



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Caracterización *in vitro* de la proteína homóloga ATM/Tel-1 de *Giardia duodenalis*”

TESIS

Que presenta:

QFB. Beatriz Alejandra Verdín Dorantes.

Para obtener el grado de

Maestra en ciencias en la especialidad de:

Genética y Biología Molecular.

Director De Tesis:

Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz.

México Distrito Federal.

Marzo, 2015

El presente proyecto se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y la asesoría de la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres y el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe. Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante la beca 347314.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada 347314 y por el financiamiento del proyecto 178430.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por aceptarme en su laboratorio, por su paciencia, sus enseñanzas y apoyo en la realización de éste proyecto.

A los Dres. Ma. Guadalupe Ortega Pierres y Luis Kameyama Kawabe por su asesoría, su disposición y consejos.

A la Dra. Ma. Luisa Bazán Tejeda por sus enseñanzas, su paciencia y su amistad. Gracias por la entrega incondicional en la realización de su trabajo, por ser el alma del laboratorio 16 y un gran ser humano.

A mis compañeros de laboratorio Rosita, Ángel, Claudia, Toño y Anita por sus enseñanzas, amistad y por hacerme pasar una estancia muy agradable durante éste trayecto.

A cada uno de mis compañeros de generación por su invaluable amistad, ayuda, consejos y momentos maravillosos. Siempre estarán en mi corazón.

A todas aquellas personas y laboratorios que aún sin conocerme me ayudaron. Especialmente al laboratorio del Dr. Zinker, Dr. Tapia, Dr. Gariglio y Dr. Cisneros.

A la secretaría Gaby Mora por su ayuda y atenciones que siempre me mostró.

A mis padres y hermana por su amor incondicional en cada instante de mi vida.

INDICE GENERAL	
INDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VII
1. RESUMEN	VIII
2. ABSTRACT	IX
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1 <i>Giardia duodenalis</i>	1
3.2 Genoma de <i>Giardia duodenalis</i>	1
3.3 Ciclo de Vida	4
3.4 Sistema de Reparación del DNA	8
3.4.1 Reparación por escisión de nucleótidos denominada NER	9
3.4.2 Reparación por escisión de bases denominada BER	10
3.4.3 Reparación de bases mal apareadas denominada MMR	10
3.4.4 Vía de Reparación de extremos no homólogos NHEJ	10
3.4.5 Vía de Reparación por Recombinación Homóloga	11
4. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada)	13
4.1 Función de ATM en el mecanismo de reparación del DNA	17
4.2 Función de ATM en el control del ciclo celular	18
4.3 Función citoplásmica de ATM	21
4.4 Características farmacológicas de ATM	21
5. Antecedentes directos	22
6. Justificación	30
7. Hipótesis	30
8. Objetivo General	30
9. Objetivos particulares	30
10. Esquema general de la estrategia general	31
11. Metodología	32
11.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Giardia duodenalis</i>	32
11.2 Extracción de DNA genómico de <i>Giardia duodenalis</i>	32
11.3 Preparación de células electrocompetentes	33
11.4 Preparación de células químicamente competentes	33

11.5 Reacción de ligación para clonar en vector de expresión pET-100-D TOPO	34
11.6 Transformación química de células Top-10 de <i>E. coli</i>	34
11.7 PCR de colonia	34
11.8 Extracción de plásmido por -Miniprep-	35
11.9 Extracción de plásmido por -Easyrep-	35
11.10 Reacción de secuenciación	36
11.11 Expresión GdH2A en células de <i>E. coli</i> BL21	36
11.12 Western blot	38
11.13 Inmunoprecipitación de GdATMTel1-3HA	38
11.14 Ensayo de actividad cinasa	39
12. RESULTADOS	40
12.1 Detección de la proteína homóloga ATMTel1 en <i>Giardia duodenalis</i> usando un anticuerpo heterólogo	40
12.2 Inmunoprecipitación de la proteína ATMTel1-3HA de trofozoitos de <i>Giardia duodenalis</i>	41
12.3 Clonación del gen GdH2A	42
12.4 Análisis funcional de la proteína ATMTel1-3HA putativa de <i>Giardia duodenalis</i>	48
13. DISCUSIÓN	50
14. ANEXOS	54
15. CONCLUSIONES	55
16. PERSPECTIVAS	55
17. REFERENCIAS	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Comparación de complejos multiproteicos entre <i>Giardia</i> y <i>Levadura (Saccharomyces cerevisiae)</i>	4
Figura 2 Características morfológicas del quiste	6
Figura 3 Ciclo de vida del parásito <i>Giardia duodenalis</i>	7
Figura 4 Modelo de señalización al producirse daño de doble cadena y mecanismo de reparación por recombinación homóloga	13
Figura 5 Esquema de la proteína ATM y organización de sus dominios	15
Figura 6 Diagrama de dominios conservados en la familia de las PIKKs	16
Figura 7 Activación de la vía de señalización de ATM y complejo MRN al generarse daño al DNA de doble cadena	20
Figura 8 Quistes liberados después de la inoculación de <i>Giardia duodenalis</i> expuestos a 1mj cm⁻² de radiación UV	24
Figura 9 Detección de GdRad51 y de la histona GdH2A fosforilada mediante western blot en muestras correspondientes a diferentes tiempos post-irradiación	25
Figura 10 Identificación de dominios conservados en las proteínas putativas GdATM/Tel1	26
Figura 11 Alineamiento de las secuencias TOR	27
Figura 12 Construcción realizada para etiquetar el gen putativo ATMTel1, mediante integración del vector pcATMTel1_3HA_NEO en el genoma de <i>Giardia duodenalis</i>	28
Figura 13 Western blot anti-HA	29
Figura 14 Detección por western blot de ATMTel1-3HA	41
Figura 15 Western blot de extracto e Inmunoprecipitado de la proteína ATMTel1-3HA	42

de *Giardia duodenalis*

Figura 16 Ensayo de western blot para detectar a la proteína homóloga GdATMTel1-3HA	43
Figura 17 Secuenciación nucleotídica del gen GdH2A	44
Figura 18 Patrón electroforético en gel de agarosa al 1% de PCR de la amplificación de GdH2A utilizando los oligonucleótidos específicos para el vector pET-100/D-TOPO a partir del DNA genómico	45
Figura 19 Patrón electroforético de DNA plasmídico en geles de agarosa al 1% de las diferentes clonas	46
Figura 20 Secuenciación parcial del extremo 5' de pET 100/D- TOPO-GdH2A	47
Figura 21 Expresión de la proteína GdH2A de <i>Giardia duodenalis</i>	48
Figura 22 Actividad enzimática de ATM-Tel1 putativa de <i>Giardia duodenalis</i>	49

ABREVIATURAS.

ATM	Ataxia telangiectasia mutada
CWPs	Proteínas de la pared quística
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DSBs	Rupturas de doble cadena
SsDNA	DNA de cadena sencilla
HR	Recombinación Homóloga
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
IR	Radiación Ionizante
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

Giardia duodenalis es un protozoo unicelular flagelado, binucleado, que infecta el intestino delgado de humanos y otros mamíferos, es el causante de la infección denominada giardiasis y afecta a un gran número de individuos a nivel mundial. Actualmente, existen evidencias que sugieren que *Giardia* lleva a cabo mecanismos de recombinación y reparación del DNA. Estos incluyen la identificación de genes que participan en procesos meióticos y en procesos de reparación por recombinación homóloga. Dentro de las proteínas que participan en el mecanismo de reparación del DNA se encuentra la proteína ATM. Esta es un regulador principal de este mecanismo ya que esta proteína tiene como uno de sus blancos la fosforilación de la histona H2AX. Dada la importancia de esta proteína en este mecanismo de reparación el objetivo de este trabajo fue determinar si la proteína putativa ATM en *Giardia* tenía actividad de cinasa y si era sensible al inhibidor 2-morfolin-4-il-6-tiantren-1-il-piran-4-ona (Ku55933) específico para ATM empleando rapamicina como un inhibidor control y como sustrato al péptido sintético PHAS-1. Esto se analizó en trofozoítos transgénicos GdATM-3HA. Los resultados del ensayo de fosforilación *in vitro* demostraron que GdATM-3HA tiene capacidad de fosforilar sustratos como PHAS-1. Esta actividad fue dependiente de Mn^{2+} como se ha sido reportado en otros organismos y el uso de inhibidores específicos de ATM y TOR indicaron que la actividad de cinasa de GdATM-3HA no fue inhibida con las concentraciones que se emplearon de estos inhibidores. Los resultados obtenidos no permiten definir si la GdATM que tiene actividad de cinasa es ATM o TOR.

2. - ABSTRACT

Giardia duodenalis is a unicellular protozoan flagellate, binucleated, which infects the small intestine of humans and other mammals, is the cause of the infection called giardiasis and affects a large number of individuals worldwide. Currently there is evidence to suggest that *Giardia* performs recombination and DNA repair mechanisms. This evidence includes the identification of genes involved in meiotic processes and repair processes by homologous recombination. Among the proteins involved in the mechanism of DNA repair is the ATM protein. This is a major regulator of this mechanism being one of its targets the phosphorylation of histone H2AX. Given the importance in the repair mechanism the goal of this study was to determine whether the putative protein ATM in *Giardia* has kinase activity and whether if it was sensitive to inhibitor 2-morpholine-4-yl-6-thianthren-1-yl pyran-4-one (Ku55933) specific for ATM, using rapamycin as a control inhibitor and as a substrate the synthetic peptide PHAS-1. This was analyzed in transgenic trophozoites GdATM-3HA. The results of in vitro phosphorylation assay showed that GdATM-3HA has ability to phosphorylate substrates as PHAS-1. This activity was dependent of Mn^{2+} as has been reported in other organisms. The use of specific inhibitors of ATM and TOR indicated that the activity kinase of GdATM-3HA was not inhibited with the concentrations that were used. The results obtained do not allow to define whether the GdATM kinase is a ATM or TOR protein.

3. INTRODUCCION

3.1 *Giardia duodenalis*

Este microorganismo fue identificado por el holandés *Antony van Leeuwenhoek* a finales del siglo XVII, en 1681 y en 1859 fue descrito con mayor detalle por W. Lambl (Adam, 2001).

El género *Giardia* se incluye en el phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonadida*, familia *Hexamitidae*, y pertenece al grupo de flagelados binucleados, encontrados en ambiente anaeróbico o microaerófilico y se clasifica en el subgrupo *Excavata* (Levine et al., 1980). El parásito protozooario *Giardia duodenalis* (sinónimos = *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) es un microorganismo eucarionte unicelular flagelado, el cual es el agente etiológico de la infección entérica conocida como giardiasis. Esta se caracteriza por dolor epigástrico, diarrea líquida, náuseas, vómito, fatiga, flatulencia, pérdida de peso y afecta a diversos vertebrados entre ellos al humano (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist, Ringqvist, Troell, & Svard, 2010). La giardiasis es una parasitosis de gran importancia epidemiológica y endémica a nivel mundial debido a su alta prevalencia y patogenicidad. Anualmente se presentan 280 millones de casos a nivel mundial (Lane & Lloyd, 2002). Este parásito sobrevive por periodos prolongados en su forma de quiste en el medio ambiente y se ha reportado que la dosis infectiva es 10 quistes (Ankarklev et al., 2010). La principal vía de transmisión es fecal-oral, al ingerir agua y alimentos contaminados (Morrison et al., 2007). Entre las características únicas de este protista se incluyen la presencia de dos núcleos con características similares, los cuales son activos transcripcionalmente. Así mismo este parásito no posee mitocondrias ni peroxisomas (Morrison et al., 2007).

3.2 Genoma de *Giardia duodenalis*.

El genoma de *Giardia* codifica una simple forma de una gran cantidad de procesos celulares, es una especie compleja formada de aislados morfológicamente indistinguible, genética y fenotípicamente distinto.

Los aislados de *Giardia* se clasifican en 8 ensamblajes (A-H), basados en la caracterización de enzimas como β giardina (*bg*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), regiones espaciadoras intergenómicas del rRNA y la proteína glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Lasek-Nesselquist, Welch, & Sogin, 2010). Los ensamblajes A y B (su identidad de aminoácidos es del 78% en regiones codificantes inferidas de la traducción *in silico* de sus genomas) infectan a la mayoría de los vertebrados y son los únicos dos ensamblajes que están asociados con infecciones en humanos. Los ensamblajes C y D han sido identificados en perros, coyotes y lobos. Se ha reportado que el ensamblaje E está presente en cerdos, ovejas, cabras, ganado vacuno y búfalos; el ensamblaje F y G en gatos y ratas respectivamente, el ensamblaje H hasta ahora se ha identificado en vertebrados marinos que incluyen dos diferentes especies de focas (*Halichoerus grypus* y *Larus argentatus*) (Lasek-Nesselquist et al., 2010).

Giardia es el organismo más divergente de los eucariotas y muestra una gran variedad de características procariotas por ejemplo: las enzimas metabólicas son de tipo bacterianas, carece de mitocondrias, peroxisomas, carece de *cap* en la mayoría de mRNAs esto debido principalmente a que el genoma de éste parásito ha derivado de la transferencia lateral de genes bacterianos y donadores tipo *arqueobacterias*. El Genoma de *Giardia* (WB clona 6) mide aproximadamente 11.7 Mb, está dividido en cinco cromosomas con un tamaño que varía en un rango de 1- 3.8 Mb. Así mismo, se han identificado 6,470 marcos abiertos de lectura (ORFs) en este microorganismo, con una distancia intergenica de 372 pares de bases (pb). El genoma de *Giardia* contiene pocos genes con intrones (Ankarklev et al., 2010).(Yee et al., 2007). Debido a su característica minimalista codifica para proteínas básicas de una gran cantidad de procesos celulares, como la replicación del DNA, transcripción y procesamiento de RNA en comparación con otros protozoarios.

Durante el inicio de la replicación complejos multiproteicos se ensamblan en el origen de replicación en *S. cerevisiae* durante el ciclo celular. *Giardia* posee dos proteínas que reconocen el origen de replicación (Orc4 y Orc1/Cdc6) y la ausencia de proteínas de iniciación (Cdt1Dpb11, Cdc45, MCM10) como en las *Archaeas* (Poxleitner et al., 2008). (Figura 1).

Adicionalmente la transcripción en *S. cerevisiae* inicia por la formación del complejo de pre-inicio que consiste de RNAPII (12 subunidades) y factores generales de la transcripción formado por las siguientes subunidades: TFIIA (2), TFIIB (1), TFIID, TFIIF (3), TFIIE (2) y TFIIH, factores que reconocen elementos en el sitio promotor, incluyendo la caja TATA, los elementos iniciadores (INR) y los elementos promotores río abajo. Los sitios promotores de *Giardia* están formados por un elemento iniciador rico en AT y carece de la mayoría de los factores generales de la transcripción en comparación con otros eucariontes. En cuanto a la maquinaria del procesamiento del RNA, ésta es menos compleja que en otros eucariotas y la señal de poliadenilación (AGUAAA) se parece a la de otros eucariotas (AAUAAA). Carece de la mayoría de genes que codifican para glicosiltransferasas (Sun, Treco, & Szostak, 1991).

Estas sencillas características lo convierten en el organismo eucariota más divergente estudiado hasta la actualidad, y es empleado como organismo modelo de estudio de los procesos moleculares básicos que regulan el funcionamiento de las células eucariotas, entre ellos el mecanismo de reparación del DNA (Morrison et al., 2007).

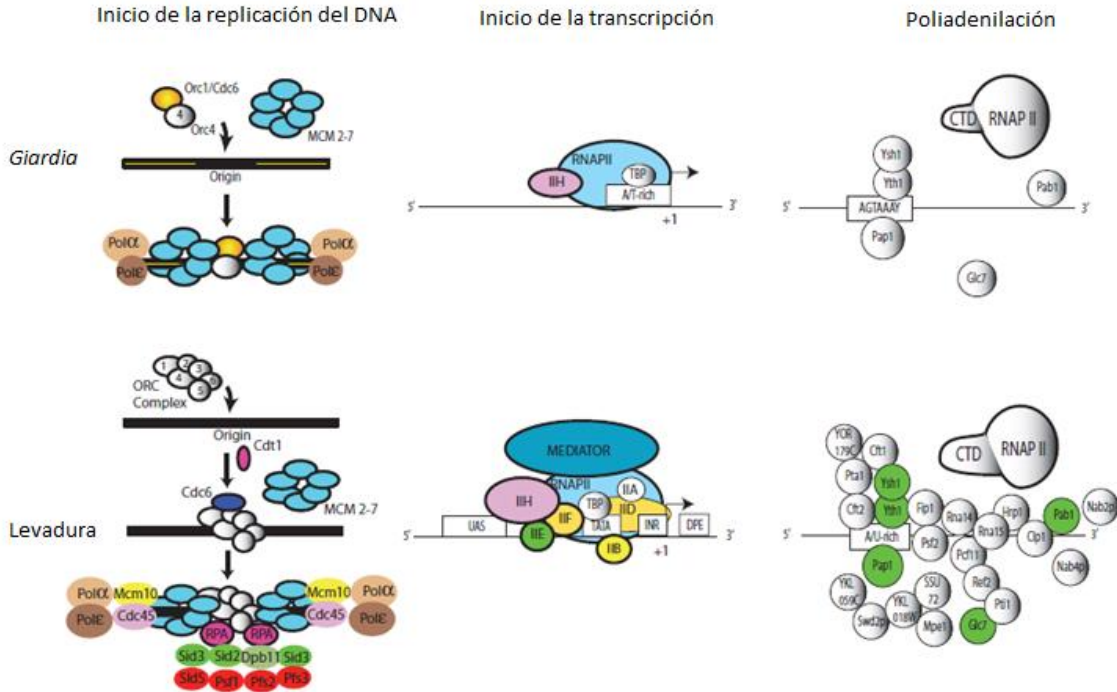


Figura 1.- Comparación de complejos multiproteicos requeridos para realizar procesos como el inicio de replicación del DNA, inicio de la transcripción y procesamiento de RNA entre *Giardia* y *Levadura (Saccharomyces cerevisiae)*. *Giardia* carece de proteínas que reconocen el inicio de replicación que comúnmente otros organismos requieren para llevar a cabo el proceso de reparación. Con respecto a la maquinaria de la transcripción y procesamiento de RNA, *Giardia* es menos compleja que otros eucariotas. Tomada y modificada de (Morrison et al., 2007).

3.3 Ciclo De Vida.

El ciclo de vida de *Giardia duodenalis* comprende dos estadios: trofozoíto y quiste. El trofozoíto es la entidad vegetativa que causa los síntomas clásicos de la giardiasis, este organismo es binucleado y coloniza al epitelio intestinal del huésped una vez que se desenquistado y se divide por fisión binaria. El trofozoíto tiene una longitud de 12 a 15 μm de diámetro, 5 a 9 μm de ancho, posee ocho flagelos organizados en pares denominados flagelos anteriores, ventrales, posteriores y caudales. El cuerpo basal es el lugar donde se originan los flagelos. El cuerpo medio es una estructura esencialmente formada por microtúbulos.

Su morfología ha sido usada a lo largo del tiempo como una herramienta taxonómica para distinguir especies de *Giardia*. Otras proteínas como cinesinas que están involucradas en la organización de microtúbulos se encuentran localizadas en el cuerpo medio. Se ha propuesto que esta estructura representa un sitio para la nucleación de microtúbulos y durante la interface sirve como reserva de microtúbulos que pueden ser usados para el ensamble del huso extranuclear (Dawson et al., 2007). El disco adhesivo es una estructura compuesta por microtúbulos y posee proteínas específicas de *Giardia*, éste juega un papel preponderante en la adhesión del parásito al epitelio intestinal del hospedero (Ankarklev et al., 2010).

