI3KB	AKTRACB2	IRGM2m	S22A5
6	MAP2K4	CREB1	MAPK12	GBP2	TYK11	ELF4E2	PKCbeta2	2AAA	ELK1	IRGb2*	MAPK1
7	IRGM1m*	RAF	GBP5*	MAPK8	MEF2C	IRGb2*	E2F4	Sgk31	CREB3B	IKba	RIP1
8	P38	CREB3	LYAM2	CDC25B	ELK1	ELF4E	BECN1	MAPKAPK5	GBP3	MLP3B	NUR77
9	RAF	ROP31	S6	ANGL3	ROP20	ICAM2	SMAD3	MAP3K3	CREB5D	Mdm2	ATG13
10	ROP31	PI3KB	PI3KB	GBP1	TYK2	CASP3	IRAK1	MAPKAPK3	RAF	MAP2K1	RPS6KA5
11	PAK2	AKTRACA	CADM1	STAT6	MAP3K3	PDCD4	MLP3B	MYC	MLP3B	SMAD2	AKTRACB2
12	MAPK10	RELA(P65)	STAT4	SYK	MAPK10	GBP5*	MAPK12	MAP2K2	IRAK4	GAD153	ROP39*
13	SMAD7	PTK2	ELK4	forkheadboxO3	STAT4	IRAK4	ATG3	IRG6a*	MYC	MAPK3	SP1
14	MAPK8	RPS6KA4	CREB4	TRIF	AKT2RACbeta	IRGb1*	ATG7	GBP2	ICAM1	bcl2	AKTRACA
15	PI3KRA4	RXR	CK2	SGPP1	SFR	MAP2K2	CREB1A	MAPK10	SMAD7	MAPK12	BCL9
16	MADCA	MAP4K2	CREB5D	2AAA	RELB	SMAD1	PKCalfa	RXR	Sgk2	SMAD3	ADA10
17	ROP17*	IRGM2m*	Sgk2	MAPK11	CK2	MNK2	MAPKAPK3	RAF	MAPKAPK2	ATG13	CK2
18	STAT2	SMAD5	MAPK1	NFAT2	SYK	SQSTM	CD40-SYK	ATG7	PKCgamma	MAPK1(ERK)	MAP3K3
19	TRIF	STK	FOS	CADH1	TRAF3	E2F4	STMN1	RELA(P65)	CADH1	ELK1	MAP3K2
20	Rap-1A	IRGQh	MAPK13	PKCbeta2	MAPK13	CREB2/2	CDK1	MAP3K5	CASP3	MAP2K4	HIF1B
21	ROP39	Amyloid beta A4	LTOR2	MAP4K4	STAT3	ROP20	CK2	MAP3K11	Mdm2	IRGMh	ATG3
22	S6	ROP20	TRAF3	MAP4K1	ELF4E	HRas1	PKAPRKX	MAP3K13	PKNN3	ROP11	HSF1
23	RPS6KA5	TRAF6	MAPK11	CREB5D	RAF	ATG13	IRGMh	PKAalfa1	IL1B	Sgk2	GBP5*
24	BCL2	MAPK8	MAP3K7	MLTK	ELK4	MAPK13	PDK1	PI3KD	MAPK3	RAC1	TAU(MAPT)
25	HSF1	CEBPB	cJUN	ACVL1	SMAD4	MAPK10	STK	TFDP1	Rap-1b	SMAD7	IRGb1*

 ROPs
 Kinases
 IRGs GTPases
 GBPs human
 CREB TF Family
 SMAD TF

Anexo 3: Resultados MSCA para ROP11. Se muestran las primeras 25 proteínas con la mayor similitudad espectral a la proteína pregunta “ROP11”, en una base de datos de 1264 secuencias, bajo 11 descriptores moleculares. * Interacción confirmada *in-vitro*. Confirmamos las interacciones **ROP11-SLC3A2** y **ROP11-ANXA6** por *pull-down* MS. La interacción **ROP11-GBP5** fue observada por Y2H, pero con un bajo número de colonias (posible falso positivo).

