



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Diseño y construcción de un sistema inducible  
generador de *DSB* dirigido en *Giardia duodenalis*”**

**T E S I S**

Que presenta

**I.Q. Sara Espinoza Corona**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

**Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 16 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del a Dra. Rosa María Bermúdez Cruz.

## AGRADECIMIENTOS

*A mi familia, a mi mamá, papá y hermanos por apoyarme, quererme y aceptarme siempre. Si alguna vez no me entendieron fueron muy buenos disimulando porque me ayudaron de la mejor forma en que les fue posible.*

*A Fer por vivir esta etapa conmigo y porque si la maestría tuvo algún inconveniente, él lo sufrió (casi siempre en silencio).*

*A mis abuelitas: Cuquita y Consuelo; tíos, tías, primos y anexos (no los menciono porque la familia es muy numerosa) por darme ánimos, estar al pendiente de mí y visitarme.*

*A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por creer en mí y darme la oportunidad de ser parte de su equipo, por su paciencia, dirección y calidad humana.*

*A mis asesores: Dr. Luis Marat Álvarez Salas y Dr. Luis Yoshío Kameyama Kawabe por sus comentarios acertados a este trabajo.*

*A la Dra. Bazán Tejeda (Luisa, para los estudiantes) por su invaluable apoyo, paciencia y principalmente por su amistad*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio 16: Mariana, Eduardo, Loan, Rosy y Ulises por hacer del laboratorio un lugar alegre, sin ellos no hubiera sido lo mismo.*

*A mis compañeros vivienda: Guadalupe, Maricruz y Felipe por aceptar compartir más que el techo, especialmente a Maricruz por apoyarme en la redacción del manuscrito y; a mis amigos de Genética por su amabilidad y atenciones.*

*A la comunidad del CINVESTAV, especialmente a: Gabriela Mora por su eficiencia y amabilidad desde el primer día que la vi cuando pedí informes sobre los requisitos de ingreso; Guadalupe Aguilar por su invaluable asistencia técnica, consejos relacionados a secuenciación, paciencia y dulces; Israel Vázquez Montiel por su indispensable asistencia técnica.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por brindar el financiamiento para la realización del proyecto (CVU 627057/336433).*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4d</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1 <i>Giardia duodenalis</i> .....	8
1.1.1 Ciclo de vida .....	8
1.1.2 Infección.....	10
1.1.3 Organelos y organización genómica .....	12
1.2 Daño al DNA.....	14
1.2.1 DSB .....	15
1.2.2 Reparación y Recombinación.....	15
1.3 Meganucleasas .....	16
1.3.1 I-SceI.....	19
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>20</b>
<b>3 JUSTIFICACION</b> .....	<b>21</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>5 OBJETIVO</b> .....	<b>22</b>
5.1 Objetivo General.....	22
5.2 Objetivos Específicos .....	22
5.2.1 Seleccionar una meganucleasa que genere DSB. ....	22
5.2.2 Generar trofozoítos transgénicos de <i>G. duodenalis</i> que contengan el Sitio Blanco para la meganucleasa seleccionada.....	22
5.2.3 Clonar y expresar a la meganucleasa seleccionada con NLS y 3xMYC en un vector inducible en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> transgénicos con el Sitio Blanco para meganucleasa seleccionada.....	22
5.2.4 Establecer las condiciones de expresión de la meganucleasa seleccionada. ....	22
<b>6 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>23</b>
<b>7 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
7.1 Cultivo celular .....	24
7.2 Búsqueda en la literatura de meganucleasas.....	24
7.3 Búsqueda del Sitio Blanco para la meganucleasa seleccionada en el genoma de <i>G. duodenalis</i> .....	24

7.4	Selección de la región del genoma para insertar el Sitio Blanco para la meganucleasa I-SceI, sbS .....	24
7.5	Inserción del Sitio Blanco para la meganucleasa I-SceI, sbS.....	25
7.6	Transfección de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> C99 mediante electroporación .....	27
7.7	Selección clonal.....	28
7.8	Extracción de DNA genómico de <i>G. duodenalis</i> (lisis alcalina) .....	28
7.9	Extracción de DNA total de <i>G. duodenalis</i> con Isotiocianato de Guanidinio.....	29
7.10	Reparación de Oligos .....	29
7.11	Reacción de ligación de Gibson .....	30
7.12	Construcción del plásmido inducible pNlop_2xNLS_3xMYC .....	32
7.13	Clonación de la meganucleasa I-SceI en el plásmido inducible pNlop_2xNLS_3xMYC .....	32
7.14	Mutagénesis dirigida.....	32
7.15	Inducción con doxiciclina.....	34
7.16	Extracción de proteínas totales .....	34
7.17	Inmunodetección en fase sólida (Western Blot) .....	35
7.18	Inmunoprecipitación con anti-HA.....	35
7.19	Análisis de expresión de mRNA de SceI .....	36
7.20	Inmunofluorescencia .....	37
7.21	Preparación y transformación química de células <i>E. coli</i> TOP10.....	37
7.22	Extracción de plásmido por Easyprep.....	38
7.23	Extracción de plásmido por Miniprep.....	39
7.24	Extracción de plásmido por midiprep.....	40
7.25	Ligaciones.....	40
7.26	Reacción de secuenciación. ....	40
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
8.1	Meganucleasas encontradas en la literatura: .....	43
8.2	BLAST del Sitio Blanco para I-SceI (sbS) en el genoma de <i>G. duodenalis</i> : .....	44
8.3	Sitio seleccionado para insertar el Sitio Blanco de I-SceI, sbS.....	45
8.4	Inserción del Sitio Blanco para I-SceI, sbS, en el genoma de <i>G. duodenalis</i> .....	49
8.5	Construcción de pACSiVSPsbs: .....	58
8.6	Obtención de trofozoítos transgénicos de <i>G. duodenalis</i> con el sbS .....	61
8.7	Construcción del plásmido pNlop_2xNLS_3xMYC.....	66

8.8	Amplificación de I-SceI desde pCBASceI con polimerasa de alta fidelidad. ....	70
8.9	Mutagénesis dirigida.....	73
8.10	Transfección de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> C99 con pNlop_2xNLS_3xMYC_I-SceI. ....	74
8.11	Análisis de expresión de mRNA de I-SceI.....	75
8.12	Expresión de I-SceI.....	76
8.13	Transfección de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> transgénicos sbS con pNlop_2xNLS_3xMYC_I-SceI.....	78
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>83</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>13</b>	<b>APENDICE</b> .....	<b>89</b>
13.1	Secuencia de los plásmidos .....	89
13.1.1	pJiVSP .....	89
13.1.2	pJiVSPsbS.....	89
13.1.3	pACSiVSPsbS.....	90
13.1.4	pNlop4_3Myc_PAK_N.....	91
13.1.5	$\Delta$ pNlop 2xNLS_3xMYC.....	92
13.1.6	pNlop 2xNLS_3xMYC.....	93
13.1.7	pNlop 2xNLS_3xMYC_I-SceI .....	94

## RESUMEN

*Giardia duodenalis* es el parásito protozoario flagelado causante de la giardiasis. La infección se transmite por el agua o alimentos contaminados con quistes. Se estima que existen 280 millones de casos de giardiasis anualmente a nivel mundial.

*G. duodenalis* se encuentra principalmente en dos estadios: quiste (forma infectiva) y trofozoíto (forma replicativa). Durante su ciclo de vida presenta varias rondas de replicación del DNA, citocinesis y cariocinesis; por lo tanto, el parásito cambia constantemente de ploidía, y la reparación de DNA es crucial para su mantenimiento genómico. El genoma puede sufrir rupturas debido a factores endógenos o exógenos, el cual es reparado por diferentes mecanismos. La lesión más dañina es la ruptura de la doble cadena de DNA (DSB, por sus siglas en inglés). Los DSB's también son introducidos de manera natural durante el proceso de meiosis con el objetivo de generar diversidad genética a través de recombinación homóloga además en eucariontes pueden ser producidos por la expresión programada de endonucleasas específicas. Las meganucleasas son pequeñas enzimas (200 aa) de escisión del DNA altamente específicas (cuyo sitio de reconocimiento es relativamente largo >20 pb).

Torres-Huerta y colaboradores en el 2011 establecieron las condiciones de daño al DNA de *Giardia* mediante radiación ionizante (formación de DSB's) evidenciado por la fosforilación de la histona GdH2A además se han estudiado y caracterizado proteínas de reparación por recombinación homóloga como GdDMC1B, GdRad52, GdMre11y GdRad50.

En este trabajo, con el objetivo de construir un sistema que genere DSBs dirigidas en el genoma de *G. duodenalis* y así poder evaluar el reclutamiento en la zona de la lesión a proteínas como GdRad51 y GdMre11, se introdujo el sitio blanco de la meganucleasa I-SceI en el genoma de *G. duodenalis* mediante recombinación homóloga; por otro lado, se clonó el gen de la meganucleasa I-SceI en un vector de expresión inducible en *Giardia* con 2 señales de localización nuclear (NLS) y una etiqueta para monitorear su expresión. Una vez transfectado

el parásito con esta construcción, verificamos su expresión por RT-PCR, western blot e inmunofluorescencia. De esta manera construimos un sistema de corte del DNA de doble cadena que permitirá, eventualmente, el estudio del remodelamiento de la cromatina y el reclutamiento de factores involucrados durante la reparación del DNA.

## SUMMARY

*Giardia duodenalis* is a flagellated protozoan parasite that commonly causes diarrheal diseases, named giardiasis. Transmission occurs by water or food contaminated with cysts. *Giardia duodenalis* has a global distribution causing an estimated 280 million cases yearly.

*G. duodenalis* has a two-stage life cycle: the cyst (infective form) and the trophozoite (replicative form). During its life cycle, several rounds of DNA replication, cytokinesis and karyokinesis occur, therefore, the parasite is in constant flux in ploidy, and DNA repair is crucial for maintaining the integrity of its genome. Its genome can suffer ruptures due to endogenous or exogenous factors, and this damage can be repaired by different mechanisms. The most severe lesion is the DNA double-stranded break (DSB) since one single DSB not repaired may induce apoptosis.

The DSB's also are introduced naturally during meiosis process, in order to generate genetic diversity by homologous recombination and into eukaryotic cells may be produced by the programmed expression of specific endonucleases. Meganucleases are highly specific DNA cleaving enzymes that are encoded within genomes of all forms of microbial life as in eukaryotic mitochondria and chloroplasts. A hallmark of the meganucleases is the contrast between their small size (200 aa) and their long DNA target sites (>20 pb).

In 2011, Torres-Huerta and cols. established a protocol to cause DNA damage in *Giardia* through ionizing radiation (DSBs generation) which was evidenced by GdH2A histone phosphorylation; besides, proteins involved in DNA repair through homologous recombination have been studied, like: GdDMC1B, GdRad52, GdMre11 and GdRad50.

In this work, in order to construct a system that produces locus-directed DSBs in *Giardia* genome that would allow us to evaluate GdRad51 and GdMre11 proteins recruitment at the break site, the meganuclease I-SceI target site was introduced into the *Giardia* genome through homologous recombination;

separately, I-SceI nuclease was cloned in an inducible gene expression system containing NLS (nuclear localization signal) and an epitope MYC in order to monitor protein expression. In cells transfected and selected, plasmid presence was confirmed by PCR analysis and I-SceI expression was verified by RT-PCR, western blot and immunofluorescence. In this way, we constructed a DNA double-stranded cleavage system that would allow us, eventually, to study the chromatin remodeling and the recruitment of factors involved in DNA repair process.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es un protozooario, flagelado, perteneciente al orden Diplomonadida que habita en el intestino delgado de humanos y otros vertebrados y es el agente causante de la giardiasis [60]. Caracterizaciones moleculares han demostrado la existencia de ocho ensamblajes o grupos genéticos (ensamblajes del A al H) [60]. Las infecciones en humanos son causados por los ensamblajes A y B (los cuales tienen un promedio de identidad de aminoácidos de sólo el 78% en regiones codificantes [3]), que también infectan a otros mamíferos [60].

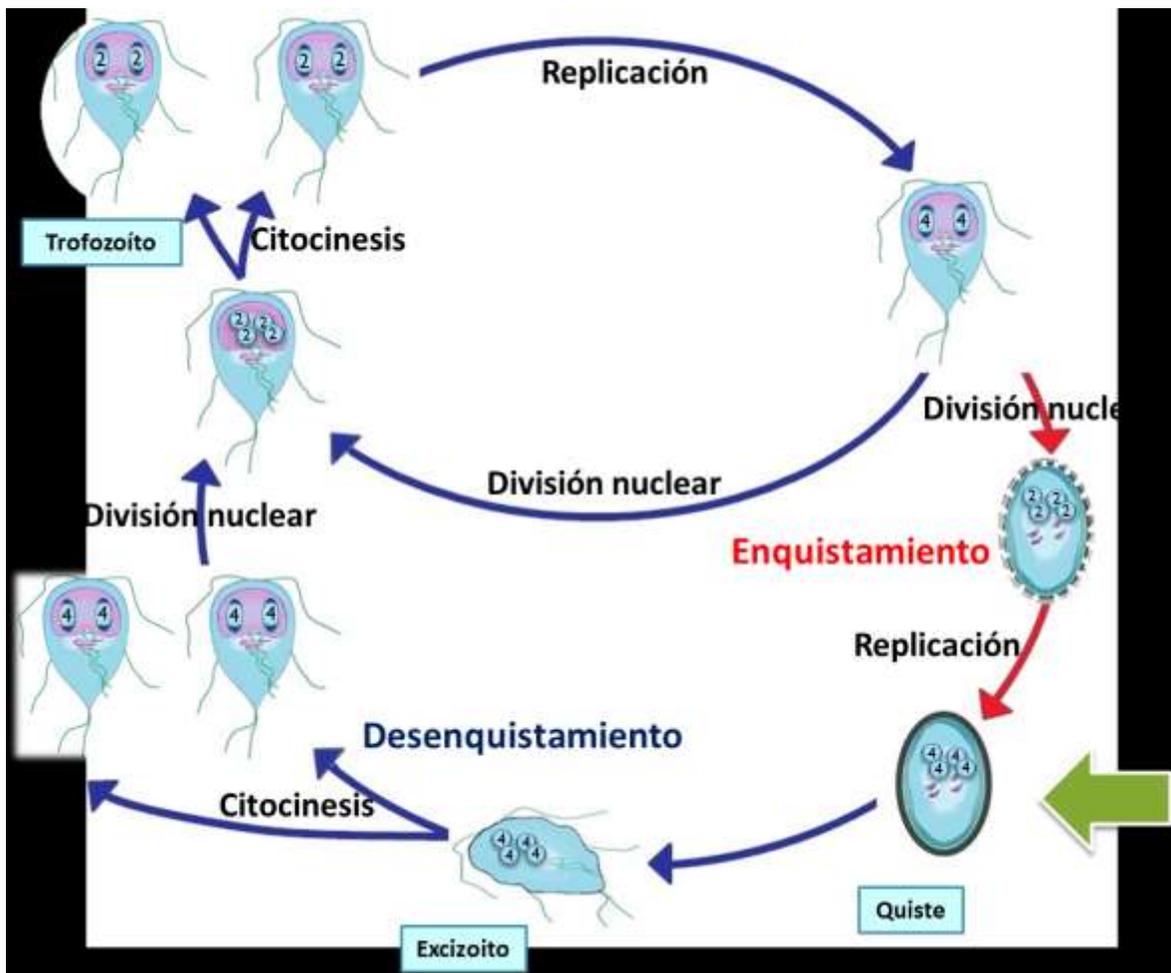
### 1.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Giardia* implica dos grandes transiciones de desarrollo: **desenquistamiento**, que comprende desde el quiste latente ingerido, el excizoito hasta el trofozoíto y; **enquistamiento**, que comprende desde el trofozoíto replicante móvil, hasta regresar al quiste infeccioso [3].

Después de la exposición al ambiente ácido del estómago, por la ingestión, los quistes se vuelven metabólicamente activos e inician el proceso de desenquistamiento [3]. Primero aparecen flagelos a través de una abertura en uno de los polos del quiste, seguido por el cuerpo excizoito que contiene cuatro núcleos [7]. El excizoito es una etapa de vida corta del parásito que inicia la infección [3]. El excizoito liberado sufre citocinesis (división del citoplasma) dos veces, sin pasar por la fase S, dando como resultado cuatro trofozoítos [5]. El enquistamiento, es un proceso de diferenciación largo que resulta en la transformación del trofozoíto en el quiste infeccioso [3]. Se produce después de que los organismos han pasado por la replicación nuclear pero antes de la citocinesis; por lo tanto, los quistes contienen cuatro núcleos [1].

El trofozoíto de *G. duodenalis*, la etapa causante de la enfermedad [3], es el estadio vegetativo y replicativo; es anaerobio aerotolerante, requiere glucosa como fuente de carbono, se divide por fisión binaria longitudinal cada 9 a 12 horas [22],

tienen forma semejante a una pera atravesada longitudinalmente, el lado plano es la superficie ventral y el lado convexo es la superficie dorsal. El trofozoíto de *G. duodenalis* tiene aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho [3]. El trofozoíto posee 2 núcleos que pueden ser diploides (4 N) o tetraploides (16 N) (N es el genoma haploide).



**Esquema 1: Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.** La infección inicia (flecha verde) cuando los quistes son ingeridos. Esquema basado en Svärd et al., (2003).

El quiste de *Giardia* es relativamente inerte, lo que le permite una supervivencia prolongada en una variedad de condiciones ambientales, son relativamente resistentes a cloración y ozonólisis y pueden sobrevivir en agua fría superficial durante varias semanas a meses [22]. Tienen forma ovalada y miden de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho [3]. El quiste está protegido de lisis hipotónica en el ambiente por: la pared del quiste que es una capa

filamentosa externa y una capa membranosa interior con dos membranas [13]. La pared exterior tiene de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor y está compuesta de carbohidratos en un 60%, principalmente de  $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-galactosamina [16, 24] el 40% restante son proteínas de la pared del quiste (CWP1, CWP2 y CWP3) [3]. El quiste posee cuatro núcleos tetraploides (16 N).

Durante su ciclo de vida presenta varias rondas de replicación del ADN, citocinesis y cariocinesis; por lo tanto, el parásito cambia constantemente de ploidía, y la reparación de DNA es crucial para el mantenimiento genómico [5].

### 1.1.2 Infección

La infección, llamada giardiasis en mamíferos, se transmite por el agua, ocasionalmente por los alimentos y de persona a persona con poca higiene oral-fecal por medio de la ingestión de los quistes. Tiene manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea recurrente.

La infección en un huésped puede iniciar cuando se ingieren quistes que pueden ser tan pocos como 10 a 25 [22]. Los trofozoítos se replican rápidamente en el intestino delgado superior, principalmente en el yeyuno, donde se adhiere a la superficie de la mucosa para obtener los nutrientes necesarios, evitar el transporte más allá del yeyuno y causa los síntomas de diarrea y mala absorción [1, 53]. Después de la exposición a los fluidos biliares algunos de los trofozoítos forman quistes en el yeyuno y se pasan a las heces, completando el ciclo de transmisión al infectar a un nuevo huésped [1].

Aunque la giardiasis afecta a personas de todas las edades, las poblaciones que se ven afectadas con mayor frecuencia son los niños de 0 a 5 años de edad (muchos de estos niños infectados son asintomáticos y pueden difundir los quistes entre los miembros del hogar [22]); seguidos por adultos de 31 a 40 años de edad, entre los que se encuentran mochileros, campistas, cazadores y viajeros a zonas endémicas de la enfermedad [22].

Se estima que existen alrededor de 280 millones de casos de giardiasis anualmente alrededor del mundo [31] teniendo mayor prevalencia en países en desarrollo, donde las deficientes condiciones sanitarias favorecen la contaminación del agua y de los alimentos con los quistes [31, 60]. Desde el 2004, la enfermedad fue reconocida por la organización mundial de la salud, WHO (por sus siglas en inglés, World Health Organization) como parte de la iniciativa de enfermedades descuidadas [3], sensibilizando sus impactos adversos en la salud y socioeconomía en países de bajos ingresos [47].

La giardiasis puede resultar en una enfermedad asintomática, diarrea autolimitada aguda o diarrea crónica, náuseas, vómito y mala absorción (pérdida de peso). Los síntomas aparecen de 6 a 15 días después de la infección [14]. La gravedad depende de la susceptibilidad del huésped y las diferencias genotípicas del patógeno en la virulencia, siendo los más afectados, además de los niños como ya se mencionó, las personas desnutridas o inmunodeficientes [3].

Entre las personas que ingieren quistes de *Giardia*, del 5% al 15% transmiten los quistes sin síntomas, del 25% al 50% desarrollan diarrea autolimitada aguda, y del 35% al 70% no tienen evidencia de infección. El período de incubación de la giardiasis es de 7 a 14 días. Los síntomas de la giardiasis son diarrea (89%), malestar general (84%), flatulencia (74%), heces grasientas y malolientes (72%), dolor abdominal (70%), distensión abdominal (69%), náuseas (68%), anorexia (64%), y pérdida de peso (64%) [22].

La mala absorción puede ocurrir con la diarrea crónica debida a la giardiasis. Los niños que tienen giardiasis sintomática pueden desarrollar esteatorrea y la mala absorción de vitamina A, B12, proteína, D-xilosa, y hierro [22]. Algunos estudios sugieren que prolongados episodios de giardiasis en niños con subyacente mala nutrición resultan en efectos nocivos, como retraso en el crecimiento, mala permeabilidad intestinal, bajo peso y talla para la edad, así como disminución de la función cognitiva en comparación con los niños normales que no tienen giardiasis [22].

### 1.1.3 Organelos y organización genómica

#### 1.1.3.1 Núcleo

Los trofozoítos tienen dos núcleos simétricos con respecto al eje largo. Los núcleos son casi idénticos en apariencia, se replican aproximadamente al mismo tiempo y ambos son transcripcionalmente activos [1, 27, 62]. La replicación del DNA inicia casi simultáneamente en ambos núcleos [59, 62]. Anteriormente se pensaba que carecía de nucleolos, sin embargo recientemente se identificó un compartimiento nuclear en cada núcleo mediante la localización de varios marcas nucleolares [26].

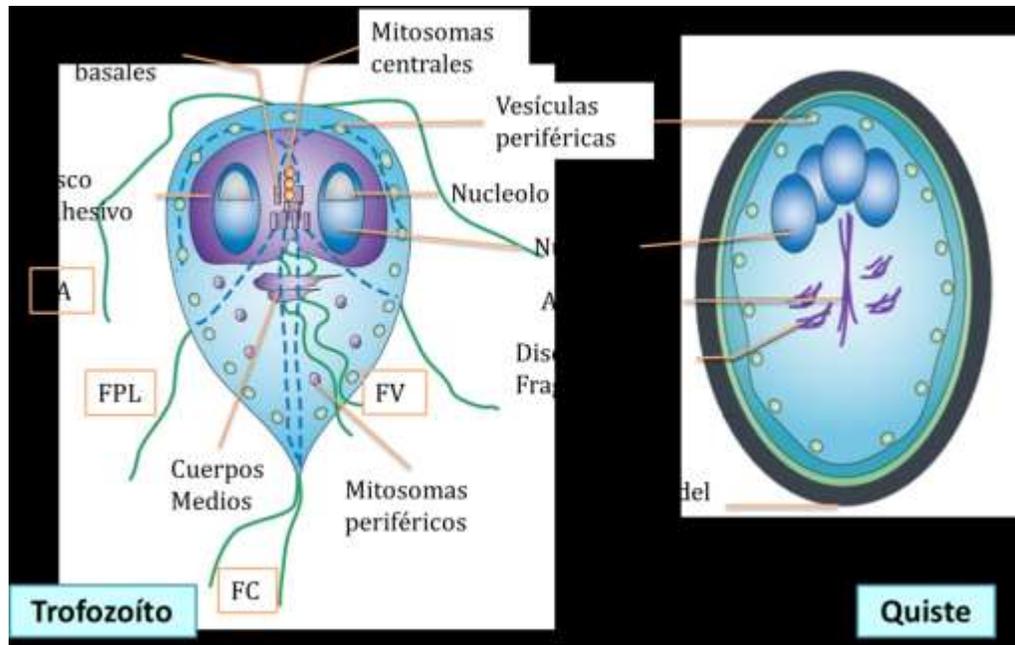
#### 1.1.3.2 Citoesqueleto

El citoesqueleto de los trofozoítos incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal, y ventral), y un disco ventral [1]. El disco ventral juega un papel central en la sobrevivencia del organismo en el intestino del huésped, permite la unión mecánica a la pared intestinal y también a la superficie del recipiente utilizado para crecimiento axénico. El disco ventral es un componente único e importante del citoesqueleto de *G. duodenalis*. El cuerpo medio es un componente del citoesqueleto que está localizado en la línea media dorsal al flagelo caudal, es único para cada especie de *Giardia*. Los trofozoítos de *G. duodenalis* suelen tener dos cuerpos medios en forma de martillos de garra [1].

