CONSTRUCCIÓN DE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA ESTUDIAR LA HOMEOSTASIS DE COFACTORES METÁLICOS EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

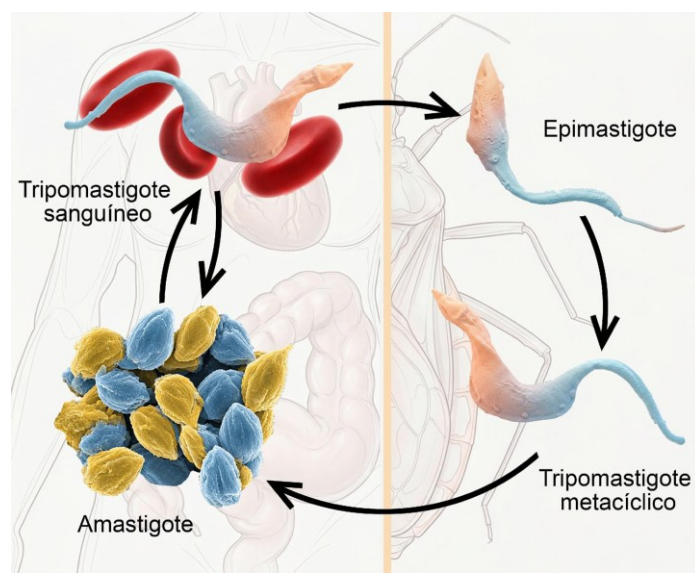
LEIVA, Pilar; TERMINE, Micaela; PODESTÁ, Florencia, BALDELOMAR, Daiana; ACOSTA OVIEDO, Héctor; MERLI, Marcelo L.; MEDIAVILLA, María G*.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)/*mediavilla@ibr-conicet.gov.ar

Palabras claves: Trypanosoma cruzi; homeostasis de hemo; homeostasis de cobre.

INTRODUCCIÓN / HIPÓTESIS

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, depende de la adquisición y distribución de cofactores esenciales como el hemo y los metales de transición. Sin embargo, los mecanismos que regulan su transporte, utilización y homeostasis en el parásito aún no se encuentran completamente caracterizados. A partir de un análisis transcriptómico de epimastigotes, se identificaron genes diferencialmente expresados potencialmente vinculados con la respuesta a hemo [1]. Entre los candidatos priorizados se seleccionaron una proteína con dominio CRAL/TRIO (*Tc*CRAL/TRIO), una proteína de unión a ARN (*Tc*RBP5) y el transportador de hierro *Tc*IT, este último incorporado al estudio a partir de evidencias complementarias sobre su posible participación en la homeostasis de cobre. El objetivo de este trabajo es avanzar en la caracterización funcional de estas proteínas mediante una estrategia integrada que combina análisis bioinformático, producción recombinante y/o herramientas de genética molecular en *T. cruzi*.



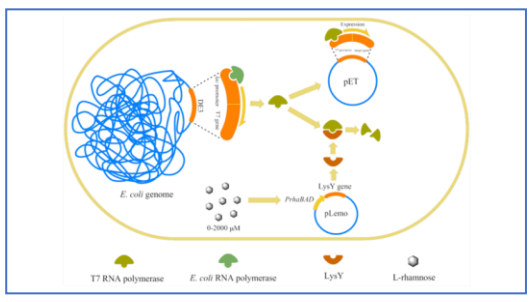
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

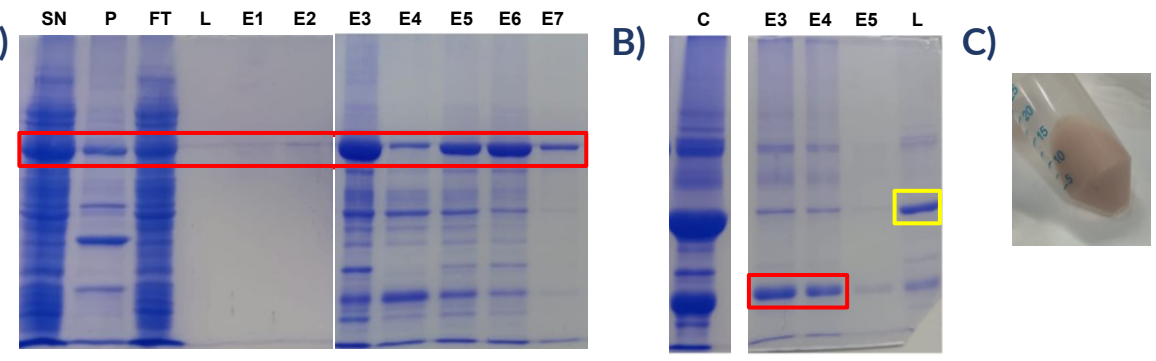
Purificación de *Tc*CRAL/TRIO recombinante

Vector de expresión pT7-HIS-MBP-*Tc*CRAL/TRIO



↓ *E. coli* Lemo21(DE3)
↓ New England Biolabs (NEB)