Descriptors	EIIP	IC	P001	h085	H371	HYDRO	VSC	P1	P2	SASA	NCISC
Query	<u>ROP11</u>										
1	CEAM1	JUN-D	IKKg-nemo	MAPK8	ACVL1	IKKg-nemo	Sgk3	SOX2	ROP39	ELK4	IRAK4
2	PKCZ2	MAP3K7	MAPK3	SYK	PITX2	SLC3A2	ELK4	LYAM2	MYC	STK	IRGb1
3	SMAD3	S6KB2	ELF4E2	SGK3	GBP5*	ATG13	ROP39	CREB5D	SLC3A2	TRAF2	ATF4
4	MAP3K7	ROP16	S6	CD22	CREB5D	IRGm2	glycokinase	MAPK10	MAPK12	TRAF3	SMAD5
5	MAPKAPK3	ELK4	CREB5D	ser/thrN12	CADM3	SGK	IRAK4	CASP3	TRAF2	ATF4	MAPKAPK5
6	IRGm2	ESAM	NR412	GBP3	MAPK8	GBP5*	SYK	S6kb2	ELK4	ROP20	CASP3
7	SMAD1	CREB2/2	NUR77	ROP31	MAPK10	ROP5	JAK3	MLTK	ROP20	GBP2	MNK1
8	TRAF2	PKAgama	M-Ras1	MAP2K2	ATF4	AMBP	LYAM2	PKAgama	IRAK4	MDM2	SLC3A2
9	MAP2K1	EIK1	SLC3A2	MAPKAPK5	MEF2C	MAP2K2	ROP31	ATG10	glycokinase	SMAD4	Rap-1A
10	CREB5D	R-Ras	TM9S1	PAK2	ROP31	ATF4	SMAD1	MAPK3	MAP3K8	MAP3K8	PKAalfa1
11	ELK4	TRAF3	PKCZ2	CDC25B	STAT6	SQSTM	ALS	IKKa	PI3KIBR5	TYK11	AKTRACB2
12	IRGb1	MEF2C	CDC25B	ELF4E1B	SGK3	IRAK4	TM9S1	HIF1A	MAP3K73	IL23R	GBRAP
13	AKT1	IRGb1	RELB	GBP7	ROP17	ROP31	caspase-9	E2F4	E2F4	NFAT4	MAP2K6
14	ATF4	MAP2K2	E2F4	ANGL3	MAPKAPK3	CREB4	GBP2	MAP3K72	ATF4	PI3KRB	IRGm2
15	SLC3A2	ANXA6	ROP20	MAP2K1	IKKb	TRAF2	P38	IKKb	MDM2	AJUBA	MAPK13
16	MAP3K72	ANGL3	EVA1A	PI3KRA4	IRGm1	STAT6	PTK2	IKKg-nemo	Sgk2	TFDP1	caseinkinase2
17	ESAM	PITX2	TIRAP	IRGb1-b2	RAF1	MAP3K3	FOXO1	CREB2/2	PI3KRB	ROP31	LTOR2
18	GBP4	CD166	ANXA6	CREB1	CEBPB	ATG10	HIF1B	PKAalfa1	SMAD5	ELF4B	PI3KRA4
19	SMAD5	RELB	S6kb1	TRAF3	MAPK11	PI3KB	NFAT2	RELA	TYK11	IRGm2	SMAD9
20	CD166	SLC3A2	PKAalfa1	STK	ANXA6	RXR	STAT2	RAB24	IRGc1	ROP5	ANGL3
21	IRGc1	AJUBA	MAPK9	GADD153	SGPP1	IKKa	MNK1	MAP3K2	SMAD1	GBP4	c-JUN
22	STK	MAP3K13	MAPK12	VCAM1	ATG13	STAT5A	IKKa	MAPK8	IRGMh	CK2	RAC3
23	MLP3C	STK	CREB4	ROP39	ATG3	ICAM2	GBP1	TIRAP	ANXA6	FOXO1	MAPK1
24	GBP6	ATG3	PI3KIBR5	MLP3B	P53	IRGb2-b1	PKCalpha	RELB	ROP31	IRGm1	CDC42
25	MAP3K3	caspase9	RAC1	PI3KIBG	STAT4	STAT5B	RIP1	JUN-D	ERBB2	CEAM1	LTOR1