#### 1.1.3.3 Mitosomas

Durante mucho tiempo, *G. duodenalis* fue visto como un 'fósil viviente', debido a su sistema de membranas poco desarrollada, su falta de intrones, su presunta falta de nucleolos y su metabolismo tipo bacteriano, en el cual enzimas metabólicas clave habiendo sido introducidos en el genoma giardial mediante la transferencia lateral de genes de las bacterias. La aparente ausencia de mitocondrias reforzó esta opinión y sugirió que las especies de *Giardia* divergieron antes de la adquisición de este orgánulo. Sin embargo, el descubrimiento de un homólogo de la chaperonina 60 (Cpn60) codificado en los núcleos *G. duodenalis* [45] desafió la visión largamente sostenida de que las especies de *Giardia* no tienen mitocondrias, y la lista de organelos de las especies de *Giardia* se amplió

en 2003 con el descubrimiento del mitosoma [57]. El número de mitosomas varía de 25 a 100 por célula, con acumulación distinta en los cuerpos basales y en la base de los axonemas flagelares [3].



**Esquema 2: Organelos del trofozoito y del quiste de *Giardia*.** FA = flagelo anterior, FPL = flagelo posterior/lateral, FV = flagelo ventral, FC = flagelo caudal. Esquema basado en Anarklev *et al.* 2010.

### 1.1.3.4 Organización Genómica

El genoma de *G. duodenalis* tiene las características esperadas para células eucariotas, incluyendo cromosomas lineales flanqueados por telómeros similares en secuencia a los de otros eucariontes (TAGGG). El DNA cromosomal de eucariontes forma cromatina al asociarse con un core de 4 histonas (H2A, H2B, H3 y H4) y a una histona enlazadora (H1) para formar nucleosomas. *G. duodenalis* tiene las 4 histonas del core y son muy similares a las de otros eucariontes [1].

Los trofozoítos de *G. duodenalis* son binucleados y tienen 5 cromosomas de tamaño aproximado de 1.6 a 3.8 MB. La suma de los tamaños de los cromosomas (3.8, 3.0, 2.3, 1.6, y 1.6 Mb) da el tamaño del genoma haploide estimado de 12.3 Mb, con un 46% de contenido de GC [1].

Los trofozoítos se alternan entre 4 N y 8 N, con la mayoría de los trofozoítos estacionarios en el estado 4 N. Para cualquier organismo con una ploidía mayor que 1, se espera cierto grado de heterocigosidad alélica. El grado de heterocigosidad es generalmente bajo en los organismos sexuales a causa de la recombinación meiótica, pero pueden llegar a ser muy alta en los organismos asexuales, como se ha demostrado en los rotíferos. Debido a que se supone que la especies de *Giardia* son organismos asexuales antiguos, se podría esperar un grado de heterocigosidad alélica muy alto sin embargo, el grado de heterocigosidad alélica en *G. duodenalis* es bastante bajo [1].

### **1.1.1 Modelo de estudio**

Las especies de *Giardia* son algunos de los eucariotas más divergentes examinados hasta la fecha y proporcionan oportunidades únicas para obtener conocimientos básicos en las vías principales que caracterizan a las células eucariotas de divergencia temprana y también para identificar nuevos mecanismos moleculares [3]. Debido a su importancia clínica y evolutiva *Giardia* es un sistema modelo interesante para estudiar la función de complejos proteicos en los diversos procesos que lleva a cabo y sobre todo de gran interés ya que en varios de sus sistemas se ha reflejado la característica de parásito minimalista, término acuñado por Morrison [25, 34].

### **1.2 Daño al DNA**

El DNA celular puede sufrir daño constantemente al estar expuesto a diversos agentes, endógenos o exógenos. Los organismos eucariotas han desarrollado varios mecanismos moleculares para garantizar la integridad de su información genética [37].

Entre las lesiones del DNA, la más dañina parece ser la ruptura de la doble cadena de DNA, DSB (por sus siglas en inglés, Double-Stranded DNA Break), ya que un solo DSB no reparado puede inducir la muerte celular [42].

### 1.2.1 DSB

La DSB es una lesión crítica que resulta de la exposición a agentes exógenos como radiación ionizante, luz ultravioleta y agentes químicos genotóxicos; además pueden ser causadas por fuentes endógenas dentro de la célula como durante el colapso de la horquilla de replicación [van de Bosch, 2002] y durante el proceso de meiosis, los DSB's son introducidos de manera natural para generar diversidad genética mediante recombinación homóloga.

Sin embargo, las células eucariotas también producen DSB mediante la expresión programada de endonucleasas específicas para su propio beneficio. Por ejemplo, su reparación se utiliza para el cambio de tipo de apareamiento-en levadura [36]; durante el proceso de meiosis, los DSB's son introducidos por la nucleasa HO para generar diversidad genética y el sitio de reconocimiento de esta nucleasa solo existe una vez en el genoma de *Saccharomyces* para la correcta segregación cromosómica [28]; Igualmente se utilizan las nucleasas RAG1 Y RAG2 para generar cortes y por NHEJ producir un repertorio inmune diverso en el contexto de V (D) J [37].

La reparación adecuada de DSBs es esencial para la estabilidad genómica. La reparación de cromosomas rotos es un reto para las células en división que necesitan distribuir información genética igual a células hijas. Los DSB's son reparados principalmente por dos vías: unión de los extremos no homólogos, NHEJ (por sus siglas en inglés NonHomologous End Joining) y recombinación homóloga, HR (por sus siglas en inglés, Homologous Recombination) [37].

### 1.2.2 Reparación y Recombinación

En todos los organismos, los procesos de reparación del DNA son esenciales para la sobrevivencia celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Estos procesos requieren las actividades coordinadas de la maquinaria conservada de reparación del DNA.

NHEJ es la vía que repara DSB por re-ligación de sus dos extremos. Tiene el potencial para ligar cualquier tipo de DSB terminal sin el requisito de una

secuencia homóloga, a diferencia de la vía de HR [37]. Sin embargo, se considera que la vía NHEJ es un proceso propenso a errores, ya que se observó que genera pequeñas inserciones y deleciones [37].

Cuando se produce un DSB, se detecta principalmente por la interacción directa del DNA terminal con un complejo llamado MRN (Mre11, Rad50 y Nbs1 o Xrs2) [37]. Este complejo tiene múltiples funciones, está implicado en la reparación de DSB y en el mantenimiento de los telómeros. Siendo el primer reconocedor del DSB, el complejo MRN está involucrado en la detección de daño al DNA y en mantener unidos los extremos de DNA rotos. Además, el complejo MRN ha sido encontrado en todos los dominios de la vida.

Uno de los primeros eventos que ocurren después de la formación de un DSB, es la fosforilación del extremo carboxi terminal de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) [44]. La distribución de  $\gamma$ H2AX, en grandes porciones de la cromatina, hacia ambos lados de un DSB es responsable de la acumulación estable de proteínas implicadas en la respuesta a DSB's, entre ellos el complejo MRN [8].

La reparación de DSB's por HR corresponde a un intercambio o una transferencia de secuencias idénticas o casi idénticas entre la molécula de DNA que lleva el DSB y otra molécula de DNA homólogo intacto. HR es un mecanismo fiel si la plantilla de DNA utilizado para la reparación es idéntica a la secuencia de DNA original que presenta el DSB. En caso contrario, la reparación de DSB por la vía HR puede conducir a mutaciones locales o reordenamientos del genoma aún más perjudiciales [37]. El proceso de HR requiere regiones homólogas extensas y repara los DSB's usando la información de la cromatida hermana no dañada del cromosoma homólogo [48]

### **1.3 Meganucleasas**

Las meganucleasas, también llamadas *homing* endonucleasas, son enzimas de escisión de DNA altamente específicas, que se encuentran dentro de todas las formas de vida microbiana, así como en mitocondrias y cloroplastos de eucariontes [51]. Están codificadas por genes que muestran movilidad genética y

persistencia. La actividad de estas proteínas es directamente responsable del comportamiento genético de sus correspondientes marcos de lectura, mediante la inducción de eventos de conversión génica homóloga, impulsados en el lugar de DSB's que dan lugar a la invasión de la cadena que lleva el gen de la endonucleasa [51].

Los genes que codifican *homing* endonucleasas a menudo están incrustados dentro de elementos de auto-splicing tales como intrones del grupo I, intrones del grupo II e inteinas. Esta combinación de funciones moleculares es mutuamente ventajosa: la actividad endonucleasa permite a los alrededores de los intrones e inteinas actuar como elementos de DNA invasores, mientras que la actividad de splicing permite al gen de la endonucleasa invadir una secuencia de codificación sin interrumpir su producto.

El descubrimiento de los intrones móviles y sus *homing* endonucleasas se remonta a la década de 1970. En 1978, una secuencia de intervención dentro de un DNA ribosomal (rDNA) mitocondrial de levadura se visualizó mediante microscopía electrónica [6]. Un estudio posterior [15] describió la secuencia y organización de este elemento de la levadura, concluyendo que el rDNA fue interrumpido por una inserción de aproximadamente 1 Kb. Éstos artículos proporcionan los detalles iniciales correspondientes a un locus en el genoma mitocondrial de levadura, denominado 'Omega', que había sido previamente observado para mostrar herencia dominante no mendeliana en experimentos de apareamiento, un fenómeno que con el tiempo llegó a ser conocido como '*homing*' [51]. En los siguientes 2 años, se determinó, a partir de varias cepas de levadura, la secuencia completa de nucleótidos de dicho elemento móvil, que corresponde a un intrón del grupo I. Estos análisis indicaron que el intrón era excepcionalmente largo (1143 pares de bases), y contenían un marco de lectura aparente que podría codificar una proteína de 235 residuos [12].

La función biológica más evidente de una *homing* endonucleasa es impulsar la movilidad, invasión, y la persistencia de su propia secuencia de codificación; como tal, la proteína es el producto de una forma específica de "DNA egoísta". Sin

embargo, esta función es en gran medida independiente de presión selectiva originada por el huésped, debido a que la mera presencia y persistencia de un intrón móvil no proporciona ningún beneficio obvio para el huésped [51].

La función mejor documentada es la denominada actividad 'maturase', que corresponde a la interacción directa de la proteína codificada por el intrón con los alrededores del intrón una actividad específica, de alta afinidad de unión que se requiere para 'chaperonear' el elemento de RNA a través de pasos necesarios de plegamiento que conducen a su eventual splicing [32].

Entre las proteínas que comparten plegamientos comunes y *motifs* catalíticos con las *homing* endonucleasas se encuentran algunas proteínas que participan en restricción de fagos, en reparación del DNA, en procesamiento de uniones y estructuras cruciformes de DNA durante eventos de invasión de cadena que conducen a integración, transposición y recombinación, en regulación transcripcional, en remodelación y mantenimiento de la cromatina y en eventos de conversión génica [51].

En los últimos 25 años se han descrito al menos seis familias únicas de *homing* endonucleasas de intrones del grupo I ('LAGLIDADG', 'HNH', 'caja His-Cys', 'GIY-YIG', 'PD- (D/E) xK' y 'EDxHD') [51]. Cada una fue nombrada en base a la presencia de *motifs* de secuencias conservadas que corresponden a residuos estructurales y catalíticos conservados en el dominio catalítico y el sitio activo de cada familia, y cada uno está confinado en gran medida (aunque no del todo) a un rango de hospederos bien definido [51].

Una característica distintiva de todas las *homing* endonucleasas, independientemente de su familia de origen, es el contraste entre su pequeño tamaño (generalmente proteínas de 200 residuos) y sus sitios blanco de DNA largos (generalmente mayores a 20 pares de bases) [51].

La familia más estudiada es la de las proteínas LAGLIDADG, que se han encontrado en todos los reinos de la vida, por lo general codificadas dentro de intrones o inteinas aunque también existen miembros de vida libre [49].

El término meganucleasa fue acuñado para designar estas proteínas: las meganucleasas se definieron inicialmente como endonucleasas que reconocen una secuencia específica larga (> 12 pb) [54]. Sin embargo, el término meganucleasa se ha convertido progresivamente en sinónimo de meganucleasas naturales o *homing* endonucleasas (HEs), tomando como referencia el proceso de *homing*.

### 1.3.1 I-SceI

Es una meganucleasa monomérica codificada por un intrón mitocondrial del grupo I de *Saccharomyces cerevisiae*, es responsable de la difusión de este intrón hacia copias de los mismos genes pero sin intrón [9, 23], a través de recombinación homóloga cuando la proteína crea un DSB en un sitio específico del genoma. El proceso fue denominado '*homing*' [35].

I-SceI, esta codificada en el intrón opcional Sc LSU. 1 del gen del rRNA 21 S [10, 23, 33], es una proteína de 235 residuos aminoácidos [38]. El sitio de reconocimiento es de 18 pares de bases y la secuencia es asimétrica: 5' TAGGGATAACAGGGTAAT 3' [10, 11]. Aunque sustituciones de una sola base son toleradas dentro de esta secuencia, las sustituciones reducen la eficiencia de la escisión por varios grados [55]. El corte genera extremos 3' OH cohesivos de 4 pares bases [11].

I-SceI es la meganucleasa prototípica utilizado para la ingeniería del genoma [49].

## 2 ANTECEDENTES

En vertebrados la fosforilación de la variante de histona H2A.X ( $\gamma$ H2AX) ocurre rápidamente después de la formación de DSB [44] y es llevado a cabo por ATM en mamíferos o por Tel1 en levaduras [44] y se propaga a lo largo de la cromatina y el reclutamiento de proteínas de reparación del DNA en foci de DNA dañados es necesario [8].

En el 2005, se estudió el remodelado de la cromatina así como el reclutamiento de los factores de la maquinaria de reparación en el sitio de rompimiento de la doble cadena en *Saccharomyces cerevisiae*. Para elucidar las vías de la cromatina que permiten la reparación de DSB's se aprovechó el sitio de corte natural de la enzima HO en una cepa de *S. cerevisiae* carente de las secuencias donadoras HMR y HML, así se introdujo la enzima HO en un plásmido de expresión inducible con galactosa. La hipótesis fue que el daño solo podría ser reparado por NHEJ, pero la mayoría de las proteínas de HR también fueron reclutadas en el sitio de ruptura [58].

También en el 2005, para estudiar la función de los telómeros en el silenciamiento de genes del parásito *Trypanosoma brucei*, se introdujo el sitio de corte de la meganucleasa I-SceI en el inicio de un telómero y se estableció la expresión de la meganucleasa I-SceI a partir de un vector inducible [2].

En *Giardia*, existe evidencia de cariogamia e intercambio de material genético ectópico entre núcleos [39] y a través de análisis *in silico* se han identificado un conjunto de genes involucrados en meiosis en este parásito, como mre11, rad50, rad52, dmc1a y dmc1b [41].

En el 2011, se establecieron las condiciones de daño al DNA de *Giardia* mediante radiación ionizante (formación de DSB's) evidenciado por la fosforilación de la histona GdH2A desde los 30 minutos post-irradiación hasta la tercera hora con una dosis de 100 Gy de IR (datos no publicados), lo que indica que existe una proteína responsable de dicha fosforilación a la cual se le denominó GdATM putativa [56].

En el 2013, se realizó la caracterización in vitro de GdRad52 y se determinó el nivel de expresión del mensajero en trofozoítos de *G. duodenalis* irradiados con rayos gama. Los resultados revelaron un incremento significativo a 1 hora (M. en C. Rosa María Martínez Miguel, manuscrito en preparación).

En el 2015, se causaron DBS a trofozoítos de *G. duodenalis* por radiación ionizante con rayos gama lo que se corroboró mediante el incremento de los niveles de fosforilación en GdH2A y se evaluó la participación de GdMre11 y GdRad50 a nivel de transcrito y de proteína, los resultados revelaron que hay un incremento significativo a 1-2 horas para el primero y 4 horas para el segundo [46].

Sin embargo, no se ha demostrado el reclutamiento de alguno de estos factores en la lesión del DNA ni remodelación de la cromatina en *G. duodenalis* a consecuencia de daño al DNA.

### **3 JUSTIFICACION**

Elucidar los mecanismos que utiliza el parásito para mantener la estabilidad de su genoma podría contribuir a la determinación de posibles blancos terapéuticos contra la maquinaria de recombinación homóloga y así establecer nuevas terapias coadyuvantes o definitivas para el tratamiento de giardiasis.

Nuestro laboratorio ha establecido condiciones para generar DSB mediante radiación ionizante y ha estudiado la participación de GdRad51 y Mre11 en la reparación del DNA.

El diseño de un sistema mediante el cual sea posible generar un DSB dirigido a una región específica en el genoma de *G. duodenalis* permitiría el estudio preciso de procesos como el reclutamiento de complejos proteicos durante la reparación del DNA y el remodelado de la cromatina.

## 4 HIPÓTESIS

Si se genera un trofozoíto de *G. duodenalis* transgénico que contenga el Sitio Blanco para una meganucleasa en el genoma, cuando la enzima sea expresada en el parásito, esta realizará un corte ocasionando un DSB.

## 5 OBJETIVO

### 5.1 Objetivo General

Construcción de un sistema inducible y generador de un DSB dirigido en el genoma de *G. duodenalis*.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Seleccionar una meganucleasa que genere DSB.
- 5.2.2 Generar trofozoítos transgénicos de *G. duodenalis* que contengan el Sitio Blanco para la meganucleasa seleccionada.
- 5.2.3 Clonar y expresar a la meganucleasa seleccionada con NLS y 3xMYC en un vector inducible en trofozoítos de *G. duodenalis* transgénicos con el Sitio Blanco para meganucleasa seleccionada.
- 5.2.4 Establecer las condiciones de expresión de la meganucleasa seleccionada.

## 6 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL



## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cultivo celular

Los trofozoítos de *G. duodenalis* ensamble A aislado WB (ATCC 30957) fueron amablemente donados por la Dra. Bibiana Chávez del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional quien denominó a la cepa como **C99**; se cultivaron a 37°C en tubos tipo falcon con medio TYI-33 libre de bilis con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina 100 u/mL; Estreptomicina, 100 µg/mL y; amfotericina B, 0.25 µg/mL) (**medio completo**) [29].

### 7.2 Búsqueda en la literatura de meganucleasas

Para la búsqueda de meganucleasas se utilizó el software del sitio [www.scopus.com](http://www.scopus.com), con las palabras de búsqueda o combinación de ellas en todos los campos: meganuclease, homing endonuclease y parasite.

### 7.3 Búsqueda del Sitio Blanco para la meganucleasa seleccionada en el genoma de *G. duodenalis*

Se realizó la búsqueda de la secuencia del sitio blanco (TAGGGATAACAGGGTAAT) de la meganucleasa I-SceI en el genoma de *G. duodenalis* ensamble A aislado WB mediante la herramienta BLAST del sitio <http://giardiadb.org/giardiadb/> con los siguientes parámetros: valor esperado = 10 y baja complejidad. Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el software Seaview [20].

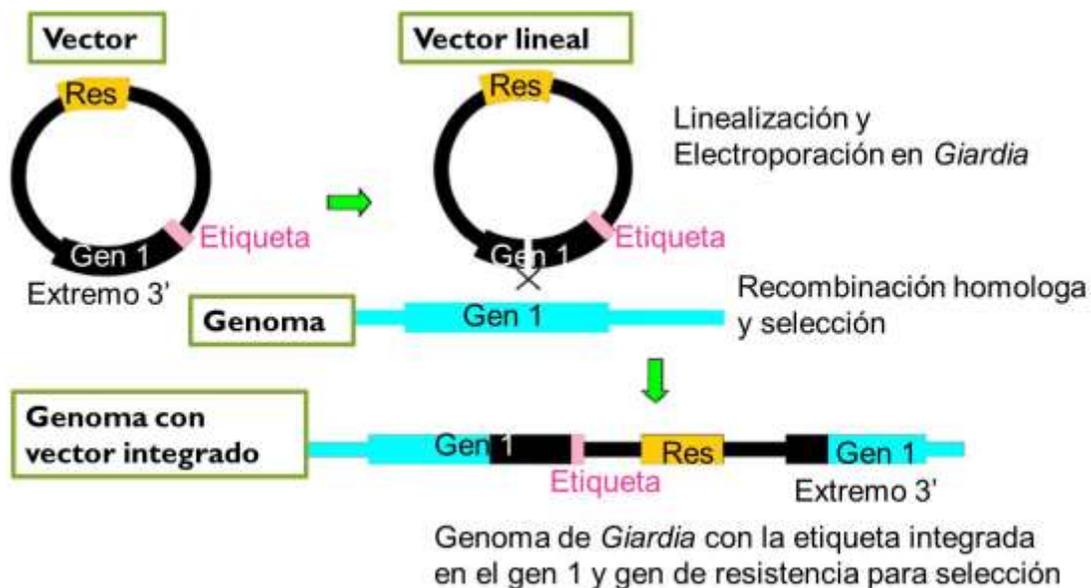
### 7.4 Selección de la región del genoma para insertar el Sitio Blanco para la meganucleasa I-SceI, sbS

En el genoma de *G. duodenalis* ensamble A aislado WB del sitio <http://giardiadb.org/giardiadb/> rastreamos los genes correspondientes a proteínas variables de superficie, VSP (por sus siglas en inglés, Variant-specific Surface protein) así como la longitud de los espaciadores intergénicos, IGS (por sus siglas en inglés, Intergenic spacer region) que las flanquean y enlistamos las secuencias codificantes, CDS (por sus siglas en inglés, Coding DNA sequence) hasta 10 Kb

de los IGS. Nos cercioramos de que el IGS tuviera un sitio de restricción natural esperando que al menos 400 pb quedaran en un extremo del IGS y fuera único una vez clonado en el vector de integración al genoma.

### 7.5 Inserción del Sitio Blanco para la meganucleasa I-SceI, sbS

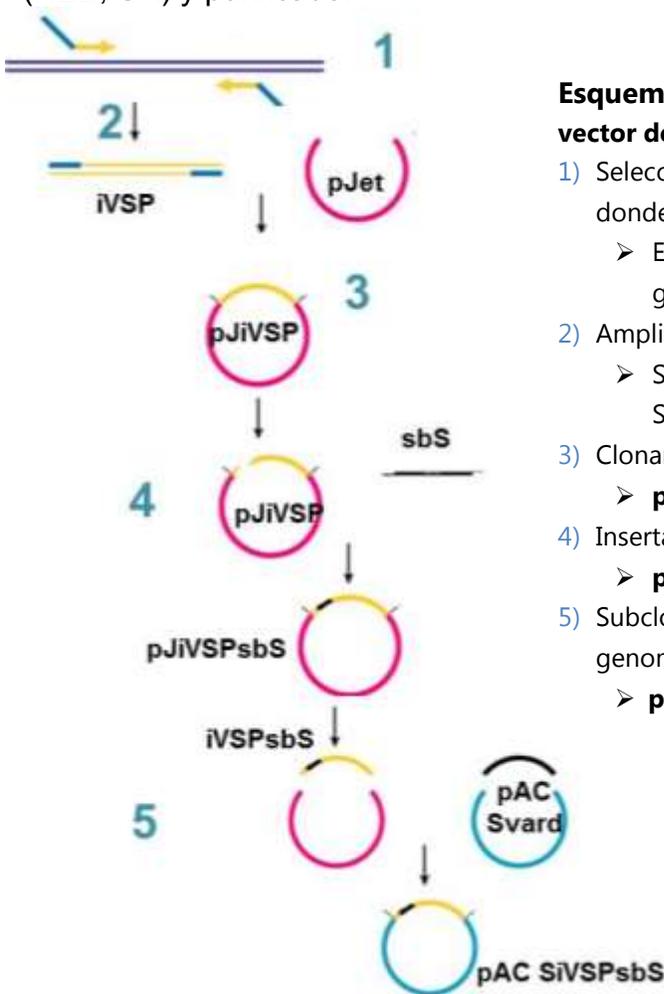
Para insertar el Sitio Blanco para la meganucleasa I-SceI en el genoma de *G. duodenalis* utilizamos el protocolo establecido por Guerguenchon & Cande, 2011 [19], en el cual parte del extremo C-terminal del gen de interés es clonado en marco con una etiqueta en un vector que contiene un cassette de resistencia a antibiótico (selección). La región clonada debe contener un sitio de restricción natural, de preferencia, único en el vector de integración al genoma. Por último, el plásmido es linealizado en el sitio de restricción único e introducido a los trofozoítos, los cuales son seleccionados con el cassette de selección.



**Esquema 3: Técnica general para etiquetar genes en loci endógenos.** Una porción del gen (sin el codón de paro y el extremo 5' del gen) es clonado en marco a una etiqueta en el extremo C-terminal. En negro se muestran las secuencias del plásmido y en azul las secuencias cromosomales de *Giardia*.