El quiste es la entidad infectiva y puede sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente (Caccio & Sprong, 2010) En el quiste la pared mide entre 0.3-0.5µm de grosor y esta revestida por una membrana interna doble. La parte exterior filamentosa de la pared del quiste está formada de 60% de carbohidratos, en su mayoría β (1-3)- N- acetil-D-galactosamina y tres diferentes proteínas en la pared del quiste (CWP1, CWP2 Y CWP3). El disco adhesivo y los flagelos se desensamblan durante el proceso de enquistamiento. El quiste maduro posee cuatro núcleos tetraploides (Ankarklev et al., 2010).

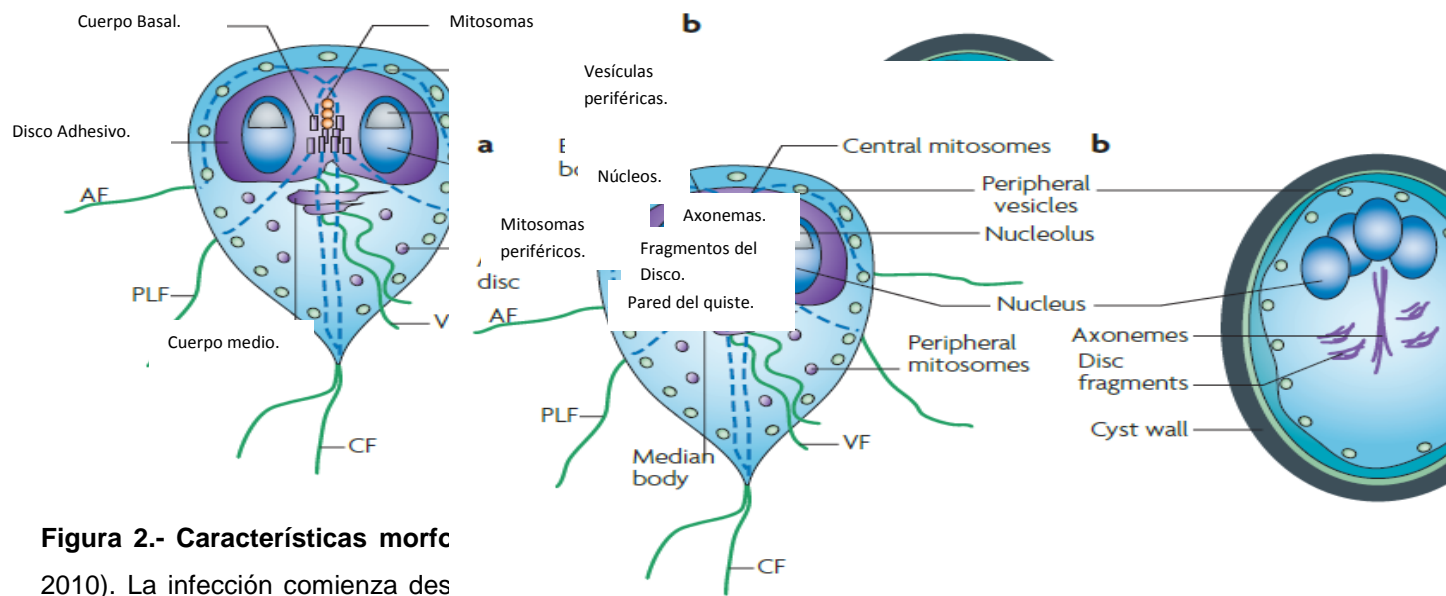


Figura 2.- Características morfo

2010). La infección comienza des

alimentos contaminados, donde la pared celular se rompe y los trofozoitos se liberan en la parte superior del intestino delgado. La adhesión de los trofozoitos a través del disco ventral a la pared de las células epiteliales del intestino delgado es indispensable para la infección. Estos se dividen por fisión binaria en el lumen del intestino. Finalmente la exposición a sales biliares, permite el enquistamiento de los trofozoitos y tras la excreción en heces fecales son potencialmente infecciosos completando así el ciclo de vida (Meloni, Lymbery, & Thompson, 1989).

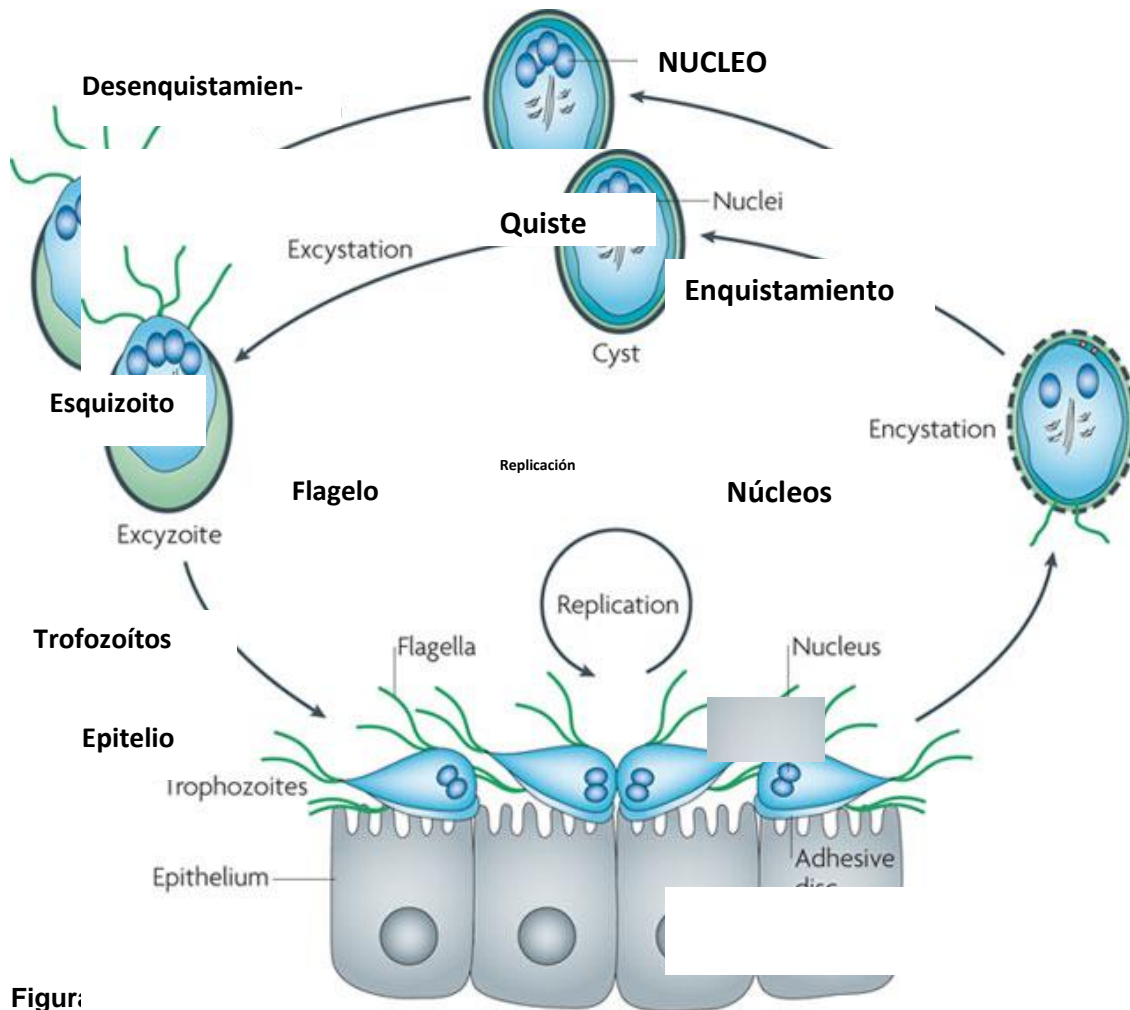


Figura
et al.,

klev
s los

quistes, el impacto clínico es más grave en niños, individuos inmunodeprimidos o desnutridos. El tratamiento más común son con diferentes fármacos, por ejemplo: bencimidazoles, nitroimidazoles, nitrotiazoles, aminoglicosidos, etc. La infección crónica generalmente es asintomática. Tomada y modificada de (Ankarklev et al., 2010).

Nature Reviews | Microbiology

El diagnóstico de giardiasis se realiza mediante la identificación de quistes o trofozoitos en heces o detectando los trofozoitos directamente en el duodeno en muestras examinadas microscópicamente. Preparaciones en fresco sin teñir son aquellas donde las células son resuspendidas en solución salina o acetato de formalina. Preparaciones en fresco teñidas con yodo son aquellas utilizadas para la identificación de quistes principalmente, ya que estos colorantes usados mejoran la resolución de las estructuras internas facilitando así su identificación ya que ésta

depende de su morfología y morfometría de estos organismos suspendidos (Mank, Zaat, Blotkamp, & Polderman, 1995).

Se han ido implementando herramientas moleculares para el diagnóstico de la giardiasis, dado que *Giardia* es el eucariota más divergente estudiado hasta la actualidad se dificulta el entendimiento de su biología. Este parásito es empleado como organismo modelo para entender las vías clave que caracterizan a la células de organismos eucariotas, entre ellos el mecanismo de reparación del DNA (Morrison et al., 2007; Verweij et al., 2003).

3.4 Sistemas de Reparación del DNA.

El daño o ruptura del DNA de doble cadena puede ser producido de manera exógena o endógena. En el primer caso éste ocurre por radiación ultravioleta (UV), radiación ionizante (IR), metales pesados, contaminantes presentes en el aire y diversos agentes químicos utilizados como terapéuticos anticancerígenos. En el segundo éste se da por hidrólisis, oxidación, alquilación, desapareamiento de bases, errores de replicación, cambios químicos espontáneos en el DNA, agentes que dañan al DNA como especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales oxidrilo, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Pardo, Gomez-Gonzalez, & Aguilera, 2009). Cuando el daño persiste se puede promover inestabilidad en el genoma, mutagénesis como sustitución de bases y pequeñas deleciones o inserciones, las cuales pueden ser responsables de algunas enfermedades en humanos como el cáncer, anormalidades neurológicas, inmunodeficiencia y envejecimiento prematuro. Con la finalidad de evitar esto los organismos eucariontes llevan a cabo múltiples mecanismos de reparación del DNA. Se ha estimado que en el genoma de mamíferos ocurren 10^5 lesiones al DNA cada día como resultado de errores de replicación y metabolismo celular. Entre las lesiones generadas, podemos encontrar: sitios básicos, entrecruzamientos y formación de aductos proteína-DNA, bases oxidadas y/o ruptura de DNA de cadena sencilla. Si una ruptura no se repara antes de la replicación del DNA, puede dar lugar a pérdida de información genética, muerte celular y carcinogénesis. Las rupturas de doble cadena son benéficas cuando se producen de una manera controlada, es decir cuando se re-

quiere que se lleven a rearrreglos cromosómicos, como en el desarrollo del sistema inmunológico y generación de diversidad genética en la meiosis (Kobayashi et al., 2012).

Las rupturas del DNA de doble cadena (DSB), surgen en procesos de recombinación meiotica, transposición de elementos móviles, mitosis, replicación, transformación, transducción y recombinación en el sistema inmune, así como por la acción de enzimas de restricción (Unal et al., 2004). Como respuesta a estas alteraciones la célula activa diferentes mecanismos de reparación y en particular la evolución de estos sistemas de reparación en los eucariontes ha permitido el desarrollo de sistemas que censan los daños generados a lo largo del ciclo celular, y reparan estos mediante arresto del ciclo celular; reparación Homologa (HR) o mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Foster, 2009). Lesiones al DNA de cadena sencilla son reparadas por la vía de reparación por escisión de bases (BER) y por la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Lombard et al., 2005).

3.4.1 Reparación por escisión de nucleótidos denominada NER

La vía de reparación del DNA por escisión de nucleótidos resuelve numerosas lesiones al DNA, particularmente modificación de bases que alteran la estructura normal de la hélice del DNA de doble cadena. En esta participan por ejemplo: dímeros de ciclobutano pirimidina y fosfo-productos de pirimidina (6-4) denominados pirimidonas generadas por radiación ultravioleta; aductos de bases creados por agentes químicos exógenos como cisplatino y benzopireno; lesiones de bases producidas por reacciones de peroxidación lipídica y especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen modificaciones de bases como ciclopurinas. Estas alteraciones típicamente impiden la progresión de la replicación o transcripción, resultando en el colapso de la horquilla de replicación. En éste mecanismo de reparación se remueve una secuencia de 30 pb que incluye la(s) base(s) dañada(s) y después se sintetiza un nuevo fragmento que reemplaza a la secuencia eliminada (Iyama & Wilson, 2013).

3.4.2 Reparación por escisión de bases denominada BER

En este tipo de reparación se remueve directamente la base dañada y ésta es remplazada por la base correcta en el DNA. Este tipo de modificaciones corresponde a procesos de oxidación, deaminación o alquilación en las bases (Iyama & Wilson, 2013).

3.4.3 Reparación de bases mal apareadas denominada MMR

Esta vía de reparación se ha conservado en bacterias y mamíferos, este sistema reconoce y repara daños entre base-base, inserciones y deleciones de estructuras secundarias, que se generan principalmente como errores de la replicación del DNA. En este mecanismo de reparación que involucra la participación de varios factores, se encuentran involucrados principalmente dos componentes proteicos: *MutS* y *MutL*. En eucariontes existen dos equivalentes funcionales como en *E. coli*, *MutSa*, *MutSβ* (proteínas MSH) (Iyama & Wilson, 2013).

3.4.4 Vía de Reparación de extremos no homólogos NHEJ.

La vía de reparación de extremos no homólogos (NHEJ), no requiere de un templado por lo que es propensa a error y puede involucrar la pérdida o ganancia de nucleótidos, así la integridad de la información no se asegura. Este mecanismo que aunque está activo en todas las fases del ciclo celular es preferentemente utilizada en la fase G1 y requiere de un complejo de proteínas para llevar a cabo su mecanismo de reparación: complejo MRN, formado por las proteínas Mre11, Rad51 y NBS1, las subunidades de la proteína Ku (Ku 70 y Ku 80), los cuales se unen a los extremos del DNA, así como DNA-PKcs, XRCC4 y un complejo DNA ligasa. (Goodarzi & Jeggo, 2013)

El complejo MRN es la única proteína común en las dos vías de reparación NHEJ y HR. Rad 50 es una de las proteínas SMC que participan en el ensamblaje estructural de los cromosomas, tiene una alta afinidad al DNA, lo que explica su función de mantener a los extremos del DNA unidos para así poder permitir su reparación (Hopfner et al., 2002). La participación de la exonucleasa Mre11, la cual está encargada de realizar la resección en dirección 5'-3' en los extremos del DNA. La proteína Xrs2 (levaduras)/ Nbs1 (mamíferos) también es parte de este complejo

y además de interactuar con mre11, también es responsable de interactuar con la proteína ATM, la cual se encarga de fosforilar a la histona H2A_x y así iniciar y amplificar las cascadas señalización para que se dé la reparación (Moreau, Ferguson, & Symington, 1999).

Otra de las proteínas esenciales en este proceso es la proteína heterodimérica Ku (Ku 70 y Ku 80) la cual se une a los extremos rotos del DNA, produciendo el reclutamiento de las proteínas pertenecientes a la familia de cinasas PI3K como DNA-PKcs. Es requerido que las terminaciones del DNA roto sean procesadas por la proteína nucleasa Artemis, ésta en ocasiones requiere eliminar estructuras secundarias formadas durante la reparación. Seguido de este procesamiento las DNA polimerasas como la polimerasa μ corrigen errores faltantes como la presencia de gaps y es entonces cuando el DNA es unido por el complejo proteico DNA ligasa IV/XRCC4/XLF (Ahnesorg, Smith, & Jackson, 2006; Frank-Vaillant & Marcand, 2001; Iyama & Wilson, 2013).

3.4.5 Vía de Reparación por Recombinación Homóloga

La reparación de daño al DNA por recombinación homóloga corresponde a un intercambio o transferencia de secuencias idénticas entre la molécula de DNA que presenta la ruptura de doble cadena y la otra molécula intacta que sirve de template o molde. Así la recombinación homóloga es un mecanismo fiel y es preferentemente activo en la fase G2 y S del ciclo celular asegurando la estabilidad del genoma. Este mecanismo involucra genes que codifican proteínas pertenecientes al grupo de epistasis de RAD 52 e incluyen RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11, NBS1/XRS2, RAD59 y RDH54/TIDI (Krogh & Symington, 2004), así como DNA nucleasas (Exo1, Sae2, Rad1-Rad10), helicasas (Sgs1, Srs2), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas, las cuales son necesarias para unir la región recién sintetizada con la región que no fue modificada durante la HR.

El primer paso esencial de la recombinación homóloga es el procesamiento de los extremos de doble hebra en donde se generó la ruptura por un complejo especializado de proteínas que representan la maquinaria de resección como el complejo

MRN (mre11,nbs1, rad50), ctp,Exo1, DNA2 y proteínas helicadas (BLM) que generan un largo extremo de cadena sencilla 3'(ssDNA). La proteína de replicación RPA en humanos, rápidamente cubre este fragmento de DNA para evitar su degradación o formación de estructuras secundarias.

El segundo paso es el apareamiento homólogo y el intercambio de cadenas. El apareamiento de la cadena sencilla 3' con su dúplex homólogo se refiere al intercambio de cadenas realizado por la recombinasa RAD51 en eucariotas, *RecA* en *Escherichia coli* , asistida por los mediadores de la recombinasa (en humanos: la proteína supresora de tumor BRCA2 y parálogos de RAD51 incluyendo RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 Y XRCC3), desplazan a RPA y forman filamentos nucleoproteicos que favorecen la formación de estructuras holliday facilitando el intercambio de cadenas con el segmento homólogo molde o templado(Pardo et al., 2009) y para posteriormente llevarse a cabo la resolución por medio de las resolvasas como GEN1 y el complejo SLX1. (Svendsen & Harper, 2010).

Para reparar efectivamente las rupturas de doble cadena, estas necesitan ser reconocidas y activar una vía de señalización que permita que se recluten las proteínas de reparación mientras simultáneamente el ciclo celular se encuentra arrestado. La proteína Ataxia telangiectasia mutada (ATM) es la proteína reguladora, responsable de amplificar la señal en las dos vías de reparación (HR y NHEJ) y de fosforilar proteínas en los puntos de control del ciclo celular o inducir apoptosis si la reparación no se lleva a cabo (Prendergast, Cruet-Hennequart, Shaw, Barry, & Carty, 2011)

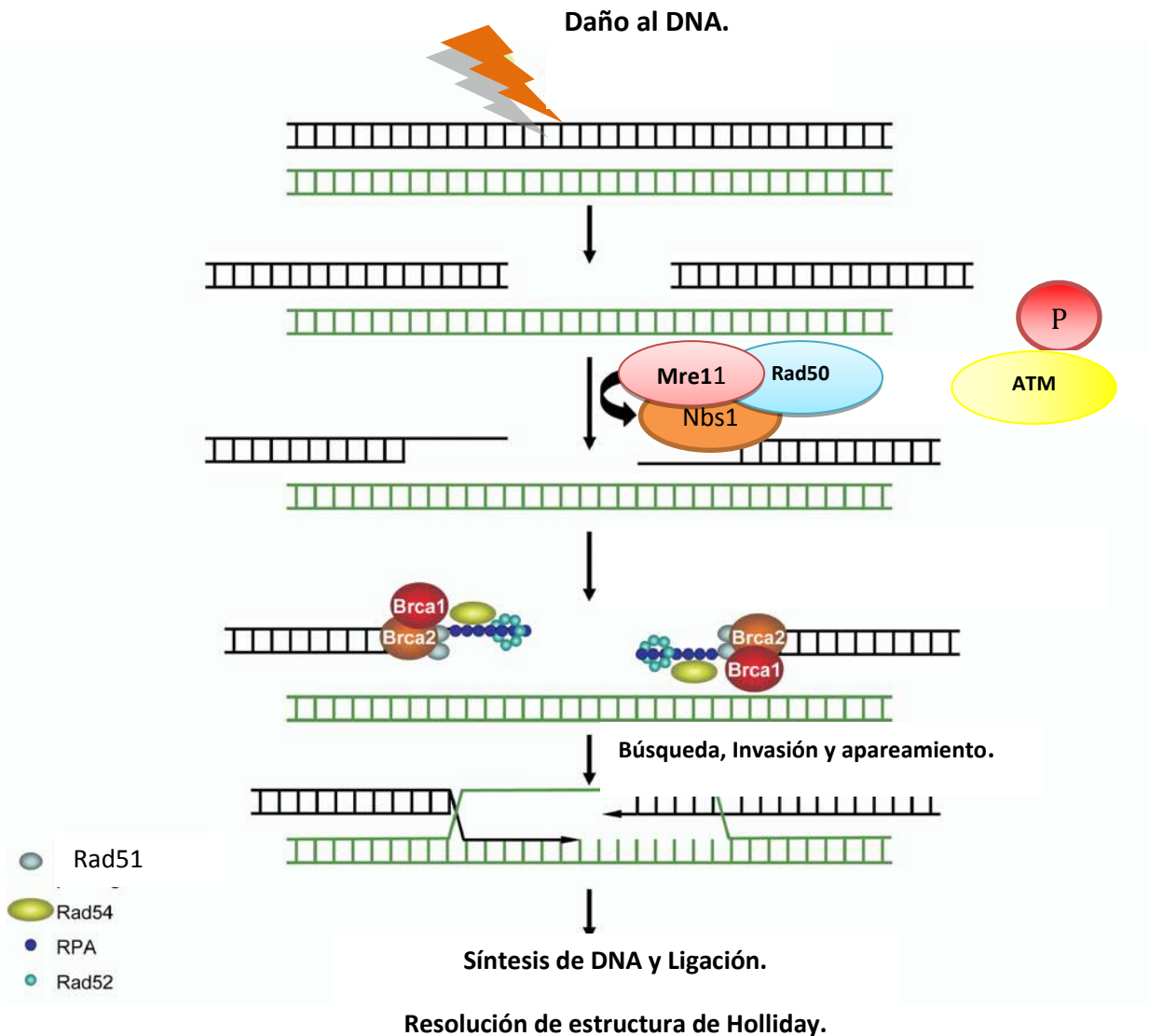


Figura 4. Modelo de señalización al producirse daño de doble cadena (DSB) y mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Tomada y modificada de (Lombard et al., 2005).

