

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**“Caracterización del complejo MR (Mre11-Rad50) en
Giardia duodenalis”**

Que presenta

M. en C. Antonio Sandoval Cabrera

**Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Director de la tesis: Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

México, Distrito Federal.

Marzo 2015.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 82622)

A mi Madre por ser ese gran ejemplo de vida

Te amo mamá

Agradecimientos

A mi familia, a cada uno de mis tíos, tías, primos y primas por toda su comprensión y apoyo, pero en especial a todos mis sobrinos por ser esa gran alegría al final del día.

A mi compañera, amiga, novia, conyugue y cómplice **Liliana Dondiego** mi pitosh, por apoyarme en este divertido viaje,

A la **Dra. Rosa María Bermúdez** por su apoyo, por la oportunidad, por su confianza, por su paciencia y por su invaluable calidad humana puesta en la dirección de éste proyecto.

A mis asesores: **Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Dra. Rebeca Manning Cela, Dr. Luis Marat Álvarez Salas, Dr. Santiago Martínez Calvillo** y al **Dr. Luis Kameyama Kawabe** por su confianza, su apoyo, por sus acertadas críticas a este trabajo y también por sus consejos que van más allá del ámbito académico.

A la **Dra. María Luisa Bazán Tejeda** y a **Israel Vázquez Montiel** por asistencia técnica invaluable para la realización de este trabajo.

A mis amigos colectados a lo largo de la estancia en el CINVESTAV: **Daniel, Crystelle, José Anselmo Amigou, Karlita, Lautaro, Rosita, Ana Lucia, Martha, Gaby, Ismael, Nico y Víctor** por regalarme inmensurables momentos de alegría, por siempre apoyarme y acompañarme todo este tiempo.

A todos los miembros del laboratorio 2 y 16: **Ana Laura, Luisa, Ana Lucía, Rosa, Diego, Fabián, Claudia, Elisa, Ángel, Beatriz, Rodrigo, Rodrigo Jr,**

Coty, Ariana y Mario. Algunos por ofrecerme sus conocimientos, otros por dejarme ofrecerles los míos pero sí a todos por brindarme su cariño.

A los miembros de personal de apoyo del departamento: **Raúl Argüello, Miriam Huerta, Pablo Gómez, Jorge Aragón, Eva Jacinto, Adalberto Herrera, Blanca Herrera, Arturo Pérez, José Arturo Rojas, Alejandra Sánchez y Guadalupe Aguilar** por su asistencia técnica.

A todo el personal de apoyo del CINVESTAV, en particular **Gabriela Mora** por su eficiencia y por su amabilidad que me ha brindado desde el mi primer día en ésta institución.

A todos aquellos que fueron omitidos por distracción, dejo aquí mi disculpa anticipada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar el financiamiento para la realización del proyecto.

Índice

1. Resumen	3
Abstract	4
2. Marco teórico	5
2.1 <i>Giardia duodenalis</i>	5
2.1.1 Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	6
2.1.2 Consideraciones genómicas	8
2.2 Estabilidad genómica y daño a DNA	10
2.2.1 Rupturas de doble cadena (Double Strand Breaks, DSB´s) de DNA.....	10
2.3 Mecanismos de reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA.....	10
2.3.1 Reparación de DSB´s por NHEJ	11
2.3.2 Reparación de DSB´s por recombinación homóloga.....	12
2.4 El complejo MRN/X (Mre11/Rad50/NBS1/Xrs2)	14
2.4.1 Mre11	16
2.4.2 Rad50	17
2.4.2 NBS1/Xrs2	18
3. Antecedentes.....	19
4. Justificación	21
5. Objetivo general	21
5.1 Objetivos particulares	21
6. Esquema general de trabajo	22
7. Material y métodos	23
7.1 Cultivo Celular	23
7.2 Análisis bioinformático	23
7.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes	25
7.4 Actividad de nucleasa.....	26

7.5	Ensayos de ATPasa	26
7.6	Ensayo de retardamiento de DNA	27
7.7	Análisis de expresión de mRNA.....	27
7.8	Marcaje endógeno de las proteínas del complejo MR.....	28
7.9	Inmunodetección en fase solida (<i>Western Blot</i>)	29
7.10	Inmunofluorescencia.....	30
7.11	Interacción de Mre11 con GdRPA	31
7.12	Ensayo de inhibición con Mirina	32
8.	Resultados	33
8.1	Identificación del complejo MR en <i>G. duodenalis</i>	33
8.2	GdMre11 y GdRad50 se unen a ssDNA	46
8.3	GdMre11 es una nucleasa dependiente de Mn ²⁺ con polaridad 3´-5´ modulada por GdRad50.....	48
8.4	GdRad50 posee actividad de ATPasa	50
8.5	GdRad50 y Mre11 se sobre-expresan en respuesta a daño del DNA.....	51
8.6	GdRad50 y GdMre11 tienen una localización nuclear independiente al daño al DNA	54
8.7	GdMre11 interactúa con la proteína de replicación A (RPA)	56
8.8	GdMre11 es susceptible a inhibición por Mirina y desacopla la señalización de daño al DNA.....	58
9.	Discusión.....	60
10.	Conclusiones	67
11.	Perspectivas	68
12.	Referencias.....	69
13.	Anexos.....	78

1. Resumen

Giardia es un reconocido parásito protozoario de importancia clínica por ser causante de la giardiasis, una enfermedad que provoca diarrea y síndrome de mal absorción en humanos y otros mamíferos. Este parásito mantiene niveles muy bajos de heterocigocidad alélica lo cual no se relaciona con la reproducción asexual que este microorganismo posee por lo que se ha sugerido que éste tiene mecanismos de recombinación genética que aún no se han descrito. La reparación al daño de DNA de doble cadena (*Double Strand Breaks*, DSB's) es crucial para la estabilidad genómica y su reparación por recombinación homóloga es uno de los mecanismos usados por las células para no perder información. El complejo MR (Mre11-Rad50) está compuesto por la proteína Mre11, una 3'-5' exonucleasa que corta los extremos durante la recombinación homóloga, y Rad50, una ABC ATPasa miembro de la familia del mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC), ambas fundamentales para el procesamiento de las DSB's. Así, en el presente trabajo se clonó, expresó y caracterizó las actividades catalíticas de las proteínas de *G. duodenalis* (GdMre11 y GdRad50). Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas recombinantes GdMre11 y GdRad50 se unen a ssDNA; la proteína GdRad50 es una ATPasa y GdMre11 presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' dependiente de Mn^{2+} que es modulada por GdRad50. Así mismo se analizó la expresión de estos genes después de que trofozoítos de *Giardia* fueron tratados con irradiación ionizante encontrando que la expresión de estas proteínas se incrementó después de 1 a 2 h de realizado éste proceso. Para determinar la expresión proteica del complejo, se adicionó de forma endógena una etiqueta de tres secuencias contiguas del epítipo de la hemaglutinina a los genes GdMre11 y GdRad50. Cuando se emplearon los trofozoítos transgénicos se observó que los niveles de ambas proteínas se incrementaron significativamente 4 h después de la exposición con radiación ionizante. Ambas proteínas mantienen su localización nuclear con o sin inducción de daño a DNA. Adicionalmente GdMre11 interactúa con la proteína de reparación A (GdRPA). El complejo también es sensible a Mirina desacoplando la activación de ATM. Conjuntamente este estudio señala la importancia que el complejo MR tiene en el procesamiento de las DSB's en el parásito.

Abstract

G. duodenalis is a well-known protozoan parasite that causes giardiasis, a disease where diarrhea and malabsorption syndrome are a hallmark. An intriguing feature of the parasite is that though is described as an asexual organism, it is capable for maintaining its allele heterocigosity as low as a sexual organism. The repair of DNA double strand breaks (DSBs) is crucial for genomic stability and homologous recombination is one of the primary mechanisms used by cells to repair DNA. The MR complex is comprised by Mre11, a 3'-5' exonuclease known to resect ends during homologous recombination, and Rad50, a member of the structural maintenance of chromosomes (SMC) family of ATPases. In this work we cloned, expressed and characterized the catalytic activities of the giardial Mre11 (GdMre11) and Rad50 (GdRad50) proteins, both fundamental for DSB's processing. Our results show that GdRad50 has ATPase activity; meanwhile GdMre11 contains a manganese dependence 3'-5' exonuclease that is positively modulated by GdRad50. Both proteins are also capable for joining DNA. We also explored the expression of giardial *mre11* and *rad50* genes after ionizing radiation, and our results indicate that both specific transcripts were increased after 1 to 2 h. Endogenous MR complex genes where tagged with three hemagglutinin coding sequences and their protein levels were found to be significantly increased 4 h after gamma radiation treatment. These proteins were localized in the nuclei before and after irradiation. GdMre11 interact with the giardial replication protein A and is inhibited by Mirin uncoupling ATM activation. Altogether, these results show the importance of this complex in the DSB's processing in the parasite and brings information about the evolution of this process during eukaryote evolution.

2. Marco teórico

2.1 *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis, denominada también *G. intestinalis* o *G. lamblia*, es un parásito protozooario flagelado y agente etiológico de la giardiasis (Wolfe, 1992), una enfermedad intestinal que infecta a una amplia variedad de mamíferos. Las manifestaciones clínicas que se presentan en humanos varían desde una infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes (Thompson, 2000). La giardiasis se encuentra diseminada en todo el mundo manteniendo una prevalencia del 1 al 50% con 200 millones de casos reportados anualmente en África, Asia y América Latina cada año (WHO, 1995). Mientras que en países desarrollados como en Estados Unidos de América se llegan a registrar hasta 20,000 casos al año (Yoder, Harral & Beach, 2010), en México se reportó una seroreactividad de un 55 % (Cedillo-Rivera, Leal, Yopez-Mulia, Gomez-Delgado, Ortega-Pierres, Tapia-Conyer & Munoz, 2009)

Este parásito protozooario se ubica taxonómicamente en el Orden Diplomonatida (organismos con dos cariomastigotes, cada uno con cuatro flagelos, dos núcleos, amitocondriados sin complejo de Golgi; presentan quiste y pueden ser parásitos u organismos de vida libre) y en la familia Hexamitidae (organismos con seis u ocho flagelos, dos núcleos, simetría bilateral, que pueden o no presentar axostilos y cuerpos medios o parabasales) (Adam, 2001).

G. duodenalis presenta en su ciclo de vida dos estadios morfológicamente distintos. El estadio reproductivo es el trofozoíto, el cual coloniza el epitelio de la parte superior del intestino delgado y el estadio denominado quiste que es excretado en las heces del huésped y resiste a las condiciones ambientales para asegurar su transmisión (Ford, 2005) .

La especie *G. duodenalis* se encuentra dividida genéticamente en 8 ensamblajes que se han denominado alfabéticamente de la A a la H, de los cuales sólo los ensamblajes A y B infectan al humano y otros mamíferos, en tanto que los C y D se han aislado de caninos, el E de ganado, el F de gatos, el G de roedores y el H de vertebrados marinos (Caccio & Ryan, 2008; Lasek-Nesselquist, Welch &

Sogin, 2010). El parásito también es potencialmente un agente zoonótico (Ryan & Caccio, 2013) cuya infección en animales de granja pueden tener un impacto económico (O'Handley, Buret, McAllister, Jelinski & Olson, 2001).

Este protozooario no sólo es objeto de estudio por la enfermedad que causa, sino también por su posición en la inferencia de la historia evolutiva de los eucariotas como un organismo de divergencia temprana (Carnaby, Butcher, Summerbell, Naeem & Farthing, 1995; Hedges, Chen, Kumar, Wang, Thompson & Watanabe, 2001; Inagaki & Ford Doolittle, 2000; Keeling, 2007; Keeling & Doolittle, 1997; Leipe, Gunderson, Nerad & Sogin, 1993; Sogin, Gunderson, Elwood, Alonso & Peattie, 1989). Sin embargo, también se ha hipotetizado que ésta posición taxonómica es debida a una alta tasa evolutiva relacionada a la adaptación a la vida parasitaria (Keeling, 2007; Lloyd & Harris, 2002; Philippe, Lopez, Brinkmann, Budin, Germot, Laurent, Moreira, Muller & Le Guyader, 2000).

2.1.1 Ciclo de vida de *G. duodenalis*

En el ciclo de vida de *G. duodenalis* los quistes del parásito que son excretados por los hospederos infectados se localizan en agua y alimentos contaminados a partir de los cuales son ingeridos por otros hospederos. Los quistes sobreviven el bajo pH estomacal así como una concentración elevada de CO₂. Una vez que llegan a la parte proximal del intestino delgado se enfrentan a un ambiente ligeramente alcalino y en este sitio se concluye el desenquistamiento. Inicialmente se libera a partir del quiste tetranucleado una forma intermedia llamada ezquizoito, el cual sufre de inmediato una citocinesis sin división nuclear originando dos trofozoítos binucleados. Los trofozoítos formados se adhieren a la superficie de los enterocitos en la región del duodeno donde posteriormente proliferan mediante fisión binaria (crecimiento vegetativo) (Ford, 2005). Cuando estos pasan al yeyuno se induce el enquistamiento debido a una alcalinización del pH en este sitio (pH 7.8) y la presencia de ácidos grasos y sales biliares (Gillin, Reiner & Boucher, 1988; Lauwaet, Davids, Reiner & Gillin, 2007). El ciclo continúa cuando los quistes maduros son excretados por el hospedero y estos se ingieren por un nuevo huésped (**Figura 2.1**).

A lo largo de su ciclo de vida, *G. duodenalis* no sólo sufre cambios en el número de núcleos por célula, sino también presenta distintos grados de ploidía. Durante el crecimiento vegetativo, cada trofozoíto binucleado duplica el genoma de cada uno de sus núcleos diploides ($2X2N$) a tetraploides ($2X4N$). En seguida, un nuevo proceso de cariocinesis da lugar a un trofozoíto tetranucleado diploide ($4X2N$), el cual sufre una citocinesis resultando en 2 trofozoítos binucleados diploides ($2X2N$). Durante la diferenciación a quiste el trofozoíto nuevamente replica su genoma ($2X4N$), los núcleos se dividen ($4X2N$) y ya enquistado ocurre una segunda replicación de su genoma ($4X4N$). El desenquistamiento trae consigo una citocinesis que origina dos trofozoítos tetraploides ($2X4N$), cada uno de éstos sufrirá un evento de cariocinesis ($4X2N$) y una citocinesis para originar dos trofozoítos binucleados diploides ($2X4N$) que se integrarán al crecimiento vegetativo (**Figura 2.1.**). Así, el proceso de diferenciación durante el ciclo de vida de *G. duodenalis*, se basa en la coordinación de la replicación del DNA, en perfecta sincronización con el ciclo celular (Svard, Hagblom & Palm, 2003), ya que es esencial garantizar la estabilidad genómica de este microorganismo.

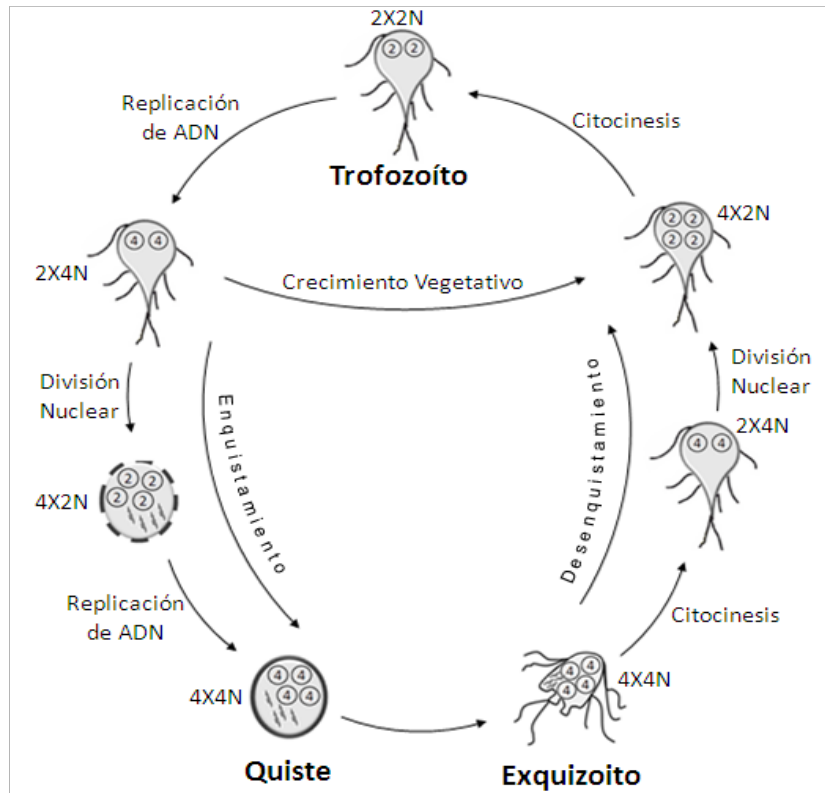


Figura 2.1. Representación esquemática del ciclo de vida de *G. duodenalis* (Svard et al., 2003).

2.1.2 Consideraciones genómicas

El genoma completo de *G. duodenalis* cepa WB ensamble A (ATCC50803) presenta alrededor de 11.7 millones de pares de bases (pb), de las cuales el 77% produce 6,470 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*, ORF's), con un promedio de distancias intergénicas de 372 pb. De éstos, 1800 se superponen y otros 1500 están dentro de las 100 pb contiguas al siguiente ORF, encontrándose sólo cuatro genes con intrones. A pesar de que tiene un número similar de ORF's con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*, el genoma de *Giardia* es compacto en estructura y contiene una maquinaria simplificada para el procesamiento del DNA así como para la mayoría de las rutas metabólicas (Morrison, McArthur, Gillin, Aley, Adam, Olsen, Best, Cande, Chen, Cipriano, Davids, Dawson, Elmendorf, Hehl, Holder, Huse, Kim, Lasek-Nesselquist, Manning, Nigam, Nixon, Palm, Passamaneck, Prabhu, Reich, Reiner, Samuelson, Svard & Sogin, 2007).

En el genoma del parásito se encuentran reportados 15 genes de origen procarionte posiblemente obtenidos por transferencia lateral, la mayoría de ellos relacionados con el metabolismo anaeróbico (Franzen, Jerlstrom-Hultqvist, Castro, Sherwood, Ankarklev, Reiner, Palm, Andersson, Andersson & Svard, 2009; Henze, Horner, Suguri, Moore, Sanchez, Muller & Embley, 2001; Horner, Hirt & Embley, 1999; Morrison et al., 2007; Nixon, Wang, Field, Morrison, McArthur, Sogin, Loftus & Samuelson, 2002).

A pesar de que el parásito se considera un organismo minimalista (Morrison et al., 2007), el 40% de sus ORF's se encuentran duplicados, y llama la atención la prevalencia de las proteínas variables de superficie denominadas VSP's (*Variable Surface Proteins*), cuyo origen es de adquisición reciente y su aparición podría estar en función de la amplitud del rango de hospedero (Sun, Jiang, Flores & Wen; Sun, Jiang, Flores & Wen, 2010).

La diversidad genómica encontrada entre los distintos ensamblajes ha puesto en duda si *G. duodenalis* es una sola especie o un conjunto de ellas (Monis, Caccio & Thompson, 2009; Teodorovic, Braverman & Elmendorf, 2007). El ejemplo más claro se presenta en la secuenciación del genoma de la cepa GS perteneciente al ensamblaje B, cuya comparación con la cepa WB del ensamblaje A mostró una diferencia nucleotídica y aminoacídica del 77 y 78% respectivamente, además de contar con repertorios completamente diferentes de VSP's (Franzen et al., 2009).

Considerando que *Giardia* es un organismo con dos núcleos, diploides, y de una supuesta reproducción asexual se esperaría que su heterocigocidad alélica fuese elevada, como ocurre en organismos de comportamiento parecido, como los rotíferos (Mark Welch & Meselson, 2000). Sin embargo, la heterocigocidad alélica del parásito es de 0.01% para el ensamblaje A (Morrison et al., 2007), 0.0023% para el ensamblaje E (Jerlstrom-Hultqvist, Franzen, Ankarklev, Xu, Nohynkova, Andersson, Svard & Andersson, 2010) y 0.425 % para el ensamblaje B (Adam, Dahlstrom, Martens, Bruno, Barbian, Ricklefs, Hernandez, Narla, Patel, Porcella & Nash, 2013). Esta evidencia sugiere que este organismo cuenta con mecanismos que le permiten

mantener una fidelidad genómica y reducir la heterocigocidad de sus 4 copias de genoma.

2.2 Estabilidad genómica y daño a DNA

El mantenimiento de la estabilidad genómica es un problema fundamental para todos los seres vivos. La integridad esta en riesgo frecuentemente, ya que se expone de forma continua a agentes exógenos o endógenos en procesos celulares normales. De acuerdo al tipo de agente, pueden producirse modificaciones químicas a los nucleótidos del DNA, provocando entrecruzamiento, pérdida de bases o inclusivamente generar rupturas de doble cadena del DNA (DSB's) (Scharer, 2003). Este último es el tipo de daño más severo porque de no ser reparado puede provocar la muerte celular o de ser reparado incorrectamente puede causar deleciones, translocaciones y fusiones de DNA (Negritto, 2010).

2.2.1 Rupturas de doble cadena (Double Strand Breaks, DSB's) de DNA

Las DSB's ocurren por exposición a agentes como la radiación ionizante o genotóxicos (van den Bosch, Lohman & Pastink, 2002), por la actividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producto del metabolismo celular (Friedberg, McDaniel & Schultz, 2004). También pueden ocurrir durante la replicación de DNA de cadena sencilla fragmentada, o bien durante el colapso de la horquilla de replicación (Cox, Goodman, Kreuzer, Sherratt, Sandler & Marians, 2000). Contrario a lo que parece, las DSB's juegan un papel benéfico en procesos como meiosis, replicación, transposición de elementos móviles, transducción, transformación y conjugación en bacterias, durante el apareamiento en levaduras y en la recombinación V(D)J del sistema inmune de vertebrados (Dudas & Chovanec, 2004).

2.3 Mecanismos de reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA

Para proteger el genoma y asegurar la integridad la información que codifica, las células han desarrollado mecanismos sofisticados para reparar las DSB's. Los principales son: la unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*,

NHEJ) o por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR) (Harper & Elledge, 2007).

2.3.1 Reparación de DSB's por NHEJ

La reparación NHEJ resulta ser relativamente más sencilla, ya que sólo se encarga de religar los extremos de las DSB's sin requerir la búsqueda de homología. Debido a esta característica, se presenta durante la fase G1 del ciclo celular o bien en células diferenciadas, en las cuales la cromátida homóloga no está disponible (Scharer, 2003; Weterings & Chen, 2008).

Después de la generación de DSB, el heterodímero de Ku70/80 es reclutado junto con la subunidad catalítica de la cinasa dependiente de DNA (DNA-PK_{cs}) para unirse a cada uno de los extremos lesionados. Esta cinasa permite la formación del complejo sináptico entre cada una de las cadenas lesionadas para mantener a los extremos en la proximidad sin unirlos. Posteriormente, varias enzimas entre las que se encuentran nucleasas y polimerasas llegan al complejo para degradar o polimerizar los extremos no ligables, este es el paso en el que la reparación pierde fidelidad. Finalmente la ligasa IV/XRCC4 cataliza la religación de los extremos y finaliza la reparación (**Figura 2.2**) (Weterings & Chen, 2008).

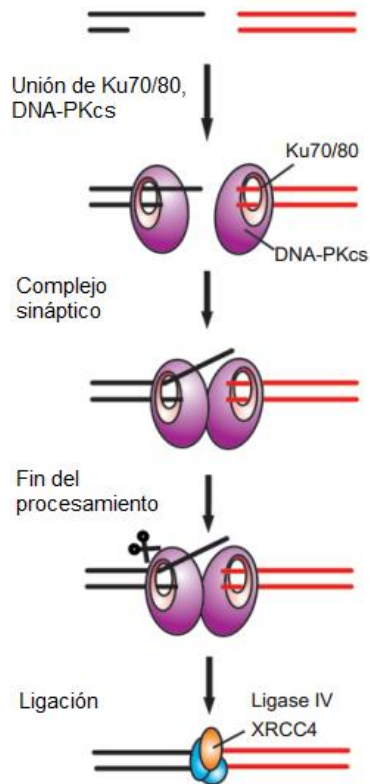


Figura 2.2. Mecanismo de reparación mediante unión de extremos no homólogos. El reconocimiento de DSB's se lleva a cabo por Ku 70/80 y DNA-PKcs que posteriormente forma el complejo sináptico, se terminan de procesar los extremos para finalmente unirse con la Ligasa IV y XRCC4 (Weterings & Chen, 2008).

2.3.2 Reparación de DSB's por recombinación homóloga

La reparación de DSB's por recombinación homóloga mantiene la integridad de la información genética durante la reparación. Este proceso se presenta principalmente en células que se dividen rápidamente y es particularmente importante en la fase S y G2 del ciclo celular, en el que las cromátidas están disponibles como molde para la reparación homóloga. En el reconocimiento de los extremos de DNA recién lesionados participa complejo MRN/X, el cual mantiene las cadenas lesionadas adyacentes e inicia la resección de las cadenas para generar extremos de cadena sencilla 3' OH (Huertas, 2010). A estos extremos cortados se une de inmediato RPA que posteriormente será reemplazada por Rad52, Rad51 y sus parálogos. Rad51 forma nucleofilamentos a lo largo de la cadena mediados por BRCA2 en humanos, los cuales serán encargados de la búsqueda de la homología

y la invasión de la cadena en la que extremos 3' OH serán utilizados para la re-síntesis de la cadena por la DNA polimerasa y proteínas asociadas formando cadenas entrecruzadas denominado estructuras de Holliday (Sung & Klein, 2006). La resolución de estas estructuras se lleva a cabo por resolvasas dejando como producto la cadena reparada con o sin intercambio de información (**Figura 1.10**) (Harper & Elledge, 2007; Scharer, 2003).

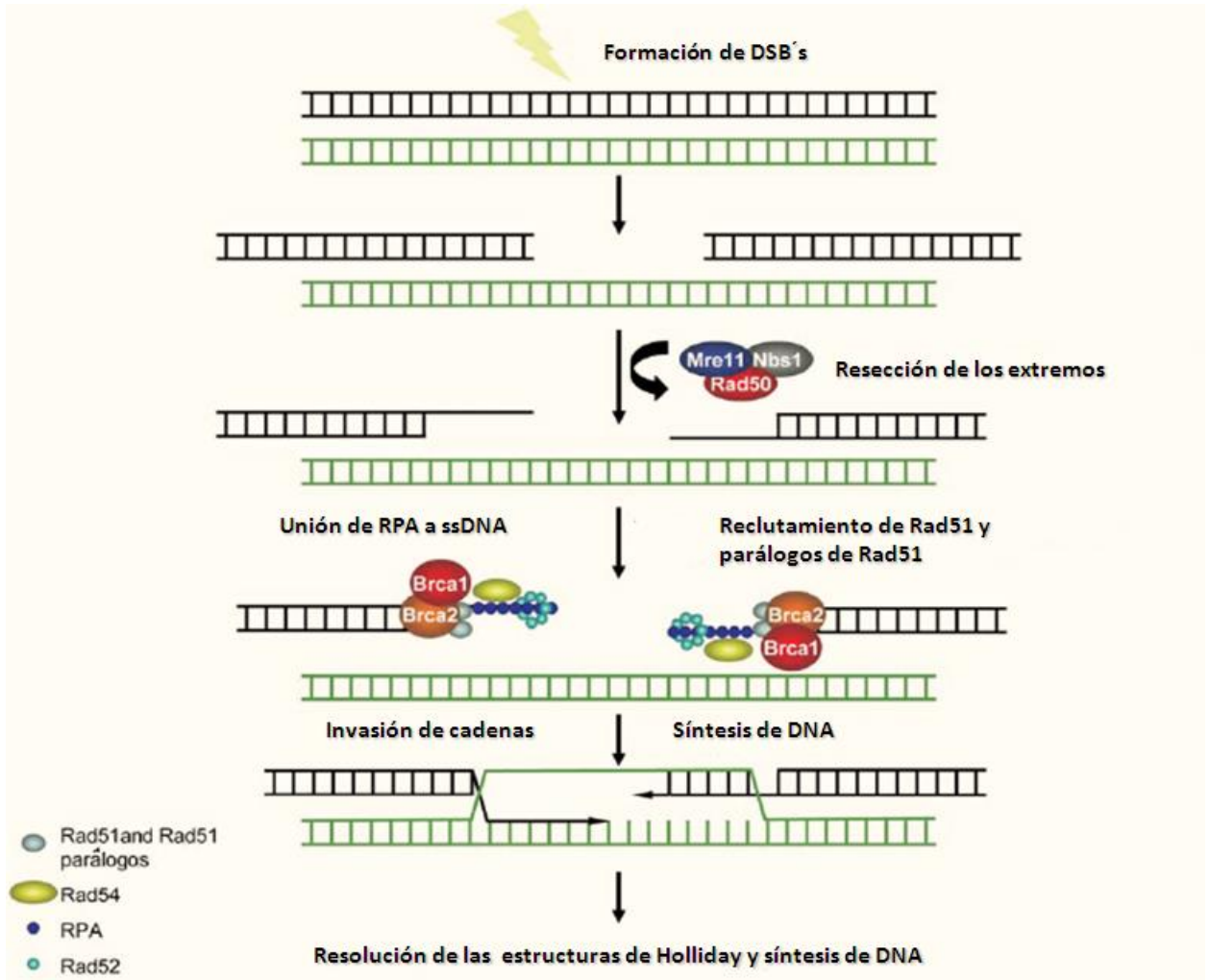


Figura 2.3. Mecanismo de reparación de DSB's por recombinación homóloga El complejo MRN reconoce los sitios de DSB, los mantiene adyacentes y los procesa para formar los extremos de ssDNA 3' OH a la que se une una RPA, esta es removida de forma coordinada por Rad52, por Rad51 y sus parálogos para iniciar la búsqueda de homología en la cromátida hermana e iniciar la resíntesis de las cadenas lesionadas (Lombard, Chua, Mostoslavsky, Franco, Gostissa & Alt, 2005).