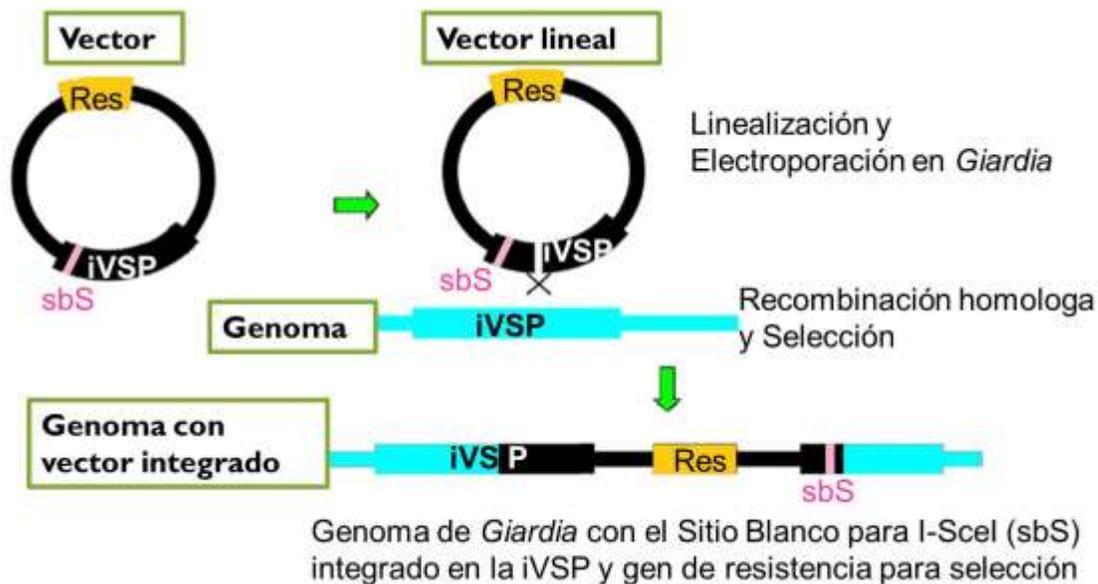
En este trabajo se amplificó el espaciador intergénico (IGS) 3' de la Proteína Variable de Superficie 160 (VSP-160, ID: GL50803\_137612) con los oligonucleótidos iVSP\_F1 y iVSP\_R1\_SacI. El amplicón se clonó en el vector transitorio pJET1.2 (Thermo Scientific, USA) y fue digerido con las enzimas de

restricción *SpeI* (NEB, UK) y *NsiI* (NEB, UK) para insertar el Sitio Blanco para I-SceI (*sbS*) obtenido de manera sintética, el cual consistió en los oligos *sbS\_F1\_SpeI\_HindIII* y *sbS\_R1\_NsiI*. El plásmido obtenido, *pJiVSPsbS*, fue digerido con *HindIII* (Fermentas, USA) y *SacI* (NEB, UK) para subclonar el inserto *iVSPsbS* en el plásmido *pAC Svard* plasmid previamente digerido con las mismas enzimas, el cual contiene como cassette de selección el gen de resistencia a puromicina. Finalmente, el plásmido *pACSiVSPsbS* fue linealizado con *BamHI* (NEB, UK) y purificado.



#### Esquema 4: Estrategia para clonar el *sbS* en el vector de integración.

- 1) Seleccionar la región genómica de *G. duodenalis* donde se integró el *sbS*
  - Espaciador Intergenico (IGS) alejado de los genes involucrados en reparación.
- 2) Amplificar el IGS (*iVSP*)
  - Se seleccionó el IGS de una Proteína Variable de Superficie (VSP-160)
- 3) Clonar el *iVSP* en vector transitorio, *pJet*.
  - ***pJiVSP***
- 4) Insertar el Sitio Blanco para I-SceI (*sbS*) en *pJiVSP*
  - ***pJiVSPsbS***
- 5) Subclonar ***iVSPsbS*** en un vector integrable en el genoma (*pAC Svard* plasmid)
  - ***pACSiVSPsbS***



**Esquema 5: Representación de la integración del sbS en el genoma de *G. duodenalis*.** El inserto iVSPsbS (creado en pJET1.2) fue clonado en el vector de integración al genoma, en negro se muestran las secuencias del plásmido, en rosa la posición del sbS y en azul las secuencias cromosomales de *Giardia*.

## 7.6 Transfección de trofozoítos de *G. duodenalis* C99 mediante electroporación

A partir de cultivos confluentes de *G. duodenalis* C99 se recolectaron  $1 \times 10^7$  trofozoítos en 300  $\mu$ L de medio completo adicionando al menos 30  $\mu$ g de plásmido (pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI o pACSiVSPsbS/*Bam*HI); la mezcla fue colocada en una celda de 4 mm Gene Pulser® (Biorad, USA) y se incidió un pulso (350 V, 1000  $\mu$ F y 700  $\Omega$ ) y se incubó en hielo durante 15 min. Finalmente, el cultivo fue trasladado a un tubo tipo falcon con 15 mL medio completo y se incubó a 37°C. A las 24 horas se adicionó el antibiótico para la selección: geneticina (G418) (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración final de 200  $\mu$ g/mL o puromicina a una concentración final de 100  $\mu$ M para las células transfectadas con el plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI o pACSiVSPsbS/*Bam*HI, respectivamente. La colecta de trofozoítos resistentes continuó durante 9 días, cada tercer día se renovó el medio completo y el antibiótico de selección, hasta la obtención de un tubo confluyente.

## 7.7 Selección clonal

Con el objetivo de obtener clonas únicas de los trofozoítos transfectados con el plásmido pACSiVSPsbS/*Bam*HI se realizó subcultivo por dilución limitante en placas de 96 pozos. Las clonas transgénicas sbS fueron corroboradas mediante PCR genómico con los oligonucleótidos: iVSP\_F1 (cuya secuencia solo se encuentra en el DNA genómico), iVSP\_R1\_Sacl, SpACSvard\_F1 y SpACSvard\_R1.

## 7.8 Extracción de DNA genómico de *G. duodenalis* (lisis alcalina)

La extracción del DNA genómico requirió de un cultivo confluyente de trofozoítos de *G. duodenalis* C99 crecidos en medio completo. El cultivo se incubó en hielo durante 30 min para permitir que los trofozoítos adheridos a la pared del tubo se despegaran, después se centrifugaron a 1,000 g durante 10 min a 4°C, al terminó el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue lavada 1 vez con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM y ajustado a pH 7.4) nuevamente se centrifugaron a 1,000 g durante 10 minutos a 4°C. La pastilla resultante se incubó toda la noche (~16hr) a 42°C en solución de lisis alcalina (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NaCl 150mM, SDS 0.4% y proteinasa K 20 mg/mL), se utilizaron 400 µL por cada 10 millones de trofozoítos. Transcurrida la lisis se adicionó RNAsa a una concentración final de 20 µg/mL y se incubó a 37°C durante 30 min. Se agregó un volumen de fenol, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,100 g durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se adicionó 0.1 volúmenes acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol 100% frío, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,100 g durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70% y se centrifugó a 14,100 g durante 10 min a 4°C en cada lavado. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada y se almacenó a -20°C.

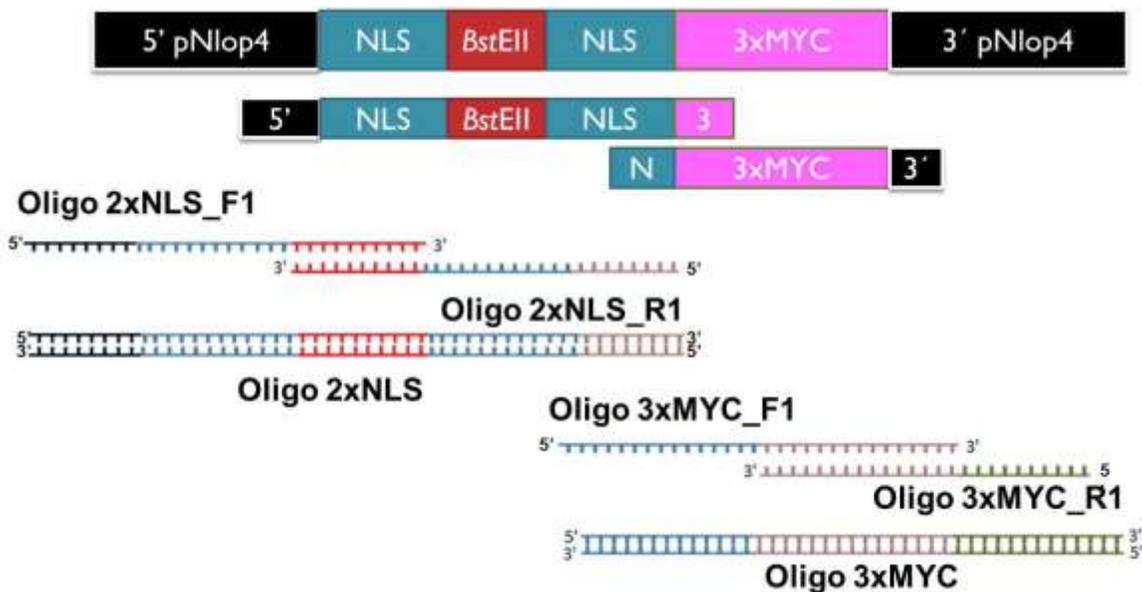
## **7.9 Extracción de DNA total de *G. duodenalis* con Isotiocianato de Guanidinio.**

Para la extracción de DNA total (DNA genómico y plasmídico) de los trofozoítos de *G. duodenalis* se utilizó el buffer de extracción descrito por Wang *et al*, 2011 [61]. El tubo de cultivo se incubó en hielo durante 30 min para permitir que los trofozoítos adheridos a la pared del tubo se despegaran, después se centrifugaron a 7,000 g durante 15 min, se desechó el medio y se lavaron 1 vez con PBS 1X. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer de extracción [24 g de isotiocianato de guanidinio (Invitrogen life technologies, USA), 20 mL de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4, 4.4 mL de EDTA pH 8 y 0.5 mL de Tritón 100X]. Se incubó a 65°C durante 1 min y se agitaron en vortex durante 1 min en intervalos de 5 s. El lisado se extrajo una vez con un volumen 1:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14,100 g durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada y precipitada con 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M durante toda la noche. El DNA precipitado se centrifugó a 14,100 g durante 20 min a 4°C, se lavó 3 veces con etanol 70% y se centrifugó a 14,100 g durante 10 min en cada lavado. El DNA se resuspendió en agua inyectable.

## **7.10 Reparación de Oligos**

Se utilizaron 500 ng de cada oligo purificado para reacciones de 30 µL de volumen final. Por un lado, se mezclaron los oligos 2xNLS\_F1 y 2xNLS\_R1 y por otro, los oligos 3xMYC\_F1 y 3xMYC\_R1. A cada par de oligos se le añadió 3 µL de buffer 2 (NEB, UK) 3X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, DTT 15 mM y BSA 0.1 mg/mL). La mezcla se incubó a 37°C durante 45 min y después a temperatura ambiente durante 20 min, para permitir que las regiones complementarias hibridasen. Se añadieron dNTP's a una concentración final de 250 µM y se agregó agua hasta completar 29 µL. Por último, se añadió 1 µL del fragmento Klenow exo- (NEB, UK) de la DNA polimerasa y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para extender los fragmentos en dirección 5' → 3', los extremos 3' complementarios.

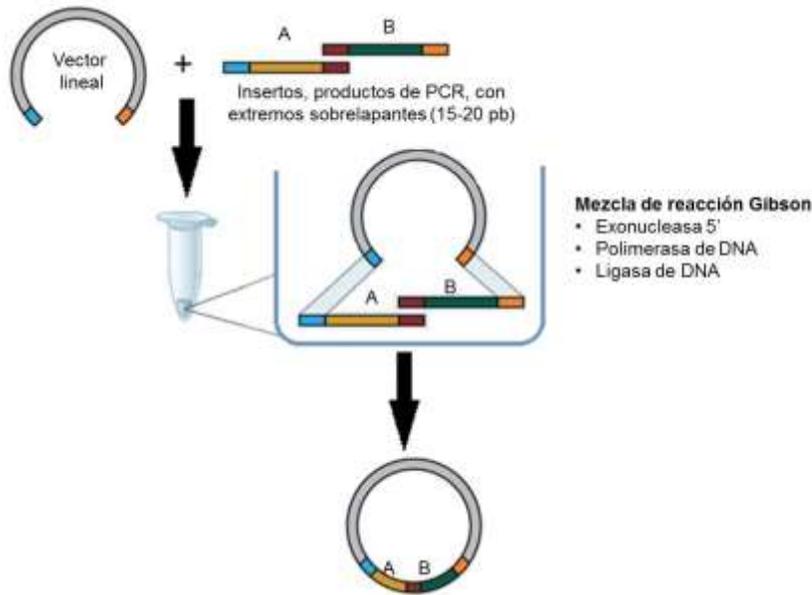
La reacción se extrajo con un volumen igual de fenol:cloroformo pH 8, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13,100 g durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se extrajo con un volumen igual de cloroformo se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13,100 g durante 10 min. Se tomó la fase acuosa y se repitió la extracción con cloroformo. Se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100%, 0.25 volúmenes de acetato de amonio 9 M y 20 µg de glucógeno a -20°C. Se centrifugó a 13,100 g durante 10 min y se realizaron 3 lavados con etanol 70%. Los oligos reparados 2xNLS y 3xMYC se resuspendieron en agua milli Q (Merk millipore, Alemania).



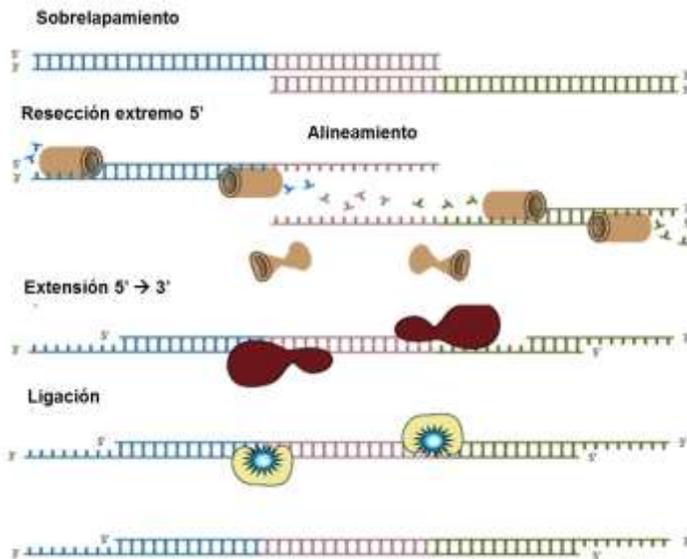
**Esquema 6: Reparación de oligos.** Para obtener la secuencia deseada del plásmido: extremo 5' del plásmido (promotor), NLS, sitio de restricción para linealización, NLS, etiqueta 3xMYC y extremo 3' del plásmido. Se mandaron sintetizar 4 cuatro oligonucleótidos capaces de aparearse en al menos 20 pb. El extremo 3' de 2xNLS\_F1 se apareará con el extremo 5' de 2xNLS\_R1, al repararse se construye el oligo 2xNLS. Se utilizó el mismo principio para la construcción del oligo 3xMYC. Un extremo del vector se apareará con el extremo 5' de 2xNLS, mientras que el extremo 3' de 2xNLS apareará con el extremo 5' de 3xMYC y finalmente el extremo 3' de 3xMYC hibridará con el otro extremo del vector.

### 7.11 Reacción de ligación de Gibson

Para la construcción de los vectores pNlop\_2xNLS\_3xMYC y pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI se siguió el protocolo descrito por Gibson *et al*, 2009 [17]. Cuyo objetivo es ensamblar y reparar moléculas de DNA sobrelapantes en un solo paso isotérmico.



**Esquema 7: Reacción de ligación de Gibson.** Dos insertos (A y B) que comparten secuencias terminales sobrelapantes entre ellos y con el vector (azul, rojo y naranja) son unidos con un vector lineal en una molécula covalentemente cerrada (circular) en una reacción isotérmica de un solo paso.



**Esquema 8: Etapas de la reacción de ligación de Gibson.** **Sobrelapamiento:** Selección de dos o más fragmentos de DNA (azul y verde) que comparten secuencias terminales sobrelapantes (rosa); **Resección de extremos 5':** La exonucleasa 5' remueve los nucleótidos de los extremos 5' de las moléculas de DNA de doble cadena; **Alineamiento:** los extremos complementarios sobresalientes de DNA de cadena sencilla se alinean; **Extensión 5' → 3':** la polimerasa de DNA rellena los huecos y; **Ligación:** la ligasa de DNA sella los cortes. Se subrayan los componentes de la mezcla de reacción Gibson.

Se ligaron 500 ng de vector lineal con lo necesario de inserto para obtener una relación 1:6 en mix de reacción de Gibson (Buffer de reacción isotérmica (Tris-HCl 91 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 9.1 mM, dNTP's 182 µM, DTT 9.1 mM, PEG-800 45.5 ng/mL, Beta-NAD 909.1 µM), Exonucleasa T5 (Epicenter, USA) 3.63 U/mL, Polimerasa Phusion de DNA (NEB, UK) 22.73 U/mL y Ligasa Taq de DNA (NEB, UK) 3.64 U/µL); la reacción se incubó a 50°C durante 1 h. Se utilizaron 11 µL para transformar células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, USA) quimio competentes.

### **7.12 Construcción del plásmido inducible pNlop\_2xNLS\_3xMYC**

El plásmido pNlop4\_3Myc\_PAK\_N (proporcionado por el Dr. Paredez, Universidad de Washington) digerido con las enzimas *NcoI* y *BamHI* para liberar el inserto 3Myc\_PAK y purificado, se mezcló con los oligos reparados 2xNLS y 3xMYC a una relación vector-inserto 1:6 siguiendo el protocolo de Reacción de Ligación de Gibson.

### **7.13 Clonación de la meganucleasa I-SceI en el plásmido inducible pNlop\_2xNLS\_3xMYC**

La secuencia de la meganucleasa seleccionada, I-SceI, se obtuvo del plásmido pCBASceI donado por Maria Jasin (plásmido de Addgene # 26477) [43]. En este plásmido la secuencia de I-SceI está precedida por NLS y una etiqueta de HA; se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia desde la etiqueta HA y además para que los extremos hibridaran con plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC/*BstEII*, los oligos fueron: I-SceI\_F1 e I-SceI\_R1. El amplicón se mezcló con el plásmido de expresión inducible pNlop\_2xNLS\_3xMYC, previamente digerido con *BstEII* y desfosforilado con Fosfatasa alcalina (CIP) a 37°C durante 1 h a una relación vector-inserto 1:6 y agua inyectable a un volumen final de 7 µL, continuando con el protocolo de Reacción de Ligación de Gibson.

### **7.14 Mutagénesis dirigida**

Para insertar el nucleótido faltante se utilizó el QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante para 50 ng de plásmido ΔpNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI (exceptuando la adición de los oligos), la mezcla de reacción se separó en 2

partes iguales y a cada una se añadió 1  $\mu\text{L}$  de oligo ml-SceI\_F1 65 ng/ $\mu\text{L}$  o de oligo ml-SceI\_R1 65 ng/ $\mu\text{L}$ . Se incubaron por separado durante dos ciclos y se juntaron las reacciones para los 16 ciclos restantes. Con el siguiente programa de incubación: desnaturalización inicial 95°C durante 2 min; 18 ciclos de 95°C durante 20 s, 60°C durante 10 s, 68°C durante 3.5 min y; extensión final a 68°C durante 5 min.

Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de la reacción como control. El resto se trató con 0.8  $\mu\text{L}$  de enzima DpnI a 37°C durante 5 min, utilizando 5  $\mu\text{L}$  para transformar 50  $\mu\text{L}$  de células XL1-Blue quimio competentes. Al día siguiente al resto de la reacción se volvió a tratar con enzima DpnI (1  $\mu\text{L}$  de enzima para 25  $\mu\text{L}$  de reacción) a 37°C durante 30 min y se realizó el mismo procedimiento de transformación.

### Diseño de oligonucleótidos para mutagénesis dirigida

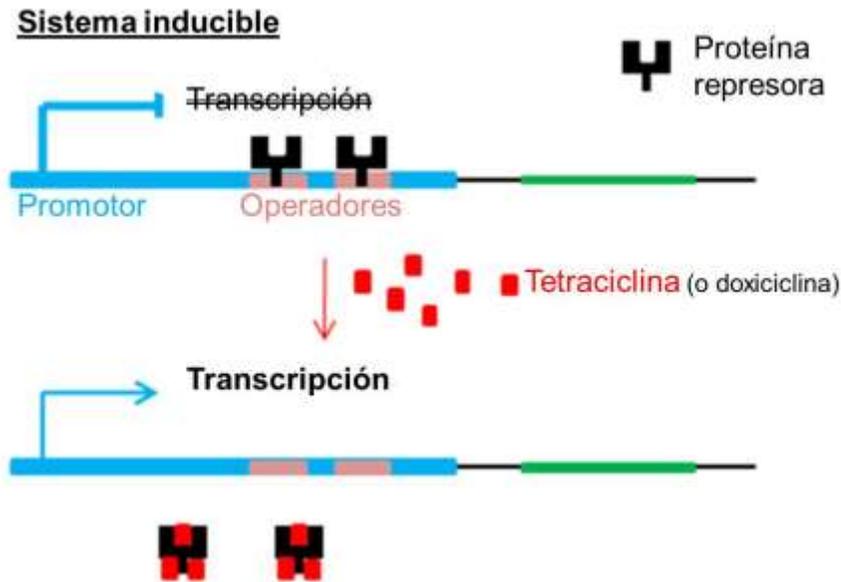
El diseño de los oligonucleótidos para mutagénesis dirigida se realizó en el sitio: <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>.



**Esquema 9: Mutagénesis dirigida.**

### 7.15 Inducción con doxiciclina

La inducción de la expresión de I-SceI se realizó con 10 µg/mL de doxiciclina (Sigma-Aldrich, USA) a diferentes tiempos (0, 0.5, 1.5, 3, 4.5, 7 y 10 hrs) o con 1 µg/mL a 7 h para la inmunofluorescencia, de acuerdo a Ching-Hung y Jung\_Hsiang, 2000 [52].



**Esquema 10: Inducción con doxiciclina.** En ausencia de doxiciclina la proteína represora se encuentra unida al operador lo cual impide que la polimerasa de RNA transcriba el gen. Al adicionar doxiciclina, ésta se une a la proteína represora dejando libre el paso para la polimerasa.

### 7.16 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron cultivos confluentes de trofozoítos de *G. duodenalis* C99 o I-SceI (células transfectadas con el plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI) con o sin inducción de doxiciclina y se colectaron por centrifugación a 7,000 g durante 15 min, lavando 3 veces con PBS 1X. Las pastillas celulares se resuspendieron en amortiguador de extractos de proteínas RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, Triton X-100 1% y SDS 0.1%) con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche ® protease inhibitor cocktail) 3X y para la extracción de proteínas de las muestras tratadas con doxiciclina se añadió MG132 (Calbiochem® Merk,

Alemania) (inhibidor del proteasoma) a una concentración final de 25  $\mu$ M y se incubaron durante 30 min en hielo. Los lisados se sonicaron con 30 pulsos al 85%, con descanso de 1 min cada 10 pulsos y se centrifugaron a 14,100 g durante 30 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante.

### **7.17 Inmunodetección en fase sólida (Western Blot)**

Los extractos totales de proteínas se desnaturalizaron en solución Laemmli 2X (2-mercaptoetanol 2.5%, azul de bromofenol al menos 0.0005%, glicerol 16%, SDS 4% y Tris-HCl 100 mM pH 6.8) y se hirvieron durante 5 min. Se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida 12% durante 1.5 horas a 100 V en solución amortiguadora de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) 1%), seguido de una transferencia a membranas de nitrocelulosa en amortiguador de transferencia (Tris-base 47.8 mM, glicina 38.3 mM y metanol 20%) durante 40 min a 0.3 A en frío. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche al 10% en TBS-T (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó un lavado de 5 min con TBS-T para incubar con anticuerpo primario anti-HA 1:5,000 (Sigma-Aldrich, USA) y 5% de leche en TBS-T o anti-MYC 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, USA) y 5% de leche en TBS-T durante 1.5 h a temperatura ambiente seguido de 3 lavados de cinco minutos con TBS-T y de la incubación con anticuerpo secundario anti-inmonoglobulinas de ratón 1:10,000 acoplado a peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS y se reveló por quimioluminiscencia, empleando el reactivo SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, USA) la placa fue expuesta durante 5 min.

### **7.18 Inmunoprecipitación con anti-HA**

Para la inmunoprecipitación de I-SceI, se utilizó el kit Pierce HA Tag IP/Co-IP Kit. Se cosecharon 4 tubos de 50 mL de cultivo confluyente de trofozoítos de *G. duodenalis* C99 o I-SceI con o sin inducción de 10  $\mu$ g /mL de doxiciclina durante 3 horas. Las proteínas totales fueron extraídas de acuerdo al protocolo previamente descrito exceptuando la adición de MG132 en el buffer de lisis. El sobrenadante

se incubó con 10  $\mu$ L de suspensión de agarosa anti-HA y se dejó en agitación durante 1 h a 4°C. La mezcla se transfirió a las columnas de purificación, para después realizar 3 lavados con 500  $\mu$ L de TBS-T (Triton X-100 0.1%). Finalmente, se añadieron 25  $\mu$ L de buffer no reductor de la muestra 2X para eluir las proteínas. La columna se colocó en agua hirviendo durante 5 min. Finalmente a las proteínas inmunoprecipitadas se añadieron 2  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Los extractos se separaron siguiendo el protocolo descrito en Western blot, pero sin la desnaturalización en solución Laemmli y el tratamiento por calentamiento.

## **7.19 Análisis de expresión de mRNA de SceI**

### Extracción de RNA

La extracción del RNA total de los trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó empleando el reactivo TRIzol™ (Life Technologies, INVITROGEN). Se emplearon  $5 \times 10^6$  células inducidas a diferentes tiempos o no inducidas por cada 0.5 mL de reactivo. Las células se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS 1X y se centrifugaron a 7,000 g durante 15 min. Las células lavadas se resuspendieron en 0.5 mL de reactivo TRIzol y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo, se agitaron vigorosamente con la mano durante 15 s y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12,000 g durante 15 min a 4°C, recuperando la fase acuosa. Se precipitó con 250  $\mu$ L de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol 75 % y se centrifugó a 7,500 g durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA fue resuspendido en H<sub>2</sub>O DEPC y se cuantificó. 1  $\mu$ g de RNA se trató con 1  $\mu$ L con DNasa I libre de RNasas (Thermo Scientific, USA) durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo adicionando EDTA a una concentración final de 5 mM e incubado a 75°C durante 10 min.