4.0 ATM (Ataxia Telangiectasia mutada)

ATM (Ataxia Telangiectasia mutada) es una proteína con actividad serina-treonina cinasa indispensable para mantener la estabilidad genómica en respuesta a la ruptura al DNA de doble cadena (Bakkenist & Kastan, 2003). El gen ATM genera un transcrito de aproximadamente 13 kb, el cual codifica una proteína de 3,056 aminoácidos, con un peso molecular de 350 kDa y cuya localización es preferentemente nuclear. Las proteínas de esta familia contienen un dominio típico de las

cinastas de lípidos, fosfatidilinositol 3 - cinastas (PI3K), por lo que se denominan proteínas cinastas PI3K (PIKKs) (Uziel et al., 1996). Esta familia está conformada por seis proteínas cinastas: **ATM**, **DNA-PKcs** es una proteína que posee una subunidad catalítica dependiente de DNA involucrada con el mantenimiento de la estabilidad del genoma al participar en la reparación del DNA por la vía de NHEJ, **ATR (Ataxia- relativa Rad3)**. Esta proteína se activa cuando se genera daño al DNA de cadena sencilla. , **mTOR** es una proteína cuya función principal es regular el crecimiento celular en respuesta a una gran variedad de factores ambientales incluyendo nivel de nutrientes, factores de crecimiento, energía, hipoxia y estrés osmótico. Esta proteína forma parte de dos complejos proteicos con distintas funciones y sustrato(s) blanco: el complejo mTOR 1 (mTORC1) y el complejo mTOR 2 (mTORC2). Ambos complejos tienen en común la subunidad Mlst8, pero difieren en los otros integrantes del complejo (Zoncu, Efeyan, & Sabatini, 2011). mTORC1 regula el crecimiento celular promoviendo la traducción, biogénesis de ribosomas y autofagia. La activación de esta proteína requiere nutrientes y aminoácidos para reclutarse en lisosomas y endosomas. Los sustratos de mTORC1 incluyen la proteína 4EBP1 y cinastas ribosomales S6K, que controlan el inicio de la traducción y elongación respectivamente (Fonseca, Lee, & Proud, 2008). mTORC2 responde principalmente a factores de crecimiento promoviendo la entrada al ciclo celular y polarización de la actina en el citoesqueleto. Los sustratos de mTORC2 incluyen proteínas cinastas AKT, SGK y PKC (Fonseca et al., 2008). mTOR conserva el dominio FRB en todos los mamíferos en donde se ha caracterizado esta proteína (FKBP12- Unión a rapamicina) (Perry & Kleckner, 2003). La proteína **ATX/hSMG-1** (Supresor de morfogénesis en el genitales) es un componente regulador del decaimiento del RNA mensajero mediado por mutaciones *nonsense* y **TRRAP** (Proteína asociada a dominios de transcripción/transformación). Esta funciona como parte un complejo multiproteico co-activador que posee actividad acetiltransferasa de histonas como regulador de transcripción de genes, pero no presenta actividad cinasa debido a que carece del residuo esencial de unión a la molécula de ATP (Goodarzi & Lees-Miller, 2004).(Templeton & Moorhead, 2005). Estas proteínas tienen una gran homología particularmente en los dominios característicos de esta

familia PI3K. La estructura general de los dominios de la familia PIKKs está definida por el dominio catalítico carboxilo terminal incluido en el dominio FAT que también se conoce como FATC (FRAPP, ATM y TRRAP), y es llamado así debido a los aminoácidos conservados entre los miembros de la familia PIKK (FRAP, ATR y TRRAP). Una de las funciones de este dominio es interactuar con el dominio cinasa para estabilizar la región carboxilo terminal de la proteína y el dominio fosfatidil-inositol 3,4- cinasa (PI3K) (Figura 6). Los tres dominios en su conjunto conforman del 5 al 10 % del tamaño total de la proteína. Mediante análisis bioinformático se encontró que la secuencia restante conformada por dominio N- terminal, está compuesta exclusivamente por los repetidos HEAT (Huntingtina, Factor de Elongación 3, subunidad A de la proteína fosfatasa 2A, TOR1). Cada repetido está compuesto por dos hélices anti- paralelas unidas por una estructura secundaria en forma de bucle flexible. Las regiones amino terminal de las proteínas PIKKs, por lo tanto están formadas por múltiples repetidos formando una matriz y se piensa que su superficie facilita la interacción proteína-proteína (Gamper et al., 2012).

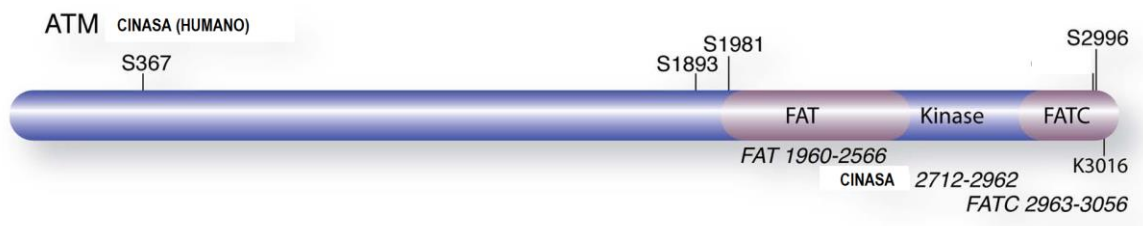


FIGURA 5. Esquema de la proteína ATM y organización de sus dominios. Principales sitios de autofosforilación (S367, S1893, S1981, S2996), sitio de acetilación (K3016) realizado por la histona acetil transferasa TIP60. En el esquema se indica la región de aminoácidos que comprenden los dominios que conforman la estructura de la proteína ATM de mamíferos (Stracker, Roig, Knobel, & Marjanovic, 2013),

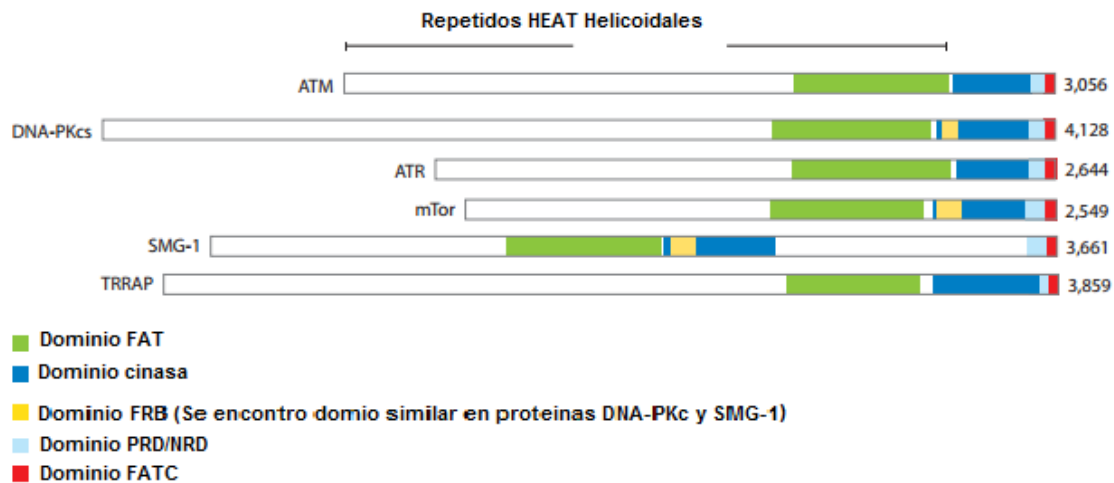


FIGURA 6. Diagrama de dominios conservados en la familia de las PIKKs. Los miembros de esta familia son ATM, DNA-PKc, ATR que participan en mecanismos de reparación cuando se genera daño al DNA, mTOR es una proteína reguladora del crecimiento celular, biogenesis de ribosomas y activa la maquinaria traduccional bajo diferentes estímulos, SMG1 es una proteína reguladora de mRNAs y TRRAP es una proteína que forma parte del complejo coactivador que posee actividad acetil transferas de histonas regulador de la transcripción de genes. Tomado y modificada de (Paull, 2015).

El gen que codifica para la proteína ATM en humanos se encuentra en el cromosoma 11q22-23 (Gatti et al., 1988). El ORF de ATM está conformado por 9,168 nucleótidos y 3,056 aminoácidos dando lugar a una proteína entre 250 y 460 kDa, la cual participa en la regulación del ciclo celular, reconocimiento y reparación del daño al DNA. La enfermedad de ataxia telangiectasia es causada por la presencia de mutaciones en el gen ATM. La severidad fenotípica de la enfermedad depende de la presencia de la proteína y su actividad cinasa residual (Jacquemin et al., 2012). En mamíferos la pérdida o inactivación del gen ATM genera un desorden autosómico recesivo neurodegenerativo caracterizado por: movimientos no coordinados asociados frecuentemente con telangiectasia (vasos sanguíneo dilatados), progresiva degeneración cerebelar, predisposición a cáncer, inmunodeficiencia, extrema radiosensibilidad, esterilidad, inestabilidad cromosómica, atrofia gonadal, retardamiento del crecimiento, envejecimiento prematuro, resistencia a la

insulina, manifestaciones de disfunción mitocondrial, inadecuada respuesta a estrés oxidativo, y la principal característica es neurodegeneración. Cuando existe una respuesta defectuosa para reparar el daño al DNA de cadena sencilla, fenotípicamente se generan síndromes caracterizados por neurodegeneración como es el caso de la ataxia espino-cerebelar con neuropatía axonal (Caldecott, 2004). La pérdida de ATM ilustra la importancia de que no ocurra la reparación del daño al DNA de doble cadena para evitar enfermedades. Sin embargo el estudio de esta vía ha dado a conocer otros dos síndromes generados con fenotipo similar al de Ataxia Telangiectasia, que están asociados con mutaciones de los componentes del complejo MRN. Estos son el síndrome de Nijmegen (NBS) que resulta de la mutación de NBS1 y el síndrome A-TLD resultante de la mutación de Mre11. Así se inició el estudio de estos mecanismos de reparación en mamíferos.

4.1 Función de ATM en mecanismos de reparación del DNA.

Uno de los aspectos más importantes sobre el mecanismo de activación de ATM en respuesta al daño al DNA es que esta proteína es predominantemente nuclear, su actividad cinasa se ha determinado realizando Inmunoprecipitación y ensayos cinasa.

ATM es considerada como el regulador más importante en respuesta a la ruptura del DNA de doble cadena. Esta proteína es activada por la autofosforilación en el residuo de serina 1981, que permite la disociación de ATM multimérica inactiva a monomérica activa, en un proceso promovido por el complejo MRN (Mre11- Rad 50-Nbs1 en humanos o xrs2 en levaduras), Este último recluta a ATM hacia los sitios en donde se generó daño al DNA, por medio de su interacción con el dominio c-terminal de la proteína NBS1 (Stracker et al., 2013). Recientemente se ha demostrado que para su activación se requiere otra modificación postraduccional; acetilación en lisina 3016 en el dominio FATC por la histona acetil-transferasa Tip60. La señalización de esta proteína en el mecanismo de reparación es específica en residuos de S/T (Q), lo cual coincide con la gran cantidad de sustratos blanco entre ellos la histona H2A_x. Después del daño generado al DNA, estos factores son movilizados al sitio de daño iniciando la cascada de señalización depen-

diente de ATM, que permite la resolución de la ruptura. El paso clave en este proceso es la fosforilación de la variante de histona H2A_x por ATM en la cromatina (Yin, Lee, Yang-lott, Sleckman, & Bassing, 2012). En el caso de *Giardia* solo existe la Histona H2A con un dominio tipo H2A_x como indicador de daño al DNA, se ha visto que la modulación de la estructura de la cromatina es un factor primordial para la activación de ATM, esto permite la fosforilación de H2A_x (S139) unida a la cromatina a lo largo de varias megabases alrededor del sitio de daño (Arango et al., 2012).

4.2 Función de ATM en el control del ciclo celular.

El ciclo celular está dividido en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. Para mantener la integridad del genoma, es importante que se mantenga el orden de las fases del ciclo celular y para esto se requiere de su regulación. Los puntos de control son pausas en la progresión del ciclo celular que permite a la célula el tiempo ideal para sensar señales o desafíos fisiológicos como daño al DNA. Uno de los puntos de control más importantes en el ciclo celular es la entrada de la fase S a G1 (G1-S). El gen supresor de tumor p53 mostró ser un elemento crítico en el punto de control de transición de las fases G1-S, ya que posterior a la exposición a la radiación ionizante, se indujo la activación de la proteína ATM. Esta última fosforila a diversos blancos involucrados en el control del ciclo celular, incluyendo p53, Chk1, Brca1 y SMC1 (Uziel et al., 2003). Entre estos la proteína p53 fosforilada en el residuo 15. La fosforilación de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular por ATM inicia una serie de eventos que detienen el crecimiento de células dañadas y se facilita su reparación (Abraham, 2001; Brown et al., 1997). Así, p53 y proteínas que interactúan con ésta como son MDM2 y Chk2, también son fosforiladas por ATM. La dependencia de la actividad de p53 por ATM permite la activación de genes, particularmente la ciclina dependiente de cinasa CDK, inhibidor p21, inducción la cual resulta en la inhibición del complejo ciclina E/CDK2 e inhibición de la progresión desde la fase G1 a S (Kastan & Lim, 2000). El primer blanco que tiene una funcionalidad en la fase intra-S después de recibir radiación ionizante es la proteína NBS1 que forma parte del complejo

MRN. El arresto en la fase S mediada por ATM es dependiente de la señalización a través del gen BRCA1. Interesantemente, se encontró que ATM fosforila BRCA1 en múltiples sitios y estas diferentes fosforilaciones producen diferentes efectos en la progresión del ciclo celular. La fosforilación en la serina 1,387 es necesaria para un correcto arresto en la fase S, mientras la fosforilación de la serina 1,423 es necesaria para mediar el arresto en fase G2-M (Bakkenist & Kastan, 2003; Goodarzi, Block, & Lees-Miller, 2003; Kozlov et al., 2006).

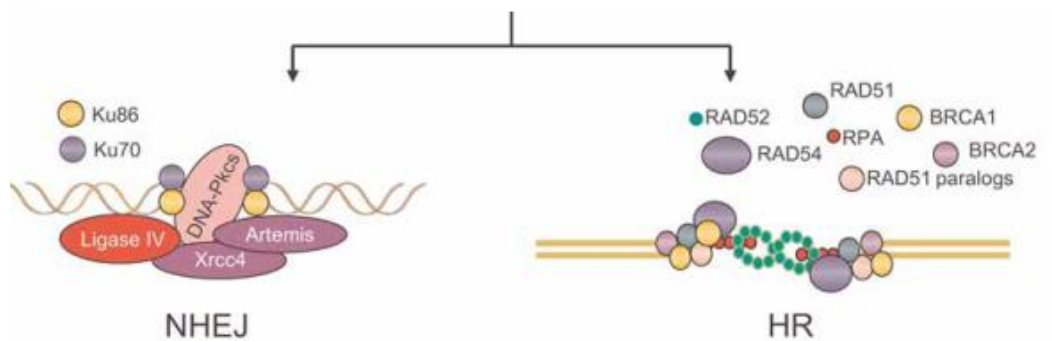
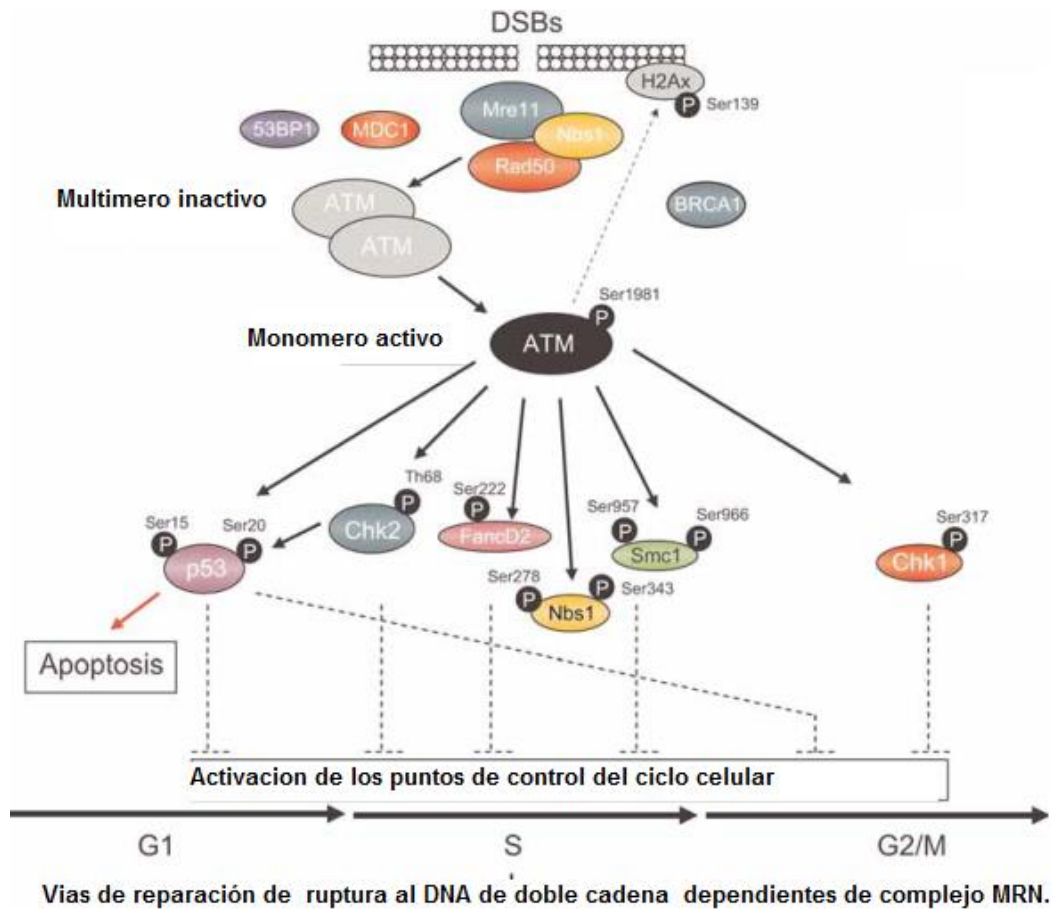


FIGURA 7. Activación de la vía de señalización de ATM y complejo MRN al generarse daño al DNA de doble cadena. Ruptura en el DNA de doble cadena activa la vía ATM mediante un proceso de autofosforilación. Este evento involucra al complejo MRN como sensor de daño. La respuesta al daño generado involucra factores adicionales que colectivamente sirven para integrar el daño, incluyendo la variante de la histona H2A_x (H2A en *Giardia duodenalis*) que funciona como plataforma para concentrar todos los factores adicionales necesarios para la reparación. ATM activada es entonces capaz de fosforilar sustratos (p53, Chk2, FancD2, Smc1, y Chk1, NBS1 etc.) que están involucrados en una serie de eventos incluyendo activación de los puntos de control (G1/S, intra-S, G2/M) en el ciclo celular y apoptosis. El daño de doble cadena puede ser reparado por dos

vías; Recombinación Homóloga (HR) y Reparación de extremos no Homólogos (NHEJ). ATM funciona como una proteína con actividad cinasa y fosforila varios sustratos que regulan el ciclo celular, procesos apoptóticos y reparación del DNA. En conjunto, ATM al fosforilar estos sustratos media la respuesta celular a la ruptura del DNA de doble cadena. Tomada y modificada de **(Reynolds & Stewart, 2013)**.