2.4 El complejo MRN/X (Mre11/Rad50/NBS1/Xrs2)

El complejo MRN/X participa en casi todos procesos que involucran la generación de DSB's. Éste detecta, une los extremos lesionados y sirve como una plataforma de reclutamiento para la llegada de otras proteínas encargadas de continuar con la reparación de la ruptura, así mismo proporciona el andamiaje para atar ambos extremos dañados y mantenerlos próximos o bien con la cromátida hermana. El complejo también está involucrado en el procesamiento nucleolítico de los extremos además de participar en la señalización del daño al DNA (Assenmacher & Hopfner, 2004; Hopfner, Karcher, Craig, Woo, Carney & Tainer, 2001; Stracker & Petrini, 2011; van den Bosch, Bree & Lowndes, 2003). El complejo está formado por tres homodímeros de las proteínas: Mre11, Rad50 y Xrs2 en el caso de *S. cerevisiae* o NBS1 para *Homo sapiens* (**Figura 2.4**). El complejo básico está conformado sólo por Mre11 y Rad50 presentes en todos los organismos, mientras que Xrs2 o NBS1 sólo se han encontrado en eucariotas (Stracker, Morales, Couto, Hussein & Petrini, 2007; Stracker, Theunissen, Morales & Petrini, 2004). El complejo tiene la función de mantener las cadenas lesionadas unidas, ya sea entre cada uno de los extremos o bien con la cadena homóloga (**Figura 2.4**). Además éste procesa los extremos para formar las cadenas sencillas de DNA de extremos 3' protuberantes siempre y cuando se encuentren presentes los mediadores Sae2 en *S. cerevisiae* o de su homólogo CtIP en humanos. La fosforilación de estas últimas por cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) modula la actividad endonucleolítica del complejo e inician la resección del extremo 5' del DNA para comenzar la reparación por recombinación homóloga (Huertas & Jackson, 2009; Limbo, Chahwan, Yamada, de Bruin, Wittenberg & Russell, 2007).

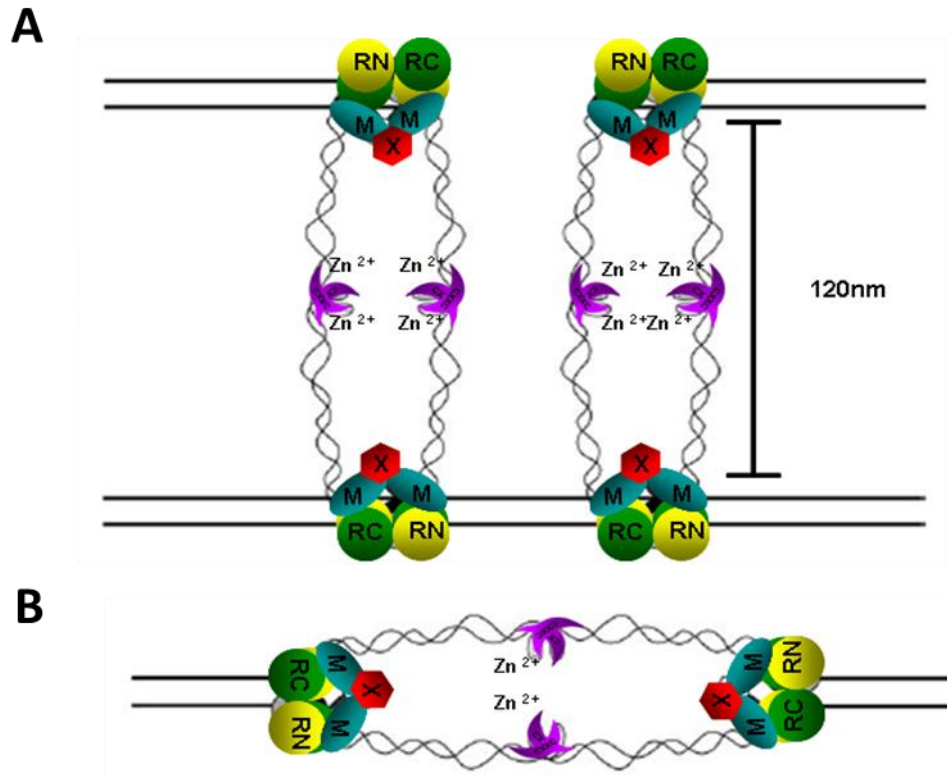


Figura 2.4. Modelo de la conformación espacial del complejo MRN/X. Un homodímero de cada una de las proteínas Mre11 (azul) y de Rad50 (C-terminal en verde y N-terminal en amarillo) se unen al DNA. Los ganchos de Zinc (púrpura) permiten la interacción de un par de complejos unidos a las cadenas de DNA. A) Conformación del complejo durante el inicio a la reparación por HR y B) durante NHEJ (Krogh & Symington, 2004)

El complejo también cumple funciones importantes en la señalización por daño al DNA y promueve el arresto del ciclo celular en respuesta a las DSB's mediante el reclutamiento y activación de la cinasa ATM (Borde & Cobb, 2009; Shibata, Moiani, Arvai, Perry, Harding, Genois, Maity, van Rossum-Fikkert, Kertokalio, Romoli, Ismail, Ismalaj, Petricci, Neale, Bristow, Masson, Wyman, Jeggo & Tainer, 2014). ATM activada fosforila diversos sustratos que promueven la señalización de los puntos de control del daño al DNA así como la acumulación de proteínas de reparación en los sitios de daño, entre ellas el mismo complejo MRN/X. La variante de histona H2AX es uno de los sustratos cuya fosforilación (γ H2AX) facilita la acumulación del complejo y el reclutamiento de más moléculas de ATM amplificando la señal del DSB's (Paull, 2015)

2.4.1 Mre11

Mre11 es la proteína central en el complejo MRN-X ya que interactúa con el resto de las proteínas del complejo (Rad51, NBS1-Xrs2) así como con el DNA (Assenmacher & Hopfner, 2004). En el extremo amino de la proteína se encuentran 6 *motifs* de fosfoesterasa altamente conservados (Krogh, Llorente, Lam & Symington, 2005) que conforman un dominio de nucleasa dependiente de Mn^{2+} que presenta actividades de exonucleasa 3'-5' de DNA de cadena doble y sencilla, y de endonucleasa en DNA de doble cadena. Mre11 solo procesa extremos de DNA romos o con extremos 3' resectados, no en DNA con extremos de cadena 3' protuberantes, por lo que la actividad de nucleasa es estructura específica (D'Amours & Jackson, 2002). Por otra parte, el extremo carboxilo contiene 2 dominios de unión a DNA (DBDA y DBDB) además de un sitio de unión a Rad50 (**Figura 2.5**) (Furuse, Nagase, Tsubouchi, Murakami-Murofushi, Shibata & Ohta, 1998; Williams, Williams & Tainer, 2007).

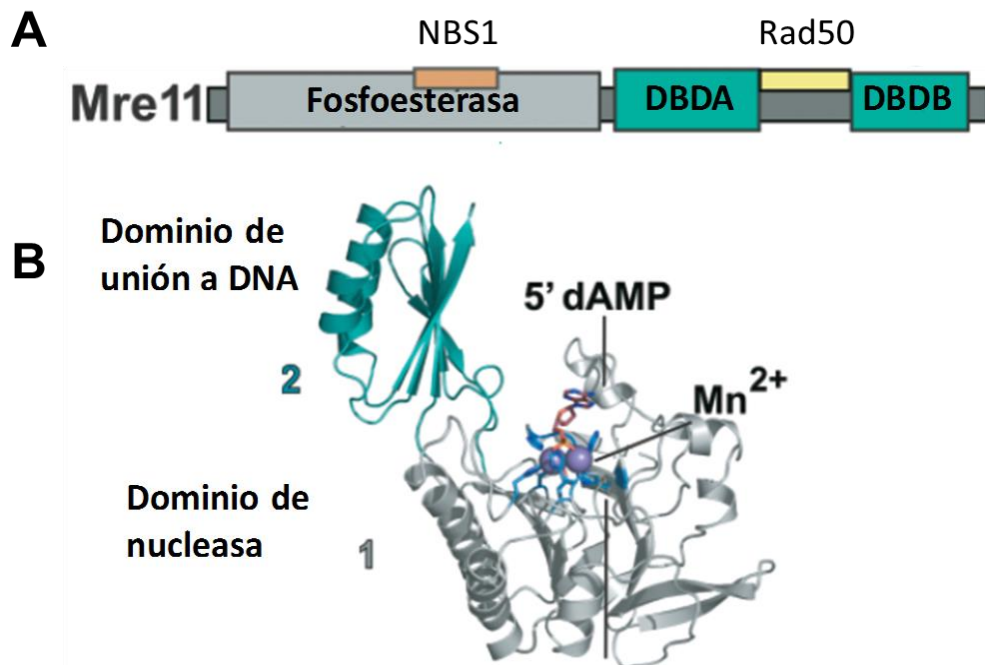


Figura 2.5. Representación esquemática de la proteína Mre11. A) Esquema de los dominios y *motifs* conservados y de los sitios de interacción con las otras proteínas del complejo. B) Estructura cristalográfica de la proteína homóloga a Mre11 de *Pyrococcus furiosus*. En verde se observa el extremo C-terminal que incluye los *motifs* de unión a DNA y el sitio de unión a Rad50, en gris se representa el extremo N-terminal que incluye los *motifs* de fosfoesterasa coordinados por Mn^{2+} . (Williams et al., 2007).

La actividad de nucleasa de Mre11 está modulada por varios factores: la presencia de Rad50 estimula la actividad de endonucleasa y de exonucleasa, mientras que la de Nsb1 en humanos estimula la actividad de endonucleasa (D'Amours & Jackson, 2002) .

2.4.2 Rad50

Rad50 pertenece a la familia de las proteínas de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC por sus siglas en inglés) (Strunnikov & Jessberger, 1999). En *S. cerevisiae* la proteína tiene un peso de 153 kDa y presenta en el dominio N-terminal un *motif* Walker A y en el extremo C-terminal un *motif* Walker B, separados por una región de 600-900 aminoácidos que forman un dominio α -hélice superenrollado (Aravind, Walker & Koonin, 1999).

Los *motifs* Walker A y Walker B forman un único dominio globular de unión a ATP del tipo ATPasa. Para que éste se forme, la porción central forma un dominio de α -hélice superenrollado con un *motif* intermedio CXXC a partir del cual cada uno de los extremos se enrollarán para formar una hélice superenrollada antiparalela. A partir del *motif* CXXC central, se puede dimerizar con otra proteína Rad50 mediante la formación de un gancho de Zinc (**Figura 2.6**) (Hopfner, Craig, Moncalian, Zinkel, Usui, Owen, Karcher, Henderson, Bodmer, McMurray, Carney, Petrini & Tainer, 2002; Hopfner et al., 2001; Hopfner, Karcher, Shin, Fairley, Tainer & Carney, 2000a). La actividad de ATPasa tiene implicaciones en la conformación estructural del complejo modulando las actividades de nucleasa y dirigiendo la resección para la recombinación homóloga o sólo la unión de los extremos (Deshpande, Williams, Limbo, Williams, Kuhnlein, Lee, Classen, Guenther, Russell, Tainer & Paull, 2014)

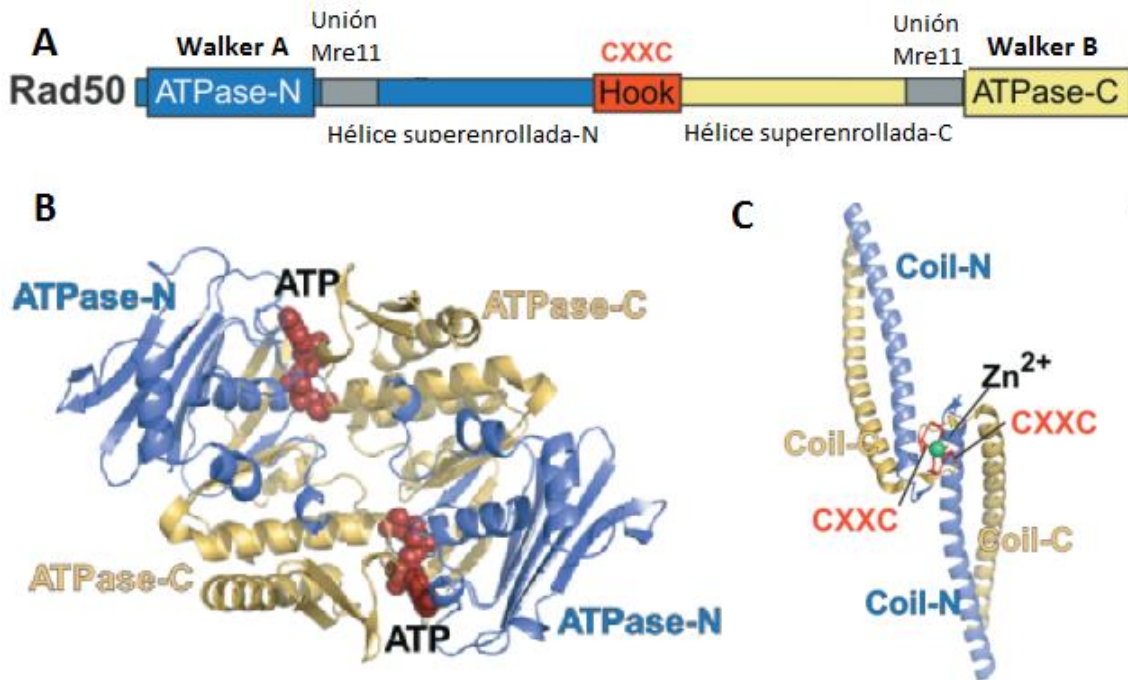


Figura 2.6. Representación esquemática de Rad50, basada en la estructura cristalizada de *P. furiosus*. A) Esquema de los *motifs* Walker A en el extremo N-terminal y Walker B en el extremo C-terminal entre una región central conformada por dominios de hélice superenrollada y el *motif* CXXC. B) Conformación sitio catalítico de ATPasa formado por los *motifs* Walker A en azul y Walker B en amarillo. C) Representación de la dimerización de Rad50 mediante el gancho de zinc acomplejada por el *motif* CXXC. (Williams et al., 2007).

2.4.2 NBS1/Xrs2

La región N-terminal de NBS1/Xrs2 consiste de los dominios: FHA (*Forkhead-Associated domain*) y dos dominios BRCT que median la unión de MRN/X a diferentes fosfoproteínas (Hari, Spycher, Jungmichel, Pavic & Stucki, 2010; Palmbo, Daley & Wilson, 2005). En la región C-terminal se encuentra el dominio de unión a Mre11 a la proteína Tel1 descrita para levaduras (Nakada, Matsumoto & Sugimoto, 2003; Shima, Suzuki & Shinohara, 2005) o para ATM de humano (**Figura 2.7**) (Falck, Coates & Jackson, 2005; You, Chahwan, Bailis, Hunter & Russell, 2005).

Nsb1/Xrs2 son sustrato de fosforilación en respuesta al daño al DNA por la familia de las ATM cinasas (D'Amours & Jackson, 2001; Lee & Paull, 2007; Paull, 2015), por lo que la función que tiene en el complejo es regulatoria mediando la

transducción de señales, además de la localización nuclear del complejo (Dudas & Chovanec, 2004; Kobayashi, Hayashi, Takata & Yamamoto, 2013).

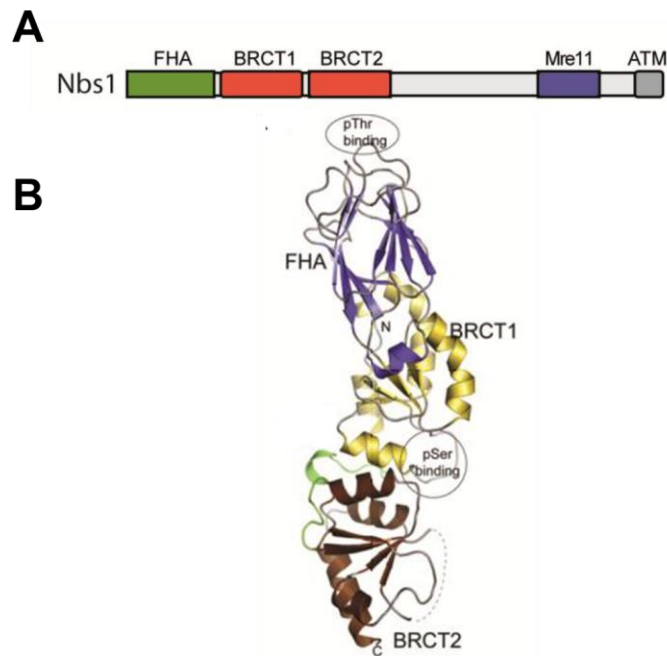


Figura 2.7. Representación esquemática de NBS1. A) Esquema del dominio de unión FHA, se indican en verde los dos dominios de unión a BRCT, en naranja en el extremo N-terminal. Los dominios de unión a Mre11 y ATM en morado y gris respectivamente en el extremo C-terminal. B) Conformación espacial del extremo N-terminal con los sitios de unión a aminoácidos fosforilados de los dominios FHA, BRCT1. (Williams, Dodson, Limbo, Yamada, Williams, Guenther, Classen, Glover, Iwasaki, Russell & Tainer, 2009).

3. Antecedentes

Diversos estudios sobre la viabilidad de *G. duodenalis* expuesta a agentes de daño como la radiación ultravioleta han comprobado su tolerancia a este agente, lo que indica la presencia de mecanismos activos de reparación de DNA (Campbell & Wallis, 2002; Shin, 2005).

La secuenciación de diversas regiones en distintas cepas y aislados de *G. duodenalis* han mostrado que existen variaciones genéticas intra e interespecífica, cuya distribución a lo largo de los diversos aislados sólo se puede explicar por mecanismos de intercambio genético (Lasek-Nesselquist, Welch, Thompson, Stuart & Sogin, 2009; Teodorovic et al., 2007). Un trabajo más exhaustivo en el

cual se secuenciaron regiones más extensas y de distintos cromosomas sugiere que el mecanismo de diversidad genética es la recombinación (Cooper, Adam, Worobey & Sterling, 2007).

La publicación del genoma completo de la cepa de *G. duodenalis* define una baja heterocigocidad entre los núcleos, que sólo puede explicarse mediante el intercambio de material genético entre ellos (Morrison et al., 2007). La evidencia de fusión de núcleos por interconexión nuclear y de transferencia de material genético en *Giardia* ha sido descrita por lo que se sugiere que éste sea un posible mecanismo para mantener una baja heterocigocidad (Jirakova, Kulda & Nohynkova, 2012; Poxleitner, Carpenter, Mancuso, Wang, Dawson & Cande, 2008)

La búsqueda *in silico* de genes que participan durante la meiosis encontró evidencias sobre la posible reproducción sexual del parásito *G. duodenalis* cuenta con genes homólogos a aquellos que participan en este proceso, como el caso de Rad51, Rad50 y Mre11, que participan también en la reparación DSB's. (Ramesh, Malik & Logsdon, 2005). Un reporte más reciente señala que genes de meiosis como Rad50, Spo1 y Hop1 se encuentran transcripcionalmente activos (Melo, Gomez, Castellanos, Alvarado, Hernandez, Gallego & Wasserman, 2008).

La evidencia sugiere que *Giardia* realiza procesos de recombinación y que debido a que existe poca información, éstos han sido considerados como raros, furtivos o crípticos (Birky, 2010; Xu, Jerlstrom-Hultqvist & Andersson, 2012). El estudio de este fenómeno en el parásito es relevante para su taxonomía y su epidemiología molecular (Caccio & Sprong, 2010), así como un indicativo del estatus evolutivo de la recombinación homóloga en un organismo minimalista y de divergencia temprana.

Una caracterización inicial sobre el complejo MRN/X mostró que existen dos copias del gen Mre11 codificadas en el parásito, ambas con dominios conservados de fosfoesterasa con una de ellas deficiente del dominio putativo de unión a DNA, mientras que la proteína putativa de Rad50 mantiene los dominios conservados de Walker A, Walker B y el *motif* de CXXC. La actividad *in vitro* de proteínas recombinantes de éstos genes fue parcialmente evaluada en condiciones

desnaturalizantes confirmando experimentalmente la identidad de ambas proteínas (Sandoval-Cabrera, 2009; Zarzosa-Alvarez, 2009).

4. Justificación

El complejo MRN/X participa en el procesamiento de la ruptura de la doble cadena del DNA durante su reparación o durante la recombinación. Considerando la importancia de estos procesos en la supervivencia, taxonomía y epidemiología del *G. duodenalis* se propone su caracterización

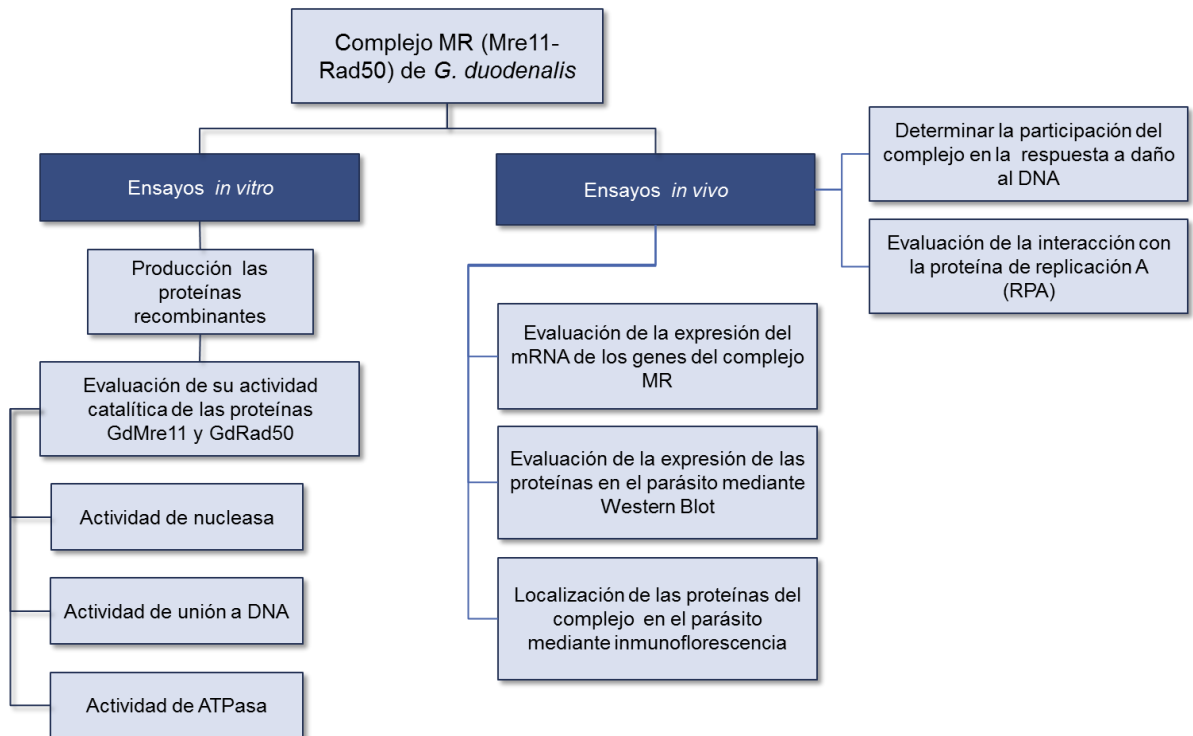
5. Objetivo general

Caracterizar la actividad del complejo MRN/X de *G. duodenalis*, evaluar su expresión y determinar su participación en el parásito durante el daño al DNA.

5.1 Objetivos particulares

- Obtener las proteínas recombinantes GdMre11 y GdRad50 de *G. duodenalis* en condiciones nativas.
- Evaluar la actividad *in vitro* de las proteínas GdMre11, GdRad50 y del complejo MRN/X de *G. duodenalis*.
- Evaluar la expresión del mRNA y de las proteínas del complejo MRN/X de *G. duodenalis*.
- Confirmar la participación del complejo MRN/X de *G. duodenalis* durante la reparación del DNA expuesto a agentes genotóxicos.

6. Esquema general de trabajo experimental



7. Material y métodos

7.1 Cultivo Celular

Los trofozoítos de *G. duodenalis* (cepa WB, ATCC 30957) se cultivaron a 37 °C en tubos cónicos de 50 ml con medio TYI-S-33 libre de bilis con 10% de suero fetal bovino, y antibióticos [Penicilina G (250 µg/ml), sulfato de estreptomina (250 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml)] (Keister, 1983).

7.2 Análisis bioinformático

Para encontrar las secuencias homólogas de las proteínas del complejo MRN (Mre11/Rad50/NBS1 o Xrs2) se usaron las secuencias de *S. cerevisiae* (Rad50 CAA65494.1; Mre11 BAA02017.1; Xrs2 AAA35220.1) y la secuencia de *H. sapiens* (NBS1 O60934.1) en la base de datos del genoma de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb/>) mediante la herramienta BLAST con los siguientes parámetros: Valor esperado=10 y baja complejidad. Las secuencias seleccionadas fueron aquellas con la menor [P(N)] (*Smallest Sum Probability*) y aquellas que mantuvieron los dominios característicos para cada proteína.

El análisis comparativo de los dominios estructurales y de inferencia filogenética se realizó con las secuencias de proteínas de otros organismos que han sido caracterizadas: (Mre11: Q8U1N9.2, AAC78721.1, P_505736.2, AAD33591.1, BAA02017.1, AED96476.1, AAL78283.1, ABC61985.1; y para Rad50: Q9UZC8, AAB07119.1, CAA99730.1, Q9W252.4, CAA65494.1, AEC08614.1, EAN79783.1, ABC61989.1 del Genbank). Además se utilizaron secuencias pertenecientes al resto de los ensamblajes secuenciados de *Giardia* [para Rad50: ensamble A2 aislado DH (Gene ID: DHA2_150638), ensamble B aislado GS_B (Gene ID: GL50581_2626) y ensamble E (Gene ID: GLP15_1993), para Mre11: ensamble A2 (DHA2_152503), ensamble B aislado GS_B (Gene ID: GSB_153065) y ensamble E (Gene ID: GLP15_1114) mientras que para Mre11S: ensamble A2 (Gene ID: DHA2_151421), ensamble E (Gene ID: GLP15_1387) y ensamble B aislado GS_B (Gene ID: GSB_153514)]. Estas secuencias fueron alineadas mediante el software

Seaview (Gouy, Guindon & Gascuel, 2010). La representación esquemática de los *motifs* estructurales encontrados se obtuvo mediante el programa disponible en línea ESPript y su identidad y similitud se estimó con Matgat software (Campanella, Bitincka & Smalley, 2003). La historia evolutiva de éstas fue inferida con la ayuda de MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar, 2013) mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de sustitución aminoacídica (Le & Gascuel, 2008). El árbol consenso inferido se realizó en base a 1000 réplicas mediante bootstrap. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo mediante la aplicación del método Neighbor-Joining a una matriz de distancias por parejas estimadas mediante un modelo de JTT. Una distribución Gamma discreta se utilizó para las diferentes tasas evolutivas a lo largo de la secuencia [5 categorías (+G, parámetro)]. (Robert & Gouet, 2014) y su identidad y similitud se estimó con Matgat software (Campanella et al., 2003).

El dominio estructural de hélice superenrollada (Coiled-Coil) fue estimado con la utilidad en línea [Pôle BioInformatique Lyonnais Network Protein Sequence Analysis (http://npsa-devel.ibcp.fr/NPSA/npsa_lupas.html)] desarrollado en base al algoritmo propuesto por (Lupas, Van Dyke & Stock, 1991).

La estimación de la estructura terciaria de las proteínas del complejo MR (Mre11-Rad50) se realizó con el servicio en línea I-TASSER (Zhang, 2013) con el uso de las secuencias aminoacídicas para GdMre11S (GL50803_14493), GdMre11 N-terminal [GL50803_27735 (residuos 1-281)] y GdRad50 (GL50803_17495) Walker A (residuos 1-205) y Walker B (residuos 1275-1387). Las estructuras con el mayor C-score se seleccionaron y editaron con PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 (Schrödinger, 2002).

La búsqueda de señales de localización nuclear NLS se llevó a cabo con la herramienta bioinformática en línea http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi (Kosugi, Hasebe, Tomita & Yanagawa, 2009), con el uso de las secuencias completas de GdMre11 (GL50803_14493) y GdRad50 (GL50803_17495)

7.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las secuencias codificantes de las proteínas del complejo (GdMre11, GdMre11S y GdRad50) fueron clonadas en los plásmidos de expresión heteróloga bacteriana pProex-OP-GdMre11L, pProex-OP-GdMre11S y pProex-OP-GdRad50 (Sandoval-Cabrera, 2009; Zarzosa-Alvarez, 2009). Estos fueron empleados para transformar células competentes de *Escherichia coli* BL21-C41 (Miroux & Walker, 1996). La inducción de las proteínas recombinantes se inició en 500 ml de medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina crecido a 37°C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 OD a 600 nm. Para inducir la producción de proteínas recombinantes se agregó Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a cada matraz a una concentración final de 0.5 mM para pProex-OP-GdRad50 o 1 mM para pProex-OP-GdMre11L, pProex-OP-GdMre11S y se incubaron a 25°C por 4 horas. La masa celular se colectó mediante centrifugación por 10 min a 800 x g y se resuspendió en 100 ml de solución de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.25% Triton X-100, 15 mM 2-Mercaptoetanol, 5% glicerol y lisozima 20 µg/ml) posteriormente, se incubó por 20 min a 4°C y se lisó mediante 6 pulsos de sonicación al 85% de 10 s con reposo de 10 s cada uno. El lisado se centrifugó 20 min a 10,000 x g y el sobrenadante se recuperó y se pasó por una columna de perlas de Ni-agarosa (Invitrogen, USA). La columna se lavó con 50 ml de solución de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.25% Triton X-100), con 50 ml de solución de lisis más 30 mM de imidazol, con 50 ml de solución de lisis más 50 mM de imidazol y finalmente se eluyó en diferentes fracciones con solución de lisis más 250 mM de imidazol. Las fracciones que contuvieron las proteínas purificadas fueron diluidas en solución de diálisis (30 Mm Tris-HCl pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM Ditiotretitol (DTT) y 5% de glicerol), finalmente las proteínas se concentraron mediante el sistema a Microcon® (Millipore, USA) y cuantificaron mediante el método de Bradford.