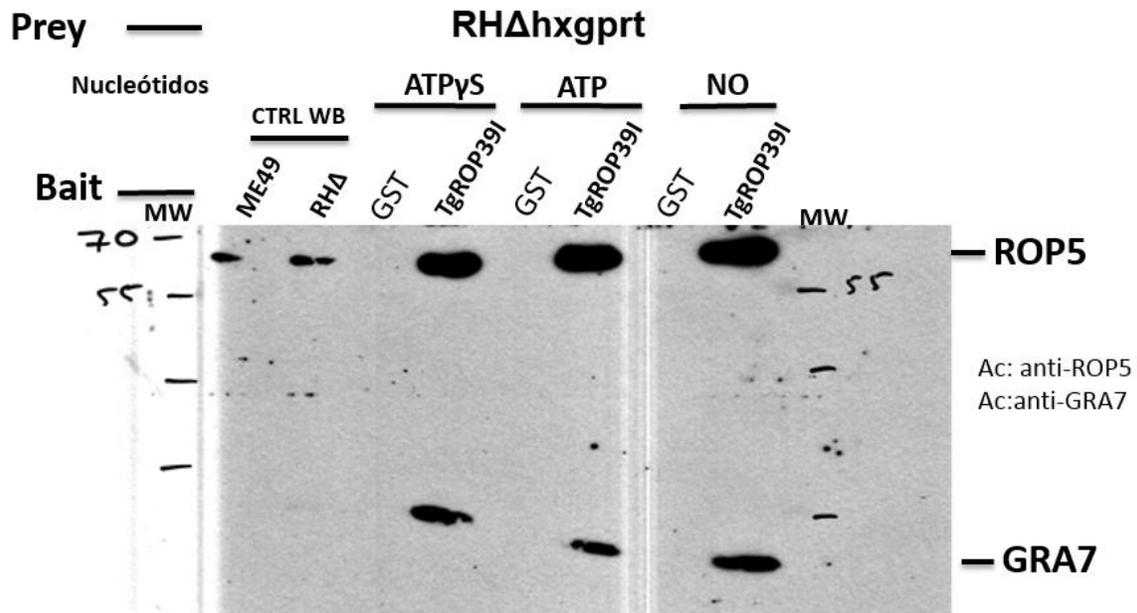
	ROPs
	Kinases
	IRGs GTPases
	pull-down MS
	GBPs human * GBP5 (Y2H)

Anexo 4: Resultados MSCA para ROP39. Se muestran las primeras 25 proteínas con la mayor similitud espectral a la proteína pregunta “ROP39”, en una base de datos de 1.264 secuencias, bajo 11 descriptores moleculares. * Interacción confirmada *in-vitro*. Confirmamos las interacciones **ROP39-SHMT2** por *pull-down* MS. La interacción **ROP39-GBP5** fue observada por Y2H, pero con un bajo número de colonias (posible falso positivo). ROP39-IRGd fue observada 1 vez por *pull-down* WB (datos no mostrados)