4.3 Función citoplasmica de ATM

La determinación de la función de ATM en el mantenimiento de la estabilidad del genoma por coordinación de la respuesta al daño al DNA y la regulación del ciclo celular así como su localización nuclear se ha obtenido principalmente de estudios en linfocitos o células provenientes de líneas celulares linfoblastoides. Sin embargo, recientemente se ha encontrado ATM con localización citoplásmica en diversos tipos celulares (Rotman & Shiloh, 1997). Estudios recientes demostraron que ATM fue encontrada en el citoplasma de neuronas diferenciadas (postmitóticas) y células de Purkinje (Manz et al., 2012). Así mismo se ha observado que pequeñas cantidades de ATM también están involucradas en asociación con organelos citoplásmicos y con proteínas involucradas con tráfico vesicular (Paull, 2015). Por otro lado, análisis proteómicos recientes sugieren la participación de la ATM en varias vías metabólicas citoplásmicas. Es sabido que uno de los blancos que ATM fosforila es la H2AX, para su evaluación *in vitro* se utilizan sustratos comerciales como 4EBP1 mejor conocido como PHAS-1 (Shiloh & Ziv, 2013).

4.4 Caracterización farmacológica de ATM

En el estudio de esta cinasa, se ha descrito que la proteína ATM es activada cuando se utiliza como cofactor Mn^{2+} a concentraciones de 5 mM lo que resulta en la fosforilación de p53 (S15), CHK2 (T68), H2AX(S139) en ensayos cinasa (Kim & Jackson, 2013). Comparado con las proteínas cinasas clásicas que utilizan Mg^{2+} la proteína DNA-PK_C puede ser activada sin Mn^{2+} siempre y cuando sus proteínas accesorias (Ku70/80) estén presentes en el sitio donde se produjo el daño en el DNA de doble cadena en ensayos de fosforilación *in vitro* (Bhatia et al., 2013). Debido a que ATM pertenece a la familia de las PIKKs (ATR, DNA-PK_C y

mTOR) y estas comparten muchos dominios, una manera de distinguirlas es mediante el uso de inhibidores específicos e inespecíficos.

Los principales inhibidores genéricos de la familia PI3K son LY294002, wortmanina y cafeína (Sarkaria et al., 1998). La respuesta de ATM sobre el sustrato p53 se disminuyó al ser tratadas con estos inhibidores (Izzard, Jackson, & Smith, 1999; Sarkaria et al., 1998; Zhou et al., 2000).

Wortmanina es un potente inhibidor genérico de las proteínas PI3K, funciona modificando covalentemente al residuo de lisina en el sitio de unión a la molécula de ATP que se encuentra en el dominio cinasa (Wymann et al., 1996). Se evidenció que la molécula de ATP es un activador específico de ATM, ya que en presencia de ATR, DNA-PK_C y mTOR no produce ningún efecto en ensayos de fosforilación *in vitro* (Kozlov, Gueven, Keating, Ramsay, & Lavin, 2003).

El inhibidor 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one llamado Ku55933 es específico de ATM. Esta molécula tiene un IC₅₀ de 12.9 nmol/L, exhibe un mecanismo de acción competitivo sobre la molécula de ATP. Produce un efecto en la disminución de la proliferación, activación de AMPK, aumento de absorción de glucosa, producción de lactato, y disminución en los niveles de ATP (Zakikhani et al., 2012). Los inhibidores específicos de mTOR son: Torin1, PP242, KU63794, Rapamicina, y WYE354 y Temsirolimus (Liu et al., 2013).

5. Antecedentes Directos.

Giardia duodenalis es considerado un organismo con reproducción asexual, lo que ha generado discusiones sobre este tipo de reproducción debido a que se han encontrado genes de la maquinaria de recombinación meiótica formada por Spo11, Dmc1, Msh4/Msh5, Mlh1, Rad50/Mre11, Mlh1, genes del complejo sinapto-temal (Hop1), proteínas de recombinación; Hop2. El alineamiento de secuencias, así como análisis filogenético indican que estos genes son homólogos a genes meióticos (Ramesh, Malik, & Logsdon, 2005).

En un reporte, se investigó la viabilidad de los trofozoitos de *Giardia duodenalis* después de exposición a radiación ionizante con una fuente de cobalto 60 mos-

trando que después de ser expuesto a una dosis de 0.25KGy mueren una baja cantidad de trofozoitos y aproximadamente el 80% recupera su viabilidad, alcanzando su máxima densidad celular de 2-3 días después de irradiación y así demostrando que existe un mecanismo de reparación poco estudiado en éste parásito (Lenaghan & Sundermann, 2003).

En el tratamiento de agua se ha utilizado radiación ultravioleta UV, procedimiento empleado para inactivar una diversidad de protozoarios incluyendo *Giardia duodenalis*, en donde se demostró que estos tienen capacidad de reproducirse después de ser expuestos a diferentes grados de radiación UV (Li, Craik, Smith, & Belosevic, 2008). Estudios realizados *in vivo* utilizando gerbos como modelo de estudio los cuales fueron inoculados con 0.2 ml de dilución con una concentración aproximada de 2.1×10^5 trofozoitos expuestos a radiación UV y sin exposición. Días después de la inoculación se excretaron, recuperaron y cuantificaron un número similar de quistes obtenidos de las heces fecales de estos gerbos inoculados con trofozoitos expuestos a UV y sin exposición, sugiriendo que hubo una recuperación de la infectividad de los trofozoitos inoculados irradiados y demostrando a su vez la existencia de un mecanismo de reparación que les permitió conservar la viabilidad (Li & Heyer, 2008) (Nasser, Vaizel-Ohayon, Aharoni, & Revhun, 2012).

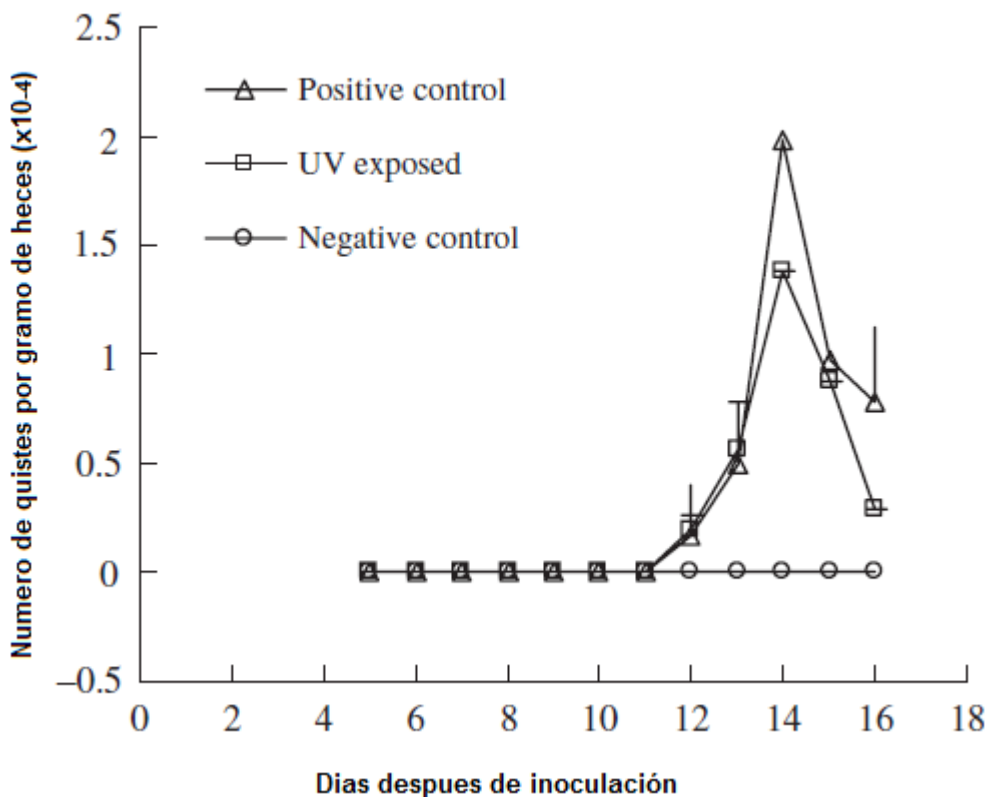


Figura 8. Quistes liberados después de la inoculación con trofozoitos de *Giardia duodenalis* expuestos a 1 mj-cm⁻² de radiación UV (□), quistes liberados después de la inoculación con trofozoitos sin exposición a radiación UV (Δ) y control el negativo (O) en gerbos mongoloides. En donde se demuestra que el patrón de quistes liberados en gerbos inoculados con trofozoitos expuestos a 1mj-cm-2 de radiación UV fue estadísticamente idéntica a la de los gerbos inoculados con trofozoitos que no fueron expuestos a radiación UV Tomada y modificada de

En nuestro grupo de trabajo se han identificado y caracterizado algunas de las proteínas participantes en el mecanismo de reparación (RAD51, RAD52, RAD50, MRE11) y recientemente se identificó *in silico* a la proteína homologa ATM/Tel1.

Se ha caracterizado la detección de la proteína GdRad51 así como la expresión de ésta después de tratar trofozoitos con una dosis de 100 Gy de radiación ionizante gamma (γ). En este trabajo se evaluó si GdRad51B activa su expresión

después de ser expuesta con radiación gamma. Estos resultados indicaron que hubo daño en el DNA manifestados como incremento en los niveles de fosforilación de la histona H2A, marcador de ruptura de doble cadena y sustrato blanco de ATM (Torres Huerta A. datos no publicados).

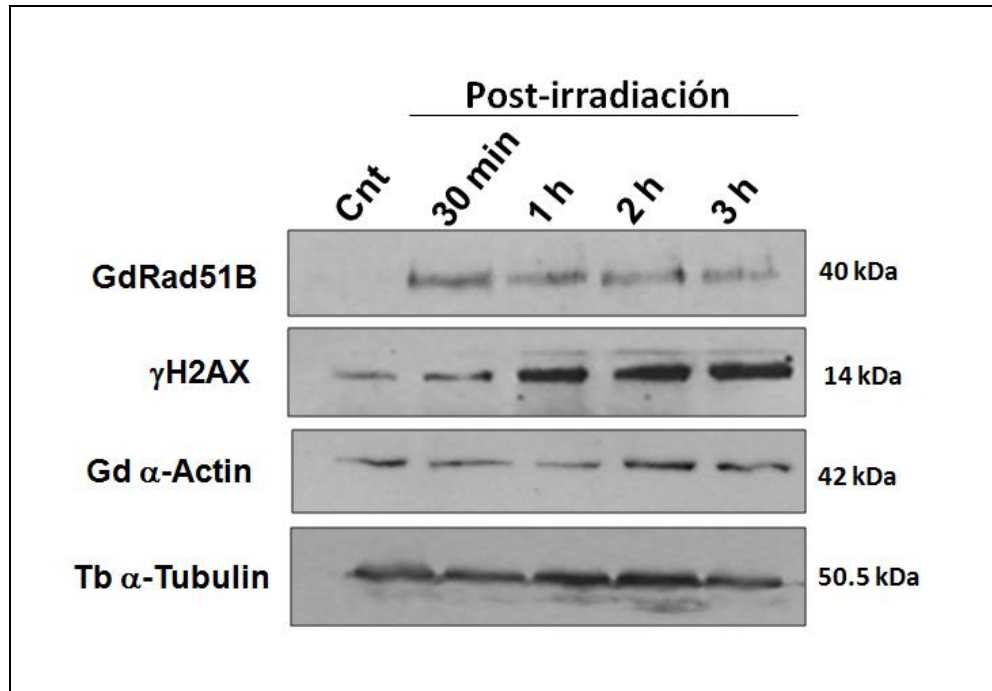


Figura 9. Detección de GdRad51 y de la histona GdH2A fosforilada mediante Western- Blot en muestras correspondientes a diferentes tiempos post-irradiación. Como controles de carga se detectaron α -Actina y α -Tubulina de *Giardia*. La dosis utilizada fue de 100 Gy. Ana Laura Torres Huerta. Manuscrito en preparación

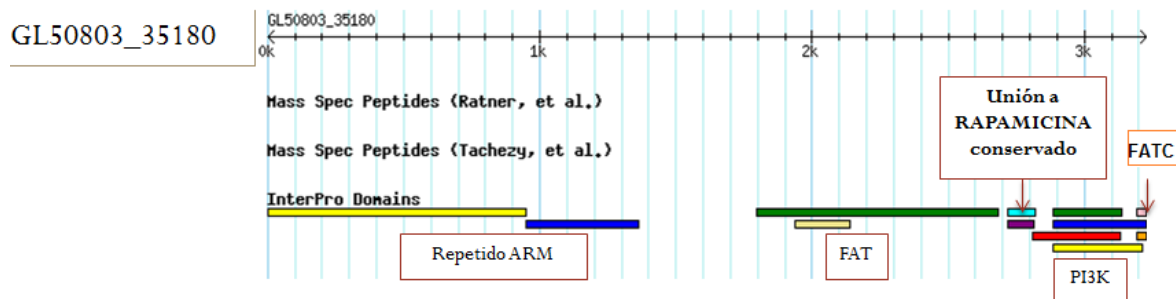
Por otro lado, se determinaron las actividades catalítica de las proteínas del complejo MRN, entre éstas se determinó la actividad nucleolítica *in vitro* de GdMre11 además de verificar su respuesta posterior a un tratamiento con radiación gamma, lo que confirma su papel durante los proceso de reparación o recombinación (Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez, Martinez-Miguel, & Bermudez-Cruz, 2015).

La búsqueda *in silico* de la proteína homóloga ATM/Tel-1 en el genoma de *Giardia duodenalis* en la base de datos de *Giardia-DB*, así como la caracterización de los dominios conservados, permitieron identificar dos candidatos putativos, basado en el valor E, que corresponden a los números de acceso GL50803_35180 con un peso molecular de 363.193 kDa y GL50803_16805 Hypotetical protein con un pe-

so molecular de 294.004 kDa. Los dominios altamente conservados identificados son: Repetidos ARM, dominio FAT, FATC, PI3K detallados por la base de datos SUPERFAMILY, PFAM, PROFILE y SMART de Interpro (Valdez-Vargas. Maestría 2014).

Candidatos homólogos a ATM-Tel1 en *Giardia duodenalis*

A. GL50803_35180 Referido como GTOR.



B. GL50803_16805 Hypothetical protein

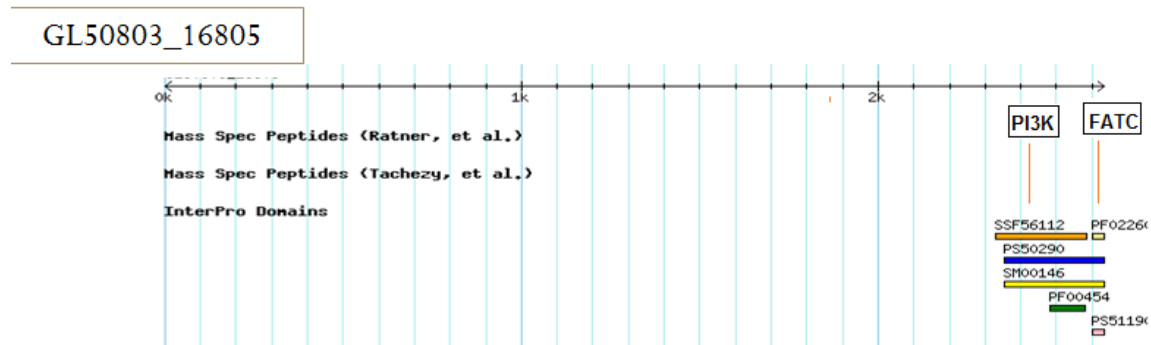


FIGURA 10. Identificación de dominios conservados en las proteínas putativas GdATM/Tel1.

A. Candidata correspondiente a GdTOR con los dominios característicos de una proteína ATM típica y un sitio de unión a rapamicina. B. Correspondiente a una proteína hipotética con únicamente dos dominios FATC y PI3K Claudia Valdez Vargas (Maestría, 2014).

Interesantemente, la candidata que presentaba todos los dominios típicos de una ATM también presentaba un sitio de unión a rapamicina, por lo que se realizó el

análisis de la conservación de esta secuencia con respecto a aquellas de proteínas ya caracterizadas (Valdés-Vargas. Maestría. 2014). Estos resultados revelaron que este sitio no estaba bien conservado en GdATM. Por lo que sería importante evaluar el efecto de rapamicina en la actividad de fosforilación de la proteína putativa GdATM.

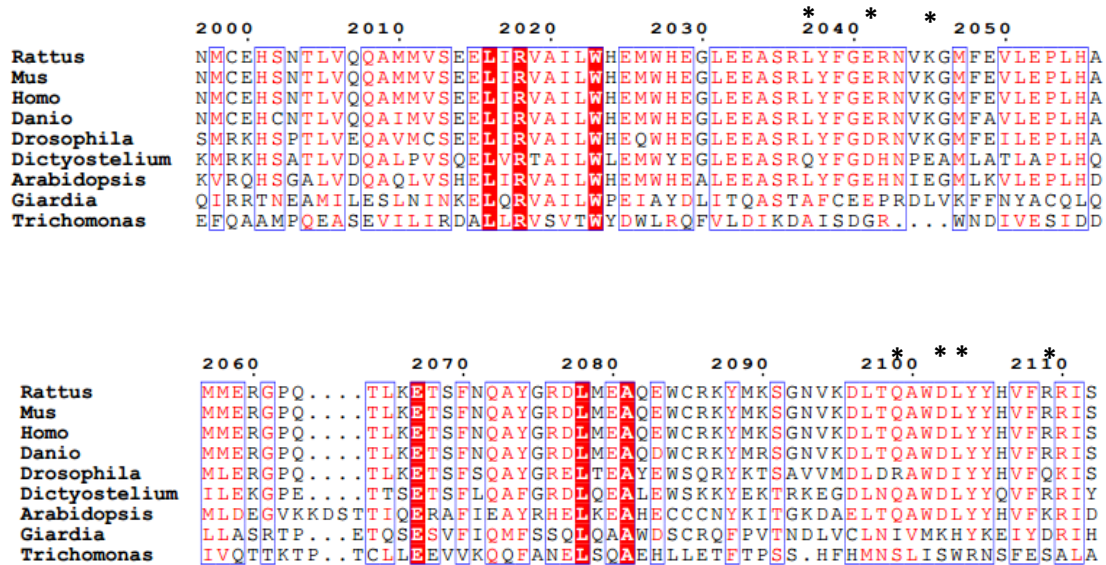


Figura 11. Alineamiento de las secuencias TOR. Se muestra únicamente el dominio de unión del complejo Rapamicina – FKBP de los aminoácidos 2012 – 2114. Los asteriscos resaltan los residuos altamente conservados de interacción química con Rapamicina. Los números superiores se refieren a TOR de *Rattus norvegicus*. (Valdez-Vargas. Maestría. 2014)

Una vez identificada, se realizó una construcción para etiquetar el gen homólogo a ATM/Tel1 con tres epitopes de hemaglutinina integrándolo en el genoma para mantener su expresión endógena y posteriormente identificar a la proteína con un anticuerpo anti-HA. (Valdez-Vargas. Maestría 2014).