7.4 Actividad de nucleasa

Para establecer la actividad de nucleasa y requerimientos catiónicos de las nucleasas rGdMre11 y rGdMre11S, éstas se agregaron a una concentración final de 400 nM a 150 ng de un fragmento de DNA de doble cadena (dsDNA) en una mezcla de reacción [(30 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM KCl, 50 µg/ml de Albúmina Sérica Humana (BSA), 5 mM MgCl₂ o MnCl₂) e incubaron durante 0, 60, 120 y 180 min a 37°C. Cada reacción fue detenida añadiendo 1/10 volumen de SDS 3% y proteasa K a una concentración final de 0.1 mg/ml y extendiendo su incubación por 10 min más. La actividad de nucleasa fue revelada mediante electroforesis en 1.5% de agarosa. Para determinar la polaridad de nucleasa de las proteínas rGdMre11 y rGdMre11S por sí mismas o en complejo, 2 pmol de un fragmento de 110 pb fue defosforilado con fosfatasa alcalina intestinal bovina y posteriormente marcado radioactivamente mediante la incorporación de un grupo fosfato en el extremo 5' realizada por la polinucleótido cinasa del bacteriófago T4 y utilizando como donador 925 KBq, ~3.3 µM, 111TBq/mmol de γ-[³²P]-ATP en una solución de reacción con 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 80 mM NaCl, 1 mM DTT, 3% glicerol, 5 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml BSA y 5 mM EDTA durante 1 h a 37°C. Los nucleótidos no incorporados fueron removidos con la columna Illustra™ ProbeQuant™ G-50 (GE Healthcare, UK). La sonda marcada fue incubada con las proteínas recombinantes GdMre11, GdMre11S con y sin rGdRad50 a una concentración de 400 nM cada una en una mezcla de reacción 30 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM KCl, 50 µg/ml de BSA, 5 mM MnCl₂ y 1 mM de DTT. La reacción se incubó a 37° y se tomaron alícuotas. Cada alícuota fue inactivada como se describió anteriormente. Los productos de reacción se visualizaron por electroforesis en gel desnaturalizante (7M urea, 15% de poliacrilamida), fijados y visualizados mediante Typhoon Phosphoimager®.

7.5 Ensayos de ATPasa

La actividad de hidrólisis del adenosín trifosfato (ATPasa) se evaluó con una concentración final de 400 nM de rGdRad50 o de los complejos: rGdRad50/rGdMre11 o rGdRad50/rGdMre11 en una mezcla de reacción (30 mM

Tris-HCl, pH 7.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 ug/ml BSA) con 74 KBq, ~3.3 μM, 111TBq/mmol de γ-[³²P]-ATP como sustrato. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas de la reacción a diferentes tiempos (0, 60, 120, 180 min) para su posterior inactivación con SDS al 1% y EDTA a 10 mM. La catálisis de ATP [γ-³²P] se manifestó mediante cromatografía de capa fina usando como fase estacionaria placas de celulosa polietilamina (PEI) y desarrollada en 1 M ácido fórmico 0.5 M LiCl. Al término de su secado fueron se visualizaron con el sistema Typhoon Phosphoimager ®.

7.6 Ensayo de retardamiento de DNA

Concentraciones crecientes de proteínas recombinantes (0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 μM) fueron mezcladas con 1 nmol de un fragmento de 60 nucleótidos de DNA de cadena sencilla (ssDNA) previamente marcado radioactivamente en el extremo 5' en con las condiciones previamente descritas en el apartado 7.4. Las distintas mezclas fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. Para visualizar la interacción DNA-proteína estas fueron corridas en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 6 %, el gel fue secado y visualizado con el sistema Typhoon Phosphoimager ®.

7.7 Análisis de expresión de mRNA.

Diez millones de trofozoítos de *G. duodenalis* en cultivo confluyente sin irradiar e irradiados a 100 Gy con una fuente radioactiva de ⁶⁰Co (Puritec Irradiation Technologies Ltd., Oxon, UK del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM), fueron colectados por centrifugación a 1000 x g 10 min en tubos de 1.5 ml a los diversos tiempos post irradiación (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4h) y lavados con PBS (37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, y 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). La extracción de RNA se realizó con TRIzol® (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente el RNA obtenido se trató con DNAsa (Thermo Fisher Scientific, USA) y la síntesis de cDNA se realizó con la transcriptasa reversa SuperScript® III (Invitrogen, USA). La cuantificación relativa del RNA mensajero del

complejo MR (Mre11-Rad50) se realizó con 100 ng de cDNA con el kit ABsolute qPCR SYBR Green® (Thermo Fisher Scientific, USA), con los oligonucleótidos específicos para cada gen (*Gdmre11S_Fw_RT* 5'-GTA CAT AGG GCA CGA GCA CGA-3', *Gdmre11S_Rv_RT* 5'-GCA GAG ACA GCA AGT ATA AGT CGG-3'; *Gdmre11L_Fw_RT* 5'-GCA GTG ATC TTC CTG AGA CAA CC-3', *Gdmre11L_Rv_RT* 5'-ACC ATA CAC CCA TCA TCT TGC TG-3'; *Gdrad50_Fw_RT* 5'-GGT TGT TGT CAT CAC GCA CAG TC-3', *Gdrad50_Rv_RT* 5'-GTC AGG TCG TCA TCC AAT CCC-3') y normalizado con el gen de ubiquitina (*Ubi_Fw* 5'-GAG CTC ATG CAG ATC TTC GTC AA-3', *Ubi_Rv* 5'-CCT TCT GGA TGG AGT AGT-3') (Gallego, Alvarado & Wasserman, 2007). La detección de la amplificación fue detectada con el sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR y los datos obtenidos fueron analizados para determinar la cuantificación relativa del mRNA mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

7.8 Marcaje endógeno de las proteínas del complejo MR

Para realizar la adición endógena de una etiqueta triple del epítipo de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza (YPYDVPDYA) en el extremo carboxilo de las proteínas del complejo MR se utilizó el protocolo establecido por Guerguechon & Cande, 2011. Este consistió en la amplificación de los extremos 3' de los genes *Gdmre11* y *Gdrad50* con los oligonucleótidos (*Gdmre11_Fw_XmaI* 5'-CCCGGG CTG AGG AGC AAG G-3', *Gdmre11L_Rv_XhoI* 5'-CTCGAG TGC ACT TAT GGT AAG GTC-3'; *Gdrad50_Fw_XmaI* 5'-CCGGGC TCA CCA ACA AGT GCC-3', *Gdrad50_Rv_XhoI* 5'-CTCGAG GTA GGT CAG GTC GTC ATC-3'). Debido a la alta homología del gen *Gdmre11s* con el extremo 5' del gen *Gdmre11*, se realizó la amplificación completa del gen *Gdmre11s* y de 650 pb río abajo con los oligonucleótidos (*Gdmre11S_Fw_XmaI_5UTR* 5'-CCCGGG TGC GAT GTT ACG TG-3' y *Gdmre11S_Rv_XhoI* 5'-CTCGAG TAG AGG CAG AGA CAG C-3'). Los amplicones se clonaron en el vector de pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, USA) y fueron restringidos con las enzimas XmaI y XhoI para finalmente subclonarlos en el plásmido pcAUK-3HA-NEO que previamente fue digerido con las mismas enzimas

para remover el gen de la Aurora Cinasa 3' (Gourguechon & Cande, 2011). Los plásmidos generados pcGdMre11-3HA-NEO, pcGdMre11S-3HA-NEO y pcGdRad50-3HA-NEO (Anexos 1,2 y 3) fueron linearizados con las enzimas de restricción NheI, BsgI y NdeI respectivamente. 20 ug de cada uno de los plásmidos linearizados se agregaron a 10 millones de trofozoítos en 300 µl de medio TYI-S-33, la mezcla se colocó en una cubeta 20 mm Gene Pulser® (Biorad, USA) y durante 10 min se incubó en hielo, a continuación se incidió un pulso (350 V, 1000 µF y 700 Ω) y se incubó de nuevo en hielo durante 15 min. Finalmente, el cultivo fue trasladado a un tubo cónico con 15 ml de medio TYI-S-33 que se incubó a 37°C. A las 24 hrs las células no adheridas fueron removidas decantando el medio y el tubo fue relleno con nuevo medio conteniendo 200 µg/ml de Geneticina (G418). La selección continuó por 9 días con cambios frescos de medio cada 2 días sólo manteniendo células adheridas. Para obtener clonas únicas se realizó subcultivo por dilución limitante en placas de 96 pozos. La corroboración de las clonas transgénicas se realizó por *Western-blot* contra el antígeno HA y mediante PCR genómico con los siguientes oligonucleótidos: para *Gdrad50* (Fw_2 5'-AGA TAG GGT TCG CTT ACA ATT TGC-3' y 50_Rv_3UTR 5'-ATC CTG CCA CCA TGA AAT AGA G-3'), para *Gdmre11* (Fw_1310 5'-ATC CTT CTT TCC TAA ATG TCC-3', F3 5'-ATG CTT ACA GCA AGA TGA TGG-3' y L_Rv_3UTR 5'-ATG TCT AAA GGT GTA AAG CGT G-3') y para *Gdmre11S* (F2-CAT ATG TCT GCA GAC AGC TCG G-3' y S_Rv_3UTR 5'-GATTCAGACCCATAGCAACG-3'), y utilizando como oligonucleótido reverso Rv_NEO 5'-ATG CAA AGA ATT CGA TTC AGG-3' el cual encuentra solo su secuencia río arriba de la inserción del 3HA perteneciente al plásmido.

7.9 Inmunodetección en fase sólida (*Western-Blot*)

Cultivos confluentes de 10^7 de trofozoítos de *G. duodenalis* cepa WB o de las células transgénicas no irradiadas o irradiadas (100 Gy) fueron colectados por centrifugación a 1000 x g 10 min y lavadas dos veces con PBS y resuspendidos en solución RIPA (50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1%

deoxicolato de sodio) y con el coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche® Protease Inhibitor Cocktail). Las células fueron incubadas en hielo durante 15 min y posteriormente centrifugadas 15 min a 14,000 x g 4°C para obtener el extracto proteico. 100 µg de este extracto fue desnaturalizado en solución Laemmli (0.1% 2-mercaptoetanol, 0.0005% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2% duodecil sulfato de sodio (SDS), 63 mM Tris-HCl pH 6.8) durante 5 min a 95 °C. Posteriormente las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar la correcta transferencia de proteínas y lavadas con solución TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20). Para bloquear la membrana se incubó en TBST más leche descremada en polvo al 5% durante 1h. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en TBST más leche descremada en polvo al 1% durante toda la noche utilizando la dilución para anti-HA producido en ratón (Sigma-Aldrich, USA) de 1:2000, para el Anti-fosfo-Histona H2A.X (Ser139) producido en ratón (Millipore, USA) de 1:5000, mientras que para el anticuerpo producido en ratón de anti-tubulina una dilución 1:20000 en TBST pero con incubación sólo de 1 h. Las membranas fueron lavadas tres veces por 5 min cada una con TBST antes de ser incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Millipore, USA) 1:30000 o 1:5000. Para el anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Promega, USA) en TBST 1% leche descremada en polvo. Después de lavar las membranas 3 veces durante 5 min cada una en agitación, las proteínas inmunoreactivas fueron reveladas con el kit para quimioluminiscencia Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, USA). El análisis densitométrico se realizó con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

7.10 Inmunofluorescencia

Se colocaron cubreobjetos 10 mm x 10 mm en placas de cultivo de 6 pozos. Los pozos se llenaron con 3 ml de un cultivo confluyente de trofozoitos de *G. duodenalis* (1×10^6) irradiados o no irradiados con radiación gama (100 Gy) e incubados durante

30 min a 37°C para favorecer su adhesión. El medio de cultivo fue removido y lavado con 3 ml de PBS dos veces, posteriormente fueron fijados y permeabilizados con metanol: acetona 1:1 a -20 °C durante 15 min y secados al aire. Después de rehidratarse con PBS, los cubreobjetos se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) al 5% en PBS durante 1 h a 37°C, posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 1:200 en PBS SFB 5% durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS de 5 min cada uno, los cubreobjetos se incubaron en 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 µg/ml durante 15 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con PBS y finalmente montados sobre portaobjetos con el medio de montaje VECTASHIELD®. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Germany).

7.11 Interacción de Mre11 con GdRPA

Se obtuvieron extractos celulares a partir de 1×10^7 trofozoitos transgénicos de *G. duodenalis* (GdMre11-3HA), mediante lisis con solución RIPA como se estableció previamente. La proteína GdMre11 etiquetada con 3HA fue inmovilizada en la columna provista en el kit Pierce® HA tag IP/Co-IP, de acuerdo con las recomendaciones de fabricante. Antes de ser eluida, se incubó durante 2 hr a 4°C con 1 mg de extracto celular de *E. coli* transformada con el plásmido pET100/D-TOPO-rGdRPA70 (Martínez-Reyes, 2013) el cuál codifica para la proteína RPA70 recombinante de *G. duodenalis* etiquetada con 6-His y previamente inducida con IPTG. Después de 3 lavados con TBS-Twen 0.05% los complejos conjugados fueron eluidos con solución Laemmli. Por otro lado, 1 mg de extracto de *E. coli* pET100/D-TOPO-rGdRPA70, fueron utilizados para inmovilizar la proteína GdRPA a una columna de Ni-agarosa, posteriormente se agregó extracto de proteína proveniente de 1×10^7 trofozoitos transgénicos de *G. duodenalis* (GdMre11-3HA) e incubados 2 h a 4°C. Después de ser lavados 3 veces con 500 µL de TBS-Tween 0.05%, los complejos fueron eluidos con solución Laemmli. En un experimento paralelo, previo a la incubación los extractos se trataron con 50 unidades de DNAsa

I durante 1 h a 25°C para descartar que la unión estuviese mediada por mutua interacción a DNA. Los complejos eluidos fueron separados por SDS-PAGE y analizados por *Western-blot* para verificar la interacción.

7.12 Ensayo de inhibición con Mirina

Cultivos confluentes de *G. duodenalis* (2×10^7) se incubaron durante 1 h a diferentes concentraciones de Mirina (Sigma-Aldrich, USA), solubilizada en DMSO (20 mg/ml). Los cultivos se irradiaron (100 Gy) como se describió anteriormente e incubaron a 37°C durante 2 horas con concentraciones crecientes de Mirina. Se obtuvieron extractos con solución RIPA y se determinó la fosforilación de la histona GdH2A por *Western-blot* como se describió anteriormente.

8. Resultados

8.1 Identificación del complejo MR en *G. duodenalis*

Los resultados que se obtuvieron en la búsqueda de genes homólogos para el complejo MRN/X (Mre11, Rad50 y Xrs2/NBS1) fueron satisfactorios sólo para Mre11 y Rad50, por lo que se designó al complejo sólo como MR y para este trabajo sólo se estudiaron aquellas reportadas para el ensamble A cepa WB. Las posibles secuencias homólogas para Xrs2 o NBS1 obtenidas en con durante la búsqueda con la herramienta BLAST permitieron obtener resultados con altos índices de [P(N)] (>0.013 y >0.18, respectivamente) sin ningún reconocimiento de los dominios característicos como el de cabeza de tenedor (FHA) o el C-terminal de BRCA1 (BRCT) para estas proteínas (Zhao, Renthal & Lee, 2002).

La búsqueda para el gen homólogo de Mre11 permitió obtener dos secuencias codificantes, la primera de ellas denominada en este trabajo como GdMre11 anotada como GL50803_27735, localizada en el cromosoma GLCHR03 487,499-489,952(-), contig AACB02000024; 39574-42027 (-) que codifica para una proteína de 817 aa. Por otro lado se identificó un CDS de menor tamaño denominado en este trabajo GdMre11S que codifica para una proteína de tan sólo 274 aa. GdMre11S alinea con una identidad del 91.3% y similitud de 93.8% al extremo amino de la proteína GdMre11 y carece del dominio C-terminal donde residen los dominios de unión a DNA por lo que asemeja a una proteína duplicada y truncada (**Figura 8.1**). Ambas proteínas exhiben el dominio amino característico de las proteínas Mre11, en este se detectaron los seis *motifs* de fosfoesterasa altamente conservados (**Figura 8.2A**). Para el resto de la secuencia aminoacídica de GdMre11, el dominio carboxilo es sumamente divergente y no presenta homología con ninguna otra secuencia estudiada (**Figura 8.1**).


```

                                                                1      10
G_duodenalis_MRE11S .....MSADSSGARRIAT
G_duodenalis_MRE11 .....MSADSSGARRIAL
P_furiosus .....MKFAH
H_sapiens .....MSTADALDDENTF
C_elegans MCGSDDSFDDFVPDSQEPASSRTRNRQDHLDDDEVPCSQRPDAANDTMVDELDEGDEPAHDESEDIKILV
D_melanogaster .....MNGTTAEQDADNVIRILV
S_cerevisiae .....MDYPPDTIRILI
A_thaliana .....MSREDFSDTLRVLV
T_brucei .....MGSRVTVLHIMAERASTQSHALPTSTQADPSLASTFKFLV
T_vaginalis .....MGESQQDTFKIAI

```

```

                20      30      40      50      60      70      80
G_duodenalis_MRE11S FTDTHGFTAPSARPCNAHENYLLEECLCLA.RKLGAHAILHAGDFFNONRLSSKKVIKAICALRRYGV
G_duodenalis_MRE11 FTDTHGFTAPSARPCNAHENYLLEECLCLA.RKLGAHAILHAGDFFNONRLSSKKVIKAICALRRYGV
P_furiosus LADIHGYEQFHK.POREEFAEAFKNALEIA.VOENVDFILINGDLFHSRPSPGTLKKAIALLO...
H_sapiens ATDIHGFMEKDA..ARGNDTFVTLDEILRA..QENEVDFILLGDLFHENKPSRKTLHTCLELLRKYCM
C_elegans ATDIHGYGENKA..NIHMDAVNTFEVLOJA..TEQKVDMILLGDLFHENNPSREVQHRVTQLLRQYCL
D_melanogaster ATDNHLGYGEKDA..VRGEDSFTAFEEILELA..VSEDVDMILLGDLFHAVPSQNALHKCELLRRYTF
S_cerevisiae TTDNHVGYNENDP..ITGDSDWKTFHEVMMLA..KNNNVDMVVQSGDLFHVNKPSKKSLYQVKTLRLCCM
A_thaliana ATDCHGYMEKDE..IRRHDSFKAFEEICSIA..EEKVDFLLLGDLFHENKPSRTTLVKAIEILRRHCL
T_brucei TSDNHGYQERDS..RRGDSFTFEECLRARVEHVDAILLGDFFHDNKPSLGLLARTSLLRSVL
T_vaginalis FTDTHGYDEQDA..ITEKDSFRAKEECVONA..HIQNADILLHAGDFFHDNRNPSRYAVIKTMKILDEFVI
          ▲▲▲▲▲                               ▲▲▲▲

```

```

                90      100      110      120
G_duodenalis_MRE11S S.....SFAGHSDGDSIPMALIMGNHD.....NNDKILGLLEAAGAVSLLG
G_duodenalis_MRE11 S.....SFADHSDGDSIPMALIMGNHD.....NNDKILGLLEAAGAVSLLG
P_furiosus .....IPKEHSIPVFAIEGNHDRTQR.GPSVLNLLEDFGLVYIG
H_sapiens GDRPVQFEILSDQSVNFGSKFPWYQDGNLNISIPVFSIHGNHDDPTGADALCALDILSCAGFVNHFG
C_elegans NGNPIALEFLSDASVNFGSVFGHVNYDQNLNVGLPFTIHGNHDLSG..KGLTALDLLHESGLVNHFG
D_melanogaster GDRPVSLEILSDQGCFHNAVNYEDPNLNIAIPVFSIHGNHDDPSGFGRLSLDLLSTSGLVNYFG
S_cerevisiae GDKPCELLLSDPSQVFHYEDFTNSVNYEDPNFNISIPVFGISGNHDSAGSDSLLCPMISILHATGLINHFG
A_thaliana NDKPVQFQVVSDQTVNFQAFGQ.VNYEDPHFNVGLPVFSIHGNHDDPAGVDNLSAIDILSACNLVNHFG
T_brucei GDKPISFTLLSDPKRNFTHPVPLANFQDPNINVALPIFMIHGNHDDPVG.GTSSIDILSTAGLVNHFG
T_vaginalis GQG.....NPPEILYEGLSSDPNLNPNINIKHFECMHGNHDAPNGLGSTSPIQLLSVSKYLNFEK
          ▲▲▲▲

```

```

                130      140      150      160      170      180
G_duodenalis_MRE11S ...HTQAGKSLTLHPFCRVVGVELVVYGLDYHKAWQRDVAPEISFAPAARSALKDEAVGRGAKGG...
G_duodenalis_MRE11 ...HTQAGKSLTLHPLCQVVGVELVVYGLDYHKAWQRDVAPEISFAPAARSALEDEAVGRGAKGG...
P_furiosus ...MRKEKVENEYLTSERLGNGEYLVKGWYKDLEIHGMKYMSSAWFEANKEILKRLFRPTDN...
H_sapiens ...RSMSVEKIDISPVLLQKGSTRIALYGGS..IPDERLRYRMFVNKKVTMLRPKEDEN...
C_elegans ...KHSNIQEFIVSPILLRKGETRLALYGGS..QRDDRLVRAFKNNSISFLRPNAGE....
D_melanogaster ...RWTDLTQVEISPVLMRKGESQLALYGLS..IHDGRLARLIKDFKVKFNCPVNAGEDGNESK
S_cerevisiae ...KVIESDKIKVVPLLFQKGSTRLALYGLAA...VRDERLERTFKDGGVTFEVTMREG...
A_thaliana KMVLGGSGVGQITLPILMKKGSTRLALYGLGN...IRDERLNRMFQTPHAVQMRPEVQEGDVS...
T_brucei ...HTSSLDDIVVEPVLLKKGDTRIALYGLGN...VRDDRLRHCFRMKKLHFVQPKEPGK...
T_vaginalis ...PVDIKETIELOPIVLKRGTIRVVVYGLGY...IFEEKFKEVVMGKLKLIAPEEGEFER...
          ▲▲

```

```

                190      200      210      220      230      240
G_duodenalis_MRE11S RRHARYTFLVLHQDYSDQVRDKISLSFVDQWNHTHAPEERIDEFVYIGHBHDETPPR.....DGETF
G_duodenalis_MRE11 RRHARYTFLVLHQDYSDQVRDKISLSFVDQWNHTHAPEERIDEFVYIGHBHDETPPR.....DGETF
P_furiosus ...AILMLHQGVREVSEAR..GEDYFEIGLGDLPEGYLYALGHIHKRYETS.....YSGS
H_sapiens ...SWFNLFVIHQNRSK..HGSTNFIPEQFLDDFIDLVIGHBHECKIAP.....TKNEQQLF
C_elegans ...DWFNLFVLHQNRPRAMH.....RSTGNFLPESLIPQFDLLIVIGHBHECKPDPQYVASEAVGDGF
D_melanogaster EEEDWFHLLVVHQNRAD..RGPKNYLPEDLLPSFLHLVIVIGHBHDCRIEP.....EENAKKF
S_cerevisiae ...EWFNLMCVHQNHTG..HTNTAFLPEQFLPDFLDMVIVIGHBHECIPNL.....VHNPIKNF
A_thaliana ...DWFNILVLHQNRVK..SNPKNAISEHFLPRFLDFIVIVIGHBHEQLIDP..QEVSGMGF
T_brucei ...DWFKILLHQNRGVRSGG.....NMKCGIYETMLAGHGMDLVIVIGHBHEQQMEP.....SPSEGF
T_vaginalis ...TYTILMHQNMSSYDHDIGVMATRLSDAIWSETNPHNVDLVIVIGHBHENLIQR.....KKYGNI
          ▲▲

```

```

                250      260      270
G_duodenalis_MRE11S TLLMPGSPHRQSRKRSLP.....DLYLLSLPL.....
G_duodenalis_MRE11 TLLMPGSPHRQSRKGNLLNVRQEDRNFYLLPLQRKCLDSPLRYCHLNRYNLLSGSFYHIGAKSIDIV...
P_furiosus PVVYPGSLERWDFGDYEVR..YEDGIKFKERYGVNKGFIVEDFKPR...
H_sapiens YISQPGSSVVTSLSPGEA.....VKHVGLLRIK..GRKNMHKIPLTVRQFMEDIVLANHPDI...
C_elegans YILQPGSTVATSLTPEEA.....LQKNAFLIKIK.....GRKFASKPIPLQTVRPMVCDELLDKIPPG
D_melanogaster YVSQPGSSVPTSLSEGEA.....KKHVGLEIY.....KGKFLKLPLETVRFVYESVVLADHADE
S_cerevisiae DVLQPGSSVATSLCEAEA.....QPKYVFIDIKY.....GEAPKMTPIPLETIRTFKMKSISLQDVPHL
A_thaliana HITQPGSSVATSLIDGES.....KPKHVLLEIKY.....GNQYRPTKIPLTSVRFEYTIVLKDESD
T_brucei DIIQPGSTILTSLSEHECN..PKKYGLEVR..GSYRVTGFLRSIRVVRRTEVLWRDNPG
T_vaginalis YVTQPGSTVYTQFKKKNA.....MQRSMAILTISQ..NPDFDKFEDIRLESPRTFIYDKIEIDNKLGL
          ▲▲

```

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 TEKYRISK..SEHDYTKIAECINTSINSEIEAVTNHAASLLCKRIMPCIIDLQKHCRELYSNGHSIESIV
P_furiosus FVEIKVRP...FIDVKIKGSEEEIRKAIKRILPLIP.....KNAYVRLNIGWRKP.....
H_sapiens FNPDPNPKV..TQAIQSFCKLEKIEEMLENAERERLGNH....QPEKPLVLRVLDVYSG.....GFEP
C_elegans SRPILKTD..RPKHTDGRYIDEIAIEAKINEMITTAKAKRRRQPELPLRLKVIYDG.....DWLNITP
D_melanogaster LGLVEGDA..STKVFKAFAQERVEAMIERAVAQHTGHPK.....QPTLPLIRLRLLYTD.....ESCM
S_cerevisiae RPHDKDAT..SKYLIEQVEEMIRDANEETKQKLLADDGEGDMVAELPKPLIRLRLVYDYSAPSNTQSPIDYQV
A_thaliana ...IDPND..QNSILEHLDKVVRLNIEKASKKAVNRS.....EIKLPLVRIKVDYS.....GFMT
T_brucei CRTLDAVEDFLRSVVEQMIEEAEQVSRIPDDVLKFHP.....NIKFPIMRLAVDFDTP.....DSTTFPQ
T_vaginalis FENDKLNLY.....IKEQIDDKLLEFMDKDKGVTIPKXQR.....PIMRIDVESTLS.....PSS

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 ASLASLRVSMQPPAGSYSFHSLIAYLRYHNNHISLEGLSLHSSPRAHSIESNDPSFLNVLKDIVRSLDDID
P_furiosus FDLTEIKELN.....VEYLKIDTWIKERTDEESGKIG.....
H_sapiens FSVLRFQKQFVD.....RVANPKDI IHFFRHREQEKTGEEINFGKLT.....KFS
C_elegans ANAKRIGLRYEN.....VVANAVDMVFIKNNKPKGKGLQTEENKNIEMA.....DEMG
D_melanogaster FNAIRFGEMLST.....RVANQDVVQFQSVVVKRTKTEAVNLDKEALR.....RALE
S_cerevisiae ENPRRFSNRFBG.....RVANGNVVQFYKRRSPVTRSKSGINGTISDR.....DVEK
A_thaliana INPQRFQKQYVG.....KVANPQDILIFS KASKKGRSEANIDDSERLPEELNQQNIEALV
T_brucei PNINRFGQYMD.....IVVNPSELLRPIKPKQVPRVASSASATGGEAPVVP.....VP
T_vaginalis LNLRLGLVDEYKE.....LVANPTKMFYVVKKANSGTKQSEKAEKQTS.....

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 LEESEECFAMGDQQNQTVLANIRCKGLSEAAIKDAILSNMLAKDISLPTIYAQFAFTILFKLARDPLQH
P_furiosusLPSDFTFEFELKI IDILGKEDDFDYI IKLITEGKVEE.....
H_sapiens EGTTLRVEDLVKQYFQTAENKVLQSLTERGMGEAVQEFVDKEEKDAIEELVKYQLE.....
C_elegans QVSATNLQTI INDFINQPLVDQMTVLKPIGIGRALEQYSAIEEGGLATSANRNFDSCLMH.....
D_melanogaster ADNATRVEELVDRYFEEAKSNKPLKLFHSKALAEMTYRLLQQRDADAENIVKFKYE.....
S_cerevisiae LFSSEGGELVQTLVNDLLNKMQLSLLVANVGLNEAVKFKVVDKDEKTALKEFISHEIS.....
A_thaliana AESNLKMEILPVNDLVDALHNFNKDDKLAIFYSCVQYNLQETRGKLAKDSAKKFEEDDLI.....
T_brucei RLNTSDIRTKVAEVEFNAN.ARDACSLSESEVSAAVYAFKAEKGERDAIDERICELLSKQSVVVS....
T_vaginalis .YISEQEHIKIEDILSQKISPSDLNFI SFDLSLKDLSLMEYINSNDNMSKSKAFEN.....