### Síntesis de cDNA

Se tomaron 8  $\mu$ L del RNA tratado con DNasa I, se mezclaron con 1  $\mu$ L de Oligo DT y 1  $\mu$ L de dNTP's 10 mM. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min. Se

añadieron 2  $\mu\text{L}$  de M-MLV Buffer de reacción 5X, 1  $\mu\text{L}$  de Inhibidor de Ribonucleasas Recombinant RNasin® y 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT y agua DEPC a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La reacción se incubó a 42°C durante 60 min.

### **7.20 Inmunofluorescencia**

Del cultivo inducido con doxiciclina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 7 h, se tomaron 400  $\mu\text{L}$  y se colocaron en cubreobjetos (lavados previamente con etanol 96%). Se incubaron a 37°C durante 15 min y se lavaron 3 veces con 2 mL de PBS 1X estéril. Se colocaron en acetona 100% a 4°C durante 10 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se trataron con Tritón X-100 0.1% durante 10 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Para bloquear se utilizó gelatina grado biología molecular 0.5% durante 45 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se incubaron primero con anticuerpo primario C-MYC de ratón (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:300 en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa-488 1:300 en PBS 1X durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS 1X. Por último, se incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 15 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con agua milli Q. Finalmente, se colocaron en portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD®. Las laminillas se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss Microscopy).

### **7.21 Preparación y transformación química de células *E. coli* TOP10**

Se inocularon 5 mL de medio de cultivo Luria Bertani (Para preparar un litro se utilizaron 10 g de triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura) sin antibiótico con una colonia de la cepa **TOP10** de *E. coli* (F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG) y **XL1 Blue** (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq  $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]), se incubó en agitación constante (150-200 rpm) a 37°C durante toda la noche. En condiciones de esterilidad se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo y se inocularon 100 mL de medio LB sin antibiótico (dilución 1:1,000), se incubó hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Se

incubó en hielo durante 20 min y posteriormente, se centrifugó el cultivo a 1,700 g durante 10 min a 4°C, la pastilla resultante fue resuspendida en 1/3 del volumen inicial del cultivo de solución reguladora TBF1 estéril (cloruro de rubidio 10 mM, cloruro de manganeso 4•H<sub>2</sub>O 50 mM, acetato de potasio 30 mM, cloruro de calcio 10 mM y glicerol 15% m/v, pH 5.8 ajustado con ácido acético diluido y se esterilizó por filtración o en autoclave) y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugaron a 1,700 g durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1/25 del volumen inicial del cultivo de solución reguladora TBF2 (MOPS 10 mM, cloruro de rubidio 10 mM, cloruro de calcio 75 mM, glicerol 15% m/v, pH 6.5 ajustado con hidróxido de potasio y se esterilizó por filtración o en autoclave). Se incubó en hielo durante 15 min y se hicieron alícuotas de 50 µL, se congelaron con hielo seco y se almacenaron a -70°C.

Para la transformación, se tomaron 50 µL de bacterias quimio competentes y se agregó el volumen indicado de producto de reacción de ligación (pJiVSP, pJiVSPsbS, pACSiVSPsbS, pNlop\_2xNLS\_3xMYC o pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI), se incubó en hielo por 30 min, posteriormente se colocó en un baño a 42°C durante 1 min y se regresó a hielo por un momento, se adicionó 250 µL de medio LB. Enseguida, se incubó horizontalmente en agitación a 37°C por una hora. Posteriormente se espatularon las células en medio de cultivo LB Agar con ampicilina 100 µg/mL. Se incubó a 37°C durante toda la noche.

### **7.22 Extracción de plásmido por Easyprep**

Se tomaron muestras de las colonias obtenidas y cada una se sembró en 3 mL de medio de cultivo líquido LB con ampicilina 100 µg/mL, y se incubó a 37°C en agitación toda la noche. Posteriormente, se centrifugó todo el cultivo, en tubos eppendorf de 1.5 mL, a 14,100 g durante 30 s para obtener la pastilla de células, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 µL de solución de lisis (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM, BSA 0.1 mg/mL, RNAsa A 0.2 mg/mL, sacarosa 15% y liozima 2 mg/mL), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se colocó en un baño de agua hirviendo durante 60 s y se colocó inmediatamente en hielo durante 60 s. Se centrifugó a 14,100 g durante 15

min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante evitando tomar parte de la pastilla. La calidad de plásmido se verificó mediante electroforesis. Este DNA plasmídico en algunas ocasiones se utilizó para restricción y amplificación por PCR [4].

### **7.23 Extracción de plásmido por Miniprep**

Una vez identificadas las colonias de bacterias que contienen el plásmido de interés (pJiVSP, pJiVSPsbS, pACSiVSPsbS,  $\Delta$ pNlop\_2xNLS\_3xMYC, pNlop\_2xNLS\_3xMYC,  $\Delta$ pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI, pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI, pCBASceI) se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en 10 mL de medio de cultivo líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), se incubó a 37°C en agitación toda la noche. Se centrifugó todo el cultivo, en tubos eppendorf de 1.5 mL, a 11,300 g durante 30 s para obtener la pastilla de células, ésta se lavó con 350  $\mu$ L de buffer de lisis STET (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0 y Triton X-100 al 5%), se volvió a centrifugar y la pastilla se disolvió en 350  $\mu$ L de buffer lisis STET, se agregaron 25  $\mu$ L de lisozima 10 mg/mL, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se sometió a ebullición durante dos minutos, se colocó en hielo durante 30 s y se centrifugó a 11,300 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 4  $\mu$ L de RNasa A 10 mg/mL y se dejó incubar durante al menos 20 minutos a 65°C, después de este tiempo se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 11,300 g durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol 100% frio, se mezcló bien y se colocó a -20°C durante al menos una hora. Se centrifugó a 14,100 g durante 20 min, se eliminó el sobrenadante, y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70%, tres veces, se volvió a centrifugar a 14,100 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante el tiempo necesario, finalmente se resuspendió en agua inyectable. La calidad de plásmido se verificó mediante electroforesis y se cuantificó en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Este DNA plasmídico se utilizó para ligaciones, restricciones, PCRs y secuenciaciones.

### **7.24 Extracción de plásmido por midiprep**

Se utilizó el kit HiSpeed® Plasmid Midi Kit (QIAGEN®, Alemania) para 150 mL de cultivo. El plásmido (pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI o pACSiVSPsbS) se cuantificó en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Este DNA plasmídico se utilizó para transfecciones.

### **7.25 Ligaciones**

Para la clonación en pJET1.2 se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se utilizaron 5 µL de reacción para transformar células TOP10 quimio competentes.

Para las ligaciones con Ligasa T4 de DNA (Fermentas, USA) se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para 100 ng de plásmido; con relación molar vector-inserto 1:50 (pJiVSP y sbS) o 1:5 (pACSvard e iVSPsbS); se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se utilizaron 5 µL de reacción para transformar células TOP10 quimio competentes.

### **7.26 Reacción de secuenciación.**

Las secuenciaciones de las secuencias de interés insertadas en los plásmidos y en el genoma de *G. duodenalis* se realizaron utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. En un tubo para PCR se mezclaron 300 ng del plásmido o producto de PCR purificado, 1 µL de oligo 10 µM correspondiente, DMSO 1% en caso necesario y agua inyectable a 12 µL. La mezcla se incubó a 72°C durante 5 min, y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se agregaron 4 µL de buffer de secuenciación 5X, y 4 µL de mezcla de secuenciación (BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing RR-100). Se colocó en el termociclador (TECHNE TC-312) con las siguientes condiciones 96°C durante 2 min, 30 ciclos de 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s y 60°C durante 4 min, finalmente a 4°C.

El producto de reacción de secuenciación se precipitó con EDTA-etanol; se centrifugó ligeramente y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se agregaron 5 µL de EDTA 125 mM pH 8.0 y 60 µL de etanol 100%, se agitó brevemente y se dejó

reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,100 g durante 20 min a 4°C, se removió completamente el sobrenadante y la pastilla se lavó 3 veces con 250 µL de etanol 70%, se centrifugó a 14,100 g durante 5 min, se removió el sobrenadante y se dejó secar. Una vez secos, los tubos se enviaron a la unidad de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, para ser analizado por electroforesis capilar mediante el secuenciador automático Perkin Elmer™ ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems).

**Tabla 1: Lista de iniciadores y el DNA utilizado como templado.**

Iniciador	Plásmido(s) o producto de PCR
SpNlop_F1	SpNlop2xNLS3xMyc,
SpNlop_R1	SpNlop2xNLS3xMyc_I-SceI
SpNlop_F2	SpNlop2xNLS3xMyc_I-SceI
SpNlop_R2	SpNlop2xNLS3xMyc_I-SceI, pCBASceI
pJET1.2Forw.	pJiVSP, pJiVSPsbS
pJET1.2Rev.	
SpACSvard_F1	pACSiVSPsbS, Producto de la PCR3 del DNA genómico del transgénico sbS.
SpACSvard_R1	pACSiVSPsbS
I-SceI_F1	pCBASceI
I-SceI_R1	

**Tabla 2: Lista de todos los oligonucleótidos utilizados y su secuencia.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>
iVSP_F1	ATGGAATCAACACTCACCGGGTCTATCG
iVSP_R1_SacI	GAGCTCAGAAGCTAGGCAGGCGTAATCCCAT
sbS_F1_SpeI_HindIII	CTAGTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATGCA
sbS_R1_NsiI	ATTACCCTGTTATCCCTAAAGCTTA
pJET1.2Forw.	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2Rev.	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
SpACSvard_F1	GGCTTGTACTCGGTGCCCATGGAT
SpACSvard_R1	GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT
2xNLS_F1	ATAGAGACTAGGAAGCTTTCCATGGGACCCAAGAAG AAGAGGAAGGTGGGGGTGACCCCAAGAAGAAGAG GAAGGTG
2xNLS_R1	TCACTACGCAGCAGATCCTCCTCCGAGATCAGCTTCT GCATTGATGCCACCTTCTCTTCTTGGGGGTCAC CCCC
3xMYC_F1	GGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACA AAAACTTATA AGTGAAGAAGATTTATTGAGGTCAGAGGAACAGAAAT TAAT
3xMYC_R1	ACGGAAAGAATTCGATTCAGGATCCTCATAAAAAGGTC CTCTTCTGAAATTAATTTCTGTTCTCTGACCTCAATA AAT
2xNLS	AGACTAGGAAGCTTTCCATGGGACCCAAGAAGAAGA GGAAGGTGGGGGTGACCCCAAGAAGAAGAGGAAG GTGGCATCAATGCAGAAGCTGATCTCGGAGGAGGAT CTGCTGCGTAGTGAAGAACAA
3xMYC	GAGGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACA AAAACTT ATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTCAGAGGAACAGA AATTAATTTCAGAAGAGGACCTTTTATGAGGAATGGA TCCTGAATCGAATTCCTT
I-SceI_F1	AGAAGAAGAGGAAGGTGGGGGTGACCTACCCATACG ATGTTCTGACTAT
I-SceI_R1	CCTTCCTCTTCTTCTTGGGGGTGACCCCTTTCAGGAA AGTTTCGGAGGAGA
SpNlop_F1	CCCTATCAGTGATAGAGACTAGTCCC
SpNlop_R1	TAACCATTGAGGCCAGGAACAAG
SpNlop_F2	TCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
SpNlop_R2	GTTACGCAGACCTTAACCAGG
mI-SceI_F1	CTGTCCCCGCCGCACAAAAAAGAACGTGTTAACCAC
mI-SceI_R1	GTGGTTAACACGTTCTTTTTTGTGCGGCGGGGACAG

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Meganucleasas encontradas en la literatura:

Se encontraron al menos 6 meganucleasas reportadas en la literatura, la mayoría proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos sitios blanco tienen una longitud mínima de 18 pb para I-SceI y máxima de 37 pb para PI-SceI; en la tabla 3 se muestran los detalles del organismo de origen, longitud y secuencia del sitio blanco para 6 meganucleasas encontradas.

**Tabla 3: Listado de meganucleasas encontradas en la literatura, organismo de origen, longitud y secuencia de su sitio blanco.**

Nombre	Organismo de origen	pb	Secuencia Sitio Blanco
I-SceI	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mitocondrial	18	TAGGGATAACAGGGTAAT
I-CeuI	<i>Chlamydomonas eugametos</i> , gen del rRNA largo de cloroplasto	27	TAACTATAACGGTCCTAAG GTAGCGAA
PI-PspI	Especies de Pyrococcus	30	TGGCAAACAGCTATTATG GGTATTATGGGT
PI-SceI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gen de la ATPasa VMA	37	ATCTATGTCGGGTGCGGA GAAAGAGGTAATGAAATG G
I-CreI homodimero	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , genoma del cloroplasto	22	CAAAACGTCGTGAGACA GTTTG
HO (I-SceII)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	TTTTAGTTTCAGCTTTCCG CAACAGTATAATTCAGCTT TCCTCAACAGTATAA

También se buscó si estas habían sido expresadas en organismos heterólogos, I-SceI fue la más versátil de todas, ya que se ha expresado en líneas celulares humanas y murinas; en animales (*Xenopus laevis* y *Drosophila*), en virus, bacterias y parásitos (*Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum*). En la tabla 4 se resumen los organismos heterólogos en los que se han expresado las

meganucleasas I-SceI y HO. El antecedente de expresión en parásitos convierte a I-SceI en la mejor candidata ya que *G. duodenalis* al ser también un parásito, podría aceptar la expresión de esta nucleasa exógena.

**Tabla 4: Organismos heterólogos en los que se han expresado las meganucleasas.**

Nombre	Organismos
I-SceI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Human myeloid leukemia cell line K562</li> <li>• Human B-lymphoblastoid cell lines TK6 and WTK1</li> <li>• Murine hematopoietic stem cells</li> <li>• <i>Xenopus laevis</i> (RANA)</li> <li>• Células de riñón humanas 293</li> <li>• Nicotiana (planta de flor)</li> <li>• Drosophila</li> <li>• Oncolytic adenoviruses</li> <li>• Zebra fish (solo introducción del plásmido)</li> <li>• <b><i>Trypanosoma brucei</i></b></li> <li>• <b><i>Plasmodium falciparum</i></b></li> <li>• <i>Streptomyces coelicolor</i> (bacterias gram +, actinobacterias)</li> </ul>
HO (I-SceII)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenovirus</li> <li>• Mouse</li> </ul>

## **8.2 BLAST del Sitio Blanco para I-SceI (sbS) en el genoma de *G. duodenalis*:**

En el genoma de *G. duodenalis* se encontraron 4 sitios homólogos pero no idénticos al Sitio Blanco para I-SceI: un sitio en el cromosoma I, un sitio en el cromosoma III y dos sitios en el cromosoma V, en la figura 1 se muestra el resumen de los resultados del BLAST. Estas secuencias se alinearon el programa seaview, observándose que no son idénticas al sbS en las 18 pb, figura 2.

A)



B)



Figura 1: BLAST A) Resumen de los resultados del BLAST. B) Detalle de los resultados del BLAST.

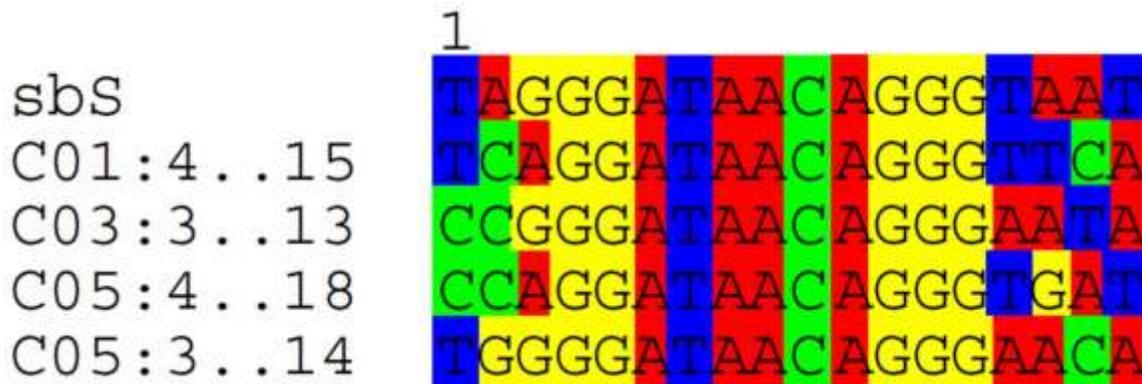


Figura 2: Alineamiento del sbS y las secuencias homólogas. En la primera fila se observa la secuencia del Sitio Blanco para I-SceI (sbS), en la segunda fila se observa la secuencia del sitio homólogo en el cromosoma I (C01) que es idéntico de la posición cuatro a la quince (4..15), descripción similar para el resto de las filas.

### 8.3 Sitio seleccionado para insertar el Sitio Blanco de I-SceI, sbS

Se enlistaron las Proteínas Variables de Superficie (VSP) y los CDS circundantes (al menos su inicio y fin) para determinar la longitud de los

espaciadores intergénicos (IGS) de las VSPs iniciando con el cromosoma I. En el cromosoma uno se encontraron 13 VSP's, ordenadas en la tabla 5. El tamaño de los IGS en *G. duodenalis* es muy variable, hay algunos genes que están sobrelapados, por lo tanto no tienen IGS, y la de mayor longitud encontrada en el cromosoma I fue de 4844-pb que corresponde a la IGS 3' de la VSP-187.

**Tabla 5: Lista de los IGS encontradas en el cromosoma I.**

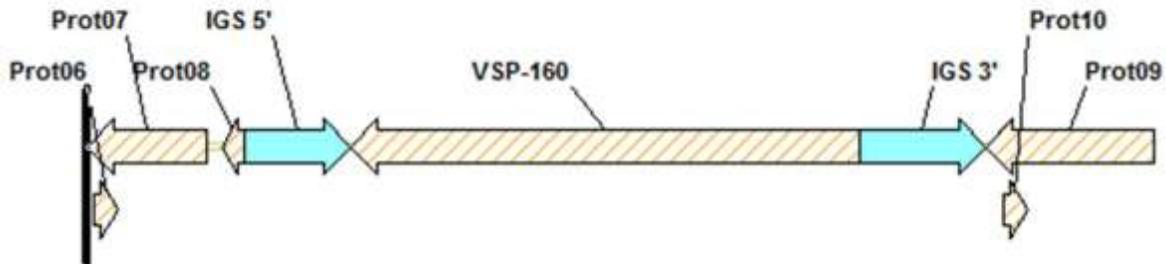
No.	ID	Descripción	CDS		IGS
			Inicio	Fin	Longitud
<b>GLCHR01:6,802..38,445</b>					
C1VSP1	GL50803_137614	Variant-Specific Surface Protein 180 (VSP-180)	21026	21331	471
			21802	23445	106
			23551	23667	
<b>GLCHR01:112,431..144,512</b>					
		hypothetical protein	125560	126036	1395
C1VSP2	GL50803_112113	Variant-Specific Surface Protein 159 (VSP-159)	127431	129512	865
		unspecified product (deprecated)	130377	130637	
<b>GLCHR01:159,065..191,662</b>					
		Dipeptidyl-peptidase III	170598	172682	
		unspecified product (deprecated)	173413	173520	544
<b>C1VSP3</b>	GL50803_137612	Variant-Specific Surface Protein 160 (VSP-160)	174065	176662	643
		unspecified product (deprecated)	177306	178166	
		High cysteine membrane protein Group 3	178194	180692	
<b>GLCHR01:233,367..264,989</b>					
		Variant-specific surface protein	247084	247257	1110
C1VSP4	GL50803_13727	Variant-Specific Surface Protein 183 (VSP-183)	248367	249989	
		<i>Sin anotaciones</i>			
<b>GLCHR01:556,245..588,293</b>					
			<b>SOBRELAPADO</b>		
C2VSP5	GL50803_115797	Variant-Specific Surface Protein 54 (VSP-54)	571245	573293	129
			573422	573640	
<b>GLCHR01:599,680..631,470</b>					
			614333	614551	129
C1VSP6	GL50803_112208	Variant-Specific Surface Protein 98.1 (VSP-98.1)	614680	616470	307

			616777	617022	
<b>GLCHR01:746,170..776,727</b>					
			<b>SOBRELAPADO</b>		
C1VSP7	GL50803_10562	Variant-Specific Surface Protein 97 (VSP-97)	761170	761727	
			<b>SOBRELAPADO</b>		
<b>GLCHR01:950,361..981,647</b>					
			964004	964270	1091
C1VSP8	GL50803_112647	Variant-Specific Surface Protein 87.1 (VSP-87.1)	965361	966647	1808
			968455	968571	
<b>GLCHR01:1,055,013..1,086,344</b>					
			1068117	1068860	1153
C1VSP9	GL50803_89315	Variant-Specific Surface Protein 187 (VSP-187)	1070013	1071344	4844
			1076188	1076424	
<b>GLCHR01:1,250,651..1,282,549</b>					
			1264708	1265628	23
C1VSP10	GL50803_113163	Variant-Specific Surface Protein 29 (VSP-29)	1265651	1267549	14
			1267563	1267754	
<b>GLCHR01:1,353,870..1,385,720</b>					
			1366847	1367554	1316
C1VSP11	GL50803_87628	Variant-Specific Surface Protein 28 (VSP-28)	1368870	1370720	-67
			1370653	1370760	
<b>GLCHR01:1,446,465..1,476,683</b>					
		Kinase, NEK	1457702	1459231	
C1VSP12	GL50803_38901	Variant-Specific Surface Protein 27 (VSP-27)	1459252	1461117	348
C1VSP13	GL50803_38910	VSP	1461465	1461683	483
	GL50803_113094	Kinase, NEK	1462166	1462336	964

Al inicio en "negritas" se muestran las coordenadas en el genoma (ej: GLCHR01:6,802..38,445 se refiere al cromosoma uno y se muestran de la base 6,802 a la base 38,445). CxVSPy se refiere a la VSP número y (ej: VSP1) encontrada en el cromosoma x (ej: C1); en letras rojas se indica la proteína selecciona para este trabajo.

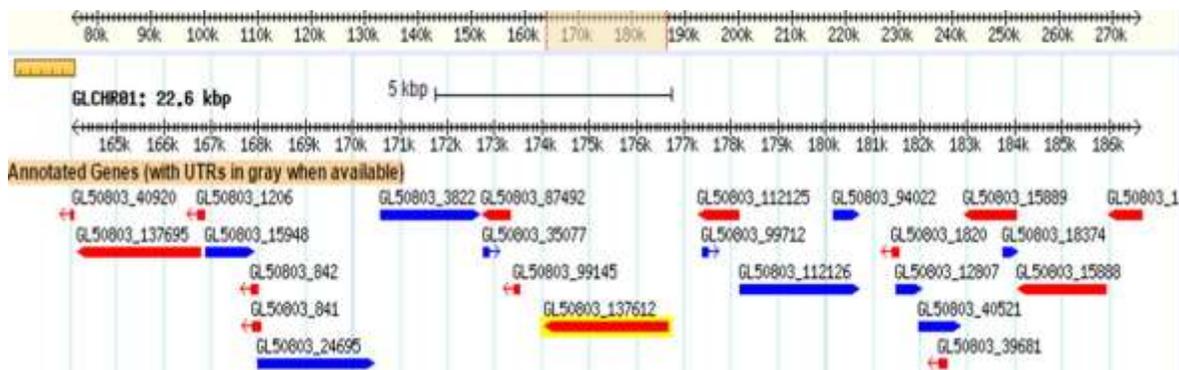
Se decidió analizar los IGS de la tercer VSP encontrada en el cromosoma I, C1VSP3, que corresponde a la Proteína Variable de Superficie 160 (VSP-160), ver esquema en la figura 11, debido a que tienen una longitud (544 y 643-pb para el IGS 5' y el IGS 3', respectivamente) que podría cumplir con el requisito de al

menos 400-pb para realizar recombinación homóloga, una vez insertado el sbS y linealizado el plásmido de integración al genoma.



**Esquema 11: Esquema de VPS-160, sus IGS y los CDS vecinos.** En azul se muestran los IGS de la VSP-160. En líneas naranjas verticales se muestran las CDS, el sentido de las flechas indica el sentido de la CDS.

Además, se encontraron la mayor cantidad de genes circundantes con función asignada (5 CDS) y ninguno pertenece a genes involucrados en reparación o recombinación y; se encontraron 18 CDS como proteínas hipotéticas o inespecíficas, ver tabla 6.



**Esquema 12: Esquema de VSP-160 y hasta 10-Kb de sus IGS.** La VSP-160 aparece como flecha roja bordeada en amarillo. En azul las CDS en la cadena sentido y en rojo en la cadena complementaria. Se muestra la región del cromosoma uno de la base 164,065 a la base 186,662.

Se eligió el IGS 3' ya que cumple con el requisito de al menos 400-pb (502-pb) una vez que el plásmido de integración al genoma sea linealizado con un sitio único.