Descriptors	EIIP	IC	P001	H085	H371	HYDRO	VSC	P1	P2	SASA	NCISC
Query	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39	ROP39
1	MADCA	MEF2C	GBP5*	ROP5*	PAK2	IRGd*	TRAF6	TRAF5	CREB1	glycokinase	ATG13
2	TRIF	TRAF3	PI3KB	CREB1	TRAF3	AJUBA	CEAM1	STAT1	Sgk2	SMAD9	SCL3A2
3	AFAP1	ROP31	RPS6KA4	SMAD2	Sgk12	S6kb2	MEF2C	IKKa	CEAM1	IRAK4	S6kib2
4	MAP3K3	HSF1	MYC	STK	AJUBA	P53	IKKb	IKKg-nemo	AKT2	ROP5*	MAP3K7
5	SQSTM	IRGm2	ATG7	MAP3K7	MAPK10	ROP17	MDM2	RPS6KA5	ROP5*	ROP31	PI3KRG
6	TRAF6	ATF2	STAT1	PI3KRG	ROP17	MAP2K2	IRAK4	ROP20	IRAK4	IRGd*	ADA10
7	GBP2	PAK2	FOS	PAK2	SMAD9	STAT2	GBP2	MADCA	glycokinase	SGPP1	ROP5*
8	forkheadboxO3	caspase-9	SGPP1	IRGm3	MADCA	SQSTM	AKT2	ICAM2	MEF2C	SHMT2	CREB1
9	FOXO1	CADM1	SLC3A2	MAPK10	SMAD5	PKCgama	IKKa	PKAalfa1	SGPP1	MAPK3	TAU
10	ACTN1	CREB1	S6kb2	ATG3	SYK	MAP3K7	PI3KB	TRAF6	IRGm2	MDM2	P100
11	PI3KB	ICAM1	MAP3K7	CREB5D	SHMT2	S6kb1	Sgk12	CEBPB	ICAM1	GBP3	ATG7
12	IRGd*	IRGm1	STAT2	IRGm2	SMAD4	IKKa	CREB1	SOX2	SMAD2	ATG13	CADH1
13	CD22	CK2	CDC25B	ROP20	IRGm1	IKKg-nemo	MAP2K2	P53	IRGm3	SMAD2	IRGd*
14	SHMT2	IRGd*	Sgk3	GADD153	ACTN1	RXR	ELF4B	IRGMh	ICAM5	TRAF6	STAT2
15	IL23R	Sgk3	GBP3	MAPK3	AKT2	STK	MAPKAPK5	STAT2	AKT1	IKKb	FOXO1
16	GBP1	CEBPB	PTK2	MADCA	IRGd*	MADCA	SMAD2	ATG12	PDCD4	MNK1	ROP17
17	GBP4	ROP18	SHMT2	ICAM2	TRAF2	IKKb	MNK1	ROP5*	CREB5D	STK	MNK1
18	Amyloid A4	MLP3C	RELB	IRGd*	MAP3K5	FOS	P38	RAB24	IKKb	SMAD1	AKT2
19	ATF4	BCL2	LRFN3	BCL2	CD166	STAT6	STAT2	Sgk2	AKTRACA	MAPK11	MAP3K72
20	TM951	RAC2	2AAA	LRFN3	MAP3K14	Sgk2	AJUBA	CREB5D	Sgk2	CREB1	BCL9
21	IRGm2	ROP5*	ULK1	IRGb1	IRGb1	BRCA1	CK2	TRIF	ELK1	MADCA	SHMT2
22	MAPKAPK3	TRAM	CREB3B	GBP5*	ATF4	NR412	IRGb5	PKCbeta2	MAPK1	MAPK1	ATF6b
23	AKT1	RAC1	P100	MLTK	PI3KRB	NUR77	SMAD5	IL23R	MDM2	MAPK13	MDM2
24	CDC42	SHMT2	IRGc1	ANGL3	MAP3K3	PI3KRB	PI3KIA	MAP2K1	STK	MEF2C	AFAP1
25	RPTOR	ATG12	ROP5*	ROP11	STK	NOD2	PDCD4	TIRAP	MAPK3	ELK1	JAK2

	ROPs
	Kinases
	IRGs GTPases
	pull-down MS
	GBPs human GBP5* (Y2H)

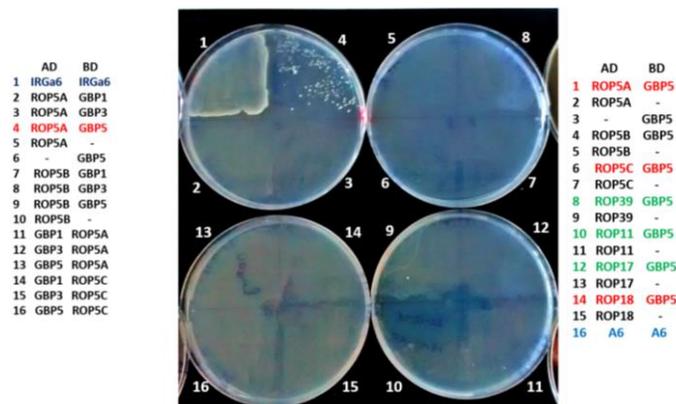
Anexo 5: *Pull-down* WB. *Bait*: ROP39 *Bait* control: GST. *Prey*: Lisados *Toxoplasma* RH Δ hxgprt. Se captura ROP5 como interactor para ROP39. También se captura a GRA7. Éste es un segundo experimento que confirma la interacción ROP39-ROP5.