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 TAEEQGLLASICNSFELISIELVVCVDKIQRYYAHLYMNNRTFVEPLMFKADTIVNQOSTSAERVAKSAEK
P_furiosusEGPLEEAVKKVSEKGTVRQKIESIPKKK.....RGTLDSDLG
H_sapiensKTQRFLEKRHIDALEDKIDEVRRPRETRQKNTNEEDDEVREAMTRARALRSQSEASAFSA
C_elegansQIDVVRKTLKKMPLPPIINDPSDLDKFRDLITKD.....LYDMKKADSERFKNPVADVEMEE
D_melanogasterKAVDHLMEAMPN..DENIDEELERFRALHKKG.....DLLK...MLDTQGLKVKKEEKSMV
S_cerevisiaeNEVGILSTNEEFRLTDDAEMKALIKQVVRAN.....SVRPTPPKENDETNFANG
A_thalianaLRVGECELEERLKD..RSTRPTGSSQPLSTGLTS.....ENLTGSGGIANASFSDDEDTTQMSG
T_bruceiMRRGESESILKPESIEYEVVRHKKKANKRYEELSRAAEEALQRSTQGNELERLADTELAASMD
T_vaginalisNINAVFNERYINII EQSKNKQKEVYDAN.....KAKEFILNQKENLPTVKK

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 DSTCVQILLTSLQAVYDQAVSYARGQEDRRRLSAVSLEKSATGFAEREPEAKQTGIRSGASSVLSVTSVTE
P_furiosus GAR.....
H_sapiens DDLMSIDLAEQMANSDDDSISAATNKGRRGRGRRGRRG.....QNSASRGGSQRGRAFKSTRQ
C_elegans DEDDPQYMPQSTSRNTYASGSEDEVANSDEEMGSSIS.....RHSKQPTTRGRGRGARGA
D_melanogaster LG.....SEVNVS...TAPATGRG.....AARGRTARTRAGATAAT
S_cerevisiae NGLDSFRSSNREVRTGSPDITQSHVDNESRITHISQAES.....SKPTS KPKRVRTATKKKIPA
A_thaliana LAPPTRRGRSSTANTTRGRAKAPTRGRGRGKASSAMKQTT..LDSSLGFRQSORASAAAASAFKSAST
T_brucei SGNFSRVGGELADGAALGLLSATAPRRAGGSATNNGEGANDALSQVGFTFPDFSNSLSPDDASGGAATR
T_vaginalis ENIAEIKGKKKTSAQFSPQKPSVHQ.....ESEEKVEIEEFPKRTVER

G_duodenalis_MRE11S
G_duodenalis_MRE11 TIGSSSTIVTNKEEHEDSQSVFLDLSISSDLPEPTTQAQHSLSVDALAIMYMPVEILKCLQDDGCMVKEH
P_furiosus
H_sapiens QPSRNVTTKNYSEVIEVD..ESDVEEDIFPTTSKTDQRWSSTS.....SSKMSQSQVSKGVD...
C_elegans GASRETTGRSNKVVSTRQDSDGFELIINDSPSPPPASRSTRG.....KARGKSAPSKRDLSPF...
D_melanogaster RGKGLDVTVS.....SRTSGRQQTLLS.....SLMGSRNTASVVIS...
S_cerevisiae FSDSTVISAENELGDNNDQDDVDIDDEDIIMVSTDEEDASYG.....LLNGRKTTKTRPAASTKT
A_thaliana IGEDDDVSPSSSEVEPEDFNKPDSSSEDESTKGGKRRPATTKRGRGRSGTSKRGRKNESSSSLNRL
T_brucei GKRSRDELNVFVDVATERDTEVNSHPNVSTVKGKGGKAVKSETSPAPKARGRKPVRVGGVNLPLFPPL
T_vaginalis PKRPRRKATQ.....


```

G_duodenalis_MRE11S .....
G_duodenalis_MRE11  GVGRGNSTAKQLEEVKTKTLRRLTEGYSSALATFFFEAPSSTAQHTCRFTSLLQACDAAEBANHLQVT
P_furiosus          .....
H_sapiens           ...FESSEDDDDD..PFMNTSSLRRNRR.....
C_elegans           .....
D_melanogaster      .....DDSD.....
S_cerevisiae        ASRRGKGRASRTPKTDILGSLAKKRR.....
A_thaliana          SSKDDEDEDEDREKKNLKSQPRVTRNYGALRR.....
T_brucei            ELTREPVPDENFLPPVVGQVGGVQGASTSSSGMPDNY.....
T_vaginalis         .....

G_duodenalis_MRE11S .....
G_duodenalis_MRE11  LEHHDNDLTISA
P_furiosus          .....
H_sapiens           .....
C_elegans           .....
D_melanogaster      .....
S_cerevisiae        .....
A_thaliana          .....
T_brucei            .....
T_vaginalis         .....

```

Figura 8.1. Alineamiento completo de las proteínas Mre11S y Mre11 de *G. duodenalis* con proteínas bien caracterizadas de otros organismos para GdMre11. Los *motifs* canónicos con la secuencia consenso están indicadas con un triángulo hacia arriba. Un carácter blanco en recuadro negro indica la identidad estricta, mientras que el carácter negro en recuadro blanco indica similitud en un *motif*.

La inferencia cristalográfica *in silico* ejecutada con la herramienta I-TASSER se realizó inicialmente con la proteína completa sin la obtención de resultados satisfactorios, así que se decidió sólo utilizar el dominio N-terminal al que previamente se observó altamente conservado. El modelo obtenido presentó un C-score significativo de 0.44, y la estructura cristalizada más relevante utilizada como molde para su modelaje fue la reportada como 4fbkA que corresponde a una fusión covalente del complejo NBS1-Mre11 unido al ion de manganeso (Schiller, Lammens, Guerini, Coords, Feldmann, Schlauderer, Mockel, Schele, Strasser, Jackson & Hopfner, 2012). El modelo también predijo con un alto índice de confianza (C-score^{LB}= 0.69) un sitio de interacción con manganeso conformado por 5 residuos (D15, D57, N101, H197 and H234) que de igual forma están perfectamente conservados (**Figura 8.2B**). Como era de esperarse, al hacer el análisis con la proteína GdMre11S se obtuvieron resultados muy semejantes, un C-score de 0.31, la misma estructura molde 4fbkA y un C-score^{LB} para el sitio de unión a manganeso idéntico al N-terminal de GdMre11.

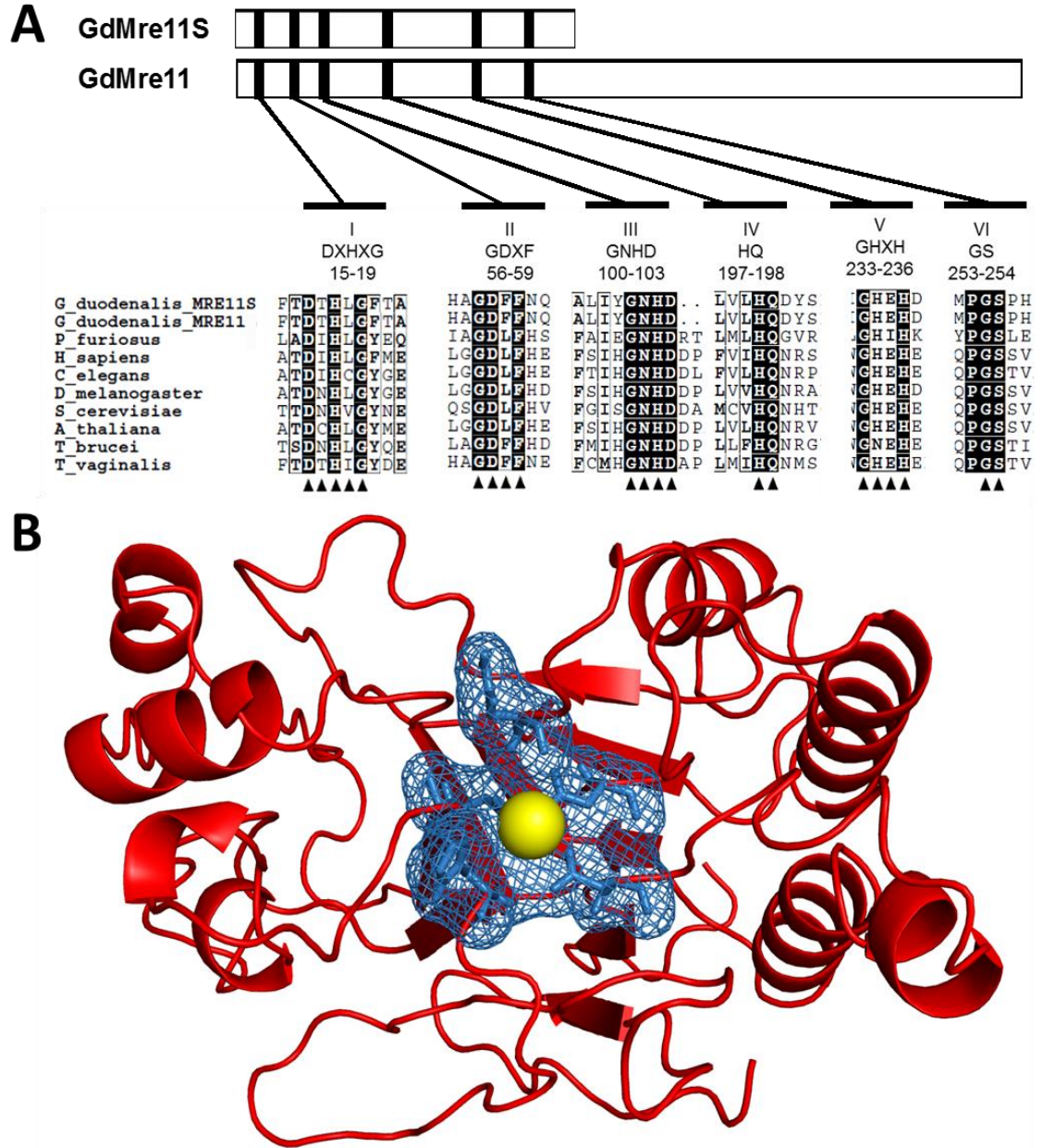


Figura 8.2. Análisis de los *motifs* funcionales y estructurales de la proteína GdMre11. (A) Reconocimiento de los seis *motifs* de fosfoesterasa basados en alineamiento con secuencias de proteínas de Mre11 de otros organismos. Los caracteres blancos en recuadro negro indican identidad mientras que los recuadros blancos con caracteres negros indican similitud. En triángulos hacia arriba se señalan los residuos que conforman los *motifs* característicos. (B) Estimación de la estructura terciaria *in silico* del dominio N- terminal de la proteína GdMre11, en malla azul se resaltan los residuos que interactúan directamente (D15, D57, N101, H197 y H234) con un átomo de manganeso mostrado en amarillo.

También se identificaron ortólogos de GdMre11 en todos los ensamblajes de *G. duodenalis* secuenciados actualmente: ensamble A2 aislado DH [DHA2_152503,

AHGT01000016: 119,752 - 122,259 (+), ensamblaje B aislado GS_B [GSB_153065, AHHH01000064: 40,954 - 43,416 (-)] y ensamblaje E [GLP15_1387, ACVC01000095: 15,670 - 16,518 (-)]. Sin embargo, ortólogos para Mre11S sólo se encuentran en el ensamblaje A2 aislado DH [DHA2_151421, AHGT01000083 40122 - 41000 (-)] y en el ensamblaje E [GLP15_1387, ACVC01000095: 15,670-16,518 (-)]. De modo interesante, el ensamblaje B mantiene un ortólogo más pequeño que Mre11S que sólo contiene los *motifs* II y III de fosfoesterasa.

Para analizar la historia evolutiva de estos ortólogos entre ellos y de otros organismos se realizó un análisis de inferencia filogenética, con el dominio mejor conservado, el N-terminal. En éste se muestra que el clado de la familia de las proteínas Mre11 de *G. duodenalis* es el más divergente, característica peculiar de la especie y que las proteínas Mre11 se encuentran relacionadas más cercanamente entre los ensamblajes A con A2 y estos a su vez con los de E en comparación con GdMre11 del ensamblaje B que es el más divergente (**Figura 8.3**).

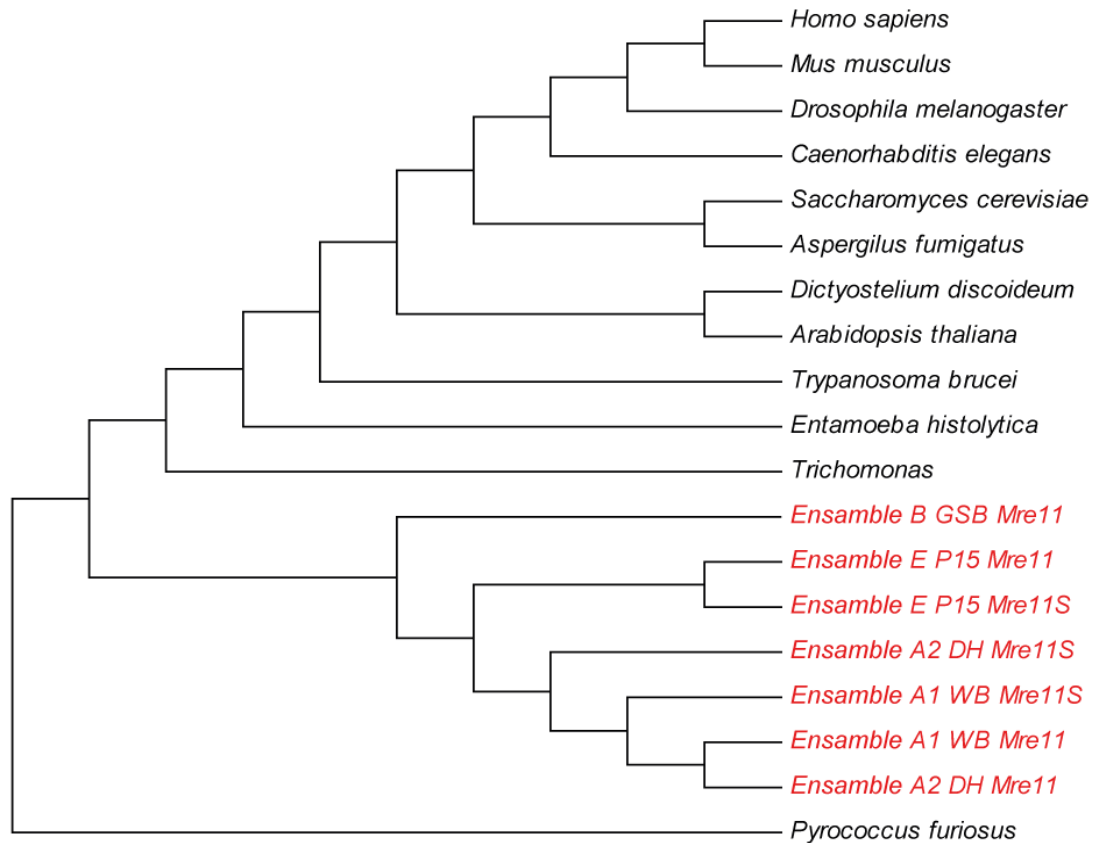


Figura 8.3. El análisis filogenético del dominio N-terminal de las proteínas Mre11 de los ensamblajes de *Giardia* y de otros organismos. Inferencia evolutiva realizada con el método de máxima verosimilitud, con el modelo de sustitución nucleotídica de Le Gascuel 2008. El árbol fue realizado por Neighbour-Joining y es representativo de 1000 réplicas tipo Bootstrap.

El gen homólogo de Rad50 encontrado en *G. duodenalis* (GdRad50) es la secuencia codificante (CDS) reportada con el acceso GL50803_17495 localizada en el locus GLCHR04: 100,005-104,168 (-), la cual codifica para un producto proteico de 1387 aminoácidos. El análisis de los dominios y *motifs* estructurales y/o funcionales arrojaron que esta proteína contiene los *motifs* Walker A (P-loop), Walker B, D-loop altamente conservados, contrastando únicamente los *motifs* Q-loop y CXXC se encuentran desplazados por 7 y 68 residuos respectivamente en el alineamiento con las demás secuencias (**Figura 8.5A**) mientras que el resto de la proteína es altamente divergente (**Figura 8.4**).


```

1      10      20      30      40      50      60
G_duodenalis_RAD50  MYYLDTLTLKNIIRSYRDO...LSTIV SPNLTITITGHNGAGKSTLLEALHLYLISQERFVYDRIEPKVAI
P_furiosus          .MKIEEVKVVYFRSHEET...IVVRIRKGINLIIIGONGSGKSSLLDAILVGLYWSKCLR.....
H_sapiens           MSRIEKMSILGVRSPGIE..DKDKQIITFSPILTILVGNPAGGKTTIECLKYICTGDFPPG.....
C_elegans           MAKFLRLHRIIRISVGD...DHDVHKIDLSPGTLISGPNGTGKTTIEALNFVITGQMPTQ.....
D_melanogaster      MSSIESLSIQGIRSFPTY..ADLDQSIKISSPVTLILGENGSGKTTVVECLKYALTGECPPG.....
S_cerevisiae        MSAYIKLSIQGIRSFDSN..DRE..VTIEGKPLTLIVGMNGSGKTTIECLKYATITGDLPPN.....
A_thaliana          MSTVDKMLIKGIRSFDP...NKN..TITFRPLTLIVGANGSGKTTIECLKVSCTGELPPN.....
T_brucei            MTSIQIEISGVRSEDPN..PNNRQRIVKPKPLTVILGKNGSGKTTIEALLNACTGQMPPPG.....
T_vaginalis         MSKLSLTIKIGIRLFPNPEPKKBYKQTIN DNNILITGPNGSGKTTIECLQYALITGLCRKRL.....

```

▲▲▲▲▲▲

```

70     80     90     100    110    120    130
G_duodenalis_RAD50  PENAVMLMQCILRHEPNTSEANSKTIPTDGFEPPLKEAVNCKKVDCKKSTRGRKSVKGIPMTSLKSNQVIL
P_furiosus          .....TKG.NTFVHDPKVAQETDVRQAQIRLQFRDVGELIAVQRSVMVCTQSKSK.....VLEFRDFSRNV
H_sapiens           .....KKQNFHISTDVARKTRVDASITLLEFDVKGRECTAVRRVLVVTSGTKA.....AAALAEHTLIA
C_elegans           .....SDRGKSFVHDPKIFGLNEVLAQIKMQRDRRGAQVSCRTMKVSKRKNK.....MSFETMSTIA
D_melanogaster      .....SKG.GVFIHDPKITGEKDIRAQVKLAFTSANGLNMIVRTNIQLLMKTT.....TTFKTELGQL
S_cerevisiae        .....ARSGHSFIHDPKVAGETETKAQIKLRFKTAAGKDVVICRSFQLTQRASK.....MEYKALIESVL
A_thaliana          .....GTEKSSFFVYDPKVVGENDVKAQIRLLFTGRGKVMQVIRSFQATRRTRNK.....TTFATLDNIV
T_brucei            .....SAGIGFFFYDINVLGKKDVAEELKLFQAVDGGKIYELVIRKTKIKSKSGKK.....SKLKTQESKI
T_vaginalis         .....

```

```

140    150    160    170    180    190    200
G_duodenalis_RAD50  ELTRIIKRGGGDKVSSSTRNRITDPSDELSSALQLCDGLFYCLICSITKSHWMFETPEEISKSTDOITLN
P_furiosus          AYLVQV...ENGKWRHACSEPSMSESVSSYIERILPYNVFLNAYIYIRQGOIDAILESDLETRDKVVRLELN
H_sapiens           TRT...KHGEKVSLSKCAEIDRMISSLVGSKAVLNNVIFCHQEDSNWPLSEGGKALKQKFDLPS
C_elegans           IKYP...DGTVNTLSKVCDFNTALLKHLGVPRAVFKYVIFCHQEDSNWPLSEGGKALKKRFDDLFFQ
D_melanogaster      NFLTGAGQSKREKQDLSLGRSMDIDVAISDFMGVSKAIINNVLFCHQEDSNWPLSEGGKALKKRFDDLFFQ
S_cerevisiae        VAIN...NSGDRSTLSTRSLELDAQVPLLYGVPRKALEYVIFCHQEDSNWPLSEGGKALKKRFDDLFFQ
A_thaliana          QTIN...PHTGEKVCLSYRCADMDDREIPALMGVSKALENVIFVHCHQEDSNWPLSEGGKALKKRFDDLFFQ
T_brucei            AFQDS...ATGKIISSTYRANDVRAIPDMLGVSPAVLEHVIFCHQEDSNWPLSEGGKALKKRFDDLFFQ
T_vaginalis         LDEH...QKEVYSKEDVVEEQQIPRLLGIPKALENVIFCQQTDCQWPELELNDKDLKLRFDLTFG

```

★

```

210    220    230    240    250    260    270
G_duodenalis_RAD50  LDRFTKLSKEFHPPPKELASSEVVCYFALKAQAVADQEGELHKLTKEMANEQCRDKLREHELLTMFTIDF
P_furiosus          LDKLESAYENLKRKIKTNINLLIESKSFIAARTENIEELIKANEDFLTKKLESEINETSILKLPPIRGLEKV
H_sapiens           ATRYIKALETLRQVRQTGQKVKVEYMQHMLKLYLKQYKAKACIRDQITSKAQLTSSKEEIVKSYENELDPL
C_elegans           LTKFVKAQERKMKIIVLDPKKEMQTHEMSKQLYETHVRDKLVARQNGCEERKISKRKEETDELKERKANG
D_melanogaster      ITEYNKALDKIKIKRKEAMEELKIKKEANIKHVAYLKQEMEVTNLNLOKKAQRKCDATKAQCSECEEMKPI
S_cerevisiae        AMKFTKALDNLSKTKKDMSDVIDIKLLKQSVHEIKLDKDRSKAMKLNHQLQTKIQYNEVSEVTESQLNEI
A_thaliana          ATRYTKALEVKKLHKDQAQELKTFKALKLENLQTLKDAAYKLRSEIADQDETESKQVQMLELTSVQKV
T_brucei            ATRYVVALDLRLENNKELRRQKQKHEASLMSSEHREARQISADITVKEETVAGIKAKTDALAPQLQEL
T_vaginalis         SDNYESAIGQIKELKKNKDKELVQLQKEEINYNKDYEQVKNEEDLKKKTRINEIEQEKKEIDVDLTRL

```

```

280    290    300    310    320    330    340
G_duodenalis_RAD50  ASLAKAGTDLSKLIGLCAANS DHRDI AKDRKSRQMCLELPISTLLSQKICASGDSLVLVYLNLSRSEDAL
P_furiosus          RENVKLELESIKKGISELKIQVEKLGKRRKKGLEEKIVQIERSEI.....
H_sapiens           KNRLKEIEHNLSKIMKLDNEIKALDRKQKQMEKDNSELEEKMEKVFQGTDEQLNDLYHNHQRVYREKER
C_elegans           QKKIEMRSTIHELEDTLTTFKTELELRQNLKKQLSLIRVEPYFGTEELKREIEFRGSEKFGVGERA
D_melanogaster      EARLVEIRNVEFEIGKYAQKQVEMDTKHKNCQOISTLTLKIKKPPRGTLDELQEINSDQRMLEMRQ
S_cerevisiae        TEKSKLFLKSNQDFQKILSKVENLNKTKLSISDQVKRLSNSID.LLDLSP.DQONLLANSFKVLMKNN
A_thaliana          DAEVHNKEMMLKDLRKLQDQVSTKTAETRSTLTFKEQQRQYALPEENEDTIELEKWKSFPERLALIGT
T_brucei            QAIATALDNVHRAEGLSRFAAVIEGRTEGKRESLSRLNVSP...GYSIG.ELLQRRQNGFKRLRES
T_vaginalis         HQIADNIEEKQGGKIKDLENVISQKEGQLKIIRKESIDSEFMNHERVQMTISS.CEDLKSASELELQSNRE

```

```

350    360    370    380    390    400
G_duodenalis_RAD50  AEAYNTLKAHNISG...SHVQDIDAKSIFSKLASDSLQESMLLAQWEKLLKAECDPQSIIPRFVDKYR..
P_furiosus          .....EKKAKIIESEIEIVKIPKLOEKKEKEYRKLK.....
H_sapiens           KLVDCHELEKLNK...ESRLLNQEKSLELVEQGRLOQADRHOEHIRARDSLQSLATQLELDGDFERG
C_elegans           RIQKIGKNNQ...ERQELLSQKTEFENRISLKAELVHCQSLKYLDERLENQLRSELDLHD...
D_melanogaster      KRTEVEGDLSQIKRSSVAEQEKLGTQDRKHKCLAKQRHQSLELACRAQLLKRKVFCERELHIPIDCDLVEQP
S_cerevisiae        QLRDLETDISSLK...RQSSLQSLNSLIRROGELIAGKETEYKRNHLSLKEAFQHKFGQLSNENI
A_thaliana          KIRKMEREMVDTET...TISSLNKATQNYMLEISKLOTEAEAHMLLKNRSDTQNIFFHYLNGVNST
T_brucei            TVSTKELMERVAVALRRCESEVSLRSNGIEFKEQEQHKKRECEELKVMISDLSMKFVLDGELNEHCLT
T_vaginalis         TINLAKSQIEMKKH...DYERVKRETEERTQKLDLKSKEENFNFEKTNFEKLSIDFKNNYGTNDY...

```

```

410    420    430    440    450    460
G_duodenalis_RAD50  ....AMLAQLSTIKSSHRDVTAVATSDNVHINTKRNLTIESFYQNIIDYPSGLTEPNESLDNIS.....G
P_furiosus          .....FRDEYESKLRLEKLSKWSSELKAIIEVIKE.....
H_sapiens           PFSEKQIKNFHKLVRERQEGEAKTANQLMDFAEKTELKQKQIDETIRDKATGLGRITELKS...EILS...
C_elegans           ...ADIDIEDNAITLKIIRGMSDKARMIKACNAELQSNLRTAQEAATKIEVEMKTLQNEKVK.....
D_melanogaster      EKMGVLRDIEAMITKCEITIEIVEQNEKADRSRQVQKIDELRITELTKSPQVTAQEKQRESSR...
S_cerevisiae        SDMAQVNHLEMSQKAFISQDLDITIDQFAKDIQLKELTNLSDLIKSITVDSQNLVYKDKRS...KLIHD.
A_thaliana          PFSTEVLNLTNRKSRLEGLMDLLDKKSNETALESTLAWDCYMDANDRMSIEAQKRRK...EIKMGI
T_brucei            KITEYVNEELHNEEQHRSGLNSIDAGIRAVDRRSTTLRAMDTEGKEEQLRHLMKR.....
T_vaginalis         ...QEYKKEIESENSKKTENKLLKRDIQNLNDPKNFQEKQREVEDEHNRQLTEVKTTELKS.....