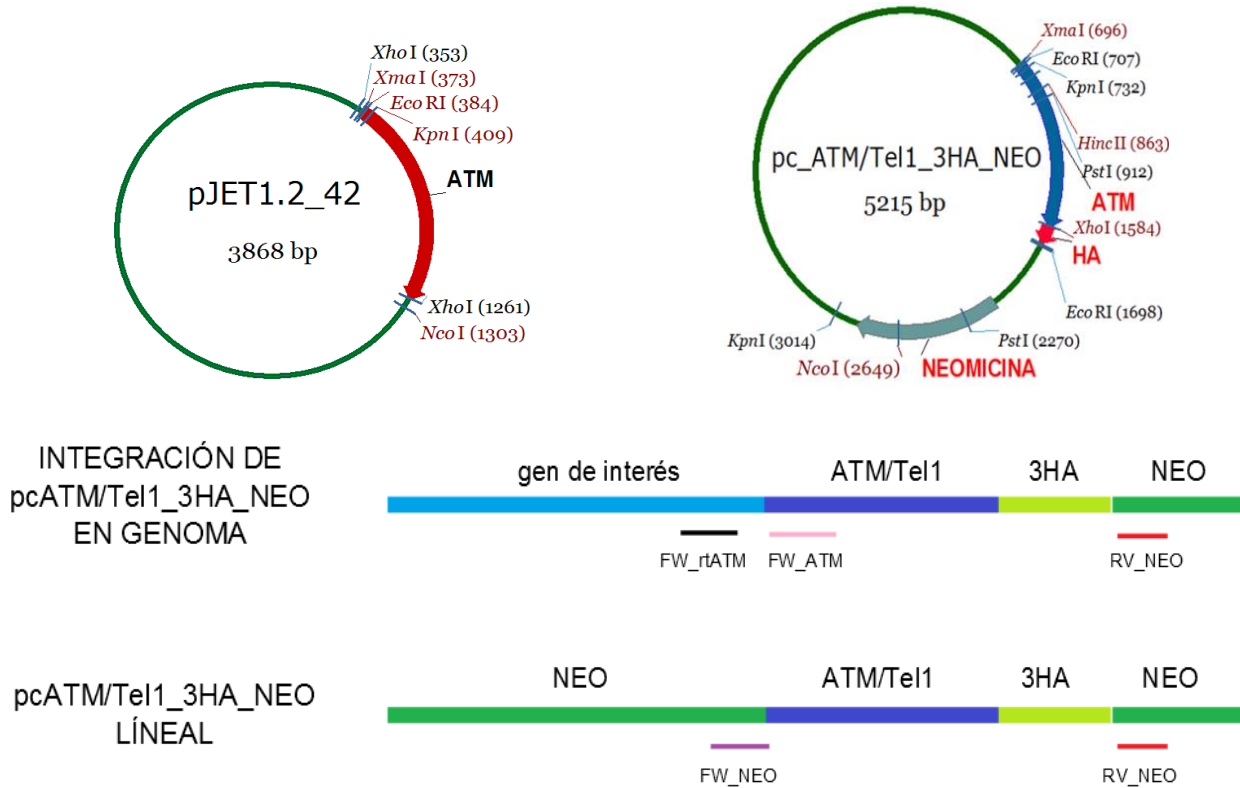


FIGURA12. Construcción realizada para etiquetar el gen putativo ATM-Tel1, mediante integración del vector pc ATM/Tel1_3HA_NEO en el genoma de *Giardia duodenalis*. (Valdez-Vargas. Maestría 2014).

Se realizó la identificación de la proteína ATM-Tel1 putativa de *Giardia duodenalis* mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-3HA por la técnica de western blot (Bazán-Tejeda, Valdez-Vargas. Maestría 2014).

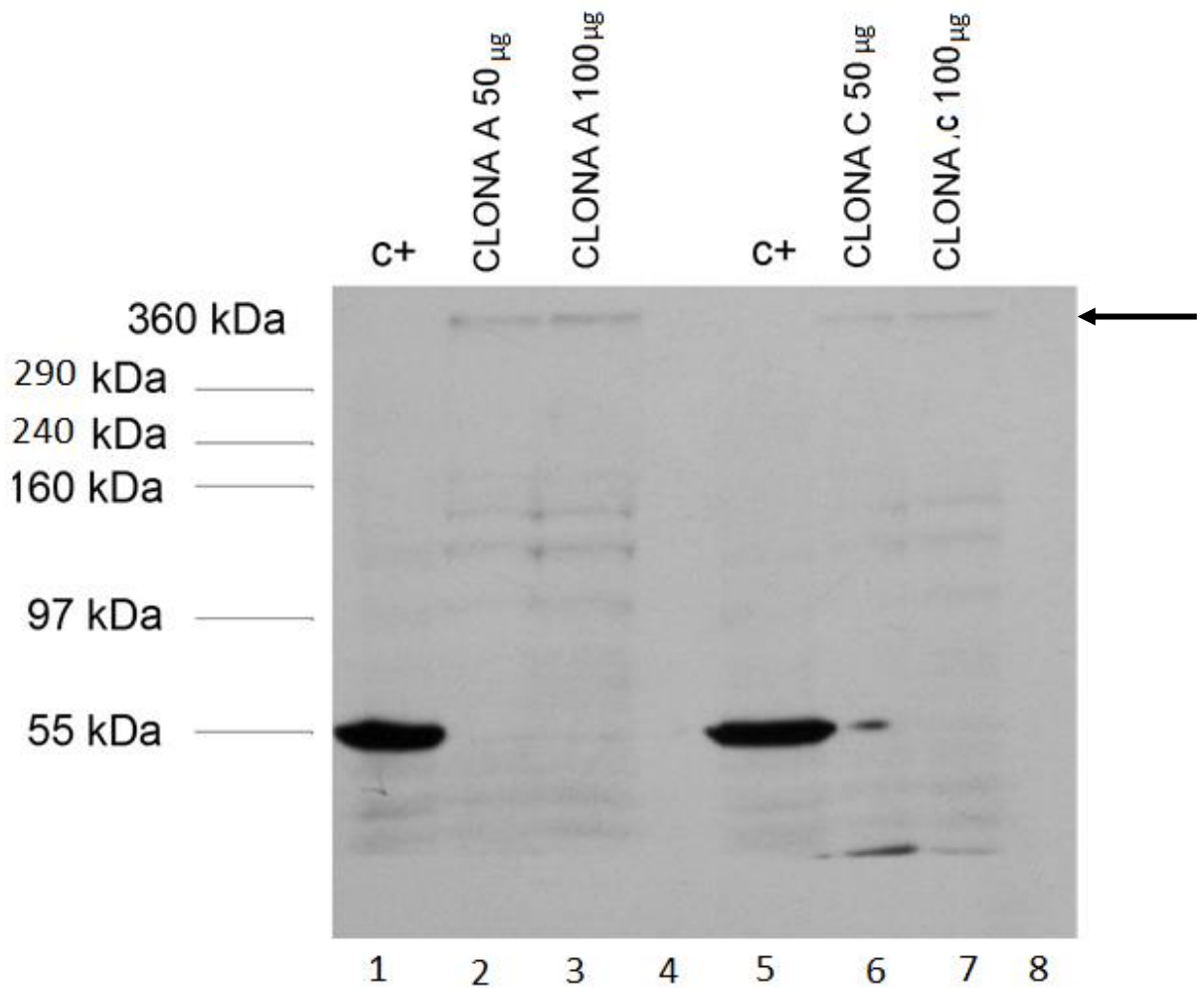


Figura 13 . Western- blot anti- 3HA. Carril 1 corresponde al contro positivo GdRad51B de 55KDa.

Se cargarón 50µg y 100µg de proteínas ATMTel1-3HA provenientes de trofozoitos trangenicos identificados como clona A y C respectivamente, detectando la proteina de interes correspondiente a un peso molecular de 360 kDa observadas en los carriles 2,3,6 y 7.

6. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la importancia evolutiva y a las características minimalistas de *G. duodenalis* es relevante estudiar el proceso de reparación del DNA por recombinación homóloga. En este proceso se presenta la fosforilación de la histona GdH2A, actividad relacionada con la proteína ATM, la cual en *Giardia* tiene los dominios de una ATM típica. Así, es importante caracterizar esta proteína y su actividad de fosforilación empleando inhibidores específicos de ATM. Esto permitirá determinar su papel en el proceso de reparación en *Giardia duodenalis*.

7. HIPÓTESIS.

Si la proteína GdATM/Tel-I es una cinasa que participa en la transducción de señales y fosforila diversos sustratos efectores, entonces GdATM/Tel-I putativa, fosforilará a la histona H2A.

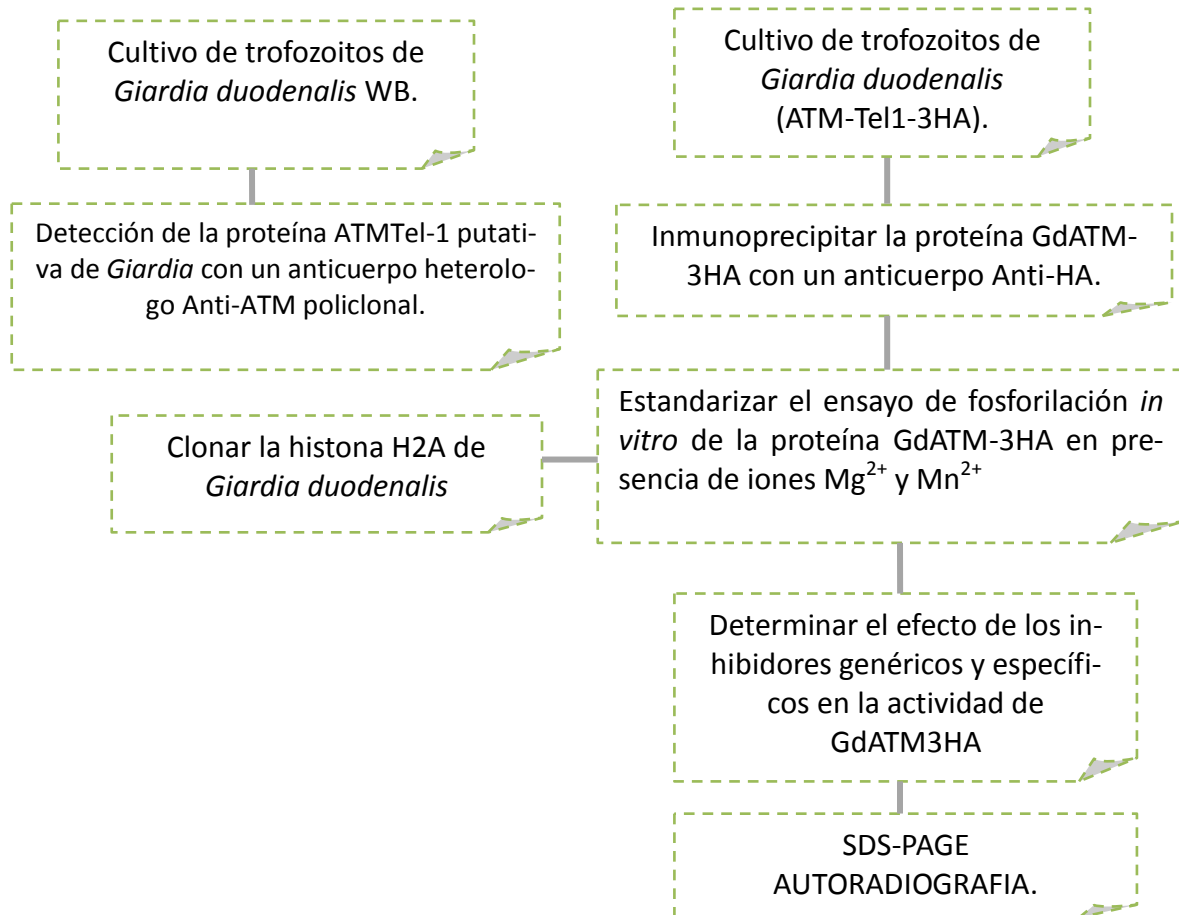
8. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la actividad de fosforilación *in vitro* de la proteína homóloga ATM/Tel-1 de *Giardia duodenalis*.

9. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Purificar la proteína GdATM de trofozoitos de *Giardia duodenalis*.
- 2.- Determinar la actividad de fosforilación *in vitro* de la proteína GdATM.
- 4.-. Determinar el efecto de inhibidores genéricos y específicos en la actividad de cinasa de la proteína GdATM.

10. Esquema general de la estrategia experimental



11. METODOLOGIA.

11.1 Cultivo *in vitro* de *G. duodenalis*

Se utilizaron trofozoitos de la cepa C99 o de trofozoitos transgénicos ATM-Tel1-3HA de la misma cepa los cuales fueron previamente obtenidos mediante la transfección con una construcción que expresa la proteína ATM etiquetada en el extremo c-terminal con 3 repetidos de hemaglutinina (3HA)- Epitope-tagged-ATM (Valdez-Vargas., Maestría 2014). Los trofozoitos fueron cultivados en medio TYI-S-33 modificado, suplementado al 10% con suero fetal bovino (Hyclone) y antibiótico-antimicótico (hyclone) y se mantuvieron a 37°C en condiciones microaerofílicas. Los parásitos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (48h) y se cuantificaron para su análisis.

11.2 Extracción de DNA genómico de *Giardia duodenalis*

Partiendo de un cultivo de trofozoitos confluyente (crecidos en medio TYI-33) de la cepa WB se realizó la extracción de DNA genómico. El cultivo de trofozoitos contenido en un tubo se incubó 30 minutos en baño de hielo para despegar a los trofozoitos. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 4°C a 2,000 g por 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con 10 ml de PBS frío y se centrifugaron nuevamente. Después de que los trofozoitos fueron concentrados se incubaron toda la noche a 42°C en buffer de lisis (10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 10 mM de EDTA, 150 mM NaCl, 0.4% SDS y 200 µg /ml de proteinasa K), usando 400µL por cada 10 millones de trofozoitos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó RNasa a una concentración final de 20 µg/ml y se dejó incubando por 30 minutos a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó la extracción del DNA mediante la técnica fenol-cloroformo y se mezcló completamente, después se centrifugó durante 5 minutos a 10, 000 g, posteriormente se recuperó la fase acuosa para precipitar el DNA con acetato de sodio a un concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol frío absoluto, se dejó incubando durante 10 min y se centrifugó 10 min a 1,1000 g. Al finalizar, la pastilla obtenida se lavó con dos volúmenes de etanol al 70 % para eliminar restos de sales y se resuspendió la pastilla en agua

grado milliQ y se almacenó a -20 °C. La calidad de DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó el DNA con un espectrofotómetro.

11.3 Preparación de células electrocompetentes

Se crecieron 10 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB), sin antibiótico , con una colonia de la cepa comercial One Shot Top-10 (Invitrogen) con genotipo *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔm15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 gal/U gal/K rpsL (StrR) endA1 nupG* durante toda la noche a 37° C, se usó 1ml de este cultivo a 100 ml de medio Luria Bertani (para 1 L se disolvió: 10 gr de Triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de NaCl pH 7.0 en 950 ml de agua destilada) o medio S.O.C (para 1 L se disolvió: 20 gr de Triptona, 5 gr de extracto de levadura y 0.5 gr de NaCl en 950 ml de agua destilada).Se dejó crecer a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica ente 0.5-0.7, se colocó la muestra 20 minutos en hielo, se dividió el volumen total a la mitad y se centrifugó a 5,000g a 4°C, enseguida se colocó en hielo nuevamente durante 15 minutos . En condiciones de esterilidad se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en agua destilada, esto se realizó dos veces. La pastilla resultante se resuspendió cuidadosamente en glicerol al 10 % y se centrifugó durante 10 minutos a 4° C. La pastilla obtenida finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10 %, se realizaron alícuotas de 25 µl y se conservaron a -70°C.

11.4 Preparación de células químicamente competentes

Se realizó el mismo procedimiento que en el crecimiento de las células electrocompetentes, (finalmente la pastilla resultante se resuspendió en 16.65 ml de la solución Tfb1y se colocó 5 minutos en hielo. Se repitió la centrifugación a 5000 g durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se le adicionó 2 ml de solución TfbII, posteriormente se dejó reposar 15 minutos en hielo y finalmente se realizaron alícuotas de 50 µl y se conservaron a -70°C.

11.5 Reacción de ligación para clonar en vector de expresión pET-100

El producto fresco de PCR 0.5-4 μ l, se adicionó 1 μ l de solución salina para transformación química o electroquímica; posteriormente se adicionó 1 μ l del vector TOPO. Se mezcló cuidadosamente, se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. De la mezcla anterior (6 μ l) se tomaron 3 μ l y se procedió a transformar en 25 μ l de células químicamente competentes TOP10 *E. coli* F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ m15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*)7697 *gal/U gal/K rpsL* (StrR) *endA1 nupG* o electrocompetentes, finalmente se incubó 30 minutos en hielo.

11.6 Transformación química de células Top10 de *E. coli*

Se adicionó 3 μ l de la reacción de ligación a un vial de 25 μ l de células químicamente competentes Top10, se incubó en hielo durante 30 minutos e inmediatamente se les dio un choque térmico en un termobloc durante 30 segundos a una temperatura de 42°C sin agitación. Posteriormente se adicionaron 250 μ l de medio S.O.C. Se incubó en agitación constante a 200 rpm a 37°C durante 1 hora al finalizar el tiempo se vertió el vial en condiciones de esterilidad en una placa de medio LB con el antibiótico de selección (ampicilina) y se dejó incubando toda la noche a 37 °C, Se seleccionaron 5 colonias al azar y se sembraron por separado en una caja petri. Después se realizó PCR de colonia para verificar que fueron positivas para el inserto. Se aisló el plásmido por Miniprep, se analizó por restricción para confirmar la presencia y correcta orientación del inserto. Finalmente se realizó la secuenciación de la construcción en la unidad de Ácidos Nucleicos para su lectura.

11.7 PCR de colonia

Se tomó una colonia aislada y se le resuspendió en 50 μ l del coctel de PCR, se incubó por 10 minutos a 94°C para lisar las células e inactivar a las nucleasas, el material genético presente en el lisado se utilizó para realizar la amplificación. Está se realizó en un termociclador de acuerdo a las condiciones especificadas para la GdH2A (mencionadas arriba) y para la extensión final se incubó a 72°C por 10 minutos. Finalmente se visualizó el producto de PCR esperado en gel de agarosa.

Una vez identificado la clona(s) correcta(s) se realizó un stock en glicerol y se conservó a -80°C por tiempo indefinido.

11.8 Extracción de plásmido por Miniprep

Se tomó una colonia y se inoculó en 10 ml de medio Luria Bertani (LB), conteniendo el antibiótico de selección, se incubó toda la noche. El cultivo se colocó en hielo y se centrifugó durante 30 segundos a 12,500 g para concentrar la pastilla bacteriana. Se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 350 µl de buffer STET (10mM Tris-HCl, 1mM de EDTA, 100 mM NaCl y 5% de Triton X-100 v/v), después se resuspendió en éste buffer y se añadió 25 µl de lisozima (2 mg/ml). Se dejó incubando a temperatura ambiente 5 minutos, después se colocó en agua hirviendo 1 minuto para desnaturalizar la lisozima. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos, la pastilla obtenida se retiró del tubo y se agregaron 3.5 µl de 0.2 mg/ml RNAsa A, dejando incubar por 10 minutos, después se adicionaron 75 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µl de isopropanol (0.8 volúmenes). Se homogenizó y se dejó incubando por 10 minutos, se centrifugó nuevamente a 12,500 g durante 10 minutos. Enseguida se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla con dos volúmenes de etanol al 70 % para eliminar sales, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 10µl de agua.