**Tabla 6: Detalle de los genes circundantes hasta 10-Kb de los IGS de la VSP-160.**

GLCHR01:164,065..186662					
No.	ID	Descripción:	CDS		IGS
			Inicio	Fin	Longitud
1	GL50803_40920	hypothetical protein	163192	164100	
2	GL50803_137695	kinase, CMGC DYRK	164184	166766	
3	GL50803_1206	unspecified product (deprecated)	166729	166863	
4	GL50803_15948	hypothetical protein	166878	167909	
5	GL50803_842	unspecified product (deprecated)	167856	167981	
6	GL50803_841	unspecified product (deprecated)	167881	168057	
7	GL50803_24695	hypothetical protein	167980	170451	
8	GL50803_3822	Dipeptidyl-peptidase III	170598	172682	
9	GL50803_35077	unspecified product (deprecated)	172762	172878	
10	GL50803_87492	hypothetical protein	172726	173331	
11	GL50803_99145	unspecified product (deprecated)	173413	173520	544
<b>C1 VSP3</b>	<b>GL50803_137612</b>	<b>Variant-Specific Surface Protein 160 (VSP-160)</b>	<b>174065</b>	<b>176662</b>	<b>643</b>
12	GL50803_112125	unspecified product (deprecated)	177306	178166	
13	GL50803_99712	unspecified product (deprecated)	177398	177514	
14	GL50803_112126	High cysteine membrane protein Group 3	178194	180692	
15	GL50803_94022	hypothetical protein	180170	180700	
16	GL50803_1820	unspecified product (deprecated)	181408	181560	
17	GL50803_12807	ATP binding protein associated with cell differentiation, putative	181487	182041	
18	GL50803_40521	hypothetical protein	181971	182849	
19	GL50803_39681	unspecified product (deprecated)	182408	182554	
20	GL50803_15889	UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase	182931	184031	
21	GL50803_18374	unspecified product (deprecated)	183760	184071	
22	GL50803_15888	hypothetical protein	184061	185932	
23	GL50803_13283	hypothetical protein	185993	187093	

Resultados en azul, las CDS con función asignada y resaltado en amarillo el IGS seleccionado.

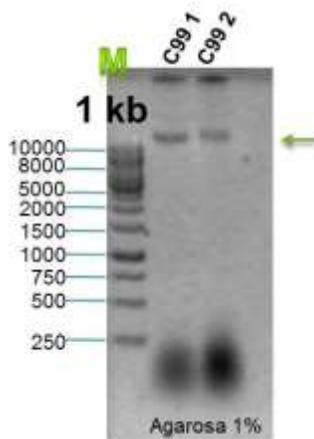
#### **8.4 Inserción del Sitio Blanco para I-SceI, sbS, en el genoma de *G. duodenalis***

Para integrar el sbS en el genoma de *G. duodenalis* primero se extrajo el DNA de *G. duodenalis* C99, después se amplificó el IGS 3' de la VPS-160, llamada iVSP y se clonó en pJET1.2 para insertar allí el sbS. Después, el inserto iVSPsbS fue subclonado en el vector de integración al genoma (pACSiVSPsbS).

Una vez linealizado y purificado pACSiVSPsbS fue introducido a trofozoítos de *G. duodenalis* C99.

### Extracción de DNA de *G. duodenalis*

Las extracciones de DNA se realizaron mediante el protocolo de lisis alcalina, se colocaron en un gel de agarosa, se colocó también marcador de 1 kilobase (kb) (Fermentas,USA), se resolvió por electroforesis y se tiñó con bromuro de etidio. Finalmente, se observaron en un fotodocumentador y se identificaron las bandas de alto peso molecular característicos.

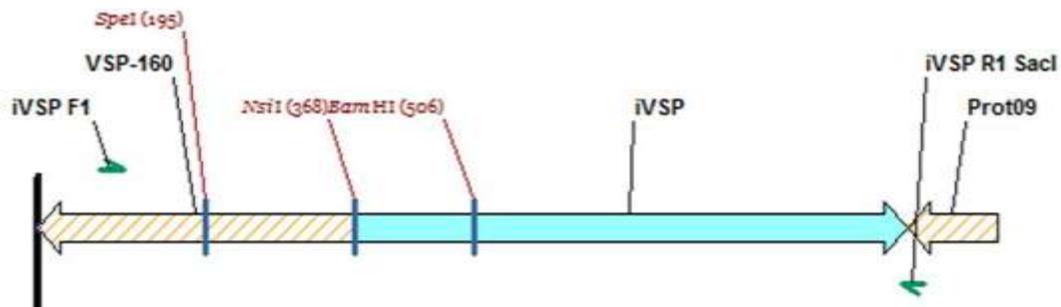


**Figura 3: DNA Genómico C99.** Se observa el corrimiento del DNA extraído de dos muestras de *G. duodenalis* C99, se agregaron 3  $\mu$ L de cada extracción. El DNA genómico se indica con una flecha verde.

### Construcción de pJiVSP:

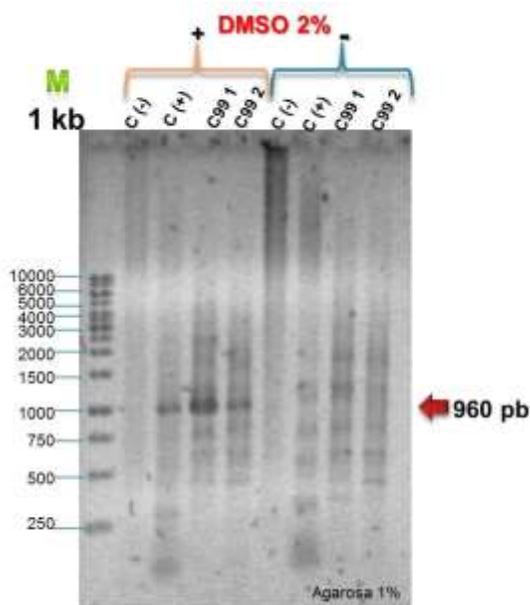
#### *Amplificación del iVSP.*

Se amplificó el iVPS con los oligonucleótidos iVSP\_F1 e iVSP\_R1\_SacI. Debido al alto contenido de GC de la iVSP, los oligos fueron diseñados en los CDS adyacentes. iVSP\_F1 está en la VSP-160 e iVSP\_R1\_SacI en parte de la proteína 9. Los sitios de restricción naturales *SpeI* y *NsiI* se emplearon para insertar el sbS cuando el iVSP este clonado en pJET1.2 ya que dichos sitios no se encuentran en pJET1.2. y el sitio de restricción natural *Bam*HI del iVSP será el sitio de linealización único cuando este clonado en el vector de integración al genoma. En el oligo iVSP\_R1\_SacI se agregó el sitio *SacI* que se utilizará para subclonar en el vector de integración al genoma.



**Esquema 13: Esquema de iVSP en el genoma de *G. duodenalis*.** Detalle de la posición de los oligonucleótidos para la amplificación de iVSP y ubicación de los sitios de restricción importantes.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue necesario agregar DMSO a una concentración final de 2% debido al alto contenido de GC del amplicón (63%) y su alta  $T_m$  (92.7). Una vez terminada la reacción se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador.

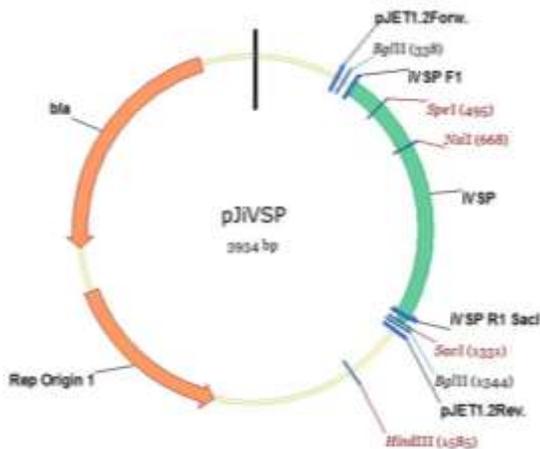


**Figura 4: PCR de iVSP con Pfx 50™ DNA polymerase (Invitrogen, USA) con y sin DMSO.**

En el primer carril se muestra el marcador de 1kb (Invitrogen, USA), en el carril dos el control negativo de PCR (esta reacción contiene la misma mezcla que las demás, excepto el templado), en el carril tres hay un control positivo de PCR, para este caso se utilizó un DNA genómico que había en el laboratorio; en los carriles 4 y 5 se observa el amplificado del tamaño esperado (960 pb). En la PCR de los carriles 6 a 9 (la descripción corresponde a los carriles 2 a 5) no se agregó DMSO y no se observa producto.

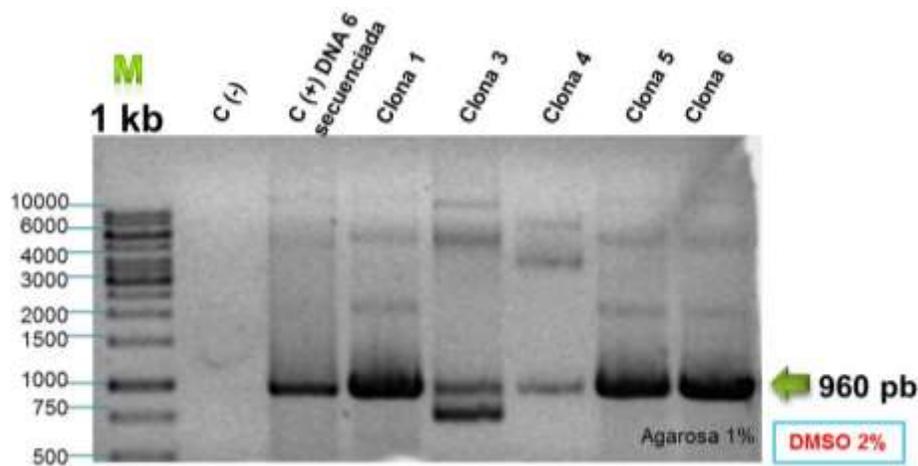
## Ligación

El plásmido pJiVSP fue construido por la clonación del amplicón iVSP desde el genoma de *G. duodenalis* C99 en el vector transitorio pJET1.2 (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este producto de ligación se transformaron células *E. coli* (TOP-10) quimio competentes. Se obtuvieron varias colonias candidatas, las cuales se seleccionaron para propagarlas y posteriormente realizar la extracción de plásmido por miniprep. El inserto iVSP contiene: los sitios *SpeI* y *NsiI* que serán utilizados para la clonación del Sitio Blanco para *I-SceI*; el sitio *SacI* (incluido en el oligo iVSP\_R1\_SacI) para subclonar en el vector de integración al genoma junto con el sitio *HindIII* (el cual será añadido en la siguiente modificación) y el sitio *BamHI* para linealizar el vector de integración al genoma.



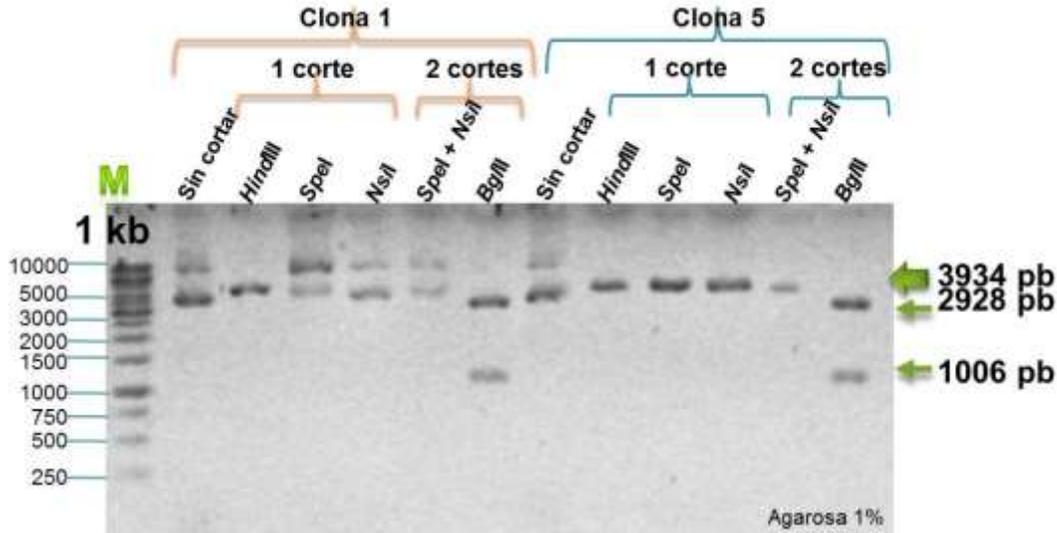
**Figura 5: pJiVSP.** Detalle de las características utilizadas para caracterizar el plásmido: los oligos utilizados para PCR (iVSP\_F1 e iVSP\_R1\_SacI), los oligos utilizados para secuenciar (pJET1.2Forw y pJET1.2Rev.) y los sitios de restricción (*SpeI*, *NsiI*, *HindIII* y *BglIII*).

Se analizaron 6 clonas por PCR, el amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel se muestra que hay varias candidatas que contienen el plásmido con el inserto iVSP. En la figura 6 se observan los amplificados de tamaño esperado de 960-pb.



**Figura 6: Producto de PCR de clonas pJiVSP con los oligos iVSP\_F1 e iVSP\_R1\_SacI.** Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas, USA); carril dos: control negativo de PCR; carril tres: control positivo de PCR que corresponde a una clona de una ligación anterior y confirmada por secuenciación (ver en discusión); del carril cuatro al ocho: se muestran los fragmentos amplificados, de tamaño esperado de 960-pb de las clonas analizadas.

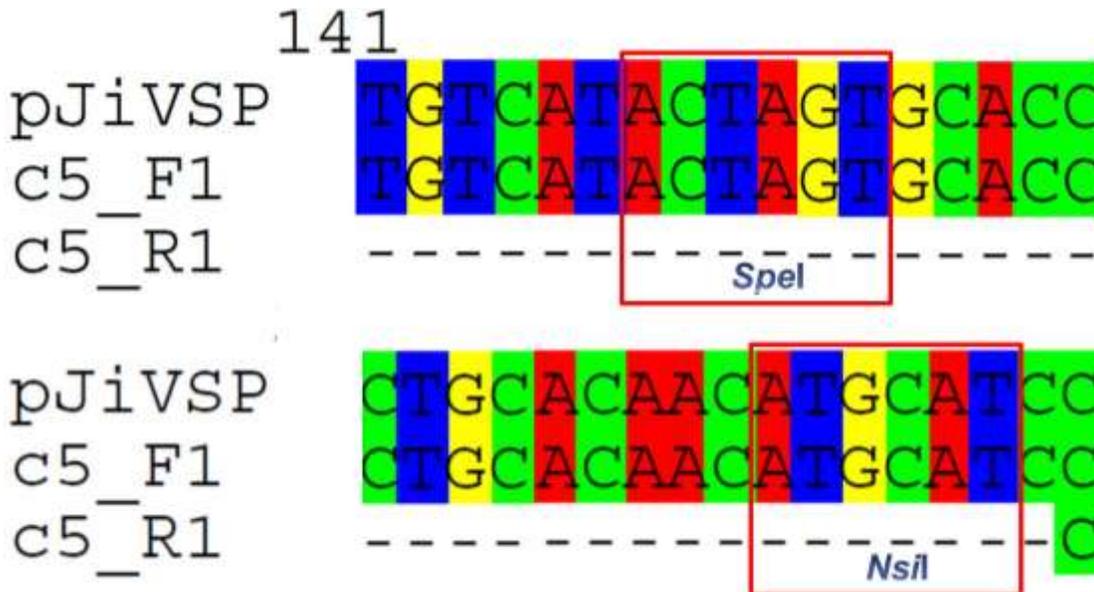
Solo se eligieron las clonas 1 y 5 para caracterizar por digestión con enzimas de restricción. Para linealizar se utilizaron las enzimas *HindIII* (cuyo sitio se encuentra en pJET1.2), *SpeI* y *NsiI* (cuyos sitios fueron agregados en el inserto iVSP). Para realizar 2 cortes y liberar un fragmento se utilizó la enzima *BglII* y doble digestión con *SpeI* y *NsiI*. Las reacciones se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 7, se muestran las bandas obtenidas por la digestión de las clonas 1 y 5 por diversas enzimas de restricción. Todas las enzimas fueron capaces de digerir el plásmido obtenido de la clona 5 por lo cual ésta clona contiene los sitios de restricción necesario para la siguiente modificación.



**Figura 7: Caracterización de pJiVSP clonas 1 y 5 por digestión con enzimas de restricción.** Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas, USA); carril dos: plásmido de la clona 1 y; carriles tres al siete su digestión: solo cortaron las enzimas cuyo sitio se encuentra en el plásmido (*HindIII* que linealizó y *Bgl II* que liberó un fragmento), *SpeI* y *NsiI* no fueron capaces de digerirlo; carril ocho: plásmido de la clona 5 y; carriles nueve al trece su digestión: todas las enzimas fueron capaces de digerir el plásmido.

### Secuenciación de pJiVSP clona5

La clona 5 también fue confirmada mediante secuenciación con los oligos pJET1.2Forw y pJET1.2Rev. El alineamiento con seaview muestra la integridad de los sitios de restricción *SpeI* y *NsiI*.

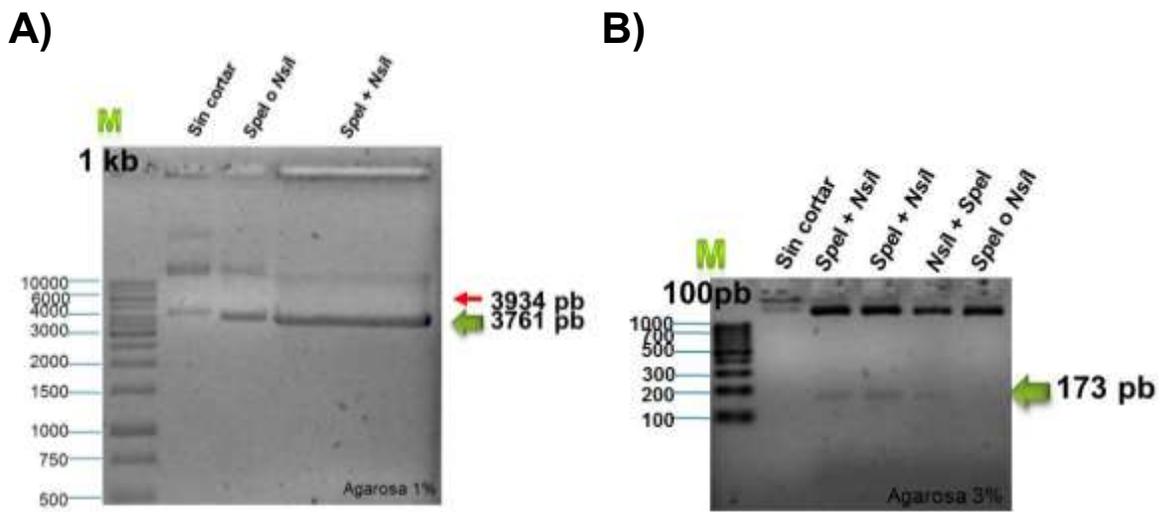


**Esquema 14: Alineamiento de pJiVSP.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo pJET1.2Forw y; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo pJET1.2Rev.

## Construcción de pJiVSPsbS

### *Digestión de pJiVSP con SpeI y NsiI para la ligación del inserto sbS.*

La doble digestión se realizó en un solo paso en buffer 2.1 (NEB, UK). *NsiI* tiene una eficiencia de corte de 75% mientras que *SpeI* de 100% en ese buffer. Las reacciones se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 8, se muestran las bandas obtenidas por la digestión de la clona 5 de pJiVSP con *SpeI* y *NsiI*. La banda de 3761-pb fue recortada, purificada y el DNA obtenido fue cuantificado.

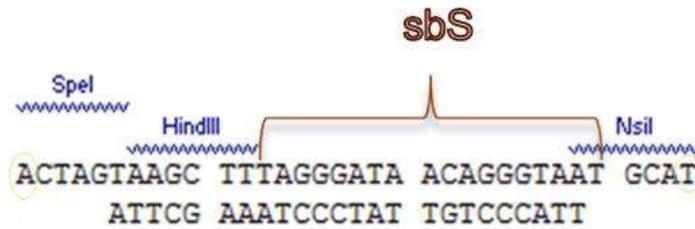


**Figura 8: Digestión pJiVSP con *NsiI* y *SpeI*** A) Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: pJiVSP sin digerir; carril tres: pJiVSP linealizado (flecha roja) con *NsiI* o *SpeI* y; carril cuatro: la doble digestión y el fragmento esperado de 3761 pb (flecha verde). B) Carril uno: marcador de 100 pb (Invitrogen,USA); carril dos: pJiVSP sin digerir, carriles tres al cinco: la doble digestión y el fragmento liberado esperado de 173 pb y; carril seis: pJiVSP linealizado con *SpeI* o *NsiI*.

### *Formación del sbS sintético en doble cadena*

Antes de realizar la ligación se hibridaron los oligos sbS\_F1\_SpeI\_HindIII y sbS\_R1\_NsiI en agua inyectable a una concentración de 4 ng/ $\mu$ L. El oligo sbS\_F1\_SpeI\_HindIII consta de: los extremos cohesivos para los sitios *SpeI* y *NsiI* (ya que la A y la T de los extremos, encerradas en círculos verdes, esquema 15, no existen físicamente, se muestran para ilustrar la secuencia de los sitios de restricción), el sitio *HindIII* para la posterior subclonación en el vector de integración al genoma y las 18 pb del sbS. El oligo sbS\_R1\_NsiI es la cadena

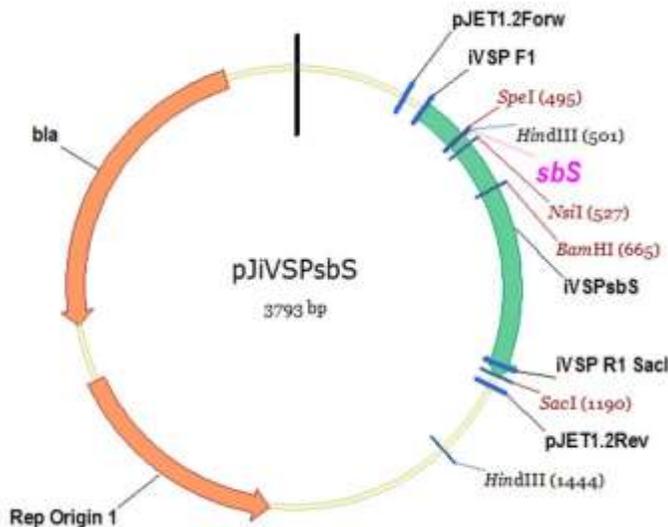
complementaria para dejar los extremos cohesivos para la ligación en pJiVSP/Spel\_NsiI.



**Esquema 15: sbS sintético en doble cadena.** Detalle de la secuencia de los oligos utilizados.

### Ligación

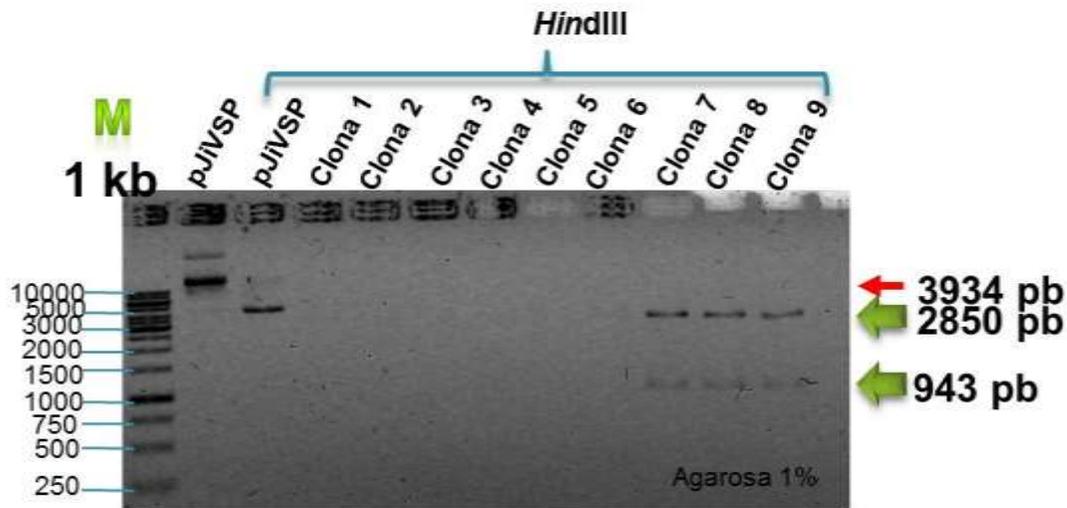
El plásmido pJiVSPsbS fue construido mediante la ligación del sbS sintético en doble cadena y el plásmido pJiVSP digerido con *SpeI* y *NsiI* con T4 DNA ligasa (Fermentas,USA) a temperatura ambiente durante toda la noche. Con este producto de ligación se transformaron células *E. coli* (TOP-10) quimio competentes. Se obtuvieron varias colonias candidatas las cuales se seleccionaron para propagarlas y posteriormente realizar la extracción de plásmido por miniprep.



**Esquema 16: pJiVSPsbS.** Detalle de las características utilizadas para caracterizar el plásmido: los oligos utilizados para secuenciar (pJET1.2Forw. y pJET1.2Rev.) y los sitios de restricción *HindIII*. También se muestra la posición del sbS, los sitios utilizados para su ligación (*SpeI* y *NsiI*), los sitios *HindIII* (501) y *SacI* para la subclonación en el vector de integración al genoma, el sitio *BamHI* para linealización y los oligos iVSP\_F1 e iVSP\_R1\_SacI.