```

470 480 490 500 510 520 530
G_duodenalis_RAD50 LESLCLLSMICMKVSAIDDDVINONIAQKQRDDEAIRESTAVLDNAVTAERESREATSILVLSGSLSDK
P_furiosusGKKKERAEIIEKLESETEKRELELKP.....YVEELEDKQVQKQIERL
H_sapiens KKQNELKNVYELQQLGSSDRILELDQELIKAEKRELSKAEKNSNVETLKMVEISLQNEKADLDRQLRKL
C_elegans .LEKEVEQLKFKIKQGQATAGMKDLKKKEEARLSLADLP LLDENALTECKLKREK....YLRQLDIL
D_melanogasterESETLGVETIKKETSMDLKKLEKINEVNEELYESATKNIDQQAIKDAIARRKASIAENQIQFKKL
S_cerevisiae ...SEELAEKLSFKSLSTQDLSLNHELENLKYKELQSWESENIIPKLNQKIEEKNEMITILENQIEKF
A_thaliana SKRTEEEKIERSDFEPEISTVDVVKQTDEREKQVQVLELERKTKQNSERGEFSKIEQKQHEIYISLEHKIKTL
T_brucei ...CGDAKEALGKLAPYVTPTRLKKNVQDTITELKRVEMELLOKGDARYRQQDILQSVQAQKRVVVAQL
T_vaginalis ..YDEQLNKLEDYSQEGYENLKEKTEQLAKKRLDAELRSDJ..SYDKTSSKINEINNENKKNINKSLTEK

540 550 560 570 580 590 600
G_duodenalis_RAD50 LAELQNVYEESKRNRLQELSNRCTLNLTSAFQQKRVHERLLYLCANHYVSSEELTKIRDTLISGLDLLT
P_furiosus KARLKLGLSP.GEVIKLESEKERTIEEAIKIEITTRIG.....YEDKLPDVCQSQDPESDLD
H_sapiens DQEMEQLNHHTTRTQMEMLTKDKADKDEQIRKIKSRHSDELTSLLG.YFPNKKQLEDWLHSSKS...KEIN
C_elegans KKKCAEAEKNAEKDREKESLQKTLSIARKKMTAYQRIYDNNWQGLIG.QAPDFPWPILSFTV...HKLR
D_melanogaster DEQLTFLGSMKLVACSLKQKELDKKQEVHRVRSRHSDFHGKLFKEPITCN..YRRSMQVYV..EKLR
S_cerevisiae QDRIMKTNQQAADLYAKLGLIKKSNITKLELQKITEKQLQNSRIRQVFLPTQEFQRADLEMDQF..KLPF
A_thaliana NRERDVMAGDAEDRVLKLSLKTTEQENLKKHKKIIDCECKDRIRGVLKGLRPPKDMKREIVQAL..RSIE
T_brucei RQELSRHKQRSGREAEMLLRTQIAEKELINNRLOEELIAGLNDLGCNTGGSQTLLTVMQID..KLRR
T_vaginalis KEITKKLENQRSINQQLNDNEQKISKNNKEIKSLINIKELIHEEID....EENFSKIIKKEKQ..KSLN

610 620 630 640 650 660 670
G_duodenalis_RAD50 YLPALLLVTLNHQRNPEQDIGSACRLVMLTWEENWTKLKSCLDCMGYPHIDILTNTIEGISSDCLTLNLLN
P_furiosusQME
H_sapiens QTRDRLAKLN.....KELASSEQNKNHINNELKRRKEEQLS...YEDKLPDVCQSQDPESDLD
C_elegans NDKKIMEEDLRDVLNVQKLETMQHQYRQKQESLTAQELKLSN.....IFEACSCAEAEVSEKLE
D_melanogaster REIQELNEKANTQ...KLKEQSYEIKRKNLISDISRMEKELKD.....SEELIYQKCRSTPYDDLLE
S_cerevisiae NMQKNIAINNK...MHLEDRRYTNALYNLNTIEKLDQDNQKSKKQVQLLENLPEDCTIDEYNDVLE
A_thaliana REYDDLKLSKREA...EKEVNMLQMKIEVNNLSLFFKHNDKTESRRKRYIESKQLQALKQESVTIDAYPKLE
T_brucei KMADTLYSVEAEANDLRQLIALKQNRSQLEKIVSENIELQRRK...VQCISKLGNDDALTNFEALLV
T_vaginalis NEENSIRVETDKE...KTKYEKSQIELDKSKLENKNTKND.....IESDLIENLGGSTDFENEYK

★

680 690 700 710 720 730 740
G_duodenalis_RAD50 ALNFTINNKTKDCIGIELRFLFSTSDDLPGSLTKMVRVSDALQKNLTTTGNIIITVIPTLRNDFSVYINKR
P_furiosus QEKNERMKAIEELRKAKG.....KCPVCGRELTEEHKK.....
H_sapiens RLKKEIEKSSKQR.AMLAGATAVYSQFTITQLTDENQSCCPVQRFQIEAEQEVISDLQSKLR LAPDKL
C_elegans NLRKRLKRAKRD.LAPLSAKSNLYDSYIEESK..SSGCCPLCDDRFQKTKKEINFEPSKLENMTLSFPTE
D_melanogaster RSKRTISKLPQFDH.GALKSSEALIKYKQMDPEEPS..CPLCHHNMTS.DEACDLSLTELDEIQKLPDNI
S_cerevisiae ETELSYKTALENL.KMHQTTLEFNKALEIAE..RDSCCYLCSRKFENESFKSKLLQELKTKTDAN...F
A_thaliana SAKDKRDDRKREY.NMANGMRQMFPEPKRARQEH.S.CPCCERSFTADEEASF.KQVVKASSTGEHL
T_brucei EARDRYHKLNEKL.SGSKALAAACHAFVQAKVEDK..CPLCGRAFSENELNDFLASFVQQTSGKDS
T_vaginalis KYKNEQENLQKLI.SLDTKSQSIYEFVSESR.SESCQCPCKRRKFKDNSERDEFIKNELEKVLKLDLPSK

▲

750 760 770 780 790 800
G_duodenalis_RAD50 AKISEEMAKNMLVL.....FEGFLDEYKQDMAQKADLVNAIVSALGAFSNILPIALSQCN
P_furiosusKLEIKLREFFSVMRDAEQIKELKESKLG.....ELMERYTELEIKKIEELKRTTEERKLRVNLR.
H_sapiens KSTSESELKKEKRR.....DEMGLVPMRQSIIDLKEKEIPELRLNQLONVRDQIRLKNNDIEE
C_elegans EEELEKLVSKLEKE.....IIVKAEQQANELQRIVKELEKVRKRNKLSATEMAEAKSNLSK
D_melanogaster TRAEKALKAQEIYK.....ENLLQLKPTILKVKELKDS.LPKQKLELKKVEELLGDSVSEYET
S_cerevisiae EKTLDKTDVQNEKEY.....LHSLRLEKHIITLNSINEKIDNSQCKLEKAKEETKTSKSKLDE
A_thaliana KALAVESSNADSVF.....QQLDKLRVFEYSKLTTEIIPLEKILQEHTEELGQKSEALDD
T_brucei IKGDVKALQVRVGLQLESQVDMVRRLDNAPQLEESLRSITIKQIRKLEILEDVHNKRLKVDKMDQR
T_vaginalis IASNEELRKKVSEK.....IESIENLRDKHFIYQVLEDIPKLEEEIDTLKSKRDQNFEEYQQ

810 820 830 840 850 860 870
G_duodenalis_RAD50 LNIPFDKAHVELLELEKNGQVMHKIMLDNNEISSSGDRADDTLYQILCGVPTNTVTCDSFFLLIPQLEIYQ
P_furiosusKLEIKLREFFSVMRDAEQIKELKESKLG.....FNLEELKREKREF
H_sapiens QETLLGTIMPE...EESARVCLTDVTIMERFQEMELKDVEKRIQAQAARLQGLDLDLRTVQVQVQKQEK
C_elegans NEKQLETVNAK...LKLAEGLDQDVGVIQQLYEQTEENEKRYEQLVSESDSS..DGLSYTELKRVKVEDK
D_melanogaster LIALIGEPHTN...MELANSMMGDMSLLDEALKDSARLT KDLDLQKQGLPASYSVSSMDLQAKKSKV
S_cerevisiae LEVDSTKLKDEKELAESEIRPLIEKFTYLEKELKDLLENSKTISEELSYNTSEDGQTVDELDRQKRM
A_thaliana VLGISAQIKAD...KDSIEALVQPLENADRFQEIYVSYQKQIEDLEYKLDLFRGLGVTMEIEIQSELSL
T_brucei AQKLVQAAMEVN.AMTSEKQALLQQLNRREAAACEASTSSANIGGAGEPCAGELASLSYEELSDKYESA
T_vaginalis IKQNYDEIRSKK...EKFEHEVIPKKNVVERLISYVSKYESENDNLRSLKLNKLPNLSVIEEKKRILEDK

880 890 900 910 920 930 940
G_duodenalis_RAD50 SADCCCTIIDTINAFDCLKLIAAKGLES TRVDSSENELNSLRIQLSDEENSLVLVKQES EELLESRASMRLE
P_furiosus EG.....LNEEF.NKIKGELIGLERDLKRIKALEGRKLEIEKVRKAKKE
H_sapiens QHKLDTVSSKIELNRKLIQDQEQIQHLSKSTT.NELKSEKQLISTNLQRRQQLLEEQTVELSTEQVLSYRE
C_elegans DEBYRKIVQEGEELQKCSERNK...LQSKL.NELGTHRVSLGEAAAQAGAPAEQLETKRIEQECITAE
D_melanogaster SKLELETERKELESQAQNAVQQMDALNRREKK.NSLKDRQIHLREGLQSLPQLKRELEKLSFTVAISE
S_cerevisiae NDSLRELRKTTISDLQMEKDEKVENSRMNLNLI.KKELTVSEIESSSLTQKQNDSDRSKRRENINDISR
A_thaliana QSSKDKLHGELKLRDDQIYMERISQVQARW.HAVREKAKAANLRLDVTKAEEDLQALAEKSLQDL
T_brucei NAEHLRLNVLLSEMQRG..EEGSAQALVVKEL.TMKRSELCELMKMLTRQAEVEATLAQYAEQEEGYVSR
T_vaginalis SQNLQTEQAN...LMKKLTEASDRKSKLQSRVY.NEVNKNLNDYKSKFPDDKKNKKEKROKRGKIKRDIENK


```

          950      960      970      980      990      1000      1010
G_duodenalis_RAD50  ISELEKQFLATSIDGQPPYSINYAQLVKE.DMQIGEKLKHYGEERKKLSLKMDALKEEVDALILDTTQIS
P_furiosus          LENLHRQLRELGFESVEELN.....LRIQLEEF
H_sapiens           IKDAKEQVSPLETTLEKFFQKEELINKK.NTSNKIAQDKLNDIKEKVKNIHGVMKDIENYIQDGKDDYK
C_elegans           ISQKRN.....DLPDAQPKKDDLTRNVSSKEEEKKAEMEVQMMKKELDQKIFHRKSLFKVQVEGGLC
D_melanogaster     ISELKAKIQPLKLNLRAAIEEKEERLKKSE.SEKLAQLNSKYNSYKSTDHDIQRINKEADYAKLDLRNEI
S_cerevisiae       VKLELARISLKNKKDEAQAQVLDKVKNER.DIQVRNKQKTADINRLIDRFQTIYNEVVDFAKGFDELQ
A_thaliana         VKYLTEALGPLSKEKEQLLSDYNDMKIRR.NQYEELAEKKRNYQEQVEALLKASYKINEYHDLKKGERL
T_brucei           IAEIDDQREKLVAAQLESYNKELEALHAKRKELELASQQGYIGQLKRTLGLLSAVLPRLRDYITSRVGEEEL
T_vaginalis        LIETIERLNKEMNEANAQNLESIKKATNEL.QLDVDKLNNDPFIKKNDFEKISKSKETISKYSVDETRNKI

```

```

          1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080
G_duodenalis_RAD50  LSESATVPLTHAEFLGMKPALEKIKKSPSATEIESAASSYQVAHDKTLCLQITLAILEEYATVDFLSEKFL
P_furiosus          HDKYVEAKKSESLERELKKNLEKEKT....ELDQAFEMLADVEN.....EIEEKAELKDLSEKFL
H_sapiens           KQKETEENKVIATQLSECEKHKKEKINE....DMRLMRQDIDTQKIQERWLDQNLTRKRNNEELKELVEER
C_elegans           ERQLMDKENNIAITLNASLEENQQRK....RFEEDLRSFDSHQRESILKDLQITLHIEKILKRTL
D_melanogaster     KKLDEITMAMSKDKLRKLEAEISLKT....ELETIKTECSNQQTVERDLKDNRELKQLEDKAKLRESC
S_cerevisiae       TTK.ELELNKAKMELKQLDLKSN....EVNEEKRLADSNNEEKNLKQNLIELKSKQLQHEISEI
A_thaliana         DDIQERQLSLSQLQSCERARKNELAG....ELNRRKDLMRNQDQLRRNIEDNLNRYRTKAKVELTREI
T_brucei           SRDRESLCVNEKRRDTQAEVKKLR....SIDDTLRINEEQRLRVEVDKYIYELKKGSIKEDKRL
T_vaginalis        YELEKTKKENEDSLQQLDENLKKWEK....KQEADQNMDEIKIKLEENNLVHDYQLQKVKYRIEHEK

```

```

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
G_duodenalis_RAD50  LALLDRVRLQFAGSIEYTCCG....ELLMVVRTEPEELTNKCTLDGVLNGLTTMSSLYESARSQSAME
P_furiosus          N.....EIEEYEEKRELRVKL.....EIEEYEEKRELRVKL.....EIEEYEEKRELRVKL.....
H_sapiens           KQHLKEMGQMQ.....VLOMKSEHQKLEENIDNI.....KRNHNALGLGQK
C_elegans           ATFDGQINEDR.....ITEQKQAYNNKLNLELRLI.....GNEEVKIYTMQ
D_melanogaster     QVLDKQLGNLD.....FHSVSKKVNLTQRDKA.....TVRKGELGQLG
S_cerevisiae       SRLDVQNAEAE.....RDKYEESLRLTRFEKL.....SENAGKLGEMK
A_thaliana         ESLEEQILNIGG.....IAAVEAIVKILRERERL.....LSELNRCRGVVS
T_brucei           SDVRCTLSELKVNAPAAEAVALGKDVVERESVGRIRIELIRGKISAL.....ECLRAQQDGVAE
T_vaginalis        EELLRELSGFAN.....IDDIKNIDIKQELNK.....EKRSSELQGSYS

```

```

          1150      1160      1170      1180      1190      1200      1210
G_duodenalis_RAD50  LYKKEGVTEGQKKEHERLKEELHTAVERAQSASLLIVKGA STLISILMQRVTKVFRHMLLKKLNSKLO
P_furiosus          ELKKSVEQIKATLR..KLEKEEREKAKLEIKKLEKALSKVEDLRKKIKDYKTLAKKQALNRISEIASE
H_sapiens           GYEEIITHKRELRFQFQDAEKEYREMMIVMRTTELVNKDLDIYKTLDAQIMKFFHSMKMEINKIIRD
C_elegans           EYEKQKNIABAKLSIKKEQNAESNYRDAIIELAITKESISDLTKYRNCLDASLQFHSKMGVNRGIDDD
D_melanogaster     EIHSGVNNKLRQREIDEPFRKESLNFRKANYEIEVTRLCIEDLGGYRLALEWALQFHSKMEINRLRE
S_cerevisiae       QLQNDISLTHQLR..TDYKDIKKNYHKEWELQTRSFTDDIDVYSKALDSAIMRYHGLKMQDINRIIDE
A_thaliana         VYSSISKNRVELKQAQYKIDIDRRHFDQLIQLKTTMANKDLDRYNALDKALMRFHMKMEINKIIRE
T_brucei           AMRQDESLEKGLTRDKYKIDIEKRYRTFLKVQTEIAVSDVEKYRALEKAVQTYHQEKIAQINQILAD
T_vaginalis        HLDKELKDLRSRLN..NRYKDTNNNLTEIRLKAATEMTIKDILTKFAEQLNNSIXEYHQKRVLEINELKKA

```

```

          1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
G_duodenalis_RAD50  LWNQCARTGATRNEISTVRLAITQVGTGDKAKDVIELQAICTNPDTDCPVVRSFREAQSSGQVLLSIL
P_furiosus          IFSEFTDG.....KYSNVIVRAEENK.....TKLFVVYEGKVEPLTEFL...SGGERIALGLA
H_sapiens           LWRSTYRQG....DIEYIEIRSDADENW.SASDKRRNYNYRVVMLKG.D.TALDMRGRG.SAGQKVLASLI
C_elegans           LWRKVNST....DITIRIRSDATS....ETSQKVAEYEVMMVHGETEVENRGRG.SAGQKMLASLI
D_melanogaster     WYRKIVYRGN....DIDYIQVKTDEVSSD.ASADRRKTYNYRVVQSKNY.SEIEMRGRG.SAGQKVLASLI
S_cerevisiae       LWKRTYSGT....DIDTIKIRSDVSS....STVKGKSYNYRVVVMYKQD.VELDMRGRG.SAGQKVLASLI
A_thaliana         LWQOTYRQG....DMDYIRIHSSEGG....AGTRSYSYKVLMTQTD.TELEMGRG.SAGQKVLASLI
T_brucei           LWRHTYKGS....DIDTIELRSDDVT....STARRSYSYRVVMKRG.N.SEMDMRGRG.SAGQKVLASVL
T_vaginalis        FWEKSYQSM....DIENISIVAHSSSTENNESKSGRISYDYRVVMPKSG.QEVEMSGRQ.SAGQKVLASLI

```

```

          1290      1300      1310      1320      1330      1340
G_duodenalis_RAD50  LRLSFSYISMSFFSFIVLDEPTNYLDRKNNKNLAHVLAADFISQAQNT.....QVVVITHSLEFR
P_furiosus          FRLALSMLVGRIDLILLDEPTPFLDEERRRKLDDIMERHLR.....RISQVIMVSHDEELK
H_sapiens           IRLALAEFTCLNCGIIALDEPTTNLDRENIESLAHALVEIISKRSQ.....RNFQLLVITHDEDFV
C_elegans           IRLALAEVFFGGSCSMIALDEPTTNLDESKEVGMALVADIAERRGFDENGKLRGRDMQVIVTHDERLV
D_melanogaster     IRLALAEFTSSNCGVIALDEPTTNLDRANINSCEALNCIVEERQSQ.....SNFMIIITHDENFV
S_cerevisiae       IRLALSFTFGANCGVIALDEPTTNLDEENIESLAKSLHNIINMRRHQ.....KNFQLIVITHDERKFL
A_thaliana         IRLALAEFTCLNCGIIALDEPTTNLDGPNSESAGALLRIMEDRKGQ.....ENFQLIVITHDERFA
T_brucei           IRLALSFAFCDCCGIIALDEPTTNLDEPNARSLAESLRMLIDSHRAV.....KHFQLIVITHDERHFV
T_vaginalis        IRMALAKAFG..CSIALDEPTTN.....

```

```

          1350      1360      1370      1380
G_duodenalis_RAD50  DALIAATNNTNTRAYKISMPEGGSTIREIAWGLDDDLTY...
P_furiosus          DAADYVIR...LRLEGGKSKVEVVS.....
H_sapiens           ELLGRSEYVEKPYRIRKKNIDQCSEIVKCSVSSLGFNH....
C_elegans           NRITISCRPEYIYCLGKDEHGISFLSKRYPDGTGVRVNTKRRF
D_melanogaster     SSLGKITSYHRVFRNEECKSVIRRVEAGPSKKALIDQ.....
S_cerevisiae       GHMNAAAFTHDFKVKRRDRQKQSQIEWVDINRVTY.....
A_thaliana         QMIGQRQHAEKYRVAKDDMQHSIEAQEIFD.....
T_brucei           RALGGQALDTPFYIHKDREGAFSVIEERTFDQLFAS.....
T_vaginalis

```

Figura 8.4. Alineamiento completo de Rad50 de *Giardia duodenalis* con proteínas bien caracterizadas de otros organismos. Los *motifs* canónicos con la secuencia consenso están indicadas con un triángulo hacia arriba, los *motifs* posiblemente desplazados están marcados con asteriscos. Un carácter blanco en recuadro negro indica la identidad estricta, mientras que el carácter negro en recuadro blanco indica similitud con un grupo.

La estimación de la posible estructura terciaria para GdRad50 arrojó resultados insatisfactorios cuando se usó la proteína completa. Siguiendo la misma lógica que se utilizó para GdMre11, se colocaron sólo las secuencias de los *motifs* Walker A y B por separado para el modelaje. Para el dominio Walker A se obtuvo una estructura certera con in C-score de 0.49 modelada basada primordialmente en la estructura 1xexA perteneciente al extremo N-terminal de una ATPasa de la familia de mantenimiento estructural de cromosomas. Además, exhibió una estimación de un sitio de unión a ATP con un C-score^{LB}=0.72 conformada por los residuos (R13, S14, N35, G36, A37, G38, K39, S40, T41, R59, A69, M71, L72 y M73) de los cuales los primeros 7 se encuentran altamente conservados (**Figura 8.5B**). La aproximación más cercana del dominio Walker B resultó en un modelo con un C-score=-0.76 con uso preferencial de la ATPasa 3EF3 (2iwhB) como molde, la cual predijo un sitio de unión a ADP conformado por 3 residuos (E1309, N1312, y H1312) que se encuentran altamente conservados. De modo notable, estas estimaciones sugieren la transición de ATP a ADP durante la actividad de ATPasa (**Figura 8.5B**).

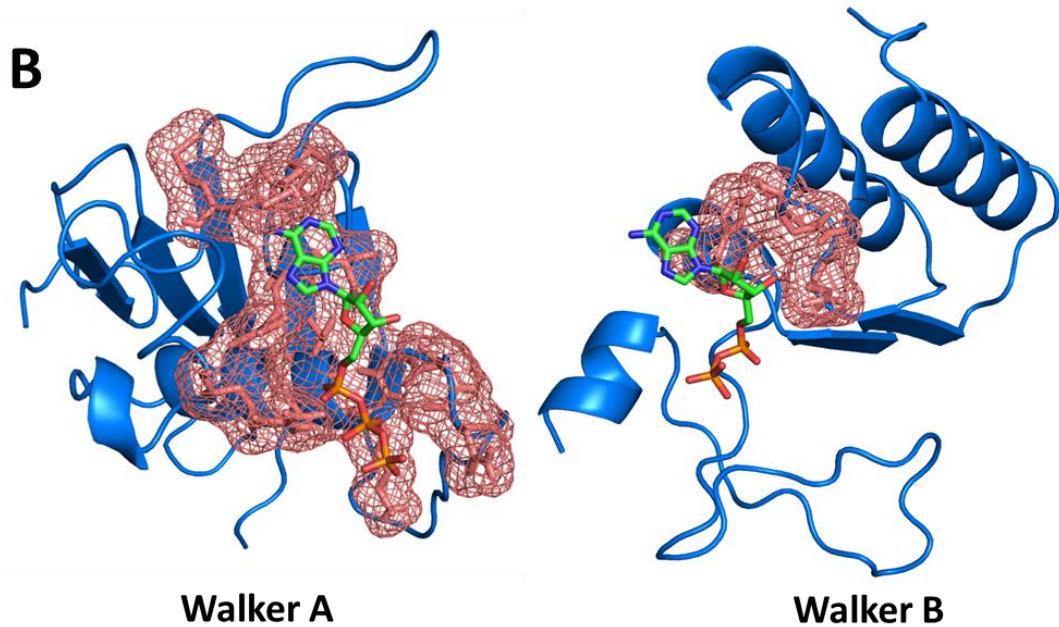
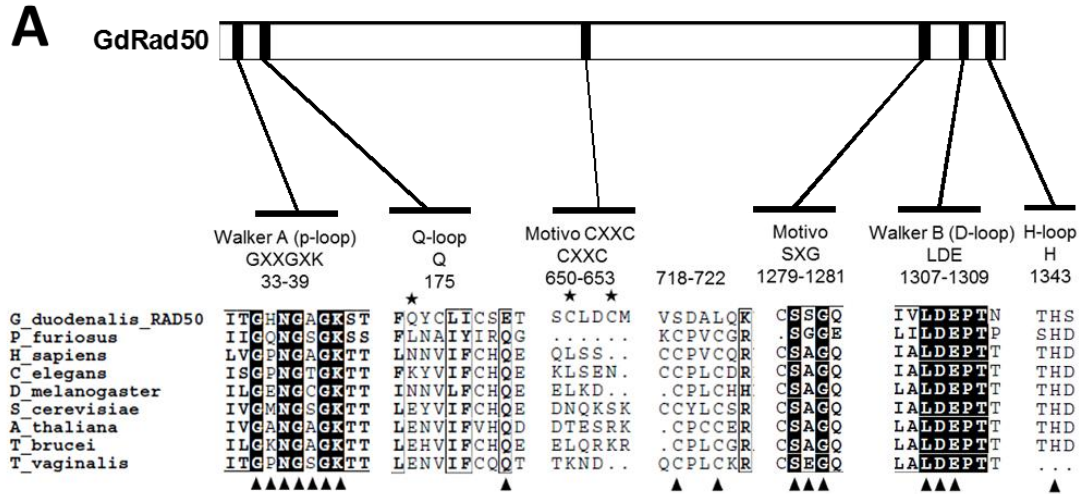


Figura 8.5. Análisis de los *motifs* funcionales y estructurales de la proteína GdRad50. (A) Reconocimiento de los *motifs* característicos basados en alineamiento con secuencias de proteínas de Rad50 de otros organismos. Caracteres blancos en recuadro negro indican identidad mientras que los recuadros blancos con caracteres negros indican similitud. En triángulos hacia arriba se señalan los residuos que conforman los *motifs* característicos de las proteínas analizadas en el resto de las especies y en asterisco se señalan los posibles residuos desalineados para GdRad50. (B) Estimación de la estructura terciaria *in silico* del dominio Walker A y Walker B, en malla rosa se resaltan los residuos que interactúan directamente con una molécula de ATP para el dominio Walker A (R13, S14, N35, G36, A37, G38, K39, S40, T41, R59, A69, M71, L72 y M73) y con una molécula de ADP para el dominio Walker B (E 1309, N1312, and H1312).

Una característica estructural primordial de las proteínas de Rad50 es el dominio intermedio antiparalelo rico en hélices-superenrolladas (*Coiled-coils*), del que su prevalencia dependerá su estructura, mientras éstas sean mayores tendrán alta rigidez estructural (de Jager, Trujillo, Sung, Hopfner, Carney, Tainer, Connelly, Leach, Kanaar & Wyman, 2004). Una predicción bioinformática de estos en GdRad50 colocó al parásito como el organismo que tiene menor enriquecimiento de hélices superenrolladas comparado con otras especies y que probablemente presente una flexibilidad mayor en estos dominios. (**Figura 8.6**).

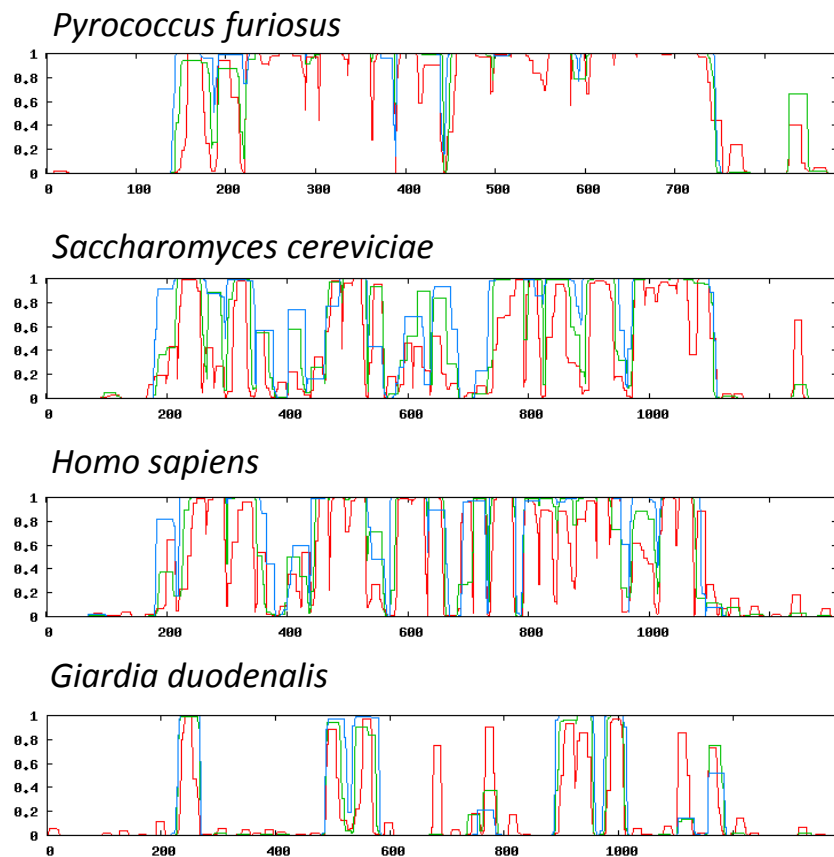


Figura 8.6 Predicción de dominios de hélice superenrollada. Predicción para las proteína Rad50 de la secuencia de aminoácidos de *P. furiosus* (Q9UZC8.1), *S. cerevisiae* (CAA65494.1), *H. sapiens* (AAB07119.1) y *G. duodenalis* (GL50803_17495). Los picos indican la mayor probabilidad de hélice superenrollada. Las probabilidades se presentan en verde, azul y rojo de acuerdo con la ventana de 14, 21 y 28 aa.

Los ortólogos encontrados para el resto de los ensamblajes cuyos genomas actualmente están secuenciados son los siguientes CDS: para el ensamblaje A2 aislado DH fueron [DHA2_150638, AHGT01000014: 158205 - 162368 (+)], ensamblaje B aislado GS_B [GSB_153694, AHHH01000099 22770 - 26921 (+)] y para el ensamblaje E [GLP15_1993, ACVC01000118: 6,582 - 10,730 (+)]. La historia evolutiva inferida demuestra que las proteínas de los ensamblajes A1 y A2 se encuentran más cercanamente relacionadas en comparación con el ensamblaje E, el ensamblaje B resultó nuevamente el más divergente (**Figura 8.7**).

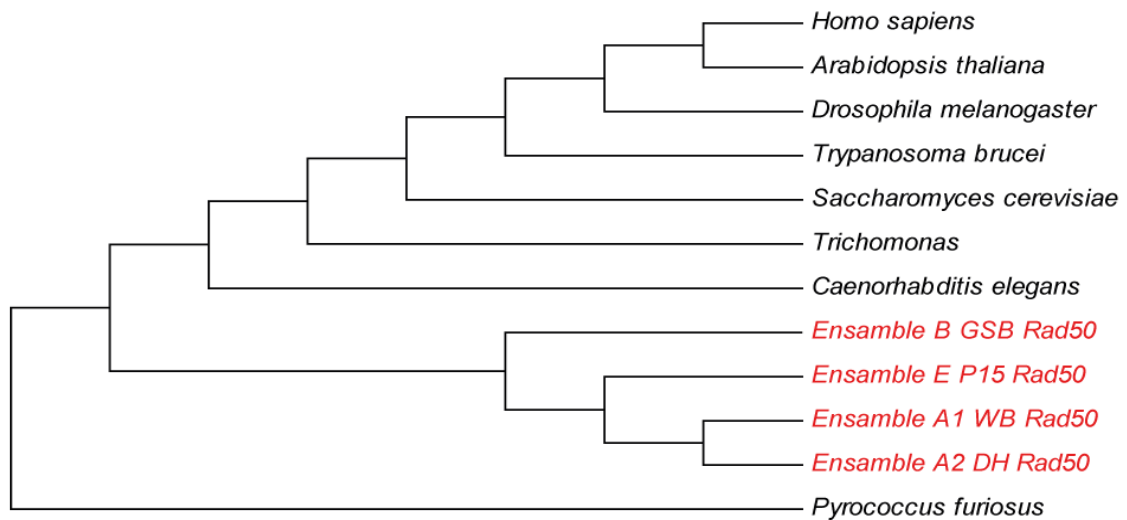


Figura 8.7. Análisis filogenético de las proteínas Rad50 de los ensamblajes de *Giardia* y de otros organismos. Inferencia evolutiva realizada con el método de máxima verosimilitud, con el modelo de sustitución nucleotídica de Le Gascuel 2008. El árbol fue realizado por Neighbour-Joining y es representativo de 1000 réplicas tipo Bootstrap.

8.2 GdMre11 y GdRad50 se unen a ssDNA

Para explorar las actividades bioquímicas putativas de GdMre11S, GdMre11 y GdRad50, sus secuencias codificantes fueron clonadas en el plásmido de expresión pProex-OP, el cuál agrega una etiqueta 6X-His para la posterior purificación de las proteínas recombinantes. En la **Figura 8.8B y C** se muestra el resultado de la purificación de las proteínas recombinantes, en ésta se observa un producto proteico único para rGdMre11 de 90 kDa y para rGdRad50 de 150 kDa en SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie, cuya identidad fue verificada por *Western-blot* observando señal del mismo tamaño. Para rGdMre11S se obtuvieron

dos productos observables en el SDS-PAGE de 30 y 20 kDa, el primero de ellos corresponde a la proteína recombinante esperada al observar su identidad por *Western-blot*, mientras que el de 20 kDa es posiblemente la proteína slyD cuyo tamaño es consistente con el mostrado (**Figura 8.8A**), ésta es una proteína producida por *E. coli* con una alta afinidad a columnas de Niquel que cumple con funciones de maduración de proteínas encontrada frecuentemente co-purificada en éstos procedimientos (Andersen, Leksa & Schwartz, 2013).