11.9 Extracción de DNA por Easyprep

Se inoculó una colonia en 10 ml de LB, se dejó incubando durante toda la noche, se tomó 1.5 ml del medio en un tubo eppendorf, se centrifugó a 12,500 g durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se repitió el paso anterior 3 veces tomando la pastilla proveniente de 4.5 ml de medio. Una vez obtenida la pastilla celular se resuspendió en 50 µl de buffer de lisis. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, después 1 minuto en ebullición, posteriormente enhielo 2 minutos. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12,500 g, recuperando el sobrenadante y vertiéndolo en un tubo nuevo cuidadosamente, Se analizó en gel de agarosa para evaluar la calidad del plásmido. Finalmente se cuantifico en el espectrofotómetro *eppendorf BioPhotometer*.

11.10 Reacción de secuenciación

Se mezcló 2 μ l de DNA, 1 μ l de oligonucleótido T7 12 μ M y 9 μ l de agua grado milliQ en un tubo para PCR de 50 μ l. Se calentó la reacción a 72° C en el termociclador durante 5 minutos, posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente 5 minutos y se adicionó 4 μ l de buffer big dye. Una vez terminado la reacción se estableció las condiciones en el termociclador: 96°Cx30 segundos 30 ciclos de (96°Cx20segundos, 53°Cx20 segundos, 60°Cx4 minutos) 4°C por 7 minutos. Se precipitó con EDTA- Etanol al 100%. Se centrifugó un minuto, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó 5 μ l de EDTA 125mM pH 8.0 y 60 μ l de etanol al 100%. Se removió todo el sobrenadante y se lavó con 270 μ l de etanol al 70%dos veces. Finalmente se removió todo el sobrenadante y se dejó secar por 30 minutos o el tiempo necesario.

11.11 Expresión de GdH2A en células *E. coli* BL21.

Se tomaron 50 ng (1 μ l) de plásmido y se transformaron en células BL21 (DE3) cepa [*F⁻ ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dmc rne131* (DE3)], mezclando gentilmente con una pipeta, se incubó 30 minutos en hielo e inmediatamente después se dio choque térmico durante 30 segundos a 42°C y se colocó el tubo en hielo nuevamente durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 250 μ l de medio S.O.C, se agitó el tubo y se llevó a incubar a 37°C por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se transfirieron 100 μ l de la reacción de transformación a una placa de medio LB con el antibiótico de selección (ampicilina). Posteriormente se espatuló la reacción, se cerró la caja petri y se llevó a incubar a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias al azar y se aislaron en otra placa de medio LB con ampicilina cada una por separado.

Al día siguiente, se tomó una colonia de las cinco aisladas al azar. Se inoculó en a 3 ml de medio LB y se dejó incubando toda la noche a 37°C en agitación constante, transcurrido este tiempo se tomaron 500 μ l de este cultivo y se transfirieron a 10 ml de medio LB con 10 μ l de ampicilina llevándose a incubar el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica entre 0.5-0.7(D.O.₆₀₀ mid-log).Una vez logrado ésto se dividió el cultivo en dos matraces distintos por volúmenes iguales y

se rotularon como inducible con IPTG (Isopropil-D- β -tiogalactopiranosido) con una concentración final de 1 mM y sin inducir al que no se le adiciono IPTG. Se procedió a tomar alícuotas en diferentes tiempos post- inducción iniciando desde el tiempo cero hasta las 1, 2 y 3 de ambos matraces. Una vez tomadas las primeras dos alícuotas correspondientes al tiempo cero se llevaron los matraces a incubar a 37°C para posteriormente tomar las alícuotas correspondientes a la primera hora y así sucesivamente hasta llegar a la tercer hora, tiempo en el que el cultivo fue concentrado por centrifugación a 7,000 g a 4°C por 10 minutos para obtener el paquete celular. Posteriormente la pastilla celular se le añadió buffer de lisis y lisozima a una concentración final de 1mg/ml y se resuspendió completamente, se incubó en hielo por 30 minutos, se sónico a 85% de amplitud 3 veces x 20 segundos con 1 minuto de descanso. Finalmente se centrifugó el lisado a 10,000 g a 4°C por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante, una vez terminado este procedimiento se prosiguió a montar las columnas con Ni-NTA y se realizó la purificación de la proteína a 4°C para evitar la degradación. El procedimiento que se realizó fue el siguiente: primeramente se pasaron las siguientes soluciones por la columna: 10 ml de agua bidestilada y 10 ml de buffer de lisis después se prosiguió a pasar la muestra por duplicado recuperando la extracción en tubos eppendorf de 50 ml. Una vez finalizado este procedimiento se pasaron 50 ml de buffer lisis con una concentración de Imidazol de 30 mM, después 50 ml de buffer lisis con una concentración de Imidazol de 50 mM y finalmente 2.5 ml de buffer lisis con una concentración de Imidazol de 250 mM. Se recolectaron alícuotas de cada extracto de 1 ml en tubos eppendorf y se guardaron a 4°C. Una vez terminada la purificación se guardaron las columnas previamente lavadas con 10 ml de ácido acético 200 mM, 10 ml de glicerol al 30% y 5 ml de etanol al 30%. Al día siguiente se trabajó con las alícuotas conservadas a 4°C tomando una alícuota nuevamente de cada tubo de 20 μ l y adicionándoles 10 μ l de buffer Laemmli 2X. Durante este procedimiento se conservaron las muestras en hielo, se hirvieron durante 5 minutos. Finalmente se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y se realizó la detección de la señal por Western-blot.

11.12 Western Blot

Una vez que las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, lo cual se verificó mediante la tinción con rojo de ponceau, se lavó la membrana con TBST (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0.05%) hasta que se eliminó el colorante. Para bloquear la membrana se utilizó leche en polvo a una concentración final de 5% en buffer TBST incubando durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se retiró la leche, se lavó la membrana con TBST 3 veces durante 5 minutos y posteriormente se agregó el primer anticuerpo anti-histidina con buffer TBST a una dilución 1:7,000 durante toda la noche. Al día siguientes se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 minutos con buffer TBST, entonces se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón a una dilución de 1:30,000 en buffer TBST y se dejó incubando durante 2 horas, después se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBST y finalmente se reveló mediante quimioluminiscencia.

11.13 Inmunoprecipitación de GdATM-HA

Este procedimiento se llevó a cabo como se describió previamente (Saraiya, Li, & Wang, 2011). Se emplearon 10^8 trofozoitos de cultivos confluentes, se realizaron 3 lavados de los trofozoitos con PBS. Después de cada lavado las células se centrifugaron a 5,000 g durante 10 min, se lisaron con 700 μ l de buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7.5, 2 mM de EDTA a pH 8.0, 1%NP-40), en presencia del coctel de inhibidores de proteasas Complete 7x libre de EDTA (Roche). Para la Inmunoprecipitación de la proteína se utilizó el kit Pierce HA-Tag IP/Co-IP Kit (thermo scientific). Las células lisadas se incubaron con 20 μ l de perlas de agarosa que mantienen acoplado el anticuerpo anti-HA por un tiempo de 2 horas a 4 °C en agitación constante en una columna proporcionada por la casa comercial para realizar el experimento, enseguida se prosiguió a lavar las perlas con buffer TBS-T por 3 veces para eliminar residuos no deseados, descartando el sobrenadante.

11.14 Ensayo de actividad de cinasa

Para la realización de este ensayo se preparó 50 ml de buffer cinasa (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MnCl_2$, 20 mM de $MgCl_2$, 1mM de NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 20 mM de β -glicerofosfato). La temperatura de almacenamiento de este reactivo fue de 4°C. En cada experimento realizado se analizaron cinco condiciones distintas para evaluar la actividad cinasa de GdATM-Tel1-3HA. Para este experimento se utilizó la GdATM-3HA inmunoprecipitado con el procedimiento anterior.

Para evaluar las cinco condiciones se adicionaron en cada columna de reacción 15 μ l de buffer cinasa, 1 μ l de ATP [32]-2 μ Ci (Volumen variable de acuerdo al decaimiento del γP^{32}), 1 μ l de ATP 1mM, 1 μ l de DTT 1mM, 1 μ l de ATP 10 μ M y 5 μ l de sustrato 1 μ g/ μ l(PHAS-I).

Columna-1: se adicionó 2 μ l de $MnCl_2$ 5mM y el volumen necesario de H_2O para completar un volumen total de 30 μ l. Columna-2: se adicionó 3.3 μ l del inhibidor Ku55933 1,125 μ M para obtener una concentración final de 125 μ M en 30 μ l de volumen total. Columna-3: se adicionó 4 μ l del inhibidor rapamicina 56.25 μ M para obtener una concentración final de 7.5 μ M en 30 μ l de volumen total. Columna 4: se adicionó la cantidad de H_2O necesaria para obtener 30 μ l de volumen total y evaluar la actividad de GdATM-Tel1-3HA en presencia de $MgCl_2$. Columna 5: Se adicionó 15 μ l de buffer cinasa, 1 μ l de ATP [32]-2 μ Ci (Volumen variable de acuerdo al decaimiento del γP^{32}), 1 μ l de ATP 1 mM, 1 μ l de DTT 1 mM, 1 μ l de ATP 10 μ M y la cantidad de H_2O necesaria para obtener 30 μ l de volumen total y así poder evaluar la actividad de la proteína en ausencia de sustrato PHAS-I.

Como control negativo en el experimento se trabajó con una cepa WB no transgénica identificada como C99, se inmunprecipitó utilizando el procedimiento explicado en el punto 11.13. Se evaluaron dos condiciones (dos columnas).

Columna-1: Se adicionó 15 μ l de buffer cinasa, 1 μ l de ATP [32]-2 μ Ci (Volumen variable de acuerdo al decaimiento del γP^{32}), 1 μ l de ATP 1 mM, 1 μ l de DTT 1 mM, 1 μ l de ATP 10 μ M, 2 μ l de $MnCl_2$ 5 mM, 5 μ l de sustrato 1 μ g/ μ l (PHAS-I) y la cantidad de H_2O necesaria para obtener 30 μ l de volumen total. Columna-2: Se adicionó 15 μ l de buffer cinasa, 1 μ l de ATP [32]-2 μ Ci (Volumen variable de

acuerdo al decaimiento del γP^{32}), 1 μ l de ATP 1 mM, 1 μ l de DTT 1mM, 1 μ l de ATP 10 μ M, 5 μ l de sustrato 1 μ g/ μ l (PHAS-I) y la cantidad de H₂O necesaria para obtener 30 μ l de volumen total. Una vez obtenidas las condiciones a evaluar se incubaron 30 minutos a 30 °C. Posteriormente se adicionaron 7 μ l de buffer Laemmli 2X, se resolvieron en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Posteriormente el gel se tiñó con colorante azul de comassie durante 15 minutos en agitación constante, se vertió el colorante en un recipiente para su posterior uso, se retiró el exceso de colorante con agua bidestilada, se trató con glicerol al 3% por 1 hr en agitación constante y enseguida se trató con una solución ácido acético-metanol al 30% por 1hr en agitación constante después se colocó el gel en papel filtro y se cubrió con plástico adherente llevándose al secador de geles (Gel Dryer model 583 Biorad). Se utilizaron las condiciones para secar geles en gradiente. Una vez secado el gel se colocó en el casete de revelado con la placa y se expuso por 12 hrs a -80°C, finalmente se reveló al día siguiente.

12. RESULTADOS

12.1 Detección de la proteína homóloga ATM-Tel1 en trofozoitos de *Giardia duodenalis* usando un anticuerpo heterólogo.

Inicialmente, se procedió a detectar el homólogo a la proteína GdATM-Tel1 para lo cual se empleó un anticuerpo heterólogo dirigido al dominio c-terminal del dominio cinasa (abcam) disponibles comercialmente, utilizando una concentración de proteína de 50 μ g para detectar ATM-Tel1. Con estos resultados (figura 13), aunque se detectó una banda con un peso molecular de 170 KDa, la cual puede corresponder a productos de degradación de ATMTel1 o a alguna otra proteína cinasa miembro de esta familia, no se obtuvo la proteína del peso de 360 kDa esperado. Se utilizó como control positivo extracto celular de cerebro de ratón (50 μ g).

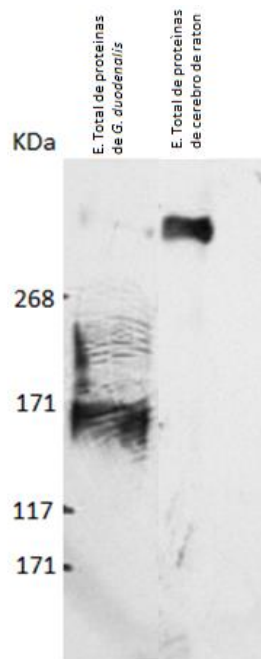


FIGURA 14. Detección por Western blot de ATM-Tel1. En la presente figura se muestra la señal obtenida con el uso del anticuerpo heterólogo anti-ATM. Carril 1 se cargaron 50 µg de proteína, carril 2 corresponde a extracto celular de cerebro de ratón con 50 µg de proteína.

12.2 Inmunoprecipitación de la proteína GdATMTel1-3HA de trofozoitos de *Giardia duodenalis*.

Debido a que el anticuerpo heterólogo no detectó la proteína de 360 kDa y dado que se tenía el transgénico GdATM-Tel1-3HA previamente generado (Valdés-Vargas. Maestría 2014). Con el propósito de aislar a la proteína GdATM-Tel1-3HA para Identificarla y usarla en ensayos de fosforilación *in vitro* se procedió a Inmunoprecipitarla a partir de un extracto total de 600 µg de proteínas totales, provenientes de trofozoitos transgénicos y resueltas en electroforesis SDS-PAGE (Figura 15 clona A y C, carril 4 y 6.), en donde se observó una banda que no coincidió con el peso molecular esperado de 360 kDa, sino que se obtuvo un peso mayor. Para descartar que las condiciones desnaturalizan de utilizadas (SDS) hayan sido insuficientes y lo que se estuviera observando fuera la proteína GdATM-Tel1-3HA formando complejos se procedió a tratar a la muestra y el gel con una concentración de urea 8 M. El resultado obtenido fue la detección de la señal en el peso correspondiente al de la proteína ATM Tel1-3HA de 360 kDa (Figura 16- carril 3). De estos resultados se puede ver que la proteína es muy escasa ya que su detección

es muy pobre cuando se usan extractos totales y ésta se puede detectar cuando la proteína es inmunoprecipitada. (Figura 14, carril 3 y 5 contra carriles 4 y 6; Figura 15 carril 3). Como control negativo se utilizó extracto total de proteínas de 100 µg y 600 µg provenientes de trofozoitos WB no transgénicos (Figura 14, carril 1 y 2).

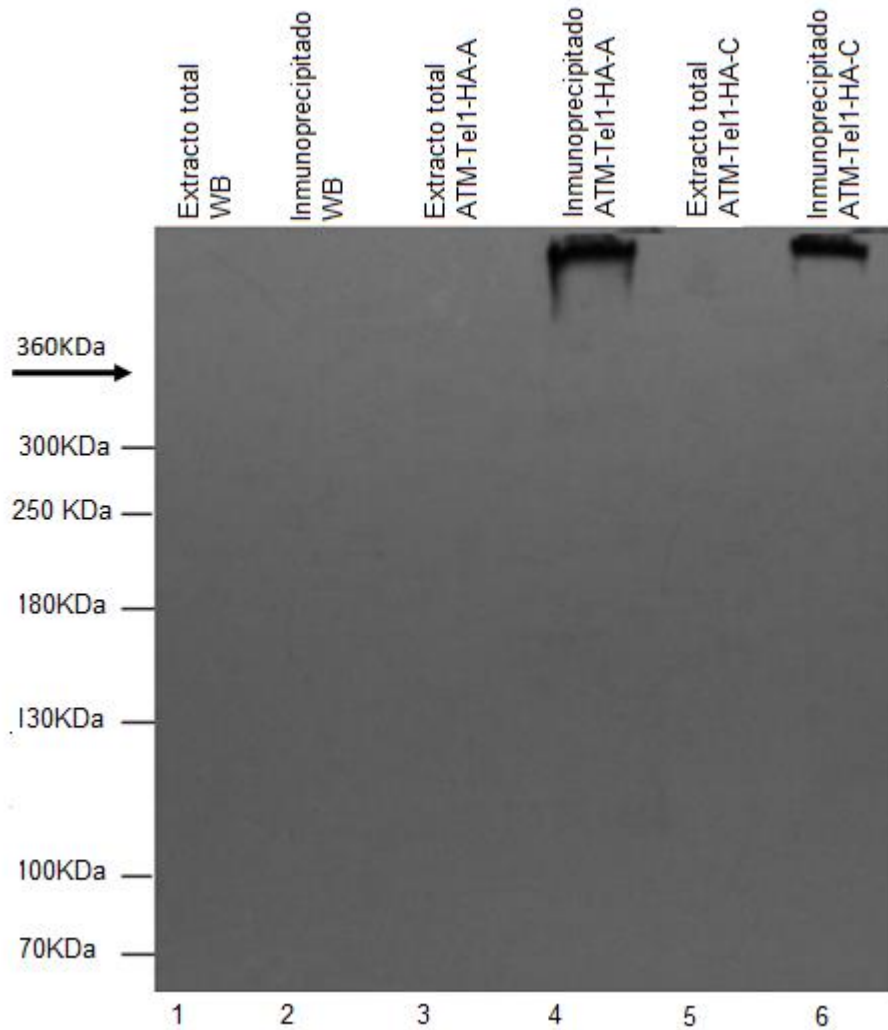
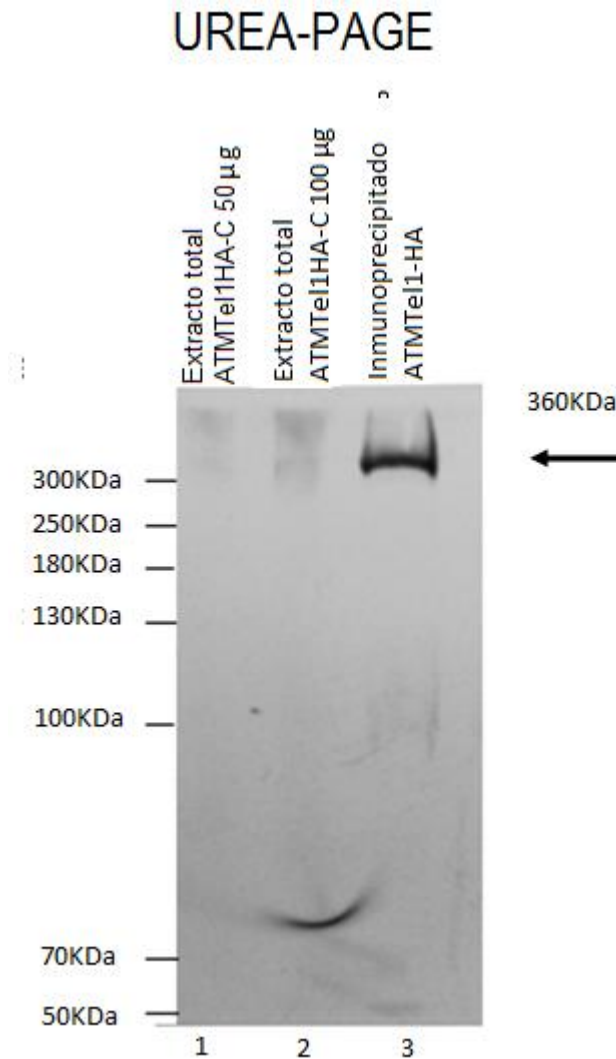


FIGURA 15. Western-blot de extracto total e Inmunoprecipitado de la proteína ATM-Tel1-3HA de *Giardia duodenalis*. La detección de la proteína se realizó empleando un anticuerpo monoclonal anti-HA. Carril 1,2: Extracto total e inmunoprecipitado proveniente de trofozoitos de *Giardia duodenalis* no transgénicos. En el presente trabajo se utilizaron dos clonas transgénicas identi-

cas como clona A y C. Carril 3, 4, 5 y 6: Extracto total e inmunoprecipitado proveniente de trofozoiti-



tos transgénicos..