El vector pJiVSPsbS contiene el sitio *HindIII* para la subclonación del inserto iVSPsbS en el vector de integración al genoma.

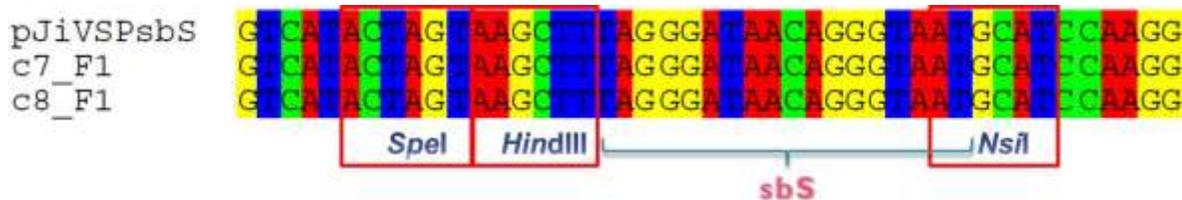
El plásmido obtenido de las clonas propagadas se analizó por digestión con enzimas de restricción. Las reacciones se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 9, se muestran las bandas obtenidas por la digestión de las clonas obtenidas con *HindIII*; de 9 clonas analizadas en tres se observa liberación de fragmento de 943-pb lo que indica que tienen el inserto sbS, debido a que allí se adicionó uno de los sitios *HindIII*.



**Figura 9: Caracterización de pJiVSPsbS mediante digestión con *HindIII*.** Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: pJiVSP clona 5 sin digerir y; carriles tres a 12: digestión con *HindIII*, la enzima linealiza la clona 5 de pJiVSP (carril tres), la cual solo contiene un sitio y se observa la banda esperada de 3934-pb, mientras que en las clonas 7, 8 y 9 de pJiVSPsbS se observan dos bandas una de 2850-pb y otra de 943-pb, que en conjunto suman 3793-pb, el tamaño del plásmido pJiVSPsbS.

### Secuenciación de pJiVSPsbS

Se secuenciaron las clonas 7 y 8 para confirmar su identidad con el oligo pJET1.2Forw. El alineamiento con seaview confirma la integridad del sbS y los sitios de restricción *SpeI* y *NsiI* utilizados para su clonación.



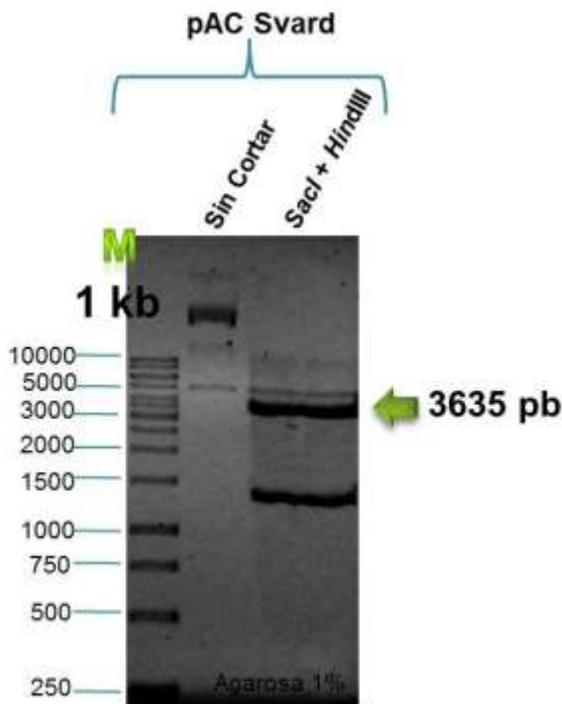
**Esquema 17: Alineamiento de pJiVSPsbS, clonas 7 y 8.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida de la clona 7 con el oligo pJET1.2Forw; fila tres: la secuencia obtenida de la clona 7 con el oligo pJET1.2Forw.

## 8.5 Construcción de pACSiVSPsbS:

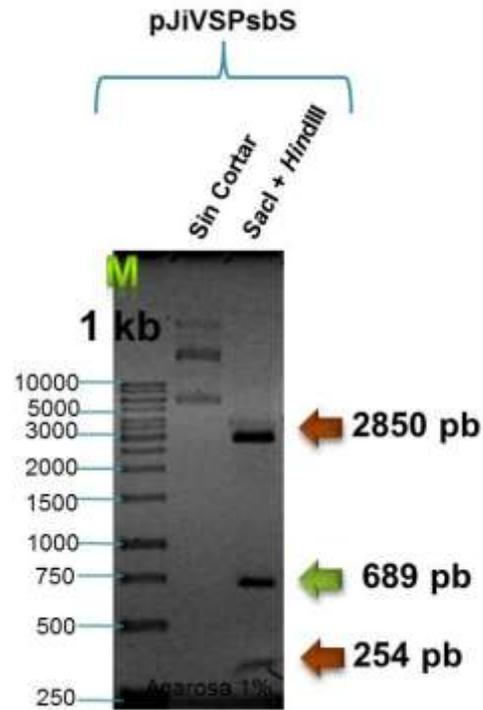
El plásmido pACSiVSPsbS se construyó clonando el inserto iVSPsbS obtenido de la digestión secuencial de pJiVSPsbS con *SacI* y *HindIII* en el plásmido pACSvard plasmid, éste último fue previamente digerido con las mismas enzimas para liberar el inserto que contenía, las digestiones se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 10, se muestran las bandas obtenidas por la digestión de pAC Svard plasmid y pJiVSPsbS con *SacI* y *HindIII*; la banda de 3635-pb del inciso A y la banda de 689-pb del inciso B fueron recortadas, purificadas y los DNAs obtenidos fueron cuantificados. La ligación de estos dos fragmentos se realizó con T4 DNA ligasa a temperatura ambiente durante toda la noche. Con este producto de ligación se transformaron células *E. coli* (TOP-10) quimio competentes. Se obtuvieron varias colonias candidatas las cuales se seleccionaron para propagarlas y posteriormente realizar la extracción de plásmido por miniprep.

En el esquema 18 se muestran algunas características relevantes del plásmido obtenido, pACSiVSPsbS.

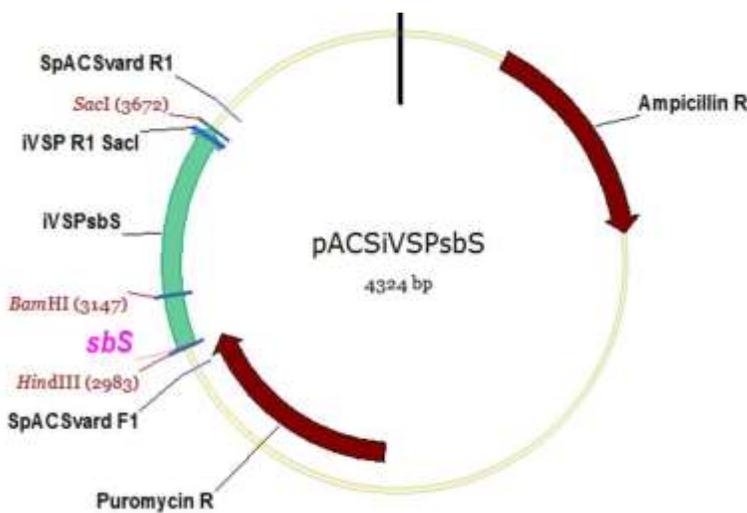
A)



B)



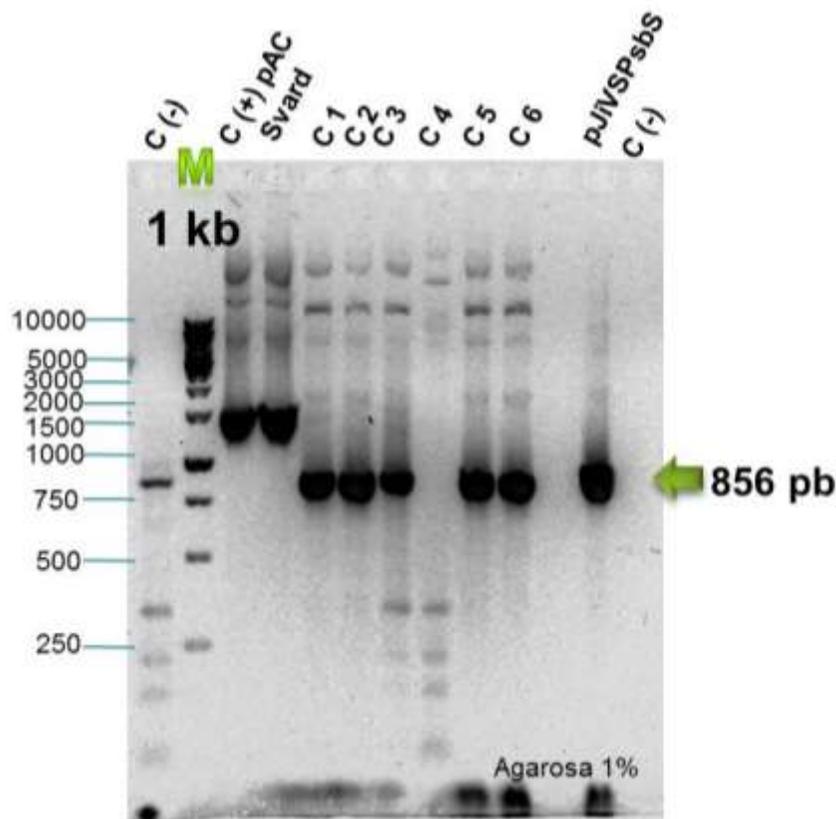
**Figura 10: Digestiones con *SacI* y *HindIII*.** A) *pAC Svard* plasmid digerido con *SacI* y *HindIII*, se obtiene el fragmento deseado de 3635-pb. B) *pJiVSPsbS* digerido con *SacI* y *HindIII*, se obtienen 3 fragmentos debido a que el plásmido contiene 2 sitios *HindIII*; el deseado es el de 689-pb (inserto iVSPsbS). Para ambos incisos, carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas, USA); carril dos: plásmido sin digerir y; carril tres: plásmido digerido secuencialmente.



**Esquema 18: pACSiVSPsbS.** Detalle de las características utilizadas para caracterizar el plásmido: los oligos utilizados para PCR y secuenciar (SpACsvard\_F1 y SpACsvard\_R1). También se muestra la posición del sbS, los sitios utilizados para su ligación (*HindIII* y *SacI*), el sitio *BamHI* para linealización y posterior integración al genoma y el oligo iVSP\_R1\_SacI.

Este plásmido no contiene la secuencia del oligo iVSP\_F1 utilizado para la amplificación de iVSP desde el genoma de *G. duodenalis* C99. La digestión con *SacI* y *HindIII* eliminó el promotor del plásmido que no es necesario debido a que el iVSPsbS no es un gen que requiera ser expresado.

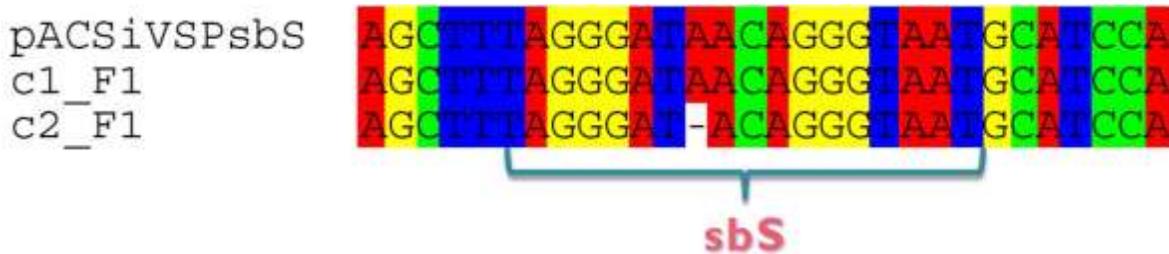
El plásmido obtenido de las clonas propagadas se analizó mediante PCR. Los amplicones se resolvieron en un gel de agarosa, figura 11 este fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador; de 6 clonas analizadas mediante PCR 5 contienen el inserto iVSPsbS.



**Figura 11: PCR de iVSP desde pACSiVSPsbS.** Carril uno: control negativo de PCR de los oligos SpACSvard\_F1 y SpACSvard\_R1; carril dos: marcador de 1 Kb; carriles tres y cuatro: control de PCR de los oligos SpACSvard\_F1 y SpACSvard\_R1, se utilizó el plásmido pACSvard cuyo amplicón es de mayor tamaño que el pACSiVSPsbS amplificado con el mismo par de oligos; carriles cinco a diez: amplicón de las clonas 1 a 6 de pACSiVSPsbS, fragmento esperado de 856-pb; carril 12: amplicón de pJiVSPsbS con los oligos pJET1.2Forw. y pJET1.2Rev. cuyo tamaño (938-pb) es similar al del producto deseado y; carril 13 control negativo de la PCR de pJiVSPsbS.

## Secuenciación de pACSiVSPsbS

Finalmente, se confirmó la integridad del sbS mediante secuenciación de las clonas 1 y 2 con el oligo SpACSVard\_F1. El alineamiento con Seaview confirma la integridad del sbS. Se seleccionó la clona 1.

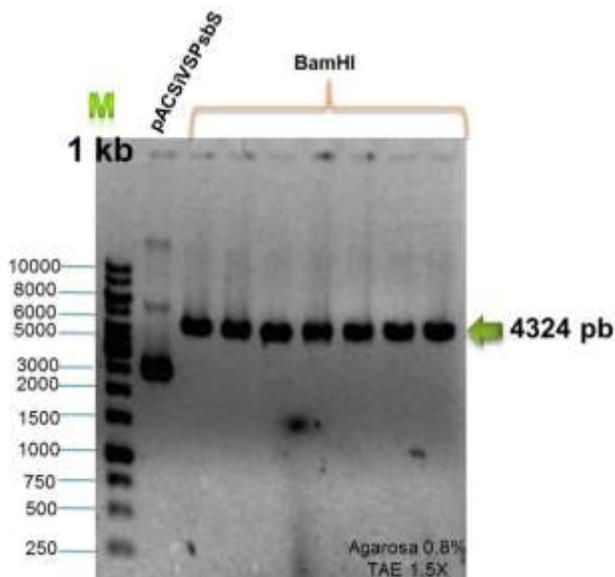


**Esquema 19: Alineamiento de pACSiVSPsbS, clonas 1 y 2.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida para la clona 1 con el oligo SpACSVard\_F1 y; fila tres: la secuencia obtenida para la clona 2 con el oligo SpACSVard\_F1.

## 8.6 Obtención de trofozoítos transgénicos de *G. duodenalis* con el sbS

Linealización de pACSiVSPsbS con *Bam*HI para transfección de trofozoítos de *G. duodenalis* C99.

El plásmido obtenido por midiprep de la clona 1 fue digerido con *Bam*HI, la reacción se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 12, se muestra el plásmido pACiVSPsbS linealizado.



**Figura 12: Digestión de pACSiVSPsbS con *Bam*HI.** Carril uno: marcador de 1 Kb; carril 2 pACSiVSPsbS sin digerir; carriles tres al nueve: digestión de pACSiVSPsbS con *Bam*HI.

El plásmido linealizado fue lavado y concentrado con una unidad de filtración Amicon Ultra (Merck-Millipore, Alemania). Este plásmido purificado se utilizó para transfectar trofozoítos de *G. duodenalis* C99.

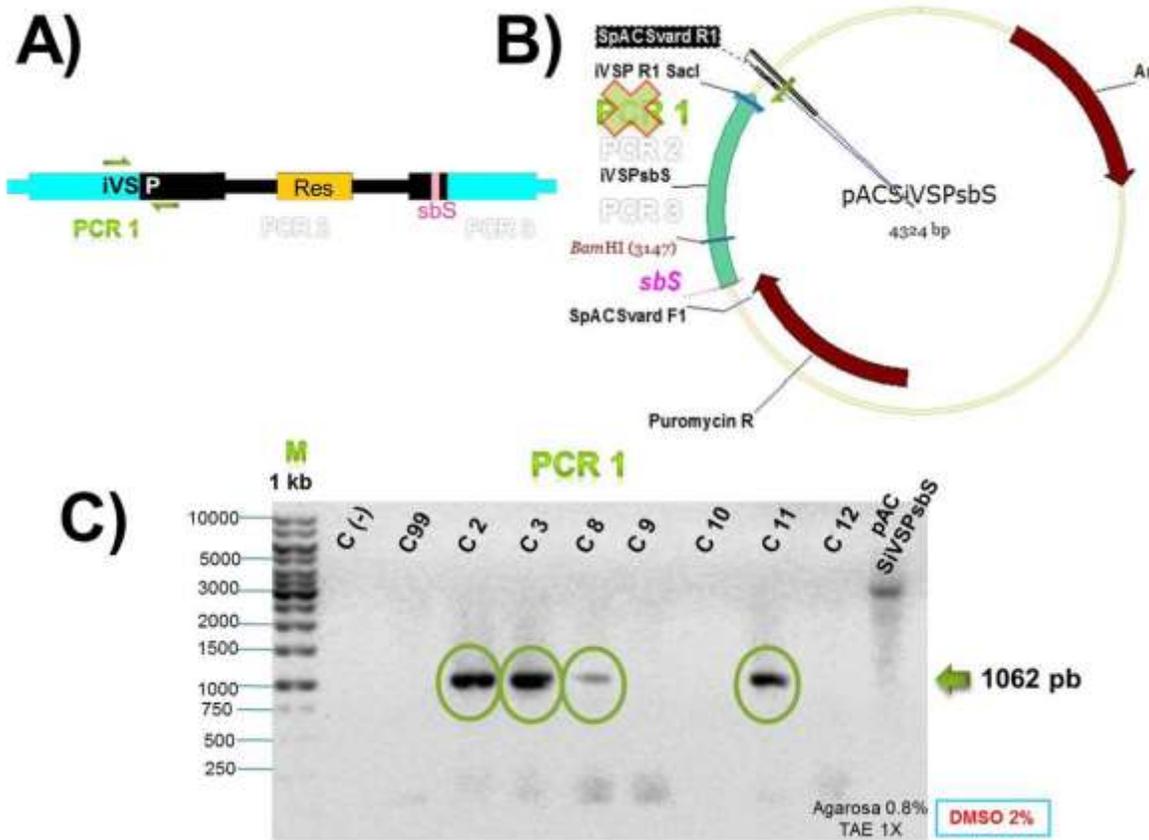
### Análisis de trofozoítos transgénicos sbS

Después de la recuperación de los trofozoítos y la selección clonal, se realizaron tres PCR's para caracterizar el plásmido, el cual podría estar en dos formas: integrado en el genoma o episomal circular. Sin embargo, se esperan tres tipos de cultivos: con plásmido integrado en el genoma (lineal), con plásmido circular o con ambos estados del plásmido ya sea porque el cultivo es una mezcla de trofozoítos o porque el plásmido se encuentra en los dos estados en un mismo trofozoíto. Los amplicones de cada PCR se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador. En los geles de las figuras 13 a 15, se muestran los amplificadores obtenidos para cada PCR.

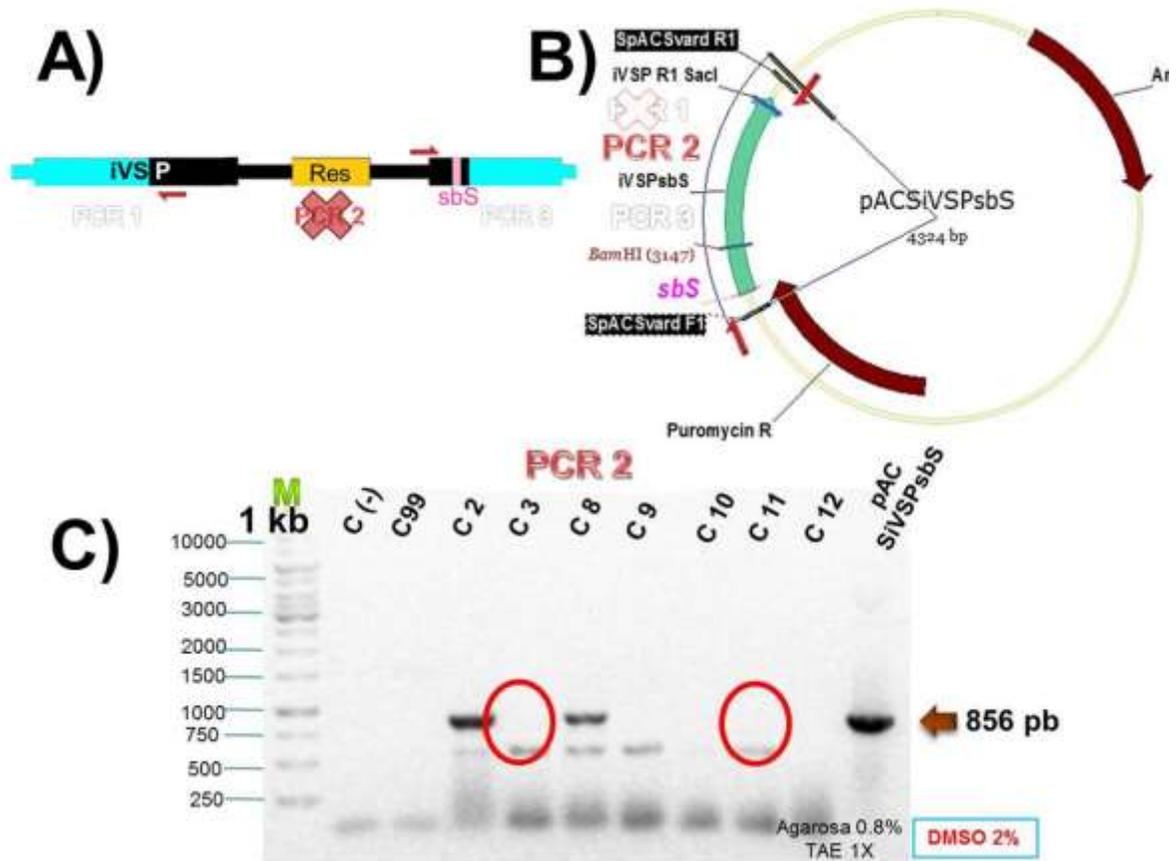
En la PCR1, figura 13, se utilizaron los oligos iVSP\_F1 y SpACSvard\_R1, solo habrá producto de PCR en las cepas que tengan el plásmido integrado en el genoma debido a que la secuencia del oligo iVSP\_F1 solo se encuentra en el genoma.

En la PCR2, figura 14, se utilizaron los oligos SpACSvard\_F1 y SpACSvard\_R1 y a pesar de que las secuencias se encuentran en el genoma no pueden dar producto debido a que se encuentran en sentido opuesto, pero sí amplificarán el plásmido circular.

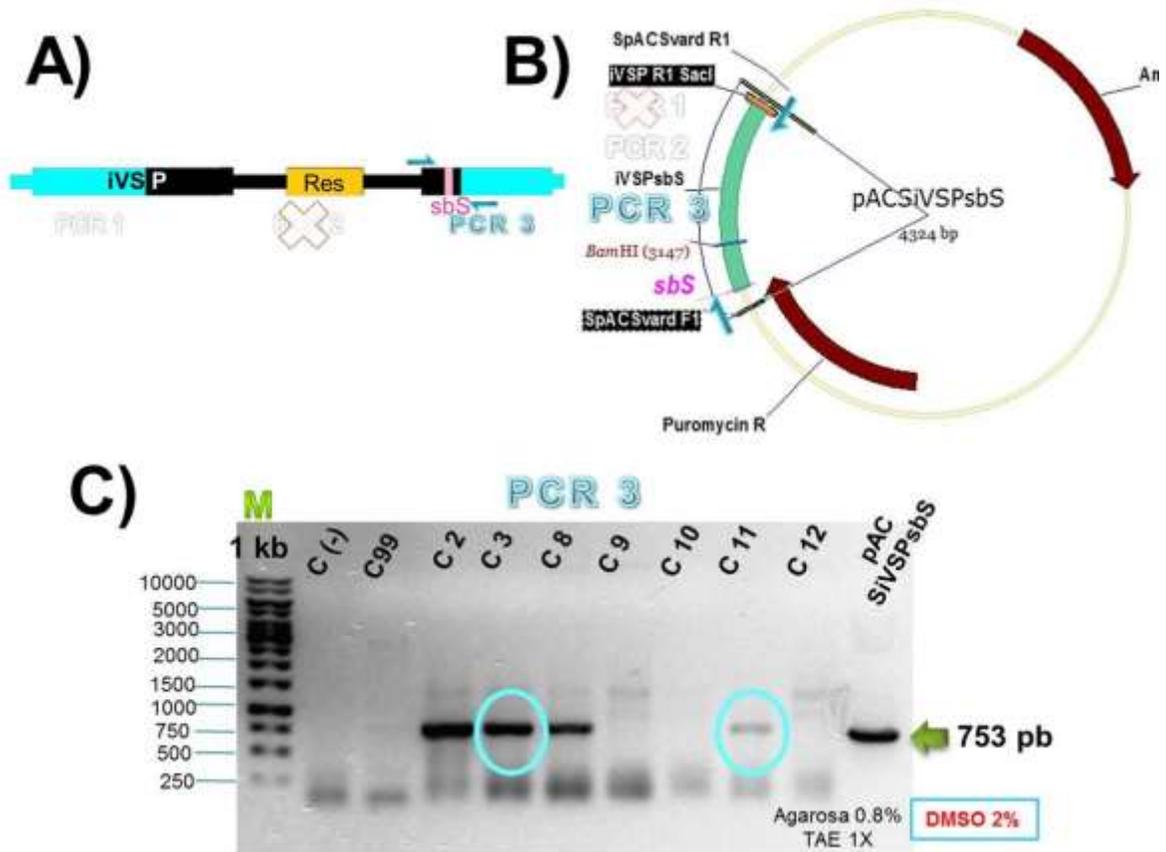
En la PCR3, figura 15, se utilizaron los oligos SpACSvard\_F1 y iVSP\_R1\_Sacl, se pretende amplificar la región donde se encuentra el sbS, esta PCR da producto en cualquier estado del plásmido; circular o lineal. Es muy importante realizar esta PCR porque el amplicón se debe secuenciar para confirmar la integridad del sbS.