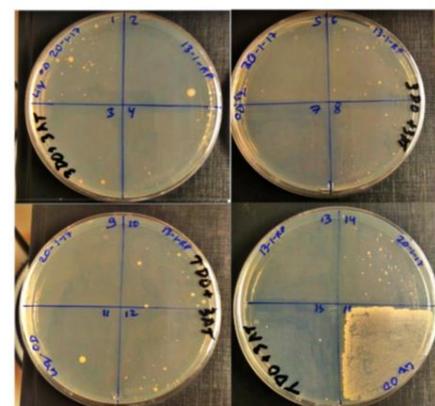
Prey: 1×10^7 parásitos lisados y 100 μ l sefarosa 4B beads por cada *pull-down*. Concentración final control *Bait* (GST) 1.1 mg/ml y *Bait* (ROP39) 0,53 mg/ml cda *pull-down*. Nucleótidos (2mM). Ac: anticuerpos. MW:(marcador de peso molecular) Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). *Pull-down* overnight 4°C rotación constant a 80 rpm. La interacción ROP39-ROP5 fue independiente de nucleótidos y de GRA7.

Anexo 6: Tamizaje de interacciones proteína-proteína por Y2H entre ROP5A/B/C, ROP17, ROP18, ROP11 y ROP39 vs GBPs 1-5. **A:** se confirma la interacción (4 cuadrante) ROP5A-hGBP5 a los 9 días post inoculación. **B:** confirma las interacciones (1 cuadrante) ROP5A-hGBP5, (6 cuadrante) ROP5C-hGBP5 y (14 cuadrante) ROP18-hGBP5. Se observaron pocas colonias para las interacciones (12 cuadrante) ROP17-hGBP5, (10 cuadrante) ROP11-hGBP5, y (8 cuadrante) ROP39-hGBP5 a los 14 días post inoculación. **C:** confirma la interacción (1 cuadrante) ROP5A-hGBP5, y (12 cuadrante) ROP18-hGBP5. Se observaron pocas colonias en las interacciones (10 cuadrante) ROP17-hGBP5 y (14 cuadrante) ROP11-hGBP5 a los 12 días post inoculación. Las lavaduras crecieron en medio TDO (triple deficiente Ade- His- Trp-). OD: 0.3. AD: Dominio de activación del vector pGADT7. BD: Dominio de unión del vector pGBKT7. CONTROL positivo de interacción IRGa6-IRGa6 (azul). Control negativo: transformación de la levadura con solo un vector (- ausencia del constructo AD o BD).

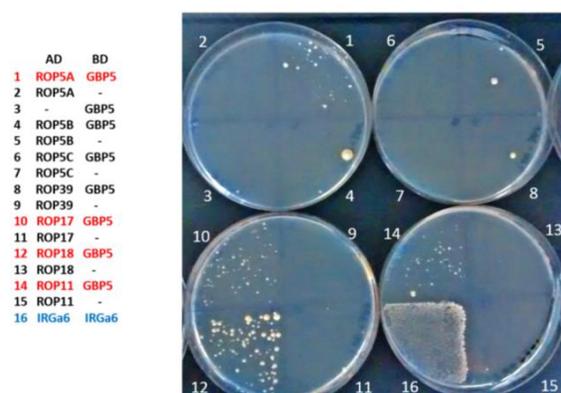
A



B



C



Anexo 7: Publicaciones y Presentaciones.

Publicaciones:

Arenas AF, Salcedo GE, Montoya AM, Gomez-Marin JE. MSCA: a spectral comparison algorithm between time series to identify protein-protein interactions. BMC Bioinformatics. 2015; 16:152. doi: 10.1186/s12859-015-0599-8. (Anexo 7).

Salcedo GE, Montoya AM, **Arenas AF**. A spectral Similarity Measure Between Time Series Applied to the Identification of Protein-Protein Interaction. Biomat. 2014. Proceedings of the International symposium on mathematical and computational biology. Issued by: World Scientific.

Presentaciones:

25th Anniversary Congress Gettysburg Pennsylvania 17-21 Jun 2014. Design of an algorithm for Spectral Comparison between time series to identify Host-Pathogen Interactions (HPIs).