FIGURA16. Ensayo de Western-blot para detectar a la proteína homóloga GdATM-Tel1-3HA.

Las muestras de este experimento y el gel al 6% que se utilizó para la resolución de las proteínas se trataron con urea a una concentración de 8M. Carril 1,2: Resolución de 50 y 100 µg de extracto total de proteínas de GdATM-Tel1-3HA.Carril 3: Perfil electroforético del inmunoprecipitado mediante electroforesis UREA-PAGE utilizando el anticuerpo anti-HA.

12.3 Clonación del gen GdH2A.

La histona GdH2A de *Giardia duodenalis* es uno de los sustratos de la proteína GdATM, por lo cual inicialmente procedimos a clonar esta proteína para utilizarla como el sustrato. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Oli-

go7 (Primer software analysis. Version 7.57) en donde se incluyó una secuencia de cuatro pares de bases (CACC) necesaria para dirigir la clonación en el extremo 5' del primer forward, característica del vector de expresión pET100/D-TOPO como se explicó en métodos. La figura 17 muestra la secuencia de la GdH2A y en rojo y amarillo se indica los primers "forward" y "reverse", respectivamente diseñados. De acuerdo el programa Oligo7, las condiciones de amplificación para los oligos GdH2A-Forward: 5'**CACCATGAGCACCAAGCCCGTCAA**3' y GdH2A-Reverse: 5'**ATGGCGGCCGATCCGTATGT** 3' fueron: inicio de: 94°Cx2min y 30 ciclos de 94°C x 2min-94°C x 1min-55°Cx1min- 72°Cx1.5min) con una extensión a 72°Cx7min.

>GdH2A

```
CCTTCTGCCAGTTCTTCCAGTTCGGTTAGCATTTTAGATCCTGCGTTTCCTTGTACTCCA
ACCGGCTGTGGGGTTGCCAGCGAAAGGTTTCTCTGTTGCATAAGCTGGCTTTTCCCCGGT
TTTTGGCAAAAGATTAAAAATGGAAATAGAAAGTCAAAGAGGTTAAAAATGAACCGTGTCT
TTATTATTTTATTACTTTATTTTCGTTTTTATCATTAGTTAGTATCATTAGTTAGAGATGT
CCAGGAGCGCAGATTTAGGCATAATTTTCAGTTTTAAATTGTCCGCGCAGATAAAGAAAGCC
CACCATGAGCACCAAGCCCGTCAAGGACAACAGCAAGATGAAGAGCAGGTCCGCGCGCGC
GGGGATCTCGTTCCCGATCGGGCGTATCCACCGCCACCTGCGCGAGGGCCGCTATGCAGA
GCGCATCTCGTCCGACGCGCCCGTCTACCTCGCGGCCGTCTCGAGAACGTCGTTCGAGA
GGTCTTCCGGGAGGCGTGCAACCACCGTGACAAGAAGAGCCAGAAGCGCATCGTCCCCAA
CCACATCCTAACTGCCCTCCGCAAGGACAAGGAGCTTTCGACCATCTTCGCCAACGTAC
AATCCGCGAGGGAGGCGTCGCCCGCTCCGCGAAGGAGGGAAGAGAGGGCAAGGGCTCCCA
TCGGTTCGAGGATCTTTGAGTGTGAGTCTGTAAACTATTGCTTAATTTGAAAATTCCGAG
TTAGGTTTCGTTTCCTTTCTCGCATGGCGGCCGATCCGTATGTAATACTCTGCGAGGCT
```

FIGURA 17. Secuencia nucleotídica del gen GdH2A. De muestra la localización del oligonucleótido sentido (GdH2A-Fw) en rojo y el oligonucleótido anti-sentido (GdH2A-Rv) en amarillo. El codón de inicio de traducción ATG subrayado. Empleando los oligonucleótidos específicos diseñados para GdH2A, se obtuvo el producto correspondiente por PCR esperado mostrado como una banda correspondiente a una longitud de 463-pb (Figura 18).

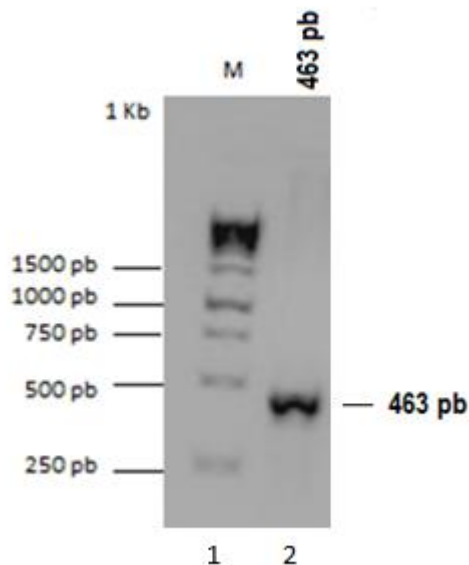


FIGURA18. Patrón electroforético en gel de agarosa al 1% de PCR de la amplificación de GdH2A utilizando los oligonucleótidos específicos para el vector pET-100/D-TOPO a partir del DNA genómico. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR correspondiente a la longitud del gen de interés GdH2A: 463pb

Una vez amplificados los productos de PCR pertenecientes a los marcos de lectura de GdH2A se realizó la ligación en el vector de clonación utilizando el plásmido pET-100/D-TOPO y éstas fueron transformadas como se describió en metodología. Las transformantes obtenidas fueron analizadas por PCR empleando los primers específicos para GdH2A. Como se puede ver en la figura 18, en la mayoría de las clonas se obtuvo un fragmento de 463-pb esperado para GdH2A (figura 18), tamaño que incluye la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas del vector. El producto amplificado fue secuenciado y comparado con la secuencia de GdH2A para verificar que no hubiera ninguna modificación (figura 20).

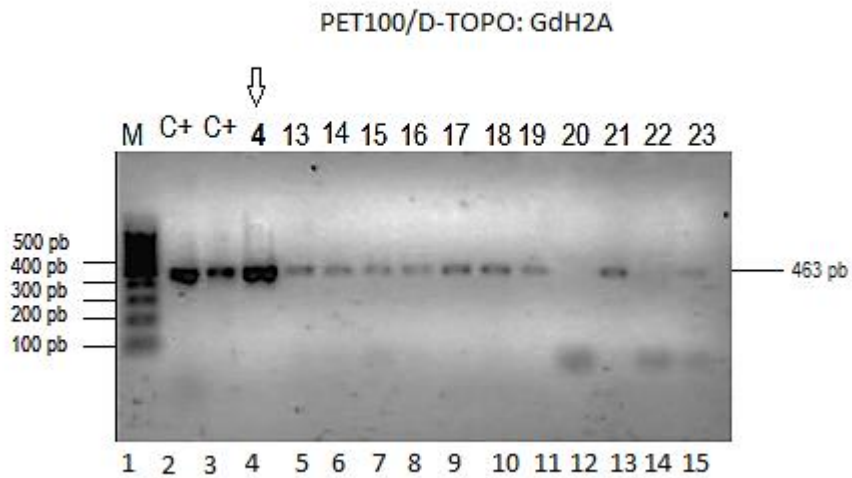


FIGURA 19. Patrón electroforético de DNA plasmídico en geles de agarosa al 1% de las diferentes clonas. pET100/D-TOPO: GdH2A: Carril (M) Marcador 1Kb. Carriles 1, 2: control positivo DNA genómico, producto de PCR de GdH2A. Carriles 13-23: DNA plasmídico extraído de clonas candidatas positivas para el inserto de GdH2A que corresponde a una longitud de 463-pb. La flecha indica la clona con la que se decidió trabajar identificada con el número 4.

Giardia intestinalis histone H2A gene, complete cds

Sequence ID: [gb|AF139873.1|AF139873](#) Length: 1682 Number of Matches: 1

Range 1: 983 to 1349 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
678 bits(367)	0.0	367/367(100%)	0/367(0%)	Plus/Plus
Query 50	CCATGAGCACCAAGCCCGTCAAGGACAACAGCAAGATGAAGAGCAGGTCCGCGCGCGCGG			109
Sbjct 983	CCATGAGCACCAAGCCCGTCAAGGACAACAGCAAGATGAAGAGCAGGTCCGCGCGCGCGG			1042
Query 110	GGATCTCGTTCCCGATCGGGCGTATCCACCGCCACCTGCGCGAGGGCCGCTATGCAGAGC			169
Sbjct 1043	GGATCTCGTTCCCGATCGGGCGTATCCACCGCCACCTGCGCGAGGGCCGCTATGCAGAGC			1102
Query 170	GCATCTCGTCCGACGCGCCCGTCTACCTCGCGGCCGTCTCGAGAACGTCGTCGCAGAGG			229
Sbjct 1103	GCATCTCGTCCGACGCGCCCGTCTACCTCGCGGCCGTCTCGAGAACGTCGTCGCAGAGG			1162
Query 230	TCTTCCGGGAGGCGTGCAACCACCGTGACAAGAAGAGCCAGAAGCGCATCGTCCCCAACC			289
Sbjct 1163	TCTTCCGGGAGGCGTGCAACCACCGTGACAAGAAGAGCCAGAAGCGCATCGTCCCCAACC			1222
Query 290	ACATCCTAACTGCCCTCCGCAAGGACAAGGAGCTTGGCACCATCTTCGCCAACGTCACAA			349
Sbjct 1223	ACATCCTAACTGCCCTCCGCAAGGACAAGGAGCTTGGCACCATCTTCGCCAACGTCACAA			1282
Query 350	TCCGCGAGGGAGGCGTCGCCCGCTCCGCGAAGGAGGGAAGAGAGGGCAAGGGCTCCCATC			409
Sbjct 1283	TCCGCGAGGGAGGCGTCGCCCGCTCCGCGAAGGAGGGAAGAGAGGGCAAGGGCTCCCATC			1342
Query 410	GGTCGCA	416		
Sbjct 1343	GGTCGCA	1349		

FIGURA 20 Secuenciación parcial del extremo 5' de pET100/D-TOPO-GdH2A. Alineamiento del resultado de la secuenciación de la clona 4 con la secuencia GdH2A de la base de datos de Giardia. En donde se demuestra que no existen mutaciones, ni deleciones en el gen y como el 100 % de identidad entre las secuencias.

Después de verificar la identidad del gen, se procedió a transformar en células BL21-43 para inducir la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG (ver metodología) y se realizó el western- blot. Lamentablemente, a pesar que la secuenciación reveló que no había modificaciones en la proteína, no se obtuvo señal de expresión de la GdH2A para ninguno de los tiempos analizados, la cual se esperaba de 14 kDa (figura 21).

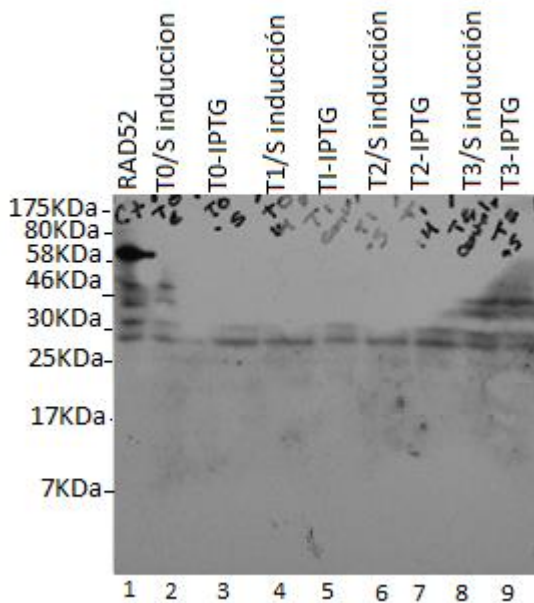


FIGURA 21. Expresión de la proteína GdH2A de *Giardia duodenalis*. Análisis de expresión de la proteína GdH2A. Carril 1: Control positivo correspondiente a la proteína rad52. Carril 2, 4, 6 y 8: Expresión al tiempo 0, 2 y 3 horas sin adicionar IPTG. Carril 3, 5, 7 y 9: Expresión al tiempo 0, 1 y 3 horas post- inducción con 20 µl de IPTG 1 mM. El anticuerpo utilizado fue anti-histidina. El peso molecular de la proteína GdH2A corresponde a 17 kDa.

12.4 Análisis funcional de la proteína ATM-Tel1-3HA putativa de *Giardia duodenalis*.

Para determinar si esta proteína presentaba actividad catalítica de cinasa, se realizaron ensayos de actividad *in vitro* de cinasa usando como sustrato a PHAS-I (4EBPI) ampliamente utilizado para este tipo de cinasas (Kozlov et al., 2003), en presencia y ausencia del cofactor divalente Mn^{2+} y Mg^{2+} , como control negativo. Esta técnica se realizó con la proteína ATM-Tel1-3HA inmunoprecipitada a partir de proteínas de trofozoitos transgénicos, empleando un sistema de Inmunoprecipitación con perlas de agarosa que tienen inmovilizado el anticuerpo anti-HA. Los resultados mostraron que la proteína GdATM-Tel1-3HA presenta actividad de cinasa (figura 21, carril 7 contra 1), demostrando que la enzima es activa en ensayos de fosforilación. También observamos que al igual que en otros organismos,

esta proteína se activa *in vitro* en presencia del ion divalente Mn^{2+} y no presenta actividad de cinasa al ser tratadas con Mg^{2+} . Sin embargo no se observó una inhibición significativa al tratar las proteínas con el inhibidor específico de ATM Ku55933 a una concentración de 125 μM . Tampoco se observó efecto del inhibidor rapamicina a una concentración de 7.5 μM .

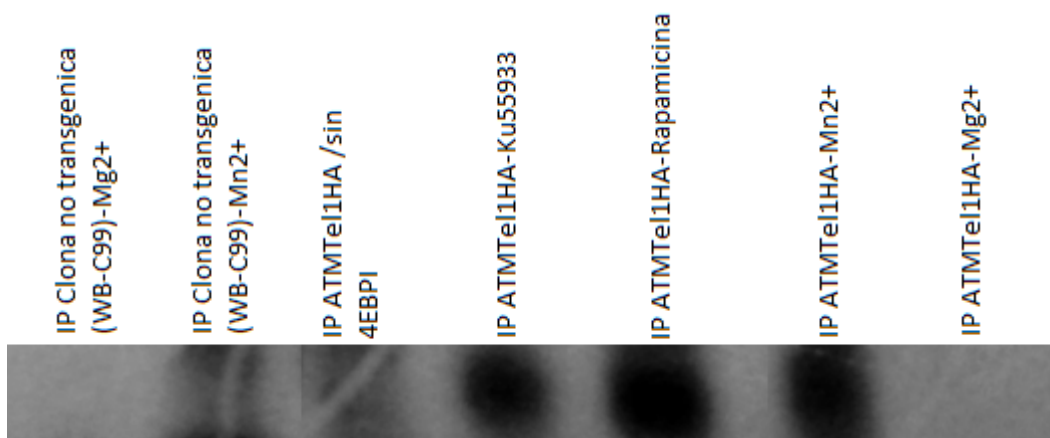


FIGURA 22. Actividad enzimática de ATM-Tel1 putativa de *Giardia duodenalis*. Proteína purificada GdATM-Tel1-3HA se sometió a ensayos de actividad de cinasa en presencia y ausencia de cofactores Mn^{2+} y Mg^{2+} usando como sustrato 4EBP1 y $[\gamma\text{-}^{32}]$ ATP. Las reacciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12%. El gel fue secado y expuesto a autoradiografía durante 12 horas a $-80^{\circ}C$. Carril 1: Inmunoprecipitado (IP) de proteínas derivado de trofozoitos de *Giardia duodenalis* WB (cepa C99) no transgénica en presencia de Mg^{2+} . Carril 2: IP de proteínas derivado de cepa C99 WB en presencia de Mn^{2+} . Carril 3: IP de GdATM-3HA en ausencia de sustrato 4EBPI. Carril 4: 5 Y 6: IP de GdATM-3HA en presencia de inhibidor específico de ATM Ku55933, inhibidor específicos de mTOR Rapamicina (125 μM , y 7.5 μM). Carril 7,8: IP de ATMTel1-3HA en presencia y ausencia de ion Mn^{2+} .

13.-DISCUSION.

La proteína ATM en organismos eucariotas superiores es la cinasa responsable de fosforilar a la histona H2AX bajo radiación ionizante (Shiloh, 2001) y es la cinasa reguladora maestra en respuesta al daño al DNA para señalar el sitio de daño y amplificar la señal (Martin, Terradas, Tusell, & Genesca, 2012). En nuestro grupo de trabajo se realizó la identificación *in silico* de ATM (Tel1 en *Saccharomyces cerevisiae*) y se encontró un candidato del gen de ATM/Tel1 en el genoma de *Giardia* con los dominios TAN, FAT, FAT-C y el dominio cinasa característicos de una ATM típica con un peso molecular de 363.193 kDa. Un aspecto muy interesante fue el hecho de que se localizó un sitio de unión al complejo rapamicina característico de las proteínas TOR poco conservado (Valdez-Vargas. Maestría 2014).

Considerando los resultados obtenidos en nuestro grupo en el presente trabajo se evaluó la actividad cinasa de la proteína putativa ATM-Tel en *Giardia duodenalis*. Así se identificó ésta empleando un anticuerpo heterólogo (Figura 14) comercialmente disponible. Sin embargo, éste anticuerpo no reconoció la proteína de 360 kDa, lo cual podría deberse a la divergencia de *Giardia* con otros organismos eucariotas. En su lugar se detectó una banda en un peso molecular de 170 kDa lo que sugiere que puede corresponder a miembros de la familia PI3-4 fosfatidil inositol cinasas o a sus productos de degradación. Sin embargo en reportes recientes la proteína ATM fue detectada en el parásito *Toxoplasma gondii* con el uso del mismo anticuerpo comercial anti-ATM (ABCAM-ab78) (Vonlaufen, Naguleswaran, Coppens, & Sullivan, 2010), esto podría evidenciar la divergencia de GdATM con otras ATMs de organismos eucariotas. Considerando los resultados anteriores se trabajó con una clona transgénica en donde se etiquetó el gen homólogo a ATM/Tel1 con un epítipo de hemaglutinina integrándolo en el genoma para mantener su expresión endógena (Valdez-Vargas. Maestría 2014) acorde con reportes relativamente recientes (Gourguechon & Cande, 2011). Así empleando la clona transgénica, se purificó la proteína GdATM-3HA para identificarla y emplearla en ensayos de fosforilación *in vitro*. Para ello se procedió a llevar a cabo ensayos de Inmunoprecipitación a partir de extractos totales provenientes de trofozoí-

tos transgénicos y los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 15). Los resultados mostraron que la banda detectada no coincidió con el peso molecular esperado de 360 kDa sugiriendo que la proteína puede estar formando complejos con ella misma u otras proteínas, debido a que en su forma nativa se encuentra formando multímeros unidos por uniones no covalentes con lo cual la proteína GdATM-3HA no se disoció y migró en un peso molecular mayor al esperado.

En el contexto de estos resultados, es importante señalar que la proteína ATM purificada y de extractos nucleares provenientes de células sin irradiar, migran con peso molecular estimado de 600 kDa (Goodarzi & Lees-Miller, 2004). Así mismo, datos reportados han mostrado que en *Xenopus leavis*, la ATM (X-ATM) se observó como una proteína con peso molecular correspondiente entre 440 y 699 kDa, en geles nativos (PAGE) por lo que se sugirió que en su estado nativo esta proteína tiene conformación estructural de dímero o multímero (Robertson, Hensey, & Gautier, 1999).