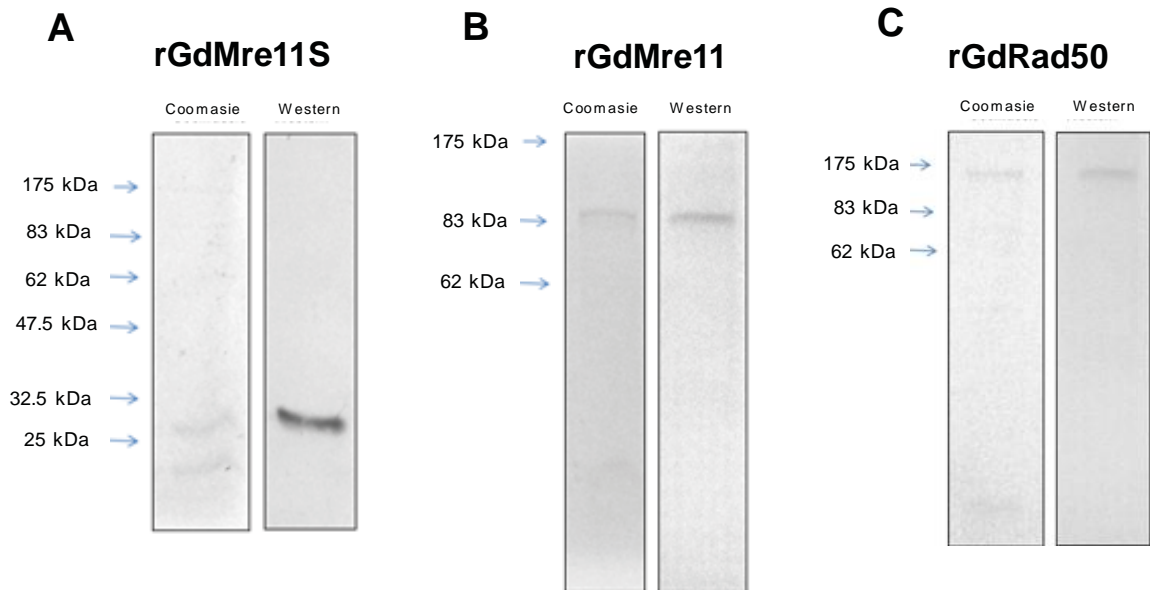


Figura 8.8. Purificación e identificación de las proteínas recombinantes. A) rGdMre11S B) rGdMre11, y C) rGdRad50. Para cada inciso se muestra al lado izquierdo el gel de SDS-PAGE teñido con coomassie y del lado derecho el *Western-blot* anti-6XHis.

La primera actividad estudiada de las proteínas recombinantes producidas fue su capacidad de unión a DNA. En este sentido Mre11 y Rad50 son versátiles en sus habilidades de unir a DNA (Ghosal & Muniyappa, 2007). Evaluamos la capacidad de GdMre11 y GdRad50 para unir ssDNA mediante ensayos de retardamiento en presencia de ATP. Para este experimento, cantidades fijas de una sonda de ssDNA marcada radioactivamente se incubaron con concentraciones crecientes de las diversas proteínas purificadas. Como se muestra en la **Figura 8.9** sólo las proteínas rGdMre11 y rGdRad50 son capaces de unir a ssDNA, consistente con el hecho de que rGdMre11S no presenta dominios de unión a DNA. La

dependencia de la concentración de proteínas de ambas fue muy similar para ambas proteínas, incluso cuando en las condiciones ensayadas no alcanzaron la saturación.

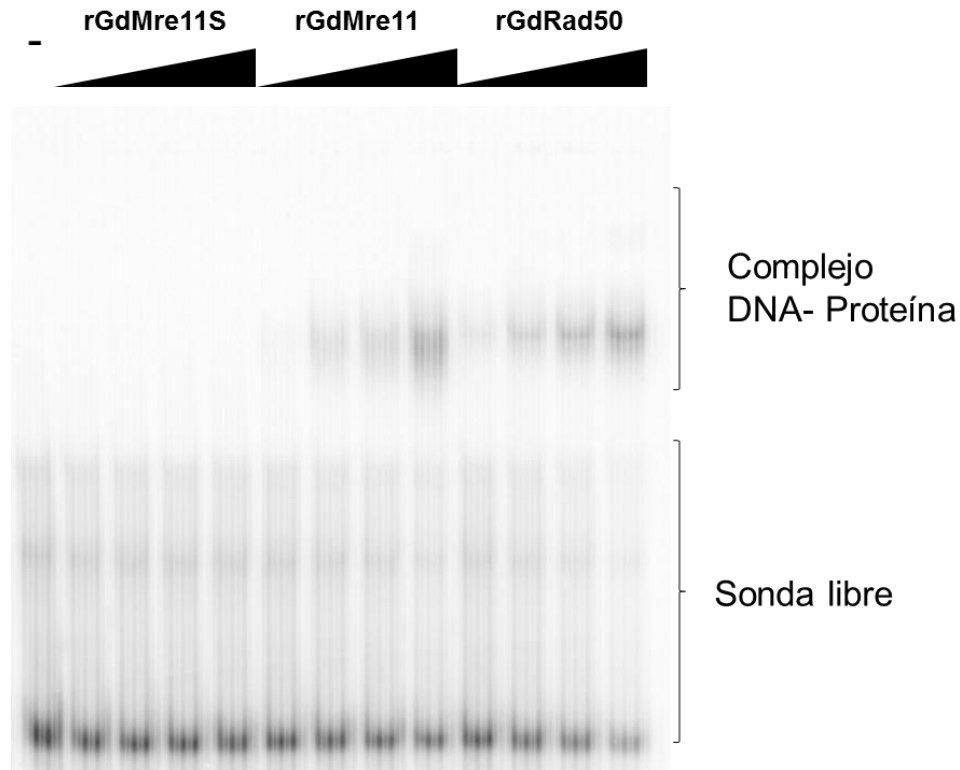


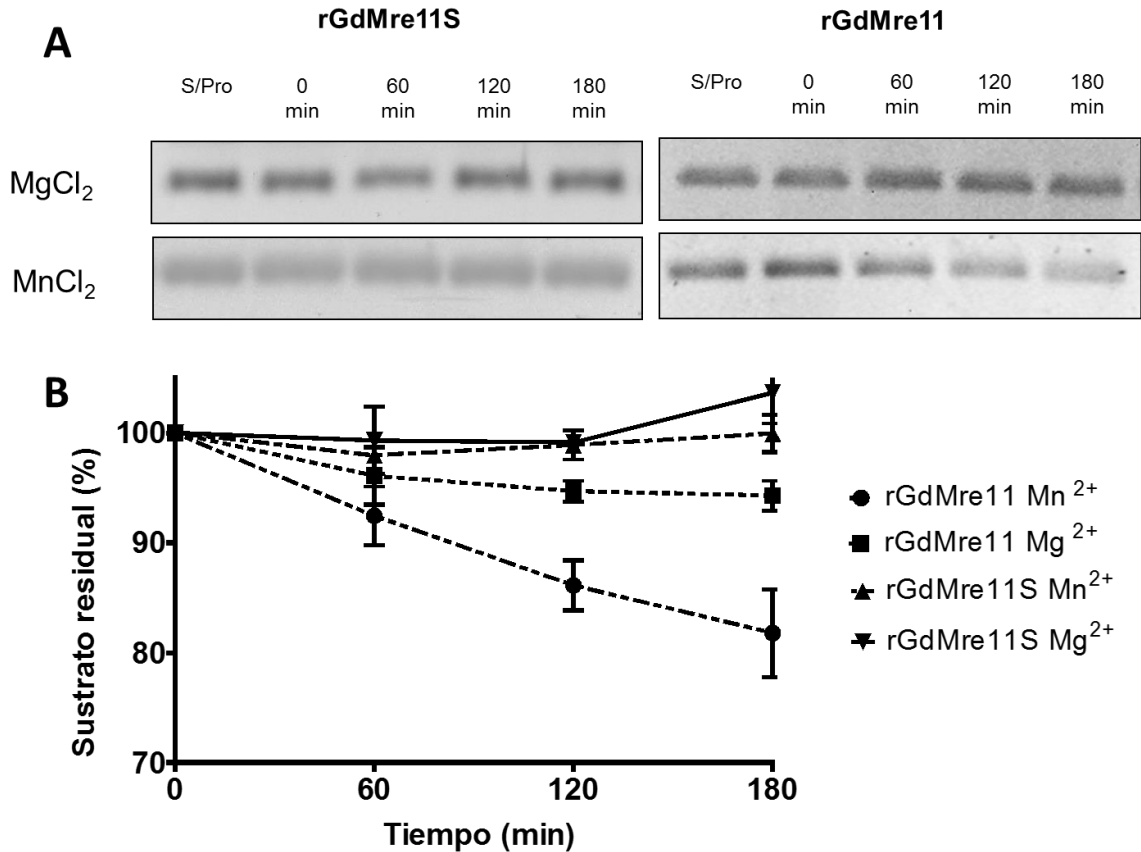
Figura 8.9. Ensayo de retardamiento de DNA de cadena sencilla del complejo MR de *G. duodenalis*. Las mezclas de reacción tuvieron una sonda de 60-nt de ssDNA marcado con ^{32}ATP sin proteína (carril 1) o cantidades crecientes representados en un triángulo escaleno (0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 mM) de las proteínas purificadas rGdMre11S (carriles 2-5), rGdMre11 (carriles 6 -9) y rGdRad50 (carriles 10-13). Se muestra radiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.

8.3 GdMre11 es una nucleasa dependiente de Mn^{2+} con polaridad 3'-5' modulada por GdRad50

Las actividad de Mre11 como exonucleasa dependiente de Mn^{2+} de polaridad 3'-5' en DNA de doble cadena en el complejo MR es primordial para sus funciones biológicas (Assenmacher & Hopfner, 2004). Como se observa en la **Figura 8.10 A** y **B** la proteína rGdMre11 tiene una actividad de nucleasa de dsDNA dependiente de Mn^{2+} que incrementa con el tiempo, reflejada en la pérdida del fragmento de dsDNA en el curso temporal. Se observa también que rGdMre11S no presenta ninguna actividad, un indicativo de que es necesario la presencia de la porción C-

terminal que contiene los sitios de unión a DNA para que se lleve a cabo la actividad de nucleasa de dsDNA. Como control se utilizó Mg^{2+} el cuál no promovió la degradación del fragmento de 150 pb.

Figura 8.10 Actividad de nucleasa dependiente de Mn^{2+} *in vitro* de las proteínas purificadas. (A) Curso



temporal de la actividad de GdMre11S y rGdMre11 con un fragmento de 150-bp de dsDNA en presencia de $MnCl_2$ y $MgCl_2$, el cual fue evaluado y analizado en gel de agarosa al 2%. (B) Representación gráfica de los datos de incluidos en (A).

La polaridad de esta actividad se evaluó con el uso de una sonda de dsDNA marcada radioactivamente en el extremo 5'. En un ensayo temporal con concentraciones fijas de proteína recombinante se observa que rGdMre11 genera fragmentos radiomarcados de diversos tamaños correspondiendo a una actividad de exonucleasa de polaridad 3'-5', misma que es incrementada con la adición de rGRad50 (Figura 8.11B). De modo interesante rGdMre11S no presenta ninguna actividad de nucleasa; sin embargo, la adición de GdRad50 promueve la actividad

de exonucleasa de polaridad 3'-5' en el fragmento de dsDNA (**Figura 8.11A**), evidenciando un efecto cooperativo de rGdRad50 sobre rGdMre11S, posiblemente proveyendo el sustrato. Para verificar que GdRad50 no tuviese actividad de nucleasa por sí sola, esta se incubó junto con la sonda al máximo tiempo de reacción y no se observó ninguna actividad de nucleasa.

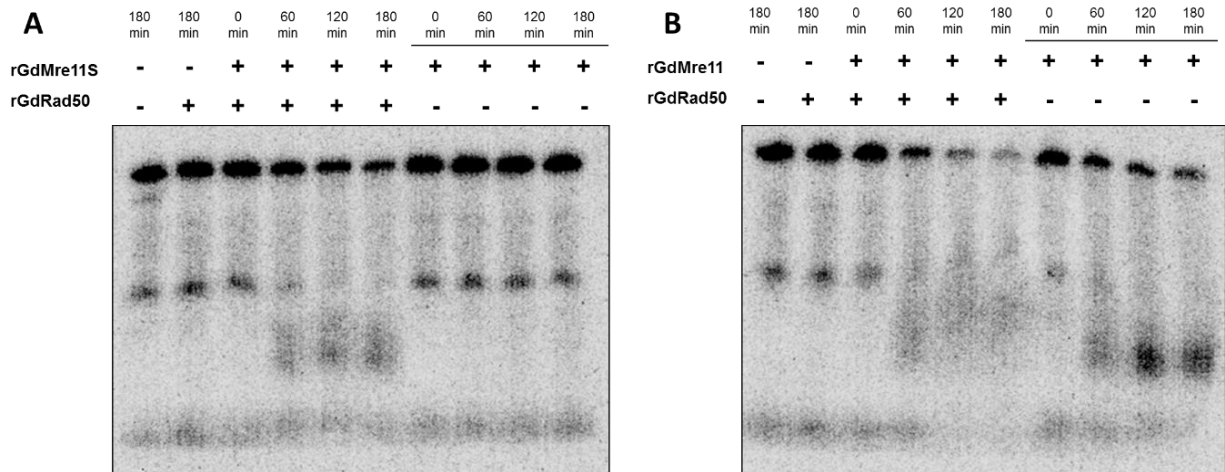


Figura 8.8 Evaluación de la polaridad de exonucleasa 3'- 5 de (A) rGdMre11S y (B) rGdMre11. Curso temporal de la actividad de rGdMre11S, el complejo rGdMre11S + rGdRad50, rGdMre11 y el complejo rGdMre11 + rGdRad50 con una sonda de 110-pb de DNA de doble cadena marcada radioactivamente en 5' con P³². Se muestra radiografía de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida urea 7M/15%.

8.4 GdRad50 posee actividad de ATPasa

Rad50 pertenece a la familia de las ABC-ATPasas no transportadoras (Hopfner, Karcher, Shin, Craig, Arthur, Carney & Tainer, 2000b). La unión a ATP y su hidrólisis están involucradas en los cambios conformacionales que modifican las actividades catalíticas del complejo (Deshpande et al., 2014; Paull & Deshpande, 2014). (Deshpande et al., 2014; Paull & Deshpande, 2014). A este respecto rGdRa50 sola o acompañada con rGdMre11 o GdMre11S se incubó con γ -[³²P]-ATP en un curso temporal. Los productos de reacción se separaron en cromatografía de capa fina, en la que se aprecia que rGdRad50 tiene una actividad de ATPasa observable por la liberación de γ ³²Pi que no se modifica por la adición de rGdMre11S (**Figura 8.12A**) o rGdMre11 (**Figura 8.12B**), de acuerdo con la cuantificación densitométrica (**Figura 8.12C**)

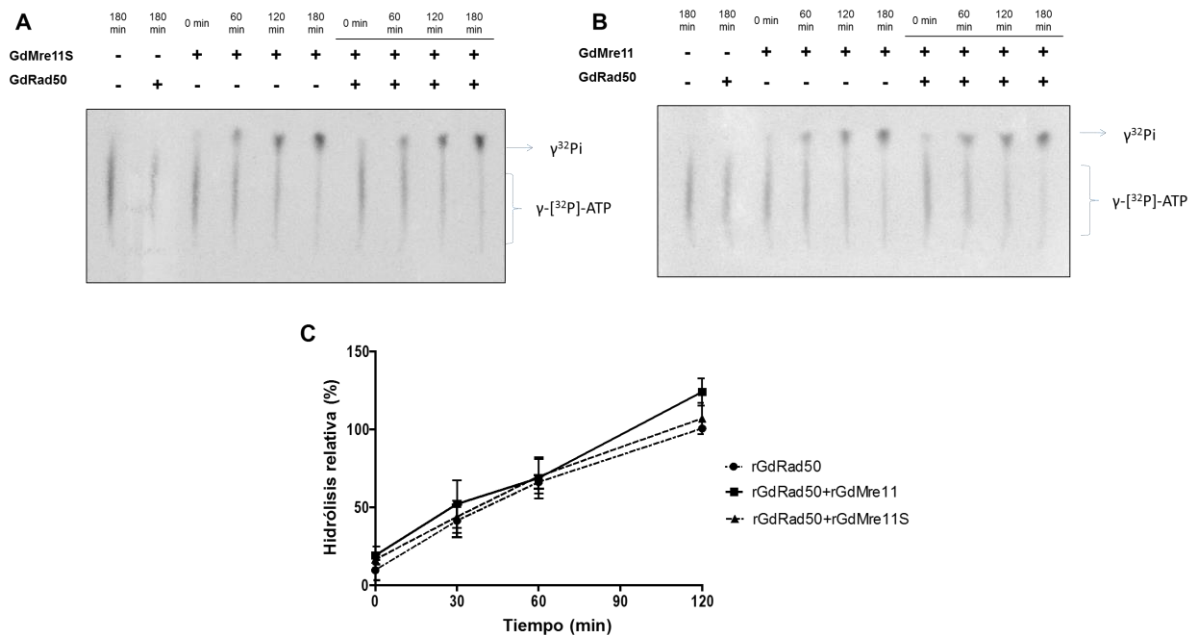


Figura 8.12. Ensayo de hidrólisis de ATP. Gráfica de la hidrólisis de γ - ^{32}P -ATP contra el tiempo debido a la actividad de la proteína rGdRad50, o por el complejo rGdRad50 + rGdMre11S o por la proteína rGdMre11. (A) Curso temporal de la actividad ATPasa de la proteína rGdRad50 y del complejo rGdMre11S/rGdRad50 y (B) de la proteína rGdRad50 y del complejo rGdMre11/rGdRad50 en radiografía de cromatografía en capa fina de celulosa PEI. (C) Cuantificación de γ - ^{32}P i, derivado de la hidrólisis por la actividad de las proteínas recombinantes (A) y (B) gráfica de la actividad contra el tiempo.

8.5 GdRad50 y Mre11 se sobre-expresan en respuesta a daño del DNA

Para evaluar la respuesta del complejo ante daño exógeno al DNA, se indujeron rupturas de la doble cadena (DSB) con radiación gamma (100 Gy) a trofozoitos de *G. duodenalis*. La producción de los transcritos de los genes *Gdmre11S*, *Gdmre11* y *Gdrad50* fue evaluada por RT-PCR en tiempo real semicuantitativo utilizando el gen de ubiquitina como referencia. Como se muestra en la **Figura 8.13**, *Gdmre11* incrementa su expresión relativa en 2 veces ($P < 0.001$) desde los 30 min, alcanzando un máximo a las 4 horas después de la inducción de daño. Por su parte, *Gdrad50* incrementa también dos veces sin ser significativo sino hasta las 2 horas ($P < 0.001$) alcanzando su máximo a las 3 horas y un decremento significativo a la 4 horas. A pesar de que se detectó un transcrito basal de *Gdmre11S*, su expresión no fue modificada aun con la inducción de DSB's.

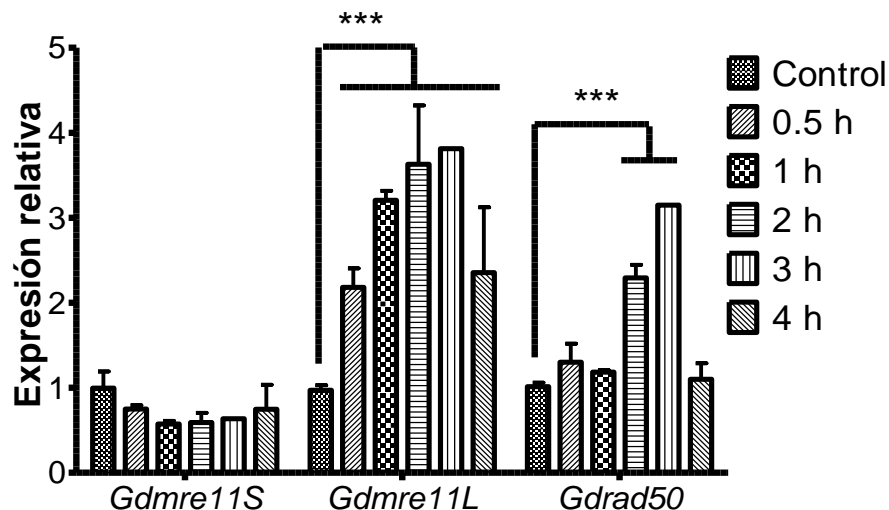


Figura 8.13. RT-PCR semicuantitativo en tiempo real de los genes *Gdmre11*, *Gdmre11S* y *Gdrad50*. Se determinaron y normalizaron los transcritos específicos de los genes *Gdmre11*, *Gdmre11S* y *Gdrad50* previamente irradiados con radiación gamma (100 Gy). Como control endógeno se utilizó ubiquitina. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía. *** P <0,001 en comparación con el control no irradiado

Para corroborar si la sobre expresión de los genes *Gdmre11* y *Gdrad50* corresponde con el incremento de su producto proteico, se procedió a etiquetar los genes del complejo con la secuencia codificante de 3 epítopes continuos de hemaglutinina del virus de influenza. Para este propósito se utilizó en protocolo establecido por Guerguechon y Cande 2011. La integración al genoma de las clonas transgénicas obtenidas (*GdMre11-3HA*, *GdMre11S-3HA* y *GdRad50-3HA*) fueron verificadas mediante PCR de DNA genómico utilizando oligonucleótidos sentido internos combinándolos con oligonucleótidos anti-sentido correspondientes al 5'UTR del contexto genómico nativo o bien a la secuencia plasmídica insertada. Como se observa en la **Figura 8.14 A, B y C**, las clonas transgénicas obtenidas son positivas para la inserción de la etiqueta y además se aprecia que no se introdujeron de forma homocigota ya que al menos uno de los *loci* mantiene el contexto genómico intacto. La generación del producto de la inserción de la etiqueta 3HA fue verificada mediante *Western-blot*. A pesar de que la inserción genómica fue positiva para las tres clonas, sólo *GdMre11-3HA* y *GdRad50-3HA* presentaron productos proteicos que corresponden al peso molecular esperado (90 kD y 150 kD,

respectivamente) mientras que para GdMre11S no se apreció ninguna señal **Figura 8.14 D**. Éste resultado imposibilitó el seguimiento del estudio de GdMre11S, posiblemente este se trata de un pseudogen cuya transcripción ocurre pero que no se traduce.

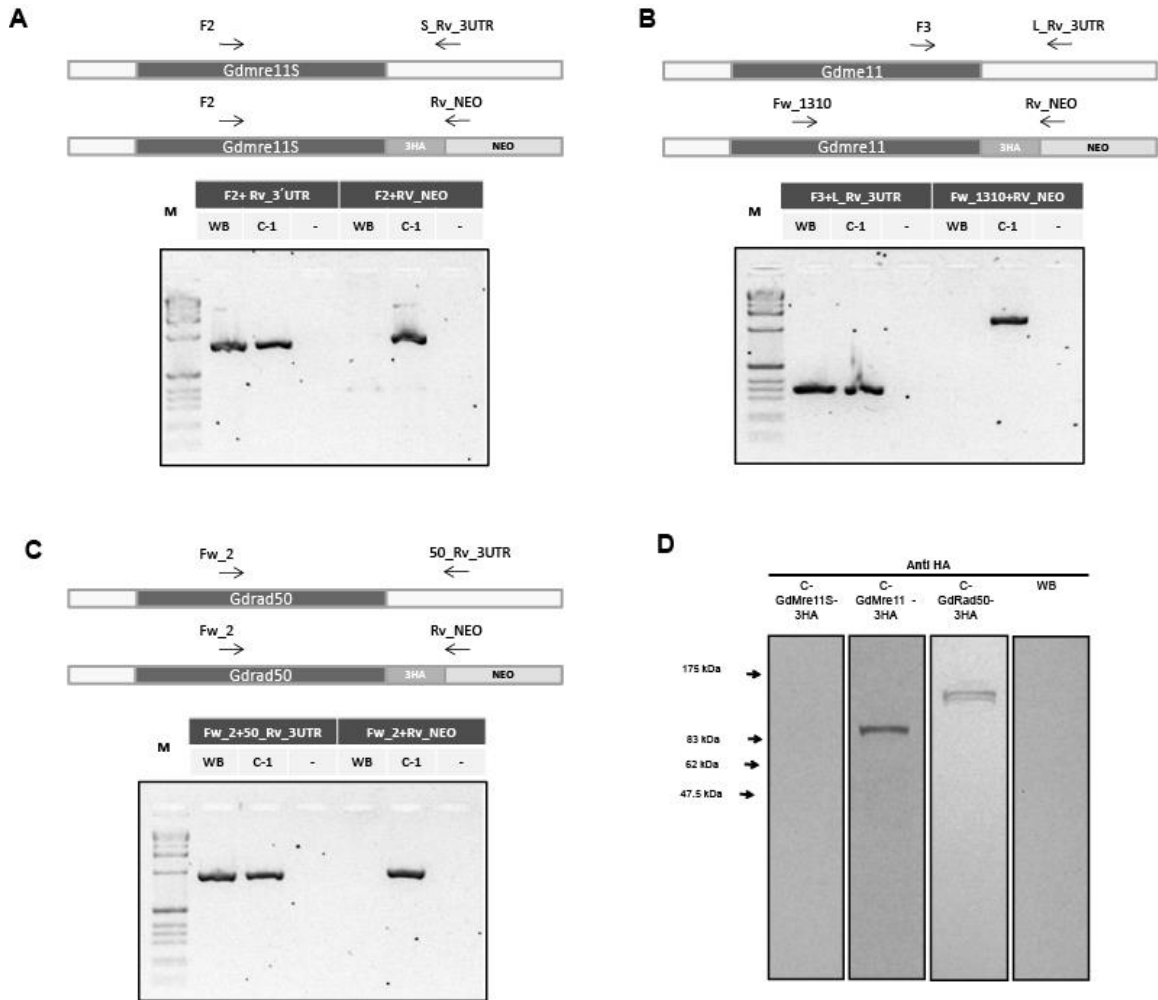


Figura 8.14. Etiquetamiento endógeno del complejo MR con 3HA. Comprobación de la inserción de la etiqueta 3HA en el genoma por PCR en las clonas A) GdMre11S, B) GdMre11 y C) GdRad50. Se observa la representación esquemática del contexto genómico de los genes nativos y modificados. D) Análisis por *Western-blot* de anti-HA de las clonas transgénicas. El aislado B se incluyó en el análisis como control no modificado.

Se generaron rupturas de DNA de doble cadena a las clonas transgénicas GdMre11-3HA y GdRad50-3HA con radiación gama (100 Gy) y la señal de su epítipo (HA) fue evaluada en un curso temporal normalizado con la expresión de alfa-tubulina como control de carga. Para corroborar la generación de DSB's se

examinó la fosforilación de la histona H2AX, la cual se presenta específicamente por daño al DNA (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova & Bonner, 1998) que en el caso de *G. duodenalis* se trata de la H2A por ser la única versión de histona H2A con la que cuenta este parásito (Manning, Reiner, Lauwaet, Dacre, Smith, Zhai, Svard & Gillin, 2011). Como se aprecia en la **Figura 8.15 A y B** existe un incremento en la fosforilación de H2A acompañada de un ligero incremento de la expresión proteica desde los 30 min con un máximo alcanzado a las 4 hr ($P < 0.06$) para ambas proteínas del complejo (GdMre11 y Rad50). Indicativo de la modulación de la expresión de las proteínas del complejo MR del parásito ante la inducción exógena de DSB's.

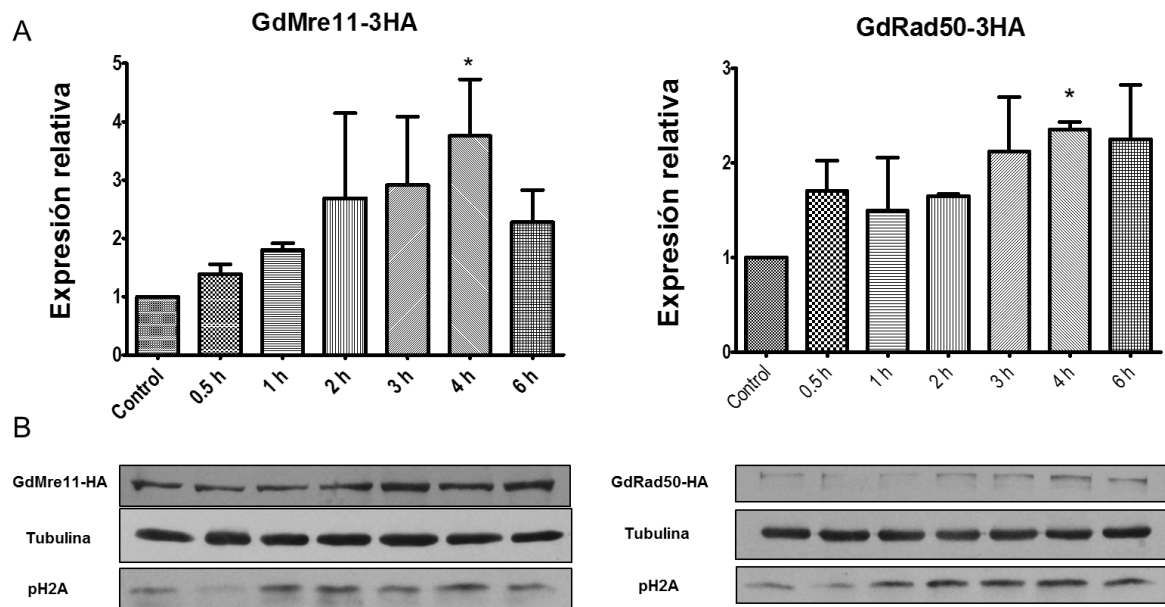


Figura 8.15 Análisis por Western blot de las proteínas etiquetadas con HA GdMre11 y GdRad50 de *G. duodenalis*. Los trofozoitos de *Giardia* fueron irradiados con radiación gamma (100 Gy) y se determinaron los niveles de las proteínas GdMre11 y GdRad50 utilizando un anticuerpo anti-HA. (A) Cuantificación de Western blots normalizados con tubulina como control de carga. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. * $P < 0.05$ en comparación con los controles no irradiados. (B) Se muestra el gel representativo de la fosforilación de GdH2A como señal de DSB.