**Figura 13: PCR1.** A) Esquema del cromosoma de *Giardia* con el plásmido integrado, en verde se muestra la posición de los oligos utilizados para la amplificación (*iVSP\_F1* y *SpACsvard\_R1*). B) Esquema del plásmido circular, solo contiene la secuencia del oligo *SpACsvard\_R1*. C) PCR con los oligos *iVSP\_F1* y *SpACsvard\_R1*. Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: control negativo; carril tres: producto de C99 (no se esperaba producto ya que esta cepa de *Giardia* no contiene el plásmido); carriles cuatro al diez producto de las clonas analizadas, en cuatro clonas se obtuvo el amplicón del tamaño esperado (1062-pb) que son las clonas positivas para la PCR1: 2, 3, 8 y 11 (carriles 4, 5, 6 y 9, respectivamente), estas clonas tienen el plásmido integrado en el genoma; carril 13: producto del pACSiVSPsbS (tampoco se esperaba producto, ya que no contiene la secuencia del oligo *iVSP\_F1*).



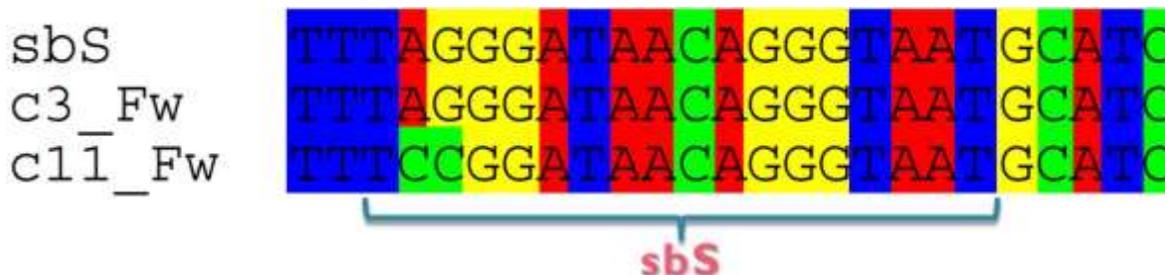
**Figura 14: PCR2.** A) Esquema del cromosoma de *Giardia* con el plásmido integrado, en rojo se muestra la posición de los oligos utilizados para la amplificación (*SpACsvard\_F1* y *SpACsvard\_R1*), no es posible obtener producto de PCR debido a que están en sentido opuesto. B) Esquema del plásmido circular, se muestra la posición de los oligos. C) PCR con los oligos *SpACsvard\_F1* y *SpACsvard\_R1*. Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: control negativo; carril tres: producto de C99 (no se esperaba producto ya que esta cepa de *Giardia* no contiene el plásmido); carriles cuatro al diez producto de las clonas analizadas, en dos clonas (2 y 8) se obtuvo el amplicón del tamaño esperado (856-pb), correspondientes al plásmido circular, por lo tanto, las clonas negativas para la PCR2, son las clonas 3 y 11 (carriles 5 y 9, respectivamente), estas clonas no tienen el plásmido circular, sólo está en su forma integrada al genoma; carril 13: producto del pACSiVSPsbS del tamaño esperado de 856-pb.



**Figura 15: PCR3.** A) Esquema del cromosoma de *Giardia* con el plásmido integrado, en azul se muestra la posición de los oligos utilizados para la amplificación (SpACsvard\_F1 e iVSP\_R1\_SacI). B) Esquema del plásmido circular, se muestra la posición de los oligos. C) PCR con los oligos SpACsvard\_F1 e iVSP\_R1\_SacI. Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: control negativo; carril tres: producto de C99 (no se esperaba producto ya que esta cepa de *Giardia* no contiene el plásmido); carriles cuatro al diez producto de las clonas analizadas. Se obtuvo amplicón de tamaño esperado (753-pb) en las clonas 2, 3, 8 y 11, carriles 4, 5, 6 y 9 respectivamente; carril 13: producto del pACSiVSPsbS del tamaño esperado de 753-pb.

#### Secuenciación del producto de la PCR3

El producto de la PCR3 de las clonas 3 y 11 fue secuenciado con el oligo SpACsvard\_F1 para verificar la integridad del sbS.



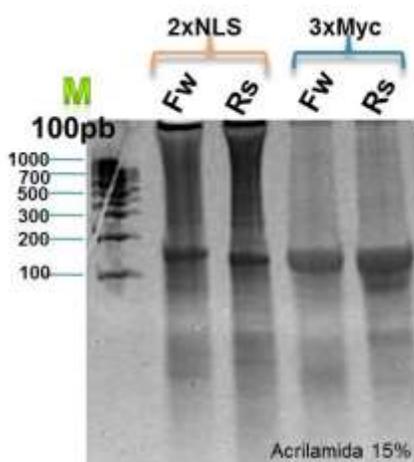
**Esquema 20: Alineamiento del transgénico sbS, clones 3 y 11.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida para la clona 3 con el oligo SpACSvard\_F1 y; fila tres: la secuencia obtenida para la clona 11 con el oligo SpACSvard\_F1.

## 8.7 Construcción del plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC

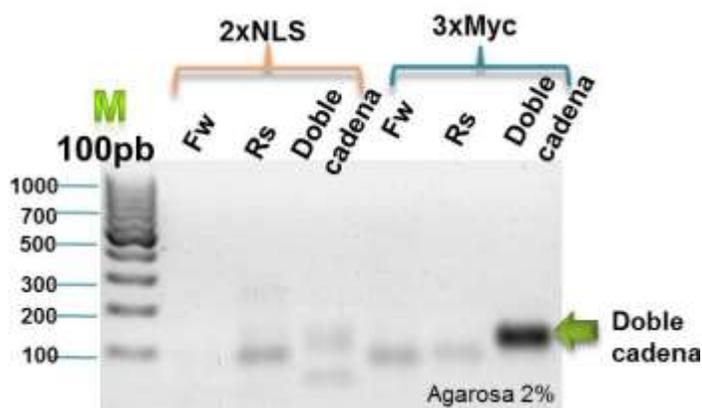
### Purificación y reparación de oligos 2xNLS y 3xMYC

Los oligos 2xNLS\_F1, 2xNLS\_R1, 3xMYC\_F1 y 3xMYC\_R1 se purificaron de gel de acrilamida, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel de la figura 16 inciso A se observan las bandas que fueron recortadas, purificadas y el DNA obtenido fue cuantificado. Después, estos se repararon y se resolvieron en un gel de agarosa para verificar su integridad, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador; en el gel de la figura 16 inciso B se observan los oligos reparados en doble cadena.

A)



B)

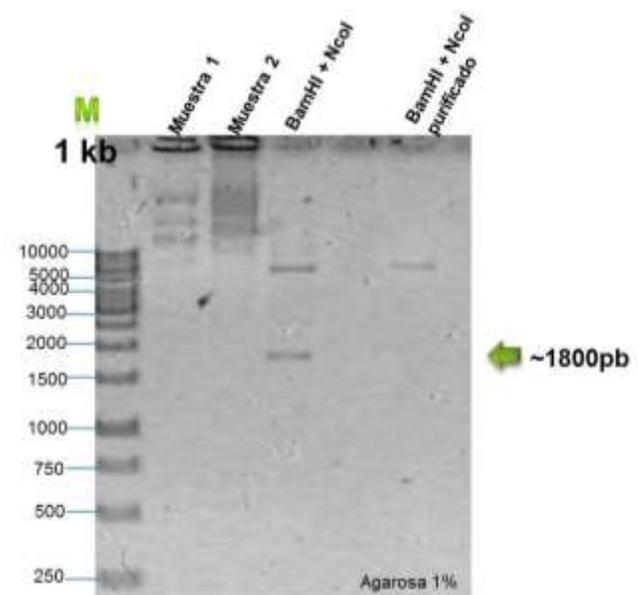


**Figura 16: Oligos Reparados.** Carril uno de ambos incisos: marcador de 100-pb. A) Oligos 2xNLS\_F1 (Fw) y 2xNLS\_R1 (Rs) en los carriles 2 y 3, respectivamente y; los oligos 3xMYC\_F1 (Fw) y 3xMYC\_R1 (Rs) en los carriles 4 y 5, respectivamente. B) Oligos 2xNLS\_F1 (Fw), 2xNLS\_R1 (Rs) y en doble cadena (2xNLS) en los carriles 2, 3 y 4, respectivamente y oligos 3xMYC\_F1 (Fw), 3xMYC\_R1

(Rs) y en doble cadena (3xMYC) en los carriles 5, 6 y 7, respectivamente. La flecha indica donde migra el fragmento de doble cadena.

### Digestión del vector pNlop4\_3Myc\_PAK\_N con *Bam*HI y *Nco*I

El plásmido pNlop4\_3Myc\_PAK\_N fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I para liberar el inserto y después utilizarlo en la reacción de ligación de Gibson. La reacción se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador; en el gel de la figura 17 se muestran las bandas obtenidas.



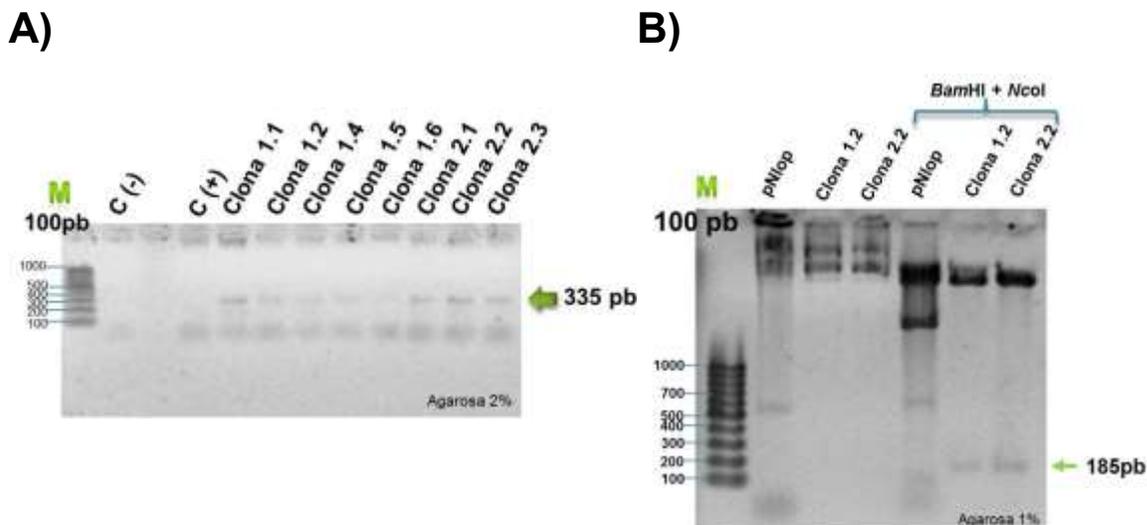
**Figura 17: Digestión del vector plásmido pNlop4\_3Myc\_PAK\_N con *Bam*HI y *Nco*I.**

Carril uno: marcador de 1 Kb; carriles dos y tres: dos muestras distintas de plásmido; carril cuatro: digestión con *Bam*HI y *Nco*I, en el cual se observa la liberación de un fragmento de aproximadamente 1800 pb y; carril seis: un plásmido como control previamente digerido y purificado

### Reacción de ligación de Gibson

Para esta ligación se utilizó como vector lineal el plásmido pNlop4\_3Myc\_PAK\_N/*Nco*I/*Bam*HI y los insertos 2xNLS y 3xMYC.

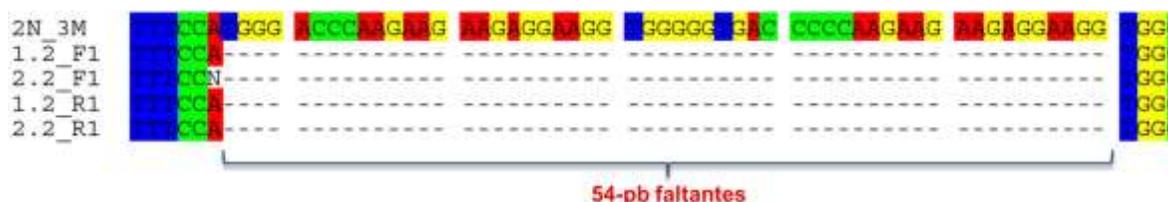
Las clonas se analizaron por PCR y digestión con *Bam*HI y *Nco*I. El amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 18 inciso A se muestra el fragmento esperado de aproximadamente 335-pb en todas las clonas analizadas. Se eligieron las clonas 1.2 y 2.2 para analizar por digestión con *Bam*HI y *Nco*I, las reacciones se resolvieron en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 18 inciso B se muestran las bandas obtenidas.



**Figura 18: Análisis de pNlop\_2xNLS\_3xMYC.** Carril uno de ambos incisos: marcador de 100-pb. A) PCR del inserto 2xNLS\_3xMYC con los oligos SpNlop\_F1 y SpNlop\_R1. Carril dos: control negativo (mezcla sin templado); carril cuatro: como control positivo pNlop4\_3Myc\_PAK\_N amplificado con el mismo par de oligos, se espera un inserto de aproximadamente 1800-pb por lo que no se aprecia en este gel y; carriles cinco al 12: productos de PCR de las clonas analizadas. B) Digestión con BamHI y NcoI. Carriles dos al cuatro: plásmido pNlop4\_3Myc\_PAK\_Ny de las clonas 1.2 y 2.2, respectivamente, sin digerir y; carriles cinco al siete: sus digestiones en el mismo orden.

### Secuenciación de clonas 1.2 y 2.2

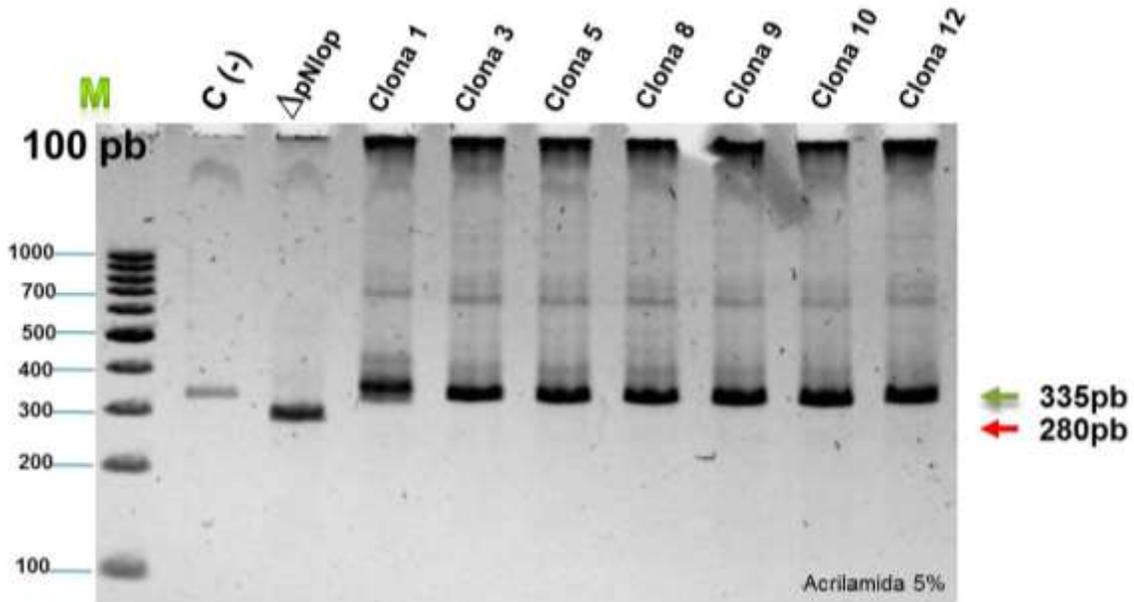
Se secuenciaron las clonas 1.2 y 2.2 con los oligos SpNlop\_F1 y SpNlop\_R1 para confirmar la integridad del inserto. Sin embargo la secuenciación muestra que a estas clonas les faltan 54-pb en el extremo 5', correspondiente al inserto 2xNLS. Por lo que éste plásmido se denominó  $\Delta$ pNlop 2xNLS\_3xMYC.



**Esquema 21: Alineamiento de  $\Delta$ pNlop 2xNLS\_3xMYC, clonas 1.2 y 2.2.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_F1 para la clona 1.2; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_F1 para la clona 2.2; fila cuatro: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 para la clona 1.2 y; fila cinco: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 para la clona 2.2.

Para completar la secuencia, el vector  $\Delta$ pNlop 2xNLS\_3xMYC fue digerido con NcoI para ligar con el inserto 2xNLS a través de la reacción de ligación de Gibson. Las clonas obtenidas se analizaron mediante PCR. El amplicón se

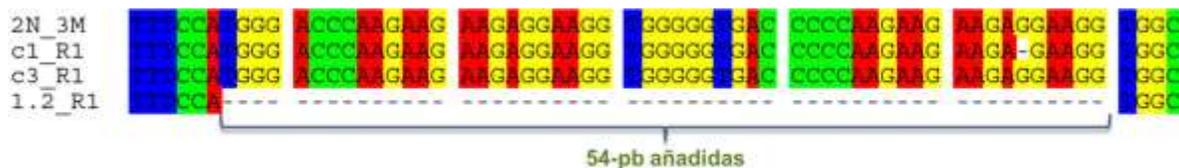
resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 19, se muestra que todas las candidatas analizadas contienen la secuencia completa.



**Figura 19: PCR de pNlop\_2xNLS\_3xMYC.** Para la amplificación se utilizaron los oligos SpNlop\_F1 y SpNlop\_R1. Carril uno: marcado de 100-pb (Fementas,USA); carril dos: el control negativo; carril tres: el producto obtenido de  $\Delta$ pNlop 2xNLS\_3xMYC de 280\_p\_b y; en resto de los carriles las clonas analizadas en la cuales se obtuvo el amplicón esperado de 335-pb.

### Secuenciación de pNlop\_2xNLS\_3xMYC

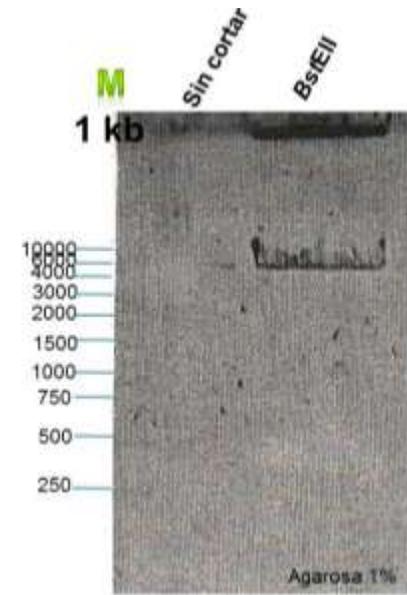
Se confirmó la integridad del inserto mediante secuenciación de las clonas 1 y 3 con el oligo SpNlop\_R1. Este plásmido contiene 2 señales de localización nuclear (NLS) una en el extremo 5' y otra en el extremo 3', 3 etiquetas MYC en tándem en el extremo 3' y un sitio *Bst*EII entre las dos NLS, para su linealización y clonación de cualquier gen que se desee expresar con ubicación nuclear.



**Esquema 22: Alineamiento de pNlop\_2xNLS\_3xMYC, clonas 1 y 3.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 para la clona 1; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 para la clona 3 y; fila cuatro: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 para la clona 1.2.

### Linealización de pNlop\_2xNLS\_3xMYC con *Bst*EII

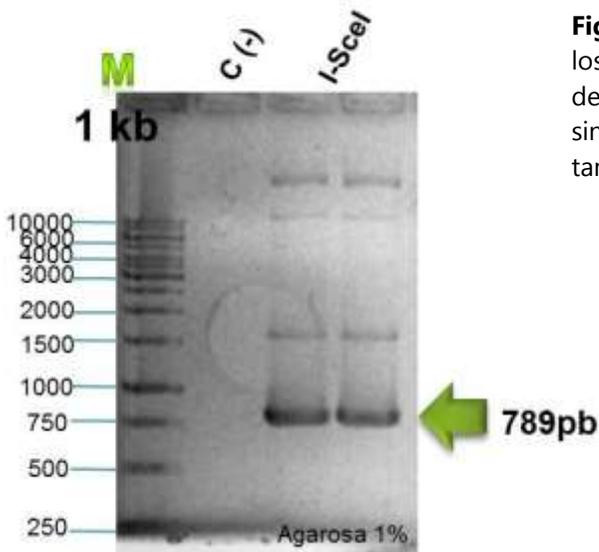
Para ligar el gen de I-SceI, primero se linealizó pNlop\_2xNLS\_3xMYC con *Bst*EII y se desfosforiló con CIP, después se resolvió en un gel de agarosa, éste se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador. La banda fue recortada, purificada y el DNA obtenido fue cuantificado.



**Figura 20:pNlop\_2xNLS\_3xMYC/*Bst*EII.** Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: pNlop\_2xNLS\_3xMYC sin digerir y; carril tres pNlop\_2xNLS\_3xMYC/*Bst*EII y desfosforilado con CIP.

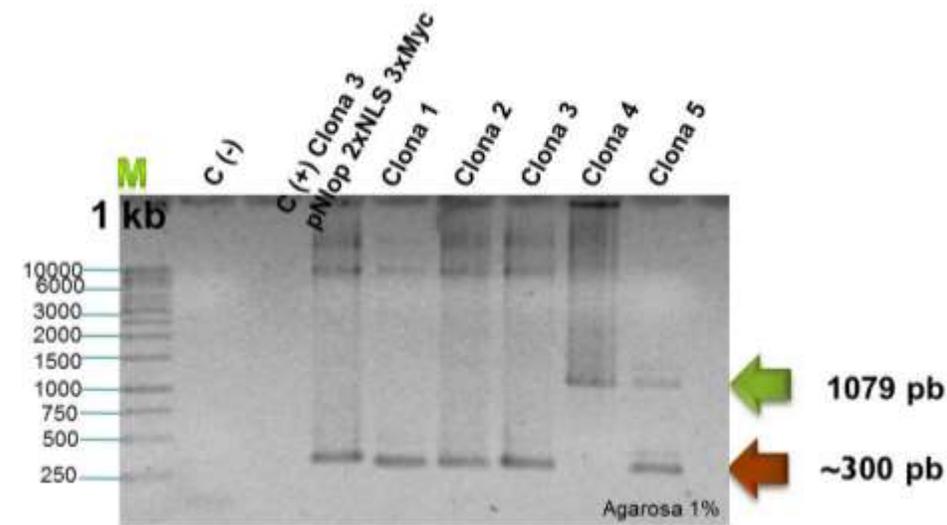
### **8.8 Amplificación de I-SceI desde pCBASceI con polimerasa de alta fidelidad.**

El gen de I-SceI fue amplificado a partir del plásmido pCBASceI con los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_R1, el amplicón se resolvió por electroforesis en gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura \_21\_ se observa la banda de tamaño esperado de 789-pb, la cual fue recortada, purificada y el DNA obtenido fue cuantificado.



**Figura 21: I-SceI.** Para la amplificación se utilizaron los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_R1. Carril uno: marcador de 1 Kb; carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carriles tres y cuatro: el amplicón de tamaño esperado de 789-pb.

Finalmente se ligó el gen de I-SceI en pNlop\_2xNLS\_3xMYC/BstEII por reacción de ligación de Gibson. Las clonas obtenidas se analizaron mediante PCR; el amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 22 se observa que solo en una de ellas se obtuvo el amplicón de tamaño esperado de 1079-pb.



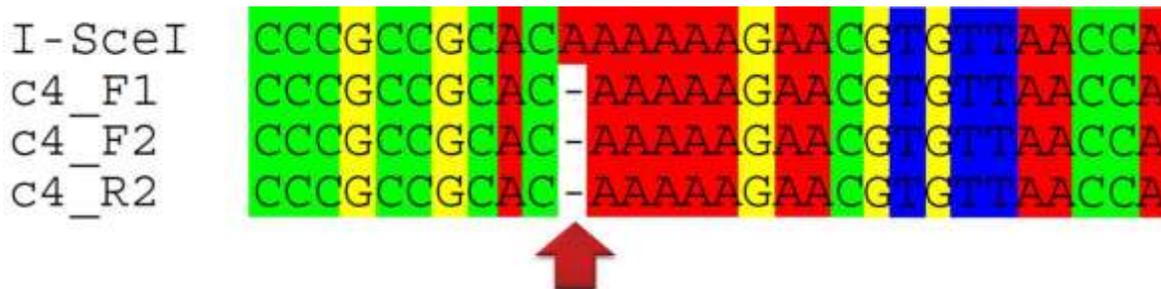
**Figura 22: PCR de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.** Para la amplificación se utilizaron los oligos SpNlop\_F1 y SpNlop\_R1. Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas,USA); carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carril cuatro: control positivo de amplificación, el vector pNlop\_2xNLS\_3xMYC y; en el resto de los carriles: las clonas analizadas, únicamente en la clona 4 (carril 8) se obtuvo el amplicón de tamaño esperado de 1079-pb.