Los resultados también demostraron que la expresión de la proteína en extractos totales es muy baja, por lo que se requiere Inmunoprecipitarla para poder identificarla (Figura 15). Por otra parte los protocolos de purificación publicados han logrado producir cantidades relativamente pequeñas de la proteína ATM de aproximadamente 1 µg o menores (Goodarzi & Lees-Miller, 2004; Rhodes, Gilmer, & Lansing, 2001; Scott et al., 1998; Smith et al., 1999).

Las condiciones empleadas para analizar la proteína fue bajo condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida al 6% SDS-PAGE. Estas condiciones no fueron suficientes para romper las interacciones de este complejo multimérico, por lo que se decidió tratar tanto a la muestra como al gel de poliacrilamida con urea a una concentración de 8M, obteniendo como resultado una banda en el peso molecular esperado de 360kDa.

Una vez que se logró purificar la proteína con un anticuerpo anti HA, se requirió utilizar un sustrato para comenzar a evaluar la actividad cinasa de la proteína GdATMTel1 por lo que se decidió generar una proteína recombinante la histona

H2A de *Giardia duodenalis* para ser utilizada como sustrato. Sin embargo, esto no se logró debido a que no se pudo expresar la proteína en el vector de expresión pET-100/D-TOPO (Figura 21). En experimentos realizados para expresar la proteína de interés se trabajó inicialmente con la cepa BL21 no se logró expresar ésta (Figura 21) por lo que decidió emplear otras cepas como BL21-41, BL21-43 para expresarla. La cepa BL21-41 posee una mutación en las proteasas *lon* y *OmpT* y esto reduce la degradación de proteínas heterólogas que se desean expresar en tanto que la cepa BL21-43 contiene una mutación en el gen (*rne131*) que codifica para una enzima RNase E trunca que carece de la habilidad de degradar el mRNA y resultando en un aumento de su estabilidad (Zhu, Zhang, Lin, Liu, & Zhao, 2014). Considerando estas características, se propuso expresar el gen de la histona H2A en estas tres cepas distintas lo que en principio reduciría la degradación de la proteína heteróloga y así expresar la histona GdH2A. Los tiempos analizados de inducción con IPTG fueron desde 30 minutos hasta la tercer hora (figura 21), también se realizó la inducción 5, 6, 7, 12 y 24 horas a temperatura ambiente y 4°C (resultados no mostrados). Sin embargo, no se logró expresar la proteína. Así mismo se secuenció la construcción realizada y se verificó que el inserto estuviera en marco. Considerando todos estos resultados se concluyó que el gen fue tóxico para las bacterias utilizadas.

.Una vez obtenida la proteína GdATM-Tel1HA por Inmunoprecipitación se procedió a realizar los ensayos de fosforilación *in vitro* mediante ensayos cinasa en presencia del sustrato específico PHAS-I

Los resultados obtenidos demostraron interesantemente que la proteína putativa de *Giardia* tiene actividad de cinasa y esta es dependiente del ion divalente manganeso (Figura 22), una característica mostrada en otras ATMs de organismos eucariotas superiores a pesar de su alta divergencia. (Goodarzi & Lees-Miller, 2004; Kozlov et al., 2003)

En otros estudios realizados en el 2004 se demostró que la proteína ATM extraída de placenta humana es dependiente de manganeso e inactiva en presencia de magnesio en ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando como sustratos PHAS-I, es

susceptible a los inhibidores wortammina, cafeína y LY294002 a una concentración de 35 nM, 194 μ M y 6 μ M respectivamente (Goodarzi & Lees-Miller, 2004).

En este trabajo se determinó que la actividad *in vitro* de cinasa de GdATM-3HA no se vio afectada con el inhibidor específico de ATM Ku55933 a una concentración de 125 μ M en presencia de Mn^{2+} , ni tampoco en presencia de rapamicina (inhibidor específico de mTOR) a una concentración de 7.5 μ M.

Comparado con otros organismos donde se empleo concentraciones menores y se inhibió la actividad de cinasa de ATM; en líneas celulares HepG2 de cáncer de hígado se evaluó la susceptibilidad de ATM a una concentración de 10 μ M Ku5593 resultando en una disminución significativa de la actividad cinasa de esta proteína (Matsuda et al., 2014). Por otro lado, en la línea celular 293T se empleó una dosis de 1 μ M de rapamicina con la cual se observó una reducción significativa de fosforilación *in vitro* del sustrato PHAS-I (McMahon, Yue, Santen, & Lawrence, 2005). Aunque esto apoya que el sitio de unión a rapamicina en ATM de *Giardia duodenalis* no está conservado (Choi, Chen, Schreiber, & Clardy, 1996), no se puede descartar que se requieran concentraciones mayores para ver una inhibición en la actividad de cinasa.

Aun cuando los resultados obtenidos demostraron que la GdATM es una cinasa, no se puede concluir si la proteína etiquetada tiene el comportamiento de una proteína ATM ni tampoco se puede descartar que el comportamiento sea de TOR. Dado que *Giardia duodenalis* es el único organismo eucariota en donde no se han encontrado secuencias homólogas de proteínas que participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica como DNA-PK y ATR (Krinsley et al., 2011) y debido a que este parásito posee un genoma reduccionista, es posible que la proteína GdATM putativa pueda tener un comportamiento dual como ATM y TOR.

14.- ANEXOS.

Anexo 1 - Medio TY-S-33 modificado

Los trofozoitos fueron cultivados en medio TYI-S-33 modificado. Se pesaron las cantidades de los siguientes reactivos. Para la preparación de 1 litro se requiere: 500 ml de agua destilada, 20 gr de caseína, 10 gr de extracto de levadura, 10 gr de glucosa, 2 gr de NaCl, 0.6 gr de KH_2PO_4 , 1.3 gr de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 gr de cisteína, 0.2 gr de ácido ascórbico y 0.012 gr de citrato de amonio férrico; se disolvió todo hasta llegar a un volumen final con un pH de 7.1, se mezcló con 890 ml de H_2O , se filtró con filtro de poro $0.22\mu\text{m}$ de diámetro.

Anexo 2 - Solución Tfb1

Para preparar 500 ml :30 mM de KOAC, 100 mM RbCl_2 , 10 mM de CaCl_2 , 50 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, glicerol al 15% v/v diluido con ácido acético.

Anexo 3 - Solución Tfb11

Para 500 ml se disolvió: 10 mM de MOPS, 75 mM de CaCl_2 , 10 mM de RbCl_2 , 15 % de glicerol.

Anexo 4 - Buffer lisis

Para preparar 10 ml: 100 μl 1 M Tris-HCl pH 8.0, 25 μl 0.4M EDTA, 100 μl 10 mg/ml BSA, 200 μl 10 mg/ml RNAsa A, 1.5 gr de sacarosa, 10 mg de lisozima, aforando hasta 10 ml con agua.

15. Conclusiones:

- El anticuerpo heterólogo de anti ATM no detectó la presencia de la proteína GdATM
- La proteína GdATM tiene actividad de cinasa.
- GdATM es activada por Mn^{2+}
- No observamos efecto de inhibición de Ku55933 ni de rapamicina a las concentraciones de 125 μM y 7.5 μM .

16.- Perspectivas

- Evaluar la susceptibilidad de GdATM a diferentes concentraciones de los inhibidores para así lograr una caracterización farmacológica completa.
- Clonar y expresar la GdH2A en sistema de baculovirus.
- Evaluar la actividad cinasa de GdATM en el sustrato GdH2A.
- Evaluar la actividad cinasa con inhibidos inespecíficos de la familiaPI3K.

17. Referencias.

- Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 15(17): 2177-2196.
- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14(3): 447-475.
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2): 301-313.
- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svard, S. G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*, 8(6): 413-422.
- Arango, D., Parihar, A., Villamena, F. A., Wang, L., Freitas, M. A., Grotewold, E., & Doseff, A. I. 2012. Apigenin induces DNA damage through the PKCdelta-dependent activation of ATM and H2AX causing down-regulation of genes involved in cell cycle control and DNA repair. *Biochem Pharmacol*, 84(12): 1571-1580.
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922): 499-506.
- Bhatia, N., Xiao, T. Z., Rosenthal, K. A., Siddiqui, I. A., Thiyagarajan, S., Smart, B., Meng, Q., Zuleger, C. L., Mukhtar, H., Kenney, S. C., Albertini, M. R., & Jack Longley, B. 2013. MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. *J Invest Dermatol*, 133(3): 759-767.
- Brown, K. D., Ziv, Y., Sadanandan, S. N., Chessa, L., Collins, F. S., Shiloh, Y., & Tagle, D. A. 1997. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5): 1840-1845.
- Caccio, S. M., & Sprong, H. 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*, 124(1): 107-112.
- Caldecott, K. W. 2004. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9): 875-882.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., & Clardy, J. 1996. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, 273(5272): 239-242.
- Dawson, S. C., Sagolla, M. S., Mancuso, J. J., Woessner, D. J., House, S. A., Fritz-Laylin, L., & Cande, W. Z. 2007. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*, 6(12): 2354-2364.
- Fonseca, B. D., Lee, V. H., & Proud, C. G. 2008. The binding of PRAS40 to 14-3-3 proteins is not required for activation of mTORC1 signalling by phorbol esters/ERK. *Biochem J*, 411(1): 141-149.
- Foster, L. J. 2009. Moving closer to the lipid raft proteome using quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*, 528: 189-199.
- Frank-Vaillant, M., & Marcand, S. 2001. NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev*, 15(22): 3005-3012.
- Gamper, A. M., Choi, S., Matsumoto, Y., Banerjee, D., Tomkinson, A. E., & Bakkenist, C. J. 2012. ATM protein physically and functionally interacts with proliferating cell nuclear antigen to regulate DNA synthesis. *J Biol Chem*, 287(15): 12445-12454.
- Gatti, R. A., Berkel, I., Boder, E., Braedt, G., Charmley, P., Concannon, P., Ersoy, F., Foroud, T., Jaspers, N. G., Lange, K., & et al. 1988. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*, 336(6199): 577-580.
- Goodarzi, A. A., Block, W. D., & Lees-Miller, S. P. 2003. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*, 5: 393-411.

- Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. 2013. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv Genet*, 82: 1-45.
- Goodarzi, A. A., & Lees-Miller, S. P. 2004. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells. *DNA Repair (Amst)*, 3(7): 753-767.
- Gourguechon, S., & Cande, W. Z. 2011. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*, 10(1): 142-145.
- Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T., Carney, J. P., Petrini, J. H., & Tainer, J. A. 2002. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418(6897): 562-566.
- Iyama, T., & Wilson, D. M., 3rd. 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 12(8): 620-636.
- Izzard, R. A., Jackson, S. P., & Smith, G. C. 1999. Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res*, 59(11): 2581-2586.
- Jacquemin, V., Rieunier, G., Jacob, S., Bellanger, D., d'Enghien, C. D., Lauge, A., Stoppa-Lyonnet, D., & Stern, M. H. 2012. Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. *Eur J Hum Genet*, 20(3): 305-312.
- Kastan, M. B., & Lim, D. S. 2000. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3): 179-186.
- Kim, J. K., & Jackson, T. L. 2013. Mechanisms that enhance sustainability of p53 pulses. *PLoS One*, 8(6): e65242.
- Kobayashi, J., Fujimoto, H., Sato, J., Hayashi, I., Burma, S., Matsuura, S., Chen, D. J., & Komatsu, K. 2012. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PLoS One*, 7(11): e49245.
- Kozlov, S., Gueven, N., Keating, K., Ramsay, J., & Lavin, M. F. 2003. ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. *J Biol Chem*, 278(11): 9309-9317.
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., & Lavin, M. F. 2006. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*, 25(15): 3504-3514.
- Krinsley, J. S., Schultz, M. J., Spronk, P. E., Harmsen, R. E., van Braam Houckgeest, F., van der Sluijs, J. P., Melot, C., & Preiser, J. C. 2011. Mild hypoglycemia is independently associated with increased mortality in the critically ill. *Crit Care*, 15(4): R173.
- Krogh, B. O., & Symington, L. S. 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*, 38: 233-271.
- Lane, S., & Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, 28(2): 123-147.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. 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(9): 1063-1074.
- Lenaghan, S., & Sundermann, C. 2003. Effect of varying cobalt-60 doses on survival and growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol*, 50 Suppl: 701.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, 27(1): 37-58.
- Li, D., Craik, S. A., Smith, D. W., & Belosevic, M. 2008. Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS Microbiol Lett*, 278(1): 56-61.

- Li, X., & Heyer, W. D. 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, 18(1): 99-113.
- Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., Zhang, X., Hur, W., Liu, Y., Kwiatkowski, N. P., Wang, J., Westover, K. D., Gao, P., Ercan, D., Niepel, M., Thoreen, C. C., Kang, S. A., Patricelli, M. P., Wang, Y., Tupper, T., Altabef, A., Kawamura, H., Held, K. D., Chou, D. M., Elledge, S. J., Janne, P. A., Wong, K. K., Sabatini, D. M., & Gray, N. S. 2013. Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res*, 73(8): 2574-2586.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., & Alt, F. W. 2005. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4): 497-512.
- Mank, T. G., Zaat, J. O., Blotkamp, J., & Polderman, A. M. 1995. Comparison of fresh versus sodium acetate acetic acid formalin preserved stool specimens for diagnosis of intestinal protozoal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(12): 1076-1081.
- Manz, C., Reimold, M., Bender, B., Bares, R., Ernemann, U., & Horger, M. 2012. [Imaging diagnosis of Alzheimer's disease]. *Rofo*, 184(12): 1079-1082.
- Martin, M., Terradas, M., Tusell, L., & Genesca, A. 2012. ATM and DNA-PKcs make a complementary couple in DNA double strand break repair. *Mutat Res*.
- Matsuda, Y., Sanpei, A., Wakai, T., Kubota, M., Osawa, M., Hirose, Y., Sakata, J., Kobayashi, T., Fujimaki, S., Takamura, M., Yamagiwa, S., Yano, M., Ohkoshi, S., & Aoyagi, Y. 2014. Hepatitis B virus X stimulates redox signaling through activation of ataxia telangiectasia mutated kinase. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(5): 2032-2043.
- McMahon, L. P., Yue, W., Santen, R. J., & Lawrence, J. C., Jr. 2005. Farnesylthiosalicylic acid inhibits mammalian target of rapamycin (mTOR) activity both in cells and in vitro by promoting dissociation of the mTOR-raptor complex. *Mol Endocrinol*, 19(1): 175-183.
- Meloni, B. P., Lymbery, A. J., & Thompson, R. C. 1989. Characterization of Giardia isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 40(6): 629-637.
- Moreau, S., Ferguson, J. R., & Symington, L. S. 1999. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol*, 19(1): 556-566.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J. E., Palm, D., Passamaneck, N. E., Prabhu, A., Reich, C. I., Reiner, D. S., Samuelson, J., Svard, S. G., & Sogin, M. L. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia. *Science*, 317(5846): 1921-1926.
- Nasser, A. M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A., & Revhun, M. 2012. Prevalence and fate of Giardia cysts in wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol*, 113(3): 477-484.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., & Aguilera, A. 2009. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66(6): 1039-1056.
- Paull, T. T. 2015. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem*.
- Perry, J., & Kleckner, N. 2003. The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell*, 112(2): 151-155.
- Poxleitner, M. K., Carpenter, M. L., Mancuso, J. J., Wang, C. J., Dawson, S. C., & Cande, W. Z. 2008. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite Giardia intestinalis. *Science*, 319(5869): 1530-1533.
- Prendergast, A. M., Cruet-Hennequart, S., Shaw, G., Barry, F. P., & Carty, M. P. 2011. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or gamma-irradiation. *Cell Cycle*, 10(21): 3768-3777.

- Reynolds, J. J., & Stewart, G. S. 2013. A nervous predisposition to unrepaired DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 12(8): 588-599.
- Rhodes, N., Gilmer, T. M., & Lansing, T. J. 2001. Expression and purification of active recombinant ATM protein from transiently transfected mammalian cells. *Protein Expr Purif*, 22(3): 462-466.
- Robertson, K., Hensey, C., & Gautier, J. 1999. Isolation and characterization of Xenopus ATM (X-ATM): expression, localization, and complex formation during oogenesis and early development. *Oncogene*, 18(50): 7070-7079.
- Rotman, G., & Shiloh, Y. 1997. Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays*, 19(10): 911-917.
- Sandoval-Cabrera, A., Zarzosa-Alvarez, A. L., Martinez-Miguel, R. M., & Bermudez-Cruz, R. M. 2015. MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*.
- Saraiya, A. A., Li, W., & Wang, C. C. 2011. A microRNA derived from an apparent canonical biogenesis pathway regulates variant surface protein gene expression in *Giardia lamblia*. *RNA*, 17(12): 2152-2164.
- Sarkaria, J. N., Tibbetts, R. S., Busby, E. C., Kennedy, A. P., Hill, D. E., & Abraham, R. T. 1998. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res*, 58(19): 4375-4382.
- Scott, S. P., Zhang, N., Khanna, K. K., Khromykh, A., Hobson, K., Watters, D., & Lavin, M. F. 1998. Cloning and expression of the ataxia-telangiectasia gene in baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(1): 144-148.
- Shiloh, Y. 2001. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6): 661-666.
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(4): 197-210.
- Smith, G. C., Cary, R. B., Lakin, N. D., Hann, B. C., Teo, S. H., Chen, D. J., & Jackson, S. P. 1999. Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 11134-11139.
- Stracker, T. H., Roig, I., Knobel, P. A., & Marjanovic, M. 2013. The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet*, 4: 37.
- Sun, H., Treco, D., & Szostak, J. W. 1991. Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell*, 64(6): 1155-1161.
- Svendsen, J. M., & Harper, J. W. 2010. GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes Dev*, 24(6): 521-536.
- Templeton, G. W., & Moorhead, G. B. 2005. The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep*, 6(8): 723-728.
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J. E., & Koshland, D. 2004. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell*, 16(6): 991-1002.
- Uziel, T., Savitsky, K., Platzer, M., Ziv, Y., Helbitz, T., Nehls, M., Boehm, T., Rosenthal, A., Shiloh, Y., & Rotman, G. 1996. Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics*, 33(2): 317-320.
- Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes*, 17(5): 223-225.

- Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Coppens, I., & Sullivan, W. J., Jr. 2010. MYST family lysine acetyltransferase facilitates ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase-mediated DNA damage response in *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, 285(15): 11154-11161.
- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., & Panayotou, G. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. **Mol Cell Biol**, 16(4): 1722-1733.
- Yee, J., Tang, A., Lau, W. L., Ritter, H., Delport, D., Page, M., Adam, R. D., Muller, M., & Wu, G. 2007. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. **BMC Mol Biol**, 8: 26.
- Yin, B., Lee, B. S., Yang-lott, K. S., Sleckman, B. P., & Bassing, C. H. 2012. Redundant and nonredundant functions of ATM and H2AX in alphabeta T-lineage lymphocytes. **J Immunol**, 189(3): 1372-1379.
- Zakikhani, M., Bazile, M., Hashemi, S., Javeshghani, S., Avizonis, D., St Pierre, J., & Pollak, M. N. 2012. Alterations in cellular energy metabolism associated with the antiproliferative effects of the ATM inhibitor KU-55933 and with metformin. **PLoS One**, 7(11): e49513.
- Zhou, B. B., Chaturvedi, P., Spring, K., Scott, S. P., Johanson, R. A., Mishra, R., Mattern, M. R., Winkler, J. D., & Khanna, K. K. 2000. Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. **J Biol Chem**, 275(14): 10342-10348.
- Zhu, Z., Zhang, S., Lin, X., Liu, W., & Zhao, Z. K. 2014. [Expression, purification and characterization of a novel fatty acid synthase from *Rhodospiridium toruloides*]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 30(9): 1414-1423.
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 12(1): 21-35.