8.6 GdRad50 y GdMre11 tienen una localización nuclear independiente al daño al DNA

Para determinar la localización subcelular de las proteínas GdMre11 y GdRad50 se realizó Inmunofluorescencia de las clonas transgénicas GdMre11-3HA

y GdRad50-3HA con el anticuerpo anti-HA. En condiciones normales ambas se localizaron en el núcleo (**Figura 8.16 A y B**) con un patrón ligeramente granular. En condiciones de daño al DNA, estas proteínas se agregan en los sitios de reparación denominados *foci* (Carney, Maser, Olivares, Davis, Le Beau, Yates, Hays, Morgan & Petrini, 1998; Nelms, Maser, MacKay, Lagally & Petrini, 1998). Cuando éstas fueron irradiadas (100 Gy) se mantuvo el patrón de localización granular, aparentemente sin una formación clara de *foci* (**Figura 8.16 A y B**). En humanos, la presencia de NBS1 es necesaria para la translocación nuclear del complejo ya que proporciona las secuencias de señalización nuclear (NLS) al complejo (Cerosaletti, Wright & Concannon, 2006). En ausencia de un posible homólogo en *G. duodenalis* se realizó la búsqueda *in silico* de posibles NLS tanto en GdMre11 como GdRad50. Mientras que para GdRad50 no se obtuvo ninguna predicción, para GdMre11 se notó una secuencia en el extremo amino en las posiciones 45-73 con alta predicción de NLS (Score 8.1), cabe aclarar que valores mayores a 8 son indicativos de proteínas exclusivamente localizadas en núcleo (Kosugi et al., 2009). Este resultado indica que GdMre11 junto con GdRad50 en complejo podrían por si solas translocarse al núcleo, aunque dejándolas desprovistas de generar *foci*, actividad exclusiva de NBS1 por residir en el dominio FHA (Tauchi, Kobayashi, Morishima, Matsuura, Nakamura, Shiraishi, Ito, Masnada, Delia & Komatsu, 2001) con el que no cuenta GdMre11 o GdRad50.

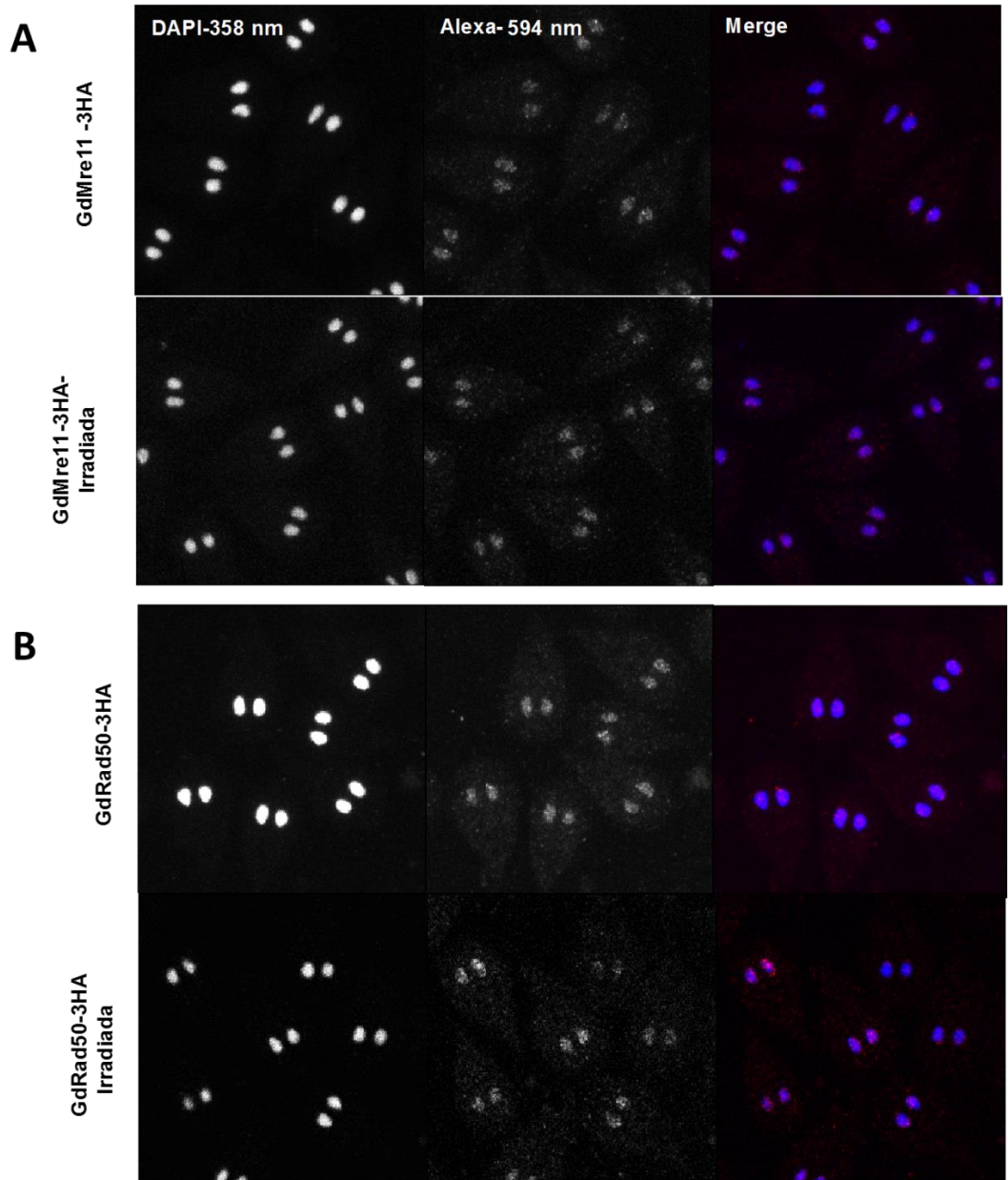


Figura 8.16. Localización subcelular de las proteínas etiquetadas del complejo MR. Inmunofluorescencia de A) Trofozoitos transgénicos GdMre11-3HA irradiados y no irradiados. B) Transgénico GdRad50-3HA irradiado y no irradiado. Las células fueron evaluadas con el anticuerpo secundario anti-HA acoplado a Alexa Fluor 594. Se utilizó 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) para contrastar el núcleo celular.

8.7 GdMre11 interactúa con la proteína de replicación A (RPA)

Además de las capacidades catalíticas del complejo MRN/X en la respuesta al daño del DNA, de igual importancia son las interacciones con los diversos factores

que participan en la señalización del daño al DNA, regulación del ciclo celular y de la replicación (Lee & Paull, 2004; Maser, Mirzoeva, Wells, Olivares, Williams, Zinkel, Farnham & Petrini, 2001; Olson, Nievera, Liu, Lee, Chen & Wu, 2007). La mayoría de estas interacciones están mediadas por NBS1 o Xrs2, y debido a que no se encontró un homólogo de éstos durante nuestra búsqueda, se exploró la interacción de GdMre11 con la proteína de reparación A (RPA), proteína de unión a ssDNA que juega un papel importante en procesos de replicación, recombinación homóloga, mantenimiento de los telómeros y regulación del ciclo celular (Oakley & Patrick, 2010). Mre11 interactúa directamente con RPA posiblemente para prevenir la unión inespecífica de la cadena de ssDNA con extremo 3' prominente o bien para protegerla de su degradación (Lee & Paull, 2004; Robison, Elliott, Dixon & Oakley, 2004). Para determinar esta interacción, se hizo uso de la proteína recombinante de *G. duodenalis* GdRPA etiquetada con 6X-His (Martínez-Reyes, 2013). Tanto la proteína GdMre11HA como GdRPA-His fueron inmovilizadas en columnas de anti-HA y Ni-agarosa respectivamente e incubadas con extractos proteicos de su contraparte. Para descartar que la interacción sea mediada por DNA, ya que ambas proteínas se unen a éste, un tratamiento previo de los extractos con DNasa I fue también incluido en el ensayo. Como se observa en la **Figura 8.17B y C** GdMre11-HA interactúa directamente con GdRPA-His independiente de la unión a DNA. Ésta interacción confirma el posible papel que el complejo puede tener en la amplia gama de procesos en los que participa RPA. En humanos la interacción de RPA con Mre11 está mediada por dos residuos contiguos de ácido aspártico cuya mutación genera un desajuste del ciclo celular en respuesta al daño del DNA (Oakley, Tillison, Opiyo, Glanzer, Horn & Patrick, 2009). En la búsqueda de la posible conservación de estos residuos encontramos que sólo un ácido aspártico está conservado contiguo a una serina cuya fosforilación podría mimetizar estructuralmente la presencia del ácido aspártico **Figura 8.17D** (Leger, Kempf, Lee & Brandt, 1997).

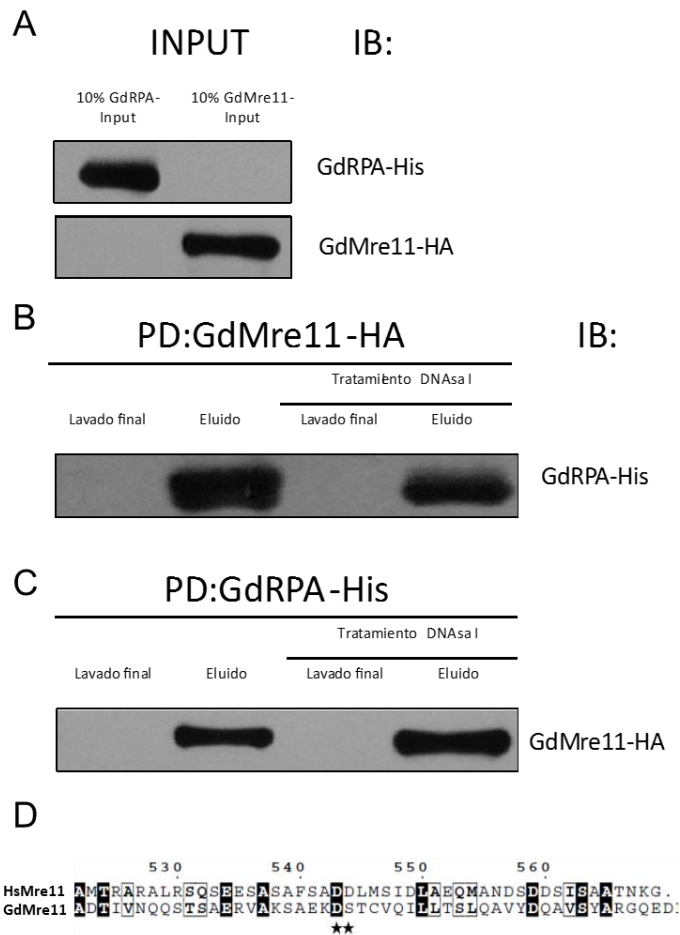


Figura 8.17. Interacción de GdMre11 y GdRPA. (A) *Western-blot* del 10% de extracto utilizado para la inmovilización de GdMre11-3HA y GdRPA-6xHis. (B) Inmovilización de GdMre11-3HA e incubación con GdRPA-6xHis. (C) Inmovilización de GdRPA-6xHis e incubación con GdMre11-3HA. Los eluidos fueron evaluados por *Western blot* con anti-HA y anti-his para evidenciar la presencia de GdMre11HA y GdRPA-His respectivamente. (D) Alineamiento de la región de los aminoácidos de Mre11 de humano (HsMre11) involucrados en la unión de RPA comparado con GdMre11. Caracteres blancos en recuadro negro indican identidad mientras que los recuadros blancos con caracteres negros indican similitud. Los asteriscos señalan los residuos de ácido aspárticos relevantes para la interacción con RPA.

8.8 GdMre11 es susceptible a inhibición por Mirina y desacopla la señalización de daño al DNA.

La Mirina es capaz de inhibir la actividad de nucleasa de Mre11, y como efecto secundario inhibir la activación de ATM dependiente del complejo MRN (Dupre, Boyer-Chatenet, Sattler, Modi, Lee, Nicolette, Kopelovich, Jasin, Baer, Paull & Gautier, 2008). En este sentido, se evaluó si GdMre11 era blanco de esta

inhibición y de manera indirecta se evaluó la actividad de la proteína ATM mediante la fosforilación de su sustrato en *G. duodenalis*, la histona H2A. Como se observa en la **Figura 8.18**, las concentraciones crecientes del inhibidor tienen como consecuencia una reducción de la fosforilación de H2A cuando ésta es inducida por radiación gama, como control se evaluó la fosforilación de la histona sin irradiar y en presencia del DMSO como vehículo del fármaco.

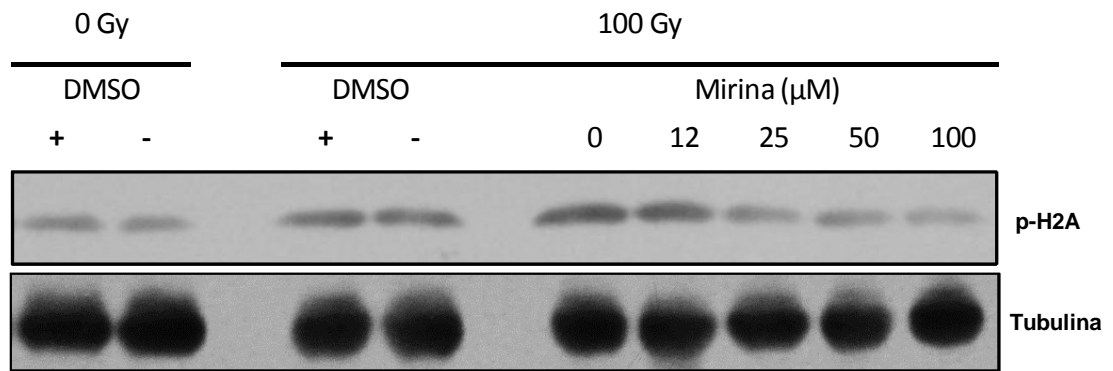


Figura 8.18. La Mirina impide la fosforilación GdH2A a través de la inhibición Mre11. Se usaron concentraciones crecientes de Mirina para tratar trofozoítos de *Giardia* irradiados con radiación gamma (100 Gy). Se determinaron los niveles de fosforilación de GdH2A por *Western blot*. Se utilizó alfa-tubulina como control de carga y DMSO (20 mg/ml) como vehículo.

9. Discusión

El complejo MRN es una pieza fundamental en el metabolismo de la reparación del DNA y particularmente de la reparación de DSB. La mayoría del conocimiento que se tiene hasta el momento fue generado en el modelo humano, levadura, arquea y bacteriófago (Herdendorf, Albrecht, Benkovic & Nelson, 2011; Hopfner et al., 2000a; Lafrance-Vanasse, Williams & Tainer, 2015; Stracker & Petrini, 2011). Pocos son los reportes en los que se ha estudiado al complejo o alguna de las proteínas de sus miembros en parásitos protozoarios (Laffitte, Genois, Mukherjee, Legare, Masson & Ouellette, 2014; Lopez-Camarillo, Lopez-Casamichana, Weber, Guillen, Orozco & Marchat, 2009; Lopez-Casamichana, Orozco, Marchat & Lopez-Camarillo, 2008; Lukaszewicz, Howard-Till, Novatchkova, Mochizuki & Loidl, 2010; Robinson, McCulloch, Conway, Browitt & Barry, 2002). El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización del complejo MR (Mre11-Rad50) en *G. duodenalis*, uno de los protozoarios más representativos por su importancia clínica y evolutiva (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist, Ringqvist, Troell & Svard, 2010).

Los miembros básicos del complejo son las proteínas Mre11 y Rad50 que se encuentran altamente conservadas en todos los organismos; mientras que un tercer miembro, NBS1 en humanos o su homólogo en levadura Xrs2 está menos conservada, sin encontrar hasta el momento ningún homólogo en procariontes (Stracker et al., 2007; Stracker et al., 2004). En este estudio no pudimos localizar algún gen homólogo a NBS1/Xrs2, consistente con la hipótesis de que *G. duodenalis* es un parásito minimalista (Morrison et al., 2007). En el resto de organismos protozoarios parece que no son excepción ya que sólo se han encontrado homólogos con bajos índices de confiabilidad para NBS1 *in silico* para los organismos unicelulares *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Marchat, Lopez-Casamichana, Orozco & Lopez-Camarillo, 2011). Es posible que la afirmación de que NBS1/Xrs2 es exclusivo de eucariotas no aplique para los protozoarios y que las actividades que normalmente realiza el complejo sean realizadas por el complejo

bivalente, o bien que para este grupo de organismos es tan divergente que resulta imposible determinar su presencia mediante búsquedas bioinformáticas.

En nuestro análisis *in silico* de la presencia de Mre11 se encontraron dos posibles proteínas una de 90 kDa (GdMre11) y otra 30 kDa (GdMre11S) cuyos genes codificantes se encuentran en *loci* distintos en el genoma, producto de un posible evento de duplicación. La duplicación de los genes Mre11 no está muy documentada sólo en análisis *in silico* se ha mostrado este evento en *E. histolytica*, *Zea mays* (Malik, Pightling, Stefaniak, Schurko & Logsdon, 2008) y entre especies de *Drosophila* (Reis, Sousa-Guimarães, Vieira, Sunkel & Vieira, 2011).

En este trabajo se observó que GdMre11S mantiene actividades limitadas catalíticas, que no presenta ningún producto proteico después de su etiquetamiento con HA ni tampoco ninguna estimulación a nivel transcripcional de su RNA mensajero a pesar de mantener un nivel basal de mRNA. Así, creemos que puede tratarse de un pseudogen cuyo transcrito no produce una proteína así como ocurre con otros RNAs en el parásito (Chen, Collins, Biggs & Penny, 2009). Adicionalmente, éste no está distribuido homogéneamente en todos los ensamblajes de *Giardia*, lo que indica que su función puede ser no tan relevante como para conservarse a lo largo de los ensamblajes, a pesar de que sí existió un proceso de duplicación por la observación de que la proteína más pequeña encontrada para el ensamblaje B solo presenta los *motifs* II y III de fosfoesterasa.

En forma general, encontramos poca similitud en las proteínas del complejo MR de *Giardia* al analizar la secuencia completa de sus proteínas y compararla con el resto de sus homólogos de otras especies, característica que no es exclusiva del parásito por presentar genes altamente divergentes (Morrison et al., 2007). Esto contrasta con los residuos altamente conservados en los dominios catalíticos, y es consistente con que éstos son los dominios más conservados en todas las proteínas de la reparación de DNA (Aravind et al., 1999). El análisis del alineamiento de los dominios de Rad50 respecto a GdRad50 nos indica que los motivos CXXC y Q-loop están desplazados, esto puede ser producto de inserciones de 8- 101 aminoácidos habituales en el parásito que parecen estar relacionadas con su estabilidad

(Morrison et al., 2007). En las proteínas Rad50 convencionales la región intermedia a los dominios Walker A y Walker B se encuentran regiones rígidas altamente enriquecidas de hélices superenrolladas (de Jager et al., 2004). Sin embargo, se ha observado que la carencia de estas estructuras en otras proteínas Rad50 podría favorecer la participación del complejo en otras funciones como rescate de la horquilla de replicación (van Noort, van Der Heijden, de Jager, Wyman, Kanaar & Dekker, 2003). En este sentido, que la predicción de estructura de GdRad50 no revele un alto enriquecimiento de hélices superenrolladas podría ser una característica que le permitiera su participación en diversas actividades en el metabolismo de DSB's.

Las características estructurales predichas *in silico* fueron consistentes con las actividades catalíticas identificadas ya que la dependencia catiónica predicha por el hallazgo del posible sitio de unión a Mn^{2+} coincidió con la observación de su dependencia por este catión experimentalmente de la proteína GdMre11. Adicionalmente se demostró que tiene la actividad exonucleasa 3'-5' dsDNA, actividad esencial para generar los extremos prominentes de cadena sencilla de DNA 3', necesarios para la invasión de la cadena durante el proceso de recombinación (Garcia, Phelps, Gray & Neale, 2011).

De acuerdo con la predicción de la conservación de los dominios Walker A y Walker B en GdRad50, así como la inferencia estructural en la que se observa un estados transitorio entre ATP y ADP, se demostró experimentalmente que rGdRad50 es una ATPasa. Esta actividad recientemente se ha considerado de suma importancia, ya que dicta los estados conformacionales del complejo que pueden regular las actividades de nucleasa de Mre11 y por lo tanto la reparación de las cadenas dañadas (Lafrance-Vanasse et al., 2015; Majka, Alford, Ausio, Finn & McMurray, 2012). Las actividades moduladoras observadas por rGdRad50 sobre la actividad de nucleasa de GdMre11 son consistentes con lo observado en otros organismos (Paull & Gellert, 1998; Trujillo & Sung, 2001) y señala que sus actividades y la regulación de éstas por el complejo son actividades conservadas en el parásito.

Conforme a lo esperado, la deficiencia del dominio C-terminal de la proteína rGdMre11S, involucrado en unir a DNA (Dery, Coulombe, Rodrigue, Stasiak, Richard & Masson, 2008), la hace incapaz de unir al DNA y por lo tanto anula su capacidad de nucleasa a pesar de que algunos residuos del dominio de fosfoesterasa están involucrados en la unión a ssDNA (Stracker & Petrini, 2011). También sugiere que su recuperación de nucleasa por la presencia de rGdRad50 se debe a que esta es capaz de suministrar el sustrato de DNA a rGdMre11S. De ser así, esta interacción deberá estar basada por residuos pertenecientes al dominio N-terminal de Mre11 del que no se han descrito sitios de interacción con Rad50 o que sean particulares del parásito (Gao & Nelson, 2014).

La respuesta del complejo MR de *Giardia* sobre el daño causado al DBS por la radiación ionizante confirma su papel en la reparación al daño en DNA en parásitos. Al haber escasos estudios que evalúan este tipo de respuesta, sólo la podemos comparar con *E. histolytica* en la cual, después de irradiar con luz UV, revela la inducción de Mre11 a las 12 h mientras Rad50 parece ser reprimida (Lopez-Casamichana et al., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden mejor con la respuesta observada en linfocitos humanos, en los que hay una inducción de estos genes a las 5 h después de irradiar con radiación gamma (0.07 Gy) (Singh, Bala, Kumar, Kumar & Dhiman, 2009).

La estrategia para la adición de la etiqueta de 3HA a cada uno de los genes que conforman el complejo MR, dio como resultado clones heterocigotas para la modificación a nivel genético deseada, por lo tanto los análisis posteriores con estas proteínas no representan el total de proteína producida por el parásito sino el de al menos uno de sus alelos. Con esta premisa encontramos que la inducción del mRNA de Gdmre11 y Gdrad50 concuerda con el incremento de sus proteínas, indicando que el parásito monta una respuesta transcripcional y traduccional de los genes GdMre11 y GdRad50 al daño por DSB's, aunque este último podría ser mayor, ya que sólo se evaluaron las proteínas etiquetadas. En contraste, en reportes de líneas celulares de humano después de ser irradiadas con radiación gamma demostraron una modulación en la expresión del mRNA en estas, pero no

en los niveles de las proteínas de las mismas (Dolganov, Maser, Novikov, Tosto, Chong, Bressan & Petrini, 1996; Maser, Monsen, Nelms & Petrini, 1997), & Petrini, 1997).

La ausencia de NBS1/Xrs2 trae consigo la incapacidad de formar *foci* sin que necesariamente se pierda la capacidad para reparar DNA (Tauchi et al., 2001; Zhao et al., 2002). Este podría ser el caso del modelo minimalista del complejo de *G. duodenalis*, el que la ausencia de éste último provoca una deficiencia en la formación de *foci* sin poner en juego la estabilidad genómica. La observación de esta incapacidad es congruente con otros reportes de incidencia de daño al DNA con fármacos, en el que tampoco se observan formación foci de H2A (Hofstetrova, Uzlikova, Tumova, Troell, Svard & Nohynkova, 2010; Uzlikova & Nohynkova, 2015). La habilidad de formar *foci* durante la evolución de los eucariotas pudo haber aparecido con la adquisición de las capacidades de NBS1/Xrs2 del complejo.

La proteína de replicación A (RPA) es un elemento indispensable en casi todos las vías metabólicas del procesamiento de DNA, como replicación, reparación, recombinación, ciclo celular y regulación de los puntos de control del daño al DNA (Zou, Liu, Wu & Shell, 2006). El que el complejo MR interactúe vía GdMre11 incrementa considerablemente las capacidades que este complejo tiene en el metabolismo del DNA del parásito y de la conservación de las múltiples capacidades del complejo. Por otro lado, este resultado indica que la interacción entre RPA y Mre11 documentada en otros organismos, se ha conservado en este parásito.

Se han realizado análisis bioinformáticos en el que se ha encontrado homólogos para el complejo MRN/X en varios organismos protozoarios (Baeza, Ruiz & Negritto, 2010; Hiraku, Sakai, Shibata, Kamijima, Hisanaga, Ma, Kawanishi & Murata, 2014). Específicamente en *T. brucei* una doble mutante *mre11* (-/-) presenta lento crecimiento, acumulación de reordenamientos cromosómicos sin translocación ni pérdida de telómeros, sensibilidad al agente de daño al DNA bleomicina, (Robinson et al., 2002). Mientras que en *Leishmania infantum*, una

mutante similar *mre11* (-/-) reduce su capacidad de generar amplicones lineales involucrados directamente en la resistencia a fármacos (Laffitte et al., 2014).

El desacople de la activación de ATM por la presencia de Mirina sugiere que el sitio catalítico de GdMre11 al que se une el fármaco mantienen características estructurales similares (Shibata et al., 2014), y que además que la vía de señalización al daño se mantienen conservadas. Esto resulta sumamente interesante sin la participación de un homólogo a NBS1 o Xrs2 y podría sugerir un modelo minimalista del complejo MR cuya presencia del tercer miembro sea prescindible más no sus funciones como es el caso de la transducción de señales de daño al DNA observable en éste trabajo.

Se propone que el mecanismo preferencial del parásito para la reparación de DSB's es la recombinación homóloga, esto al no encontrar proteínas homólogas a las que participan en el mecanismo NHEJ como Ku70/80, además de estar continuamente en síntesis de su DNA y de mantener una baja heterocigocidad alélica. Por lo tanto, como se muestra en la **Figura 9.1**, cuando se generen DSB de manera endógena o exógena en el parásito, dadas las propiedades estructurales y funcionales, el complejo MR podrá reconocer y unir DBS para mantener adyacente la cromátida hermana y también procesarlas y generar ssDNA 3' OH. Estas estructuras son necesarias para la reparación por recombinación homóloga a las que de inmediato se unirá GdRPA que también es capaz de interactuar con GdMre11. El complejo, en particular la actividad de nucleasa de GdMre11 también es capaz de mediar la actividad de una posible ATM de *G. duodenalis* (GdATM) cuya activación fosforila a la histona GdH2A que hará que se amplifique la señal de daño.

Al ser considerado este parásito como un organismo de divergencia temprana, nuestros resultados señalan que todas las actividades determinadas en este estudio podrían ser ancestrales en la historia evolutiva de los eucariotas en el metabolismo de la DSB's.

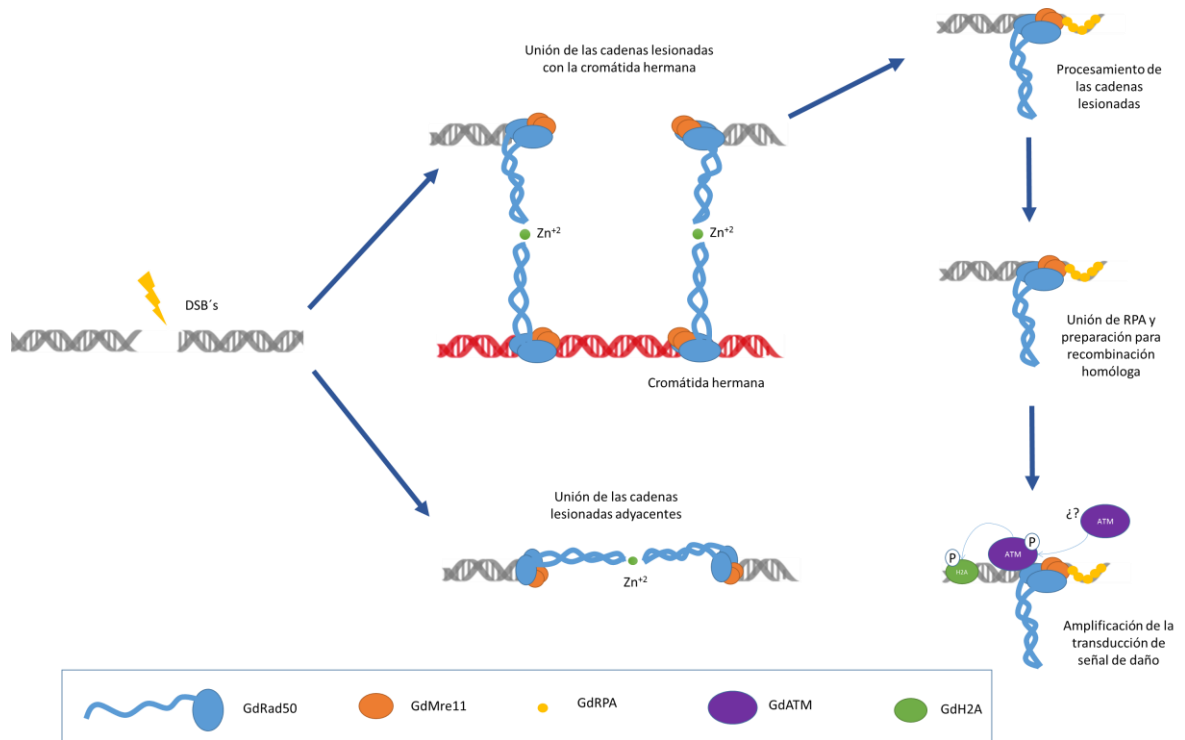


Figura 9.1 Esquema general de la participación del complejo MR de *G. duodenalis* en el mecanismo de reparación homóloga. Después de la inducción de la DSB, el complejo MR reconoce la lesión, mantiene las cadenas lesionadas adyacentes o unidas a la cromátida hermana. Los extremos lesionados se procesan originando ssDNA a la que se une GdRPA para su reparación por recombinación homóloga. GdMre11 regula la activación de la cinasa ATM que amplificará la señal de daño fosforilando a la histona H2A.