**Esquema 23: Esquema de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.** La meganucleasa I-SceI está flanqueada por NLS y contiene una etiqueta de 3xMYC en el extremo 3'.

#### Secuenciación de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI

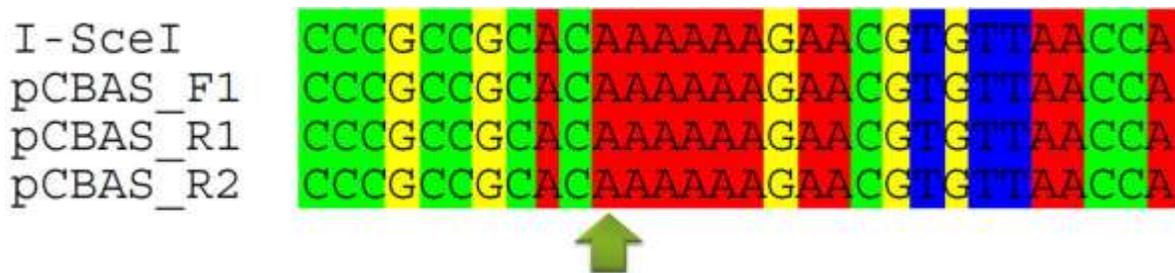
La identidad del gen de la meganucleasa I-SceI se confirmó mediante secuenciación de la clona 4 con los oligos SpNlop\_F1, SpNlop\_F2, SpNlop\_R1 y SpNlop\_R2, sorpresivamente la secuenciación reveló que faltaba un nucleótido “A” en la posición 2637, este plásmido se denominó  $\Delta$ pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI; fue necesario corregir esta mutación ya que cambia el marco de lectura de la proteína.



**Esquema 24: Alineamiento de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI, clona 4.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_F1; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_F2; fila cuatro: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1 y; fila cinco: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R1.

#### Secuenciación de pCBASceI

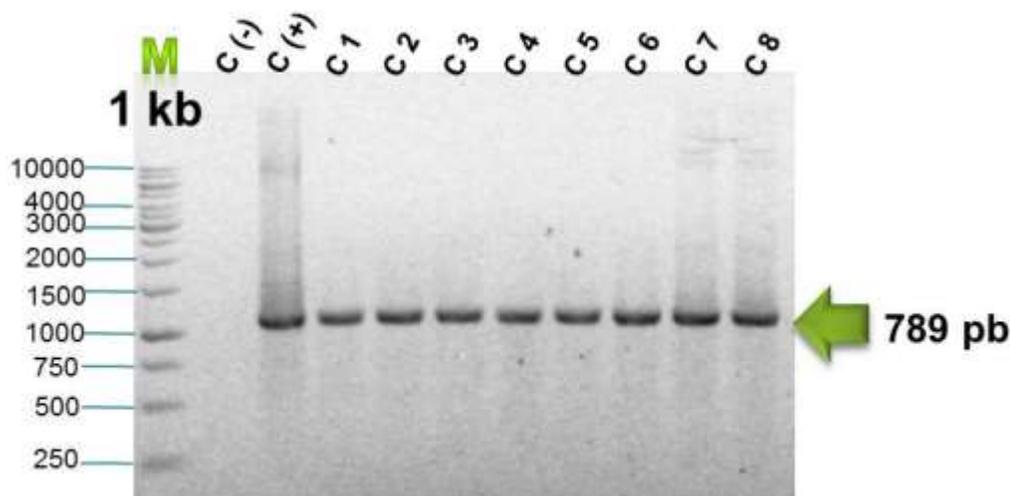
Para averiguar si la falta de esa base venía desde el templado, se realizó secuenciación del gen de I-SceI a partir de este plásmido. La secuenciación reveló que el templado está completo, la mutación obtenida tuvo otro origen.



**Esquema 25: Alineamiento de pCBASceI.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo I-SceI\_F1; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo I-SceI\_R1; fila cuatro: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R2.

### 8.9 Mutagénesis dirigida

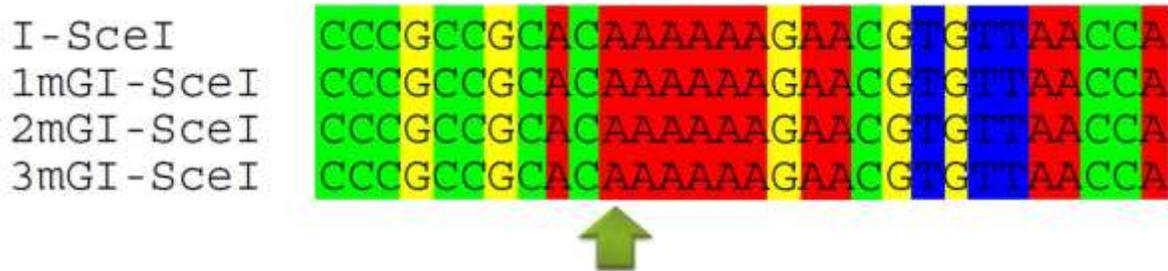
Para agregar el nucleótido faltante “A” se realizó mutagénesis dirigida con los oligos ml-SceI\_F1 y ml-SceI\_R1. Se realizó PCR de las clonas obtenidas para asegurar la presencia del inserto. El amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 23 se muestra que en todas las clonas analizadas se obtiene el producto de tamaño esperado 789-pb.



**Figura 23: PCR I-SceI.** Para la amplificación se utilizaron los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_R1. Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas,USA); carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carril tres: control positivo de amplificación (clona 4 de  $\Delta$ pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI) y; en resto de los carriles: las clonas analizadas, en todas se obtuvo el fragmento esperado de 789-pb.

### Secuenciación de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI

Para confirmar la adición de la base “A”, se secuenciaron las clona 1, 2 y 3 con el oligo SpNlop\_R2. El alineamiento en seaview muestra que las tres contienen esta adición.

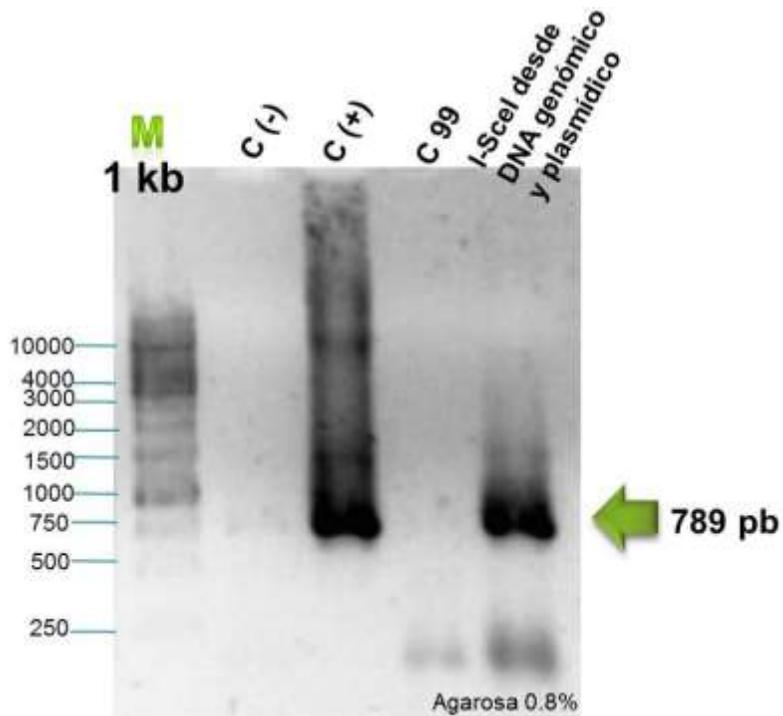


**Esquema 26: Alineamiento de pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI, clonas 1, 2 y 3.** Fila uno: secuencia teórica; fila dos: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R2 para la clona 1; fila tres: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_F2 para la clona 2 y; fila cuatro: la secuencia obtenida con el oligo SpNlop\_R2 para la clona 3.

De estas se seleccionó la clona 3 para secuenciar por completo el gen de I-SceI, se utilizaron los oligos SpNlop\_F1, SpNlop\_F2 y SpNlop\_R1. El alineamiento confirmó que la secuencia está completa y sin mutaciones.

### **8.10 Transfección de trofozoítos de *G. duodenalis* C99 con pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.**

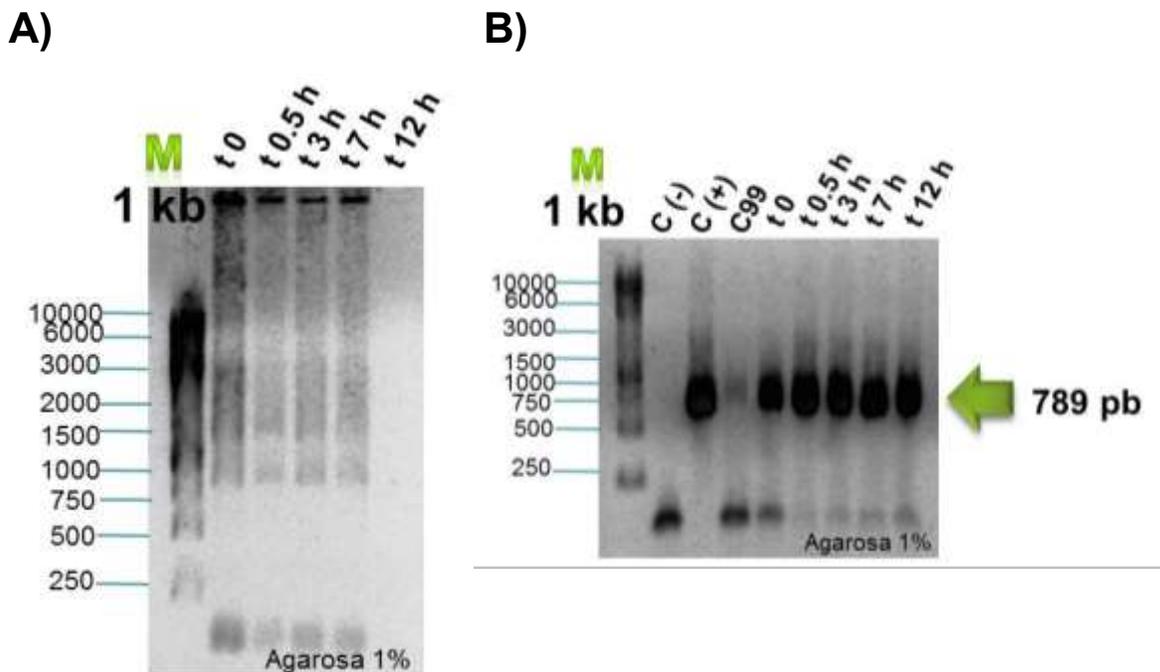
Después de la recuperación de los trofozoítos, se extrajo el DNA total con buffer de extracción de isotiocianato de guanidinio para confirmar la presencia de I-SceI. Se realizó PCR de DNA total; el amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 24, se muestra la banda obtenida con el DNA extraído de trofozoítos I-SceI (trofozoítos C99 transfectados con pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI).



**Figura 24: PCR de I-SceI desde el DNA genómico y plasmídico.** Para la amplificación se utilizaron los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_F1. Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas,USA); carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carril tres: control positivo de amplificación (pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI); carril cuatro: el DNA genómico de C99 y; carril cinco: el DNA total de los trofozoítos I-SceI, en el cual se obtuvo el fragmento esperado de 789-pb.

### 8.11 Análisis de expresión de mRNA de I-SceI

Se indujo la expresión de I-SceI a diferentes concentraciones de doxiciclina y se escogió la de 10 µg/mL de doxiciclina a diferentes tiempos, se extrajo el RNA y sintetizó el cDNA para confirmar la transcripción de I-SceI mediante PCR con los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_R1, específicos para I-SceI. El amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 25 se muestra la banda obtenida con el cDNA sintetizado.

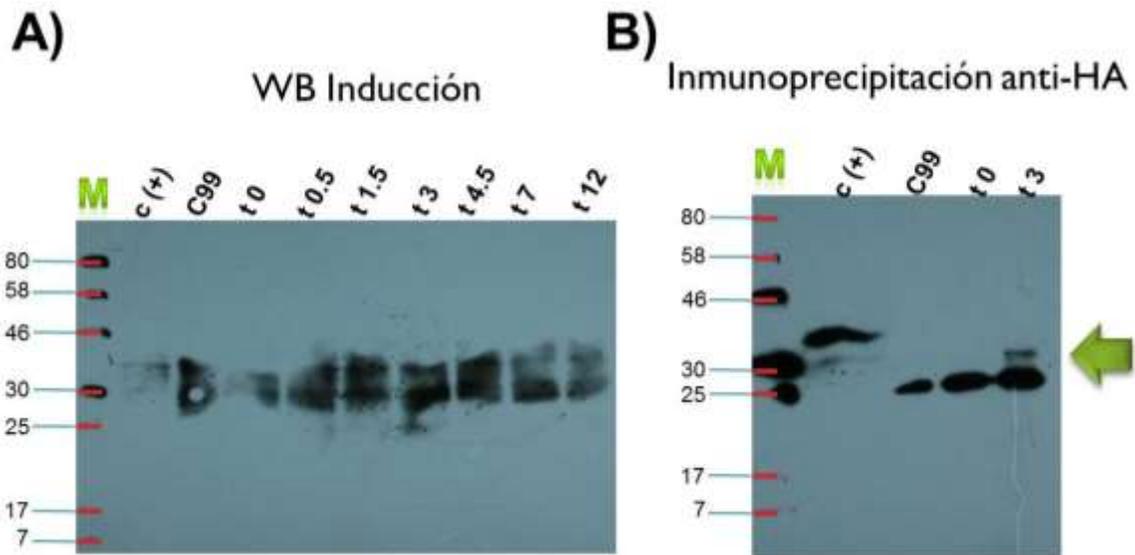


**Figura 25: Análisis de expresión de mRNA de I-SceI.** A) RNA de los tratamientos a diferentes tiempos con doxiciclina. B) PCR del cDNA obtenido. Para la amplificación se utilizaron los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_F1. Carril uno: marcador de 1 Kb (Fermentas,USA); carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carril tres: control positivo de amplificación (pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI); carril cuatro: el DNA genómico de C99 y; en el resto de los carriles: el cDNA obtenido por la inducción a diferentes tiempos con doxiciclina, en todos se obtuvo el fragmento esperado de 789-pb.

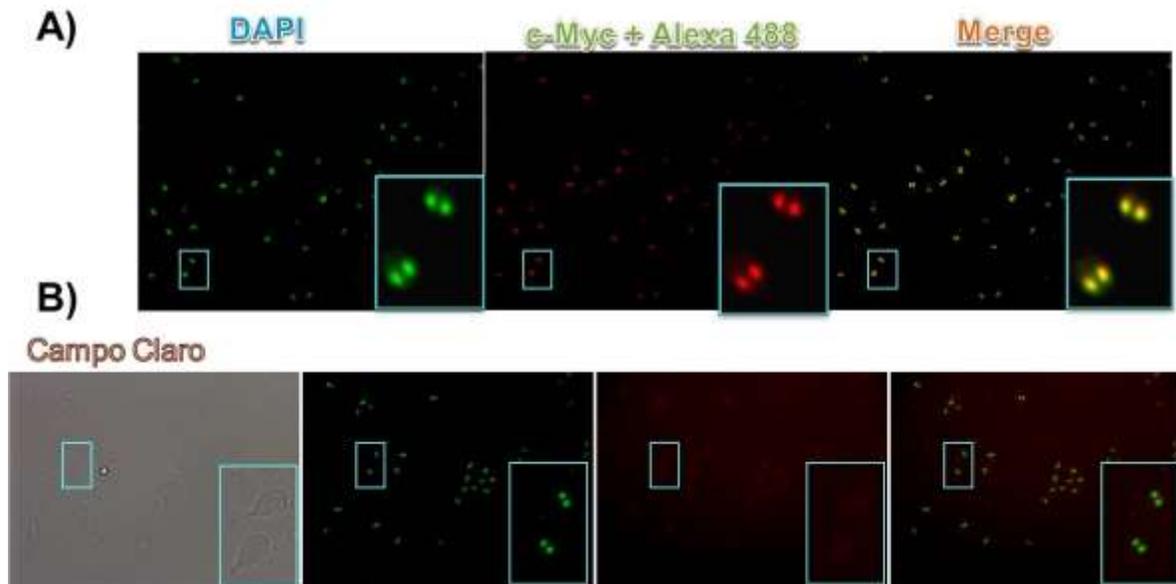
### 8.12 Expresión de I-SceI

La expresión de I-SceI se analizó mediante Western Blot con el extracto total de proteínas de los cultivos inducidos con doxiciclina 10 µg/mL a diferentes tiempos y por inmunoprecipitación con anti-HA. En la figura 26 se muestra el Western-Blot de las extracciones de los tratamientos a diferentes tiempos.

También se determinó la localización subcelular de I-SceI mediante inmunofluorescencia, en la figura 27 inciso A, se muestra la detección de I-SceI en el cultivo con inductor.



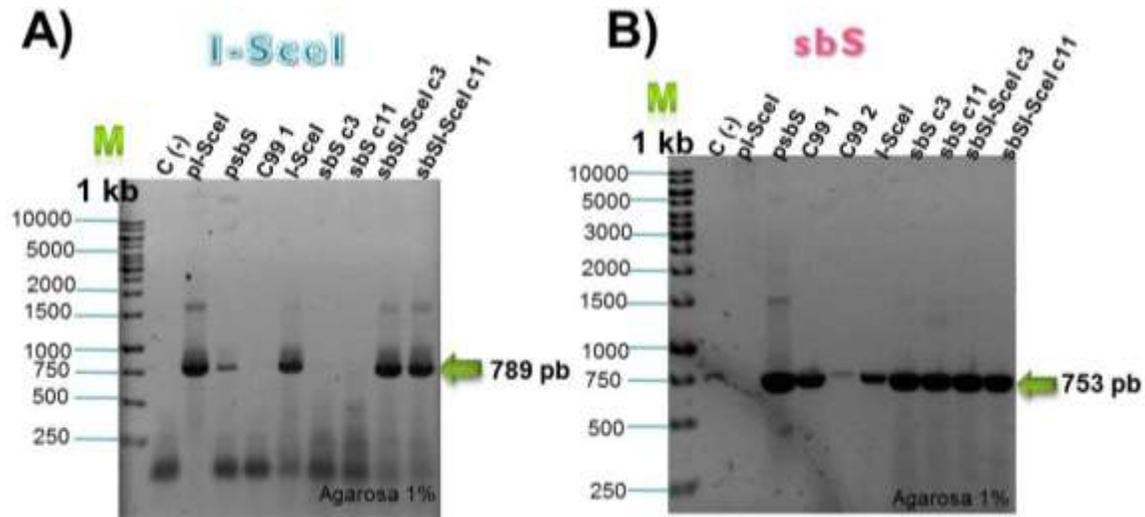
**Figura 26: Análisis de expresión de I-SceI** A) *Extracto de proteínas totales*. Carril uno: marcador de peso molecular (kDa); carril dos: un control positivo para el anticuerpo c-MYC; carril tres: el extracto de C99 y; en el resto de los carriles: los tratamientos con doxiciclina a diferentes tiempos en horas, se toma como t 0, un cultivo que no contiene doxiciclina. B) *Inmunoprecipitación con anti-HA*: Carril uno: marcador de peso molecular (kDa); carril dos: un control positivo para el anticuerpo anti-HA; carril tres: la inmunoprecipitación de C99; carril cuatro: el tiempo cero del tratamiento (sin doxiciclina) y; carril cinco: la inducción a tres horas, en la cual se observa una banda prometedora (indicada con flecha verde) en el tamaño esperado de 36 kDa.



**Figura 27: Inmunofluorescencia.** A) Columna uno: las células con DAPI en verde; columna dos: las células con c-Myc + Alexa 48, en rojo y; columna tres el Merge. B) Se muestran la misma laminilla días después para tomar el campo claro (columna uno) en el cual se observa la morfología de los trofozoítos, la cual no se alteró por la inducción o el ensayo.

### 8.13 Transfección de trofozoítos de *G. duodenalis* transgénicos sbS con pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.

Para concluir la construcción del sistema de expresión inducible y generador de DSB dirigido en el genoma de *G. duodenalis*, se transfectaron trofozoítos transgénicos sbS con el plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI. Después de la recuperación de los trofozoítos, se extrajo el DNA con buffer de extracción de isotiocianato de guanidinio para confirmar la presencia de I-SceI. Se realizó PCR de DNA total; el amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste fue teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 28 inciso A, se muestra la banda de tamaño esperado para I-SceI de 789-pb. También se corroboró la presencia del sbS mediante PCR, el amplicón se resolvió en un gel de agarosa, éste se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador, en el gel, figura 28 inciso B, se muestra la banda de tamaño esperado para sbS de 753-pb.



**Figura 28: PCR del transgénico transfectado con pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.** A) PCR de I-SceI con los oligos I-SceI\_F1 e I-SceI\_F1. B) PCR del sbS con los oligos SpACSvard\_F1 e iVSP\_R1\_SacI. Para ambos incisos, carril uno; marcador de 1 Kb (Fermentas, USA); carril dos: control negativo (mix de reacción sin templado); carril tres (pI-SceI): el plásmido pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI; carril cuatro (psbS): el plásmido pACSiVSPsbS; carril cinco (C99 1): el DNA genómico de C99 muestra 1 (en el inciso B se agregó C99 muestra 2 en el carril seis); carril seis (siete para el inciso B): el DNA total de trofozoítos I-SceI; carriles siete y ocho (ocho y nueve para el inciso B): el DNA genómico de trofozoítos sbS, clonas 3 y 11, respectivamente y; carriles nueve y diez (diez y once para el inciso B): el DNA total de trofozoítos sbS transfectados con pNlo\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI.

## 9 DISCUSIÓN

Debido a la relevancia clínica y evolutiva de *Giardia* es importante desarrollar sistemas que nos permitan estudiar principalmente los mecanismos que utiliza este organismo para mantener la estabilidad de su genoma.

Desde el 2011 nuestro grupo de trabajo ha establecido las condiciones de daño al DNA de *Giardia* mediante radiación ionizante [56] y ha estudiado proteínas involucradas en la reparación del DNA, enfocados particularmente en la reparación de DSB, por ejemplo: GdRad52, GdMre11 y GdRad50 (M. en C. Rosa María Martínez Miguel, manuscrito en preparación y [46]). El objetivo de este trabajo fue diseñar y construir un sistema inducible generador de DSB dirigido con la finalidad de estudiar procesos como el reclutamiento de complejos proteicos en el sitio de la lesión y el remodelado de la cromatina durante la reparación del DNA.

El uso de una meganucleasa como agente generador de DSB tiene múltiples ventajas, iniciando por su tamaño reducido (200 aa) y la longitud de su sitio blanco (>20 pb) cuya presencia dentro del genoma es altamente improbable con una frecuencia de corte de  $1/4^n$ , donde  $n$  = longitud del sitio blanco [21], en el caso de I-SceI para una secuencia de DNA al azar (contenido de GC del 50%) la probabilidad de ocurrencia del sitio es  $1.4 \times 10^{-11}$ , es decir, un sitio blanco en aproximadamente 20 veces el tamaño del genoma humano. I-SceI, potencialmente, permite la escisión de un genoma complejo en un solo sitio [54]. En el genoma de *Giardia*, que es de 12.3 Mb, no esperábamos encontrar el sitio blanco para I-SceI lo cual nos permitió elegir a conveniencia el locus para insertarlo, con lo cual tuvimos la ventaja de decidir la región de estudio.

Con respecto a la búsqueda de meganucleasas al utilizar solo un sitio de búsquedas y palabras dirigidas exclusivamente para meganucleasas y parásitos, presentó un sesgo, lo que evitó abarcar el número total de publicaciones existentes para meganucleasas, por ejemplo el estudio realizado en *Plasmodium falciparum* [30], en el cual para mejorar el entendimiento sobre cómo el parásito de la malaria repara DSBs y mantiene la integridad de sus genoma modificaron el sistema de la nucleasa I-SceI para generar DSBs sitio específicos e inducibles

dentro del genoma del parásito, no aparece como parte de los resultados que arrojó la búsqueda con los criterios de búsqueda utilizados. Su hallazgo fue de manera fortuita y se convirtió en una pieza importante para la conclusión de este trabajo.

Por otra parte, a pesar de que la búsqueda por alineamiento (BLAST) mostró coincidencias para el Sitio Blanco de I-SceI y que las meganucleasas pueden aceptar cambios en la secuencia de su sitio blanco, se decidió insertar en el genoma de *Giardia* una secuencia probada debido a que con cada cambio de nucleótido en la secuencia disminuye la eficiencia de corte [55].

El locus elegido se buscó primero en las VSP ya que en *Giardia* se han anotado más de 200 genes para VSP [40] y además a *Giardia* le permiten evadir el sistema inmune. En el