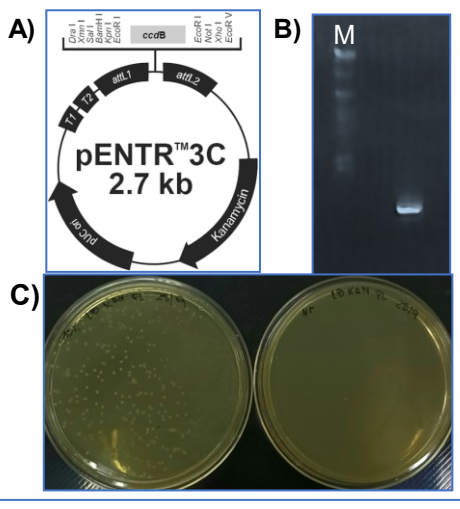




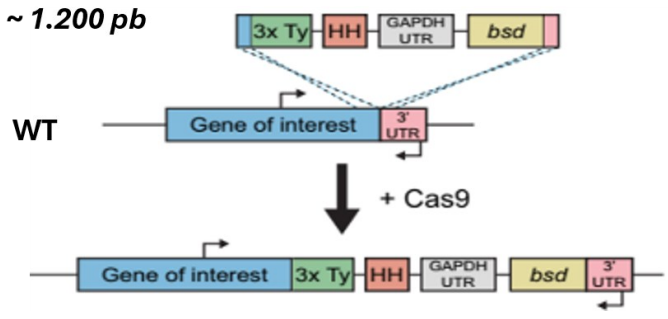
Expresión y purificación de *Tc*CRAL/TRIO. **A)** SDS/PAGE de los pasos de purificación en columna Ni-NTA. SN: sobrenadante; P: Pellet; FT: *flow through*; L: lavado; E1-E7: Fracciones de elución 1 a 7 con Imidazol 250 mM. **B)** SDS/PAGE de los cortes con TEV pasados por columna Ni-NTA: C: corte con TEV; E3-E5: Fracciones de elución; L: Lavado con Imidazol 500 mM. **C)** Pellet celular de *E. coli* sobreexpresando *Tc*CRAL/TRIO.

Generación de sobreexpresantes y *KnockDown* condicionales de *Tc*IT mediante SHARK [2]

Clonado de *Tc*IT. **A)** Mapa de pENTR3C. **B)** Chequeo por PCR de colonia. **C)** Obtención de clones.



Diseño de cebadores para la construcción del pCas9 con sgRNA específico y del molde de recombinación.

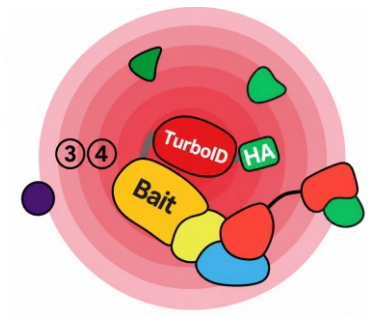


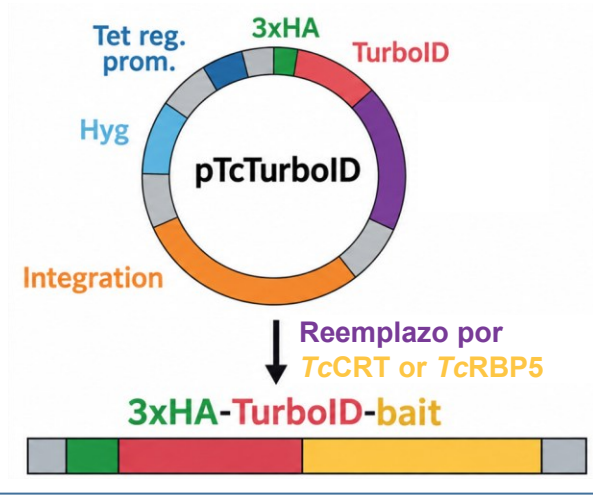
Selección del PAM y determinación del sgRNA	
PAM: CGG en 3'UTR (20-22 pb STOP)	sgRNA: AGCCAAGCGGCTCTTCCCAG ✓ sin *off-targets* en BLAST
CD: AGTGGATCCAGCCAAGCGGCTCTTCCCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAG	
CR: CTATTTCTAGCTCTAAAACCTGGGAAGAGCCGCTTGGCTGGATCCACT	
Molde de recombinación (cebadores compuestos)	
◇ Brazos de homología *TcIT* 50 bp *upstream* del STOP 50 bp *downstream* del PAM	◇ Cassette desde pSHARK1 GAAGTGCATACTAATCAAGATCCC TTAGCCCTCCCACACATAA
CD: TGGCACTGTGGGGAGGGGAGCCGTTATGACGCTCCTTGGGAAGTGGGCGGAAG TGCATACTAATCAAGATCCC	
CR: GCTCCACCGTTTTTACCCAATGCTTTGGTCTGTTGTTTGCGTGCCAGAGATTAGCCC TCCCACACATAAC	

Short Hammerhead Aptazyme-Regulated Knockdown

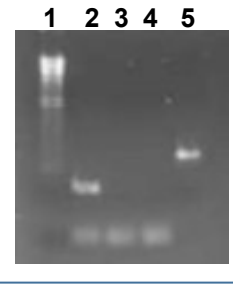
Herramientas para marcado por proximidad de *Tc*CRAL/TRIO y *Tc*RBP5 mediante TurboID [3]

Estrategia de clonado para la construcción de fusiones a TurboID. Figuras adaptadas de [3].





Diseño de cebadores para el clonado entre los sitios BamHI y EcoRV	
***Tc*CRAL/TRIO**	FP: CGCGGATCCgATGACCGACACGATGTCC RP: GGTGGTGATATCCTACTCCCATAAGGGCTTGC
***Tc*RBP5**	FP: CGCGTGGATCCgATGTCTTTTGATTCCCCGTAC RP: GGTGGTGATATCTCATTGACTCATAATGTACGGT



Amplificación de los genes a clonar:
1. Marcador de tamaño molecular
2 a 4. Producto de PCR de *Tc*RBP5
5. Producto de PCR de *Tc*CRAL/TRIO

REFERENCIAS

[1] 10.15698/mic2026.01.865; **[2]** 10.1128/msphere.00090-26; **[3]** 10.1007/978-1-0716-5142-1_17

AGRADECIMIENTOS y FINANCIAMIENTO

AGENCIA I+D+i: PICT 2021-I-A274. CONICET. UNR.