10. Conclusiones

- *G. duodenalis* cuenta con dos secuencias codificantes para la proteína Mre11, ambas presentan los dominios conservados de fosfodiesterasa pero solo una de ellas posee la región de unión a DNA.
- Se identificó una secuencia codificante para GdRad50 que posee los dominios característicos de una ABC ATPasa.
- GdMre11 es una exonucleasa de polaridad 3'-5' dependiente de Mn^{+2} cuya actividad es regulada positivamente por GdRad50.
- GdMre11S es posiblemente un pseudogen.
- GdRad50 es una ATPasa cuya actividad es independiente de la presencia de GdMre11S o GdMre11.
- Sólo las proteínas GdMre11 y GdRad50 son capaces de unir ssDNA.
- Tanto los transcritos como las proteínas de GdMre11 y GdRad50 se sobre expresan en respuesta al daño al DNA ocasionado por la irradiación gamma en trofozoitos de *G. duodenalis* con una cinética específica.
- Las proteínas GdRad50 y GdMre11L son de localización nuclear y aparentemente no forman foci ante la inducción del DSB.
- GdMre11 interactúa con GdRPA.
- GdMre11 es inhibida por Mirina y esto desacopla la activación de ATM y por consecuencia se afecta la fosforilación de GdH2A.

11. Perspectivas

Parte del material generado en el presente trabajo ha sido utilizado para ver la respuesta de este complejo durante el enquistamiento (Maya-García, 2013) y también en respuesta al tratamiento con metronidazol (Ordóñez-Quiroz, 2015).

Para ampliar información sobre las actividades bioquímicas podrían realizarse mutaciones dirigidas en los sitios catalíticos de fosfoesterasa para GdMre11 o de ATPasa para GdRad50, adicionalmente mutaciones del *motif* CXXC o en los dominios de hélice superenrollada de GdRad50 podrían mostrar indicios sobre las actividades estructurales del complejo. Modificaciones de los sitios de posible interacción con RPA o en las putativa NLS para GdMre11 podrían corroborar las hipótesis aquí establecidas.

El reconocimiento del tercer miembro del complejo es parte fundamental para las perspectivas de este trabajo. Para tal objetivo se podrían hacer análisis proteómicos de las proteínas asociadas a GdMre11-3HA durante su inmunoprecipitación. Además, este tipo de análisis también nos podrían revelar la identidad de algunos otros mediadores que interactúan normalmente con el complejo como CtIP y ATM.

12. Referencias

- Adam RD. 2001.** Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* **14**: 447-475.
- Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs SM, Hernandez MM, Narla NP, Patel RB, Porcella SF, Nash TE. 2013.** Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol* **5**: 2498-2511.
- Andersen KR, Leksa NC, Schwartz TU. 2013.** Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins* **81**: 1857-1861.
- Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svard SG. 2010.** Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* **8**: 413-422.
- Aravind L, Walker DR, Koonin EV. 1999.** Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* **27**: 1223-1242.
- Assenmacher N, Hopfner KP. 2004.** MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* **113**: 157-166.
- Baeza C, Ruiz E, Negritto M. 2010.** Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd. (*Alstroemeriaceae*) complex sensu Bayer (1987). *Genet Mol Biol* **33**: 119-124.
- Birky CW, Jr. 2010.** *Giardia* sex? Yes, but how and how much? *Trends Parasitol* **26**: 70-74.
- Borde V, Cobb J. 2009.** Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1249-1253.
- Caccio SM, Ryan U. 2008.** Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* **160**: 75-80.
- Caccio SM, Sprong H. 2010.** *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* **124**: 107-112.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J. 2003.** MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**: 29.
- Campbell AT, Wallis P. 2002.** The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Water Res* **36**: 963-969.
- Carnaby S, Butcher PD, Summerbell CD, Naeem A, Farthing MJ. 1995.** Minisatellites corresponding to the human polycore probes 33.6 and 33.15 in the genome of the most 'primitive' known eukaryote *Giardia lamblia*. *Gene* **166**: 167-172.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. 1998.** The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**: 477-486.
- Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yopez-Mulia L, Gomez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, Munoz O. 2009.** Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **80**: 6-10.
- Cersaletti K, Wright J, Concannon P. 2006.** Active role for nibrin in the kinetics of atm activation. *Mol Cell Biol* **26**: 1691-1699.
- Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR. 2007.** Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol* **17**: 1984-1988.

- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ. 2000.** The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37-41.
- Chen XS, Collins LJ, Biggs PJ, Penny D. 2009.** High throughput genome-wide survey of small RNAs from the parasitic protists *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biol Evol* **1**: 165-175.
- D'Amours D, Jackson SP. 2001.** The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* **15**: 2238-2249.
- D'Amours D, Jackson SP. 2002.** The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-327.
- de Jager M, Trujillo KM, Sung P, Hopfner KP, Carney JP, Tainer JA, Connelly JC, Leach DR, Kanaar R, Wyman C. 2004.** Differential arrangements of conserved building blocks among homologs of the Rad50/Mre11 DNA repair protein complex. *J Mol Biol* **339**: 937-949.
- Dery U, Coulombe Y, Rodrigue A, Stasiak A, Richard S, Masson JY. 2008.** A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol Cell Biol* **28**: 3058-3069.
- Deshpande RA, Williams GJ, Limbo O, Williams RS, Kuhnlein J, Lee JH, Classen S, Guenther G, Russell P, Tainer JA, Paull TT. 2014.** ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J* **33**: 482-500.
- Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petrini JH. 1996.** Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* **16**: 4832-4841.
- Dudas A, Chovanec M. 2004.** DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* **566**: 131-167.
- Dupre A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee JH, Nicolette ML, Kopelovich L, Jasin M, Baer R, Paull TT, Gautier J. 2008.** A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol* **4**: 119-125.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. 2005.** Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**: 605-611.
- Ford BJ. 2005.** The discovery of *Giardia*. *Microscope* **53**: 147-153.
- Franzen O, Jerlstrom-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svard SG. 2009.** Draft genome sequencing of *giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog* **5**: e1000560.
- Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. 2004.** The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 5-10.
- Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, Ohta K. 1998.** Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* **17**: 6412-6425.
- Gallego E, Alvarado M, Wasserman M. 2007.** Identification and expression of the protein ubiquitination system in *Giardia intestinalis*. *Parasitol Res* **101**: 1-7.
- Gao Y, Nelson SW. 2014.** Autoinhibition of bacteriophage T4 Mre11 by its C-terminal domain. *J Biol Chem* **289**: 26505-26513.
- Garcia V, Phelps SE, Gray S, Neale MJ. 2011.** Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* **479**: 241-244.

- Ghosal G, Muniyappa K. 2007.** The characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 complex reveals that Rad50 negatively regulates Mre11 endonucleolytic but not the exonucleolytic activity. *J Mol Biol* **372**: 864-882.
- Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE. 1988.** Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infect Immun* **56**: 705-707.
- Gourguechon S, Cande WZ. 2011.** Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* **10**: 142-145.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010.** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**: 221-224.
- Hari FJ, Spycher C, Jungmichel S, Pavic L, Stucki M. 2010.** A divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *EMBO Rep* **11**: 387-392.
- Harper JW, Elledge SJ. 2007.** The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**: 739-745.
- Hedges SB, Chen H, Kumar S, Wang DY, Thompson AS, Watanabe H. 2001.** A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evol Biol* **1**: 4.
- Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sanchez LB, Muller M, Embley TM. 2001.** Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene* **281**: 123-131.
- Herdendorf TJ, Albrecht DW, Benkovic SJ, Nelson SW. 2011.** Biochemical characterization of bacteriophage T4 Mre11-Rad50 complex. *J Biol Chem* **286**: 2382-2392.
- Hiraku Y, Sakai K, Shibata E, Kamijima M, Hisanaga N, Ma N, Kawanishi S, Murata M. 2014.** Formation of the nitrative DNA lesion 8-nitroguanine is associated with asbestos contents in human lung tissues: a pilot study. *J Occup Health* **56**: 186-196.
- Hofstetrova K, Uzlikova M, Tumova P, Troell K, Svard SG, Nohynkova E. 2010.** *Giardia intestinalis*: aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Exp Parasitol* **124**: 159-166.
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA. 2002.** The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**: 562-566.
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA. 2001.** Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105**: 473-485.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin D, Fairley C, Tainer JA, Carney JP. 2000a.** Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *J Bacteriol* **182**: 6036-6041.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. 2000b.** Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**: 789-800.
- Horner DS, Hirt RP, Embley TM. 1999.** A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **16**: 1280-1291.
- Huertas P. 2010.** DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 11-16.

- Huertas P, Jackson SP. 2009.** Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**: 9558-9565.
- Inagaki Y, Ford Doolittle W. 2000.** Evolution of the eukaryotic translation termination system: origins of release factors. *Mol Biol Evol* **17**: 882-889.
- Jerlstrom-Hultqvist J, Franzen O, Ankarklev J, Xu F, Nohynkova E, Andersson JO, Svard SG, Andersson B. 2010.** Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics* **11**: 543.
- Jirakova K, Kulda J, Nohynkova E. 2012.** How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection. *Protist* **163**: 465-479.
- Keeling PJ. 2007.** Genomics. Deep questions in the tree of life. *Science* **317**: 1875-1876.
- Keeling PJ, Doolittle WF. 1997.** Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1270-1275.
- Keister DB. 1983.** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**: 487-488.
- Kobayashi M, Hayashi N, Takata M, Yamamoto K. 2013.** NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1. *Genes Cells* **18**: 238-246.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. 2009.** Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 10171-10176.
- Krogh BO, Llorente B, Lam A, Symington LS. 2005.** Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics* **171**: 1561-1570.
- Krogh BO, Symington LS. 2004.** Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233-271.
- Laffitte MC, Genoio MM, Mukherjee A, Legare D, Masson JY, Ouellette M. 2014.** Formation of linear amplicons with inverted duplications in *Leishmania* requires the MRE11 nuclease. *PLoS Genet* **10**: e1004805.
- Lafrance-Vanasse J, Williams GJ, Tainer JA. 2015.** Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol*.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. 2010.** The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* **40**: 1063-1074.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Thompson RC, Steuart RF, Sogin ML. 2009.** Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J Eukaryot Microbiol* **56**: 504-518.
- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. 2007.** Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol* **10**: 554-559.
- Le SQ, Gascuel O. 2008.** An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* **25**: 1307-1320.
- Lee JH, Paull TT. 2004.** Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**: 93-96.
- Lee JH, Paull TT. 2007.** Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**: 7741-7748.
- Leger J, Kempf M, Lee G, Brandt R. 1997.** Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* **272**: 8441-8446.

- Leipe DD, Gunderson JH, Nerad TA, Sogin ML. 1993.** Small subunit ribosomal RNA+ of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol Biochem Parasitol* **59**: 41-48.
- Limbo O, Chahwan C, Yamada Y, de Bruin RA, Wittenberg C, Russell P. 2007.** Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell* **28**: 134-146.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. 2005.** DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**: 497-512.
- Lopez-Camarillo C, Lopez-Casamichana M, Weber C, Guillen N, Orozco E, Marchat LA. 2009.** DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. *Infect Genet Evol* **9**: 1051-1056.
- Lopez-Casamichana M, Orozco E, Marchat LA, Lopez-Camarillo C. 2008.** Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol Biol* **9**: 35.
- Lukaszewicz A, Howard-Till RA, Novatchkova M, Mochizuki K, Loidl J. 2010.** MRE11 and COM1/SAE2 are required for double-strand break repair and efficient chromosome pairing during meiosis of the protist *Tetrahymena*. *Chromosoma* **119**: 505-518.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. 1991.** Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164.
- Lloyd D, Harris JC. 2002.** *Giardia*: highly evolved parasite or early branching eukaryote? *Trends Microbiol* **10**: 122-127.
- Majka J, Alford B, Ausio J, Finn R, McMurray C. 2012.** ATP hydrolysis by RAD50 protein switches MRE11 enzyme from endonuclease to exonuclease. *J Biol Chem* **287**: 2328-2341.
- Malik SB, Pightling AW, Stefaniak LM, Schurko AM, Logsdon JM, Jr. 2008.** An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PloS one* **3**: e2879.
- Manning G, Reiner DS, Lauwaet T, Dacre M, Smith A, Zhai Y, Svard S, Gillin FD. 2011.** The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol* **12**: R66.
- Marchat LA, Lopez-Casamichana M, Orozco E, Lopez-Camarillo C. 2011.** DNA repair in pathogenic eukaryotic cells: Insights from comparative genomics of parasitic protozoan. In: Chen C, ed. *Selected Topics in DNA Repair*. University of San Diego, United States of America: InTech. 572.
- Mark Welch D, Meselson M. 2000.** Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* **288**: 1211-1215.
- Martínez-Reyes DA. 2013.** Clonación, expresión y caracterización in vitro de la proteína de replicación RPA70 de *Giardia duodenalis*. Unpublished Master, CINVESTAV.
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH. 2001.** Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **21**: 6006-6016.
- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. 1997.** hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **17**: 6087-6096.

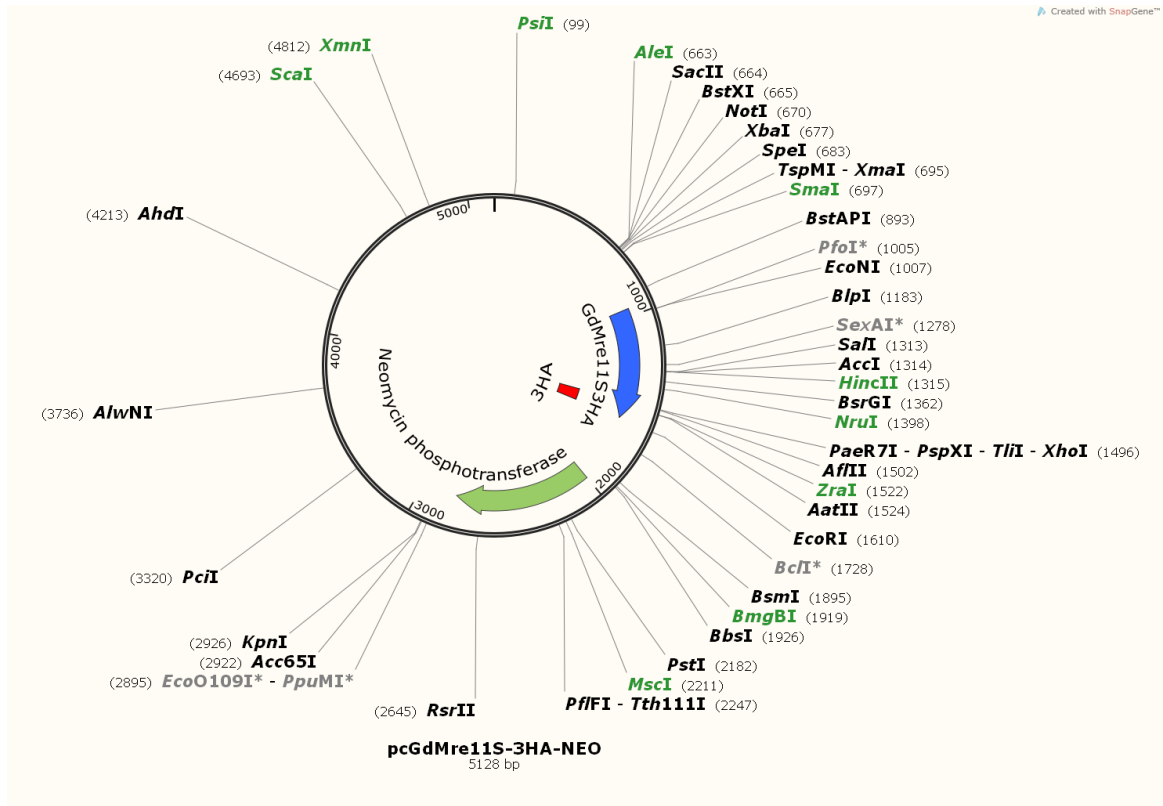
- Maya-García F. 2013.** Identificación de las proteínas Mre11 y Rad50 y su posible participación en reparación al DNA durante el proceso de enquistamiento in vitro de *Giardia duodenalis*. Unpublished Maestría, CINVESTAV-IPN.
- Melo SP, Gomez V, Castellanos IC, Alvarado ME, Hernandez PC, Gallego A, Wasserman M. 2008.** Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**: 347-350.
- Miroux B, Walker JE. 1996.** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. 2009.** Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* **25**: 93-100.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. 2007.** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**: 1921-1926.
- Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K. 2003.** ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**: 1957-1962.
- Negritto MC. 2010.** Repairing Double-Strand DNA Breaks. *Nature Education* **3**: 26.
- Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH. 1998.** In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* **280**: 590-592.
- Nixon JE, Wang A, Field J, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J. 2002.** Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **1**: 181-190.
- O'Handley RM, Buret AG, McAllister TA, Jelinski M, Olson ME. 2001.** Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Int J Parasitol* **31**: 73-79.
- Oakley GG, Patrick SM. 2010.** Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci (Landmark Ed)* **15**: 883-900.
- Oakley GG, Tillison K, Opiyo SA, Glanzer JG, Horn JM, Patrick SM. 2009.** Physical interaction between replication protein A (RPA) and MRN: involvement of RPA2 phosphorylation and the N-terminus of RPA1. *Biochemistry* **48**: 7473-7481.
- Olson E, Nievera CJ, Liu E, Lee AY, Chen L, Wu X. 2007.** The Mre11 complex mediates the S-phase checkpoint through an interaction with replication protein A. *Mol Cell Biol* **27**: 6053-6067.
- Ordóñez-Quiroz Á. 2015.** Determinación del daño al DNA de *Giardia duodenalis* por metronidazol y evaluación de la participación de la vía de reparación por recombinación homóloga. Unpublished Maestría, CINVESTAV-IPN.
- Palmbo PL, Daley JM, Wilson TE. 2005.** Mutations of the Yku80 C terminus and Xrs2 FHA domain specifically block yeast nonhomologous end joining. *Mol Cell Biol* **25**: 10782-10790.
- Paul TT. 2015.** Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem.*
- Paul TT, Deshpande RA. 2014.** The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Exp Cell Res* **329**: 139-147.
- Paul TT, Gellert M. 1998.** The 32 to 52 Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cell* **1**: 969-979.

- Philippe H, Lopez P, Brinkmann H, Budin K, Germot A, Laurent J, Moreira D, Muller M, Le Guyader H. 2000.** Early-branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proc Biol Sci* **267**: 1213-1221.
- Poxleitner MK, Carpenter ML, Mancuso JJ, Wang CJ, Dawson SC, Cande WZ. 2008.** Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science* **319**: 1530-1533.
- Ramesh MA, Malik SB, Logsdon JM, Jr. 2005.** A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol* **15**: 185-191.
- Reis M, Sousa-Guimarães S, Vieira C, Sunkel C, Vieira J. 2011.** Drosophila genes that affect meiosis duration are among the meiosis related genes that are more often found duplicated. *PloS one* **6**.
- Robert X, Gouet P. 2014.** Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* **42**: W320-324.
- Robinson NP, McCulloch R, Conway C, Browitt A, Barry JD. 2002.** Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **277**: 26185-26193.
- Robison JG, Elliott J, Dixon K, Oakley GG. 2004.** Replication protein A and the Mre11.Rad50.Nbs1 complex co-localize and interact at sites of stalled replication forks. *J Biol Chem* **279**: 34802-34810.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858-5868.
- Ryan U, Caccio SM. 2013.** Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* **43**: 943-956.
- Sandoval-Cabrera A. 2009.** Identificación, clonación y evaluación de la actividad in vitro de la proteína putativa Mre11 de *Giardia duodenalis*. Unpublished Master, CINVESTAV-MX.
- Scharer OD. 2003.** Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 2946-2974.
- Schiller CB, Lammens K, Guerini I, Coordes B, Feldmann H, Schlauderer F, Mockel C, Schele A, Strasser K, Jackson SP, Hopfner KP. 2012.** Structure of Mre11-Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 693-700.
- Schrödinger L. 2002.** The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web.
- Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genoio MM, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F, Ismail A, Ismalaj E, Petricci E, Neale MJ, Bristow RG, Masson JY, Wyman C, Jeggo PA, Tainer JA. 2014.** DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol Cell* **53**: 7-18.
- Shima H, Suzuki M, Shinohara M. 2005.** Isolation and characterization of novel xrs2 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **170**: 71-85.
- Shin GA, Bohrerova, Z., Linden, K.G., and Faubert, G.M. . 2005.** DNA repair of UV-irradiated *Giardia lamblia* cyst detected by both infectivity and molecular biological assays. In *3rd IUVA International Congress on Ultraviolet Technologies*.
- Singh S, Bala M, Kumar R, Kumar A, Dhiman SC. 2009.** Modification in the expression of Mre11/Rad50/Nbs1 complex in low dose irradiated human lymphocytes. *Dose Response* **7**: 193-207.

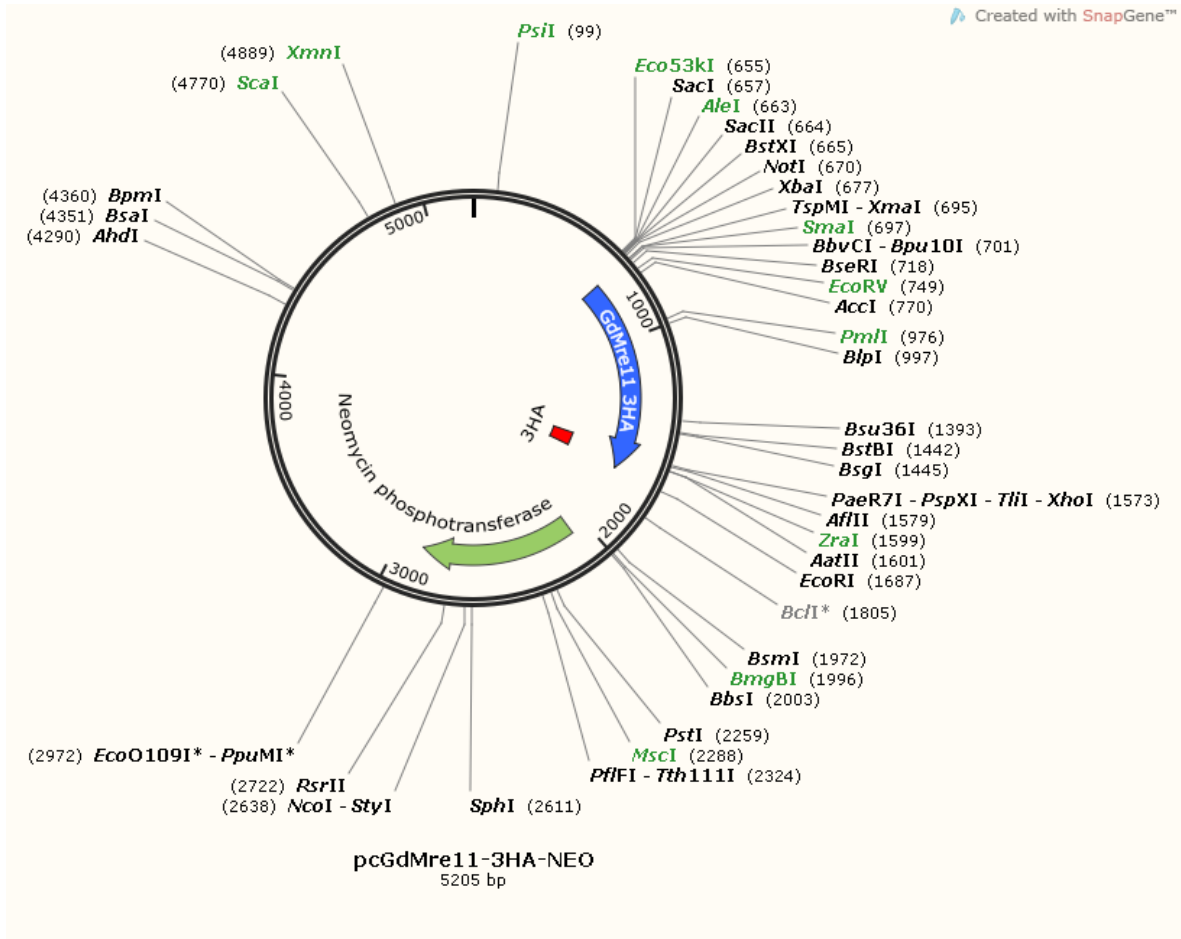
- Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. 1989.** Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**: 75-77.
- Stracker TH, Morales M, Couto SS, Hussein H, Petrini JH. 2007.** The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature* **447**: 218-221.
- Stracker TH, Petrini JH. 2011.** The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 90-103.
- Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH. 2004.** The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)* **3**: 845-854.
- Strunnikov AV, Jessberger R. 1999.** Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem* **263**: 6-13.
- Sun J, Jiang H, Flores R, Wen J. 2009.** Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. *BMC Evol Biol* **10**: 49.
- Sun J, Jiang H, Flores R, Wen J. 2010.** Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. *BMC Evol Biol* **10**: 49.
- Sung P, Klein H. 2006.** Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 739-750.
- Svard SG, Hagblom P, Palm JE. 2003.** *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 3-7.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, Komatsu K. 2001.** The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* **276**: 12-15.
- Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. 2007.** Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell* **6**: 1421-1430.
- Thompson RC. 2000.** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* **30**: 1259-1267.
- Trujillo KM, Sung P. 2001.** DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50* Mre11 complex. *J Biol Chem* **276**: 35458-35464.
- Uzlikova M, Nohynkova E. 2015.** The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol Biochem Parasitol* **198**: 75-81.
- van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. 2003.** The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* **4**: 844-849.
- van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. 2002.** DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* **383**: 873-892.
- van Noort J, van Der Heijden T, de Jager M, Wyman C, Kanaar R, Dekker C. 2003.** The coiled-coil of the human Rad50 DNA repair protein contains specific segments of increased flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7581-7586.
- Weterings E, Chen DJ. 2008.** The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**: 114-124.
- WHO ed. 1995.** *Drugs used in parasitic diseases*. Geneva: World Health Organization.

- Williams RS, Dodson GE, Limbo O, Yamada Y, Williams JS, Guenther G, Classen S, Glover JN, Iwasaki H, Russell P, Tainer JA. 2009.** Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell* **139**: 87-99.
- Williams RS, Williams JS, Tainer JA. 2007.** Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* **85**: 509-520.
- Wolfe MS. 1992.** Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* **5**: 93-100.
- Xu F, Jerlstrom-Hultqvist J, Andersson JO. 2012.** Genome-wide analyses of recombination suggest that *Giardia intestinalis* assemblages represent different species. *Mol Biol Evol* **29**: 2895-2898.
- Yoder JS, Harral C, Beach MJ. 2010.** Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* **59**: 15-25.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. 2005.** ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* **25**: 5363-5379.
- Zarzosa-Alvarez AL. 2009.** Identification, cloning and expression of the putative DNA damage repair protein Rad50 from *Giardia duodenalis*. Unpublished Master, CINVESTAV.
- Zhang Y. 2013.** Interplay of I-TASSER and QUARK for template-based and ab initio protein structure prediction in CASP10. *Proteins*.
- Zhao S, Renthal W, Lee EY. 2002.** Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses. *Nucleic Acids Res* **30**: 4815-4822.
- Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM. 2006.** Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol* **208**: 267-273.

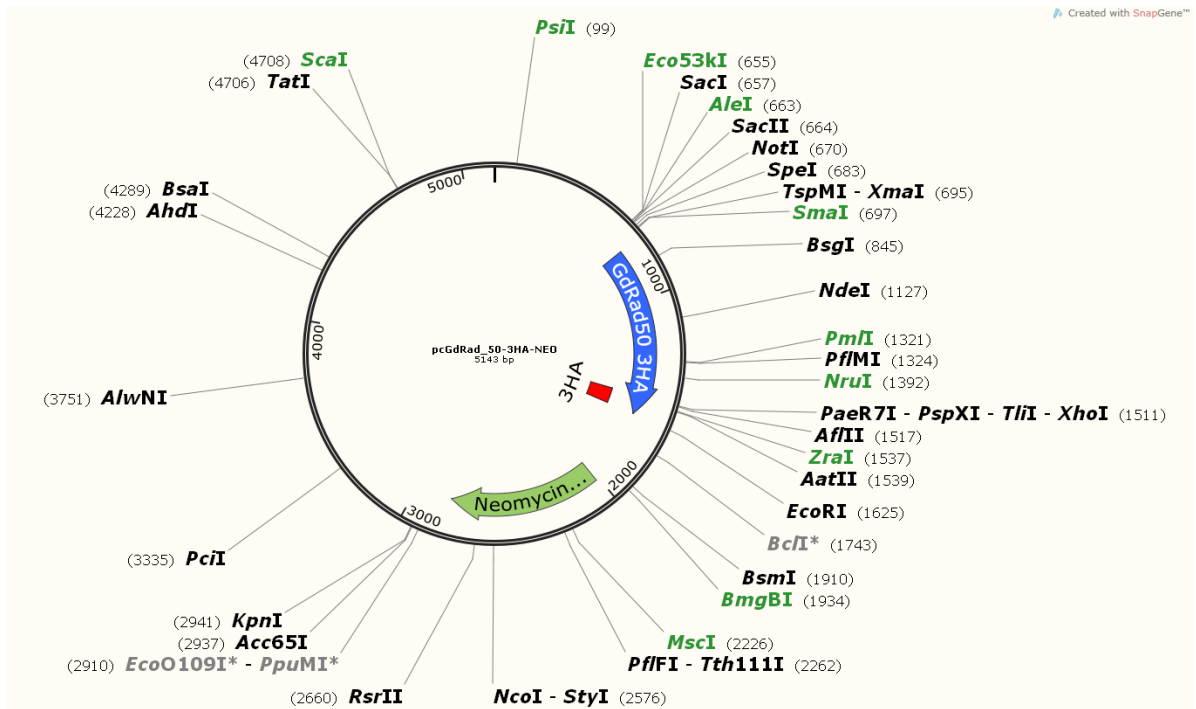
13. Anexos



Anexo 1. Representación esquemática del plásmido pcGdMre11S-3HA-NEO. En azul se muestra el extremo 3' del gen GdMre11S clonado, en rojo la posición de la secuencia codificante de los tres epitopes de Hemaglutinina y en verde el gen de neomicina fosfotransferasa. Se muestran los sitios únicos de restricción.



Anexo 2. Representación esquemática del plásmido pcGdMre11-3HA-NEO. En azul se muestra el extremo 3' del gen GdMre11 clonado, en rojo la posición de la secuencia codificante de los tres epitopes de Hemaglutinina y en verde el gen de neomicina fosfotransferasa. Se muestran los sitios únicos de restricción



Anexo 3. Representación esquemática del plásmido pcGdRad50-3HA-NEO. En azul se muestra el extremo 3' del gen Rad50 clonado, en rojo la posición de la secuencia codificante de los tres epitopes de Hemaglutinina y en verde el gen de neomicina fosfotransferasa. Se muestran los sitios únicos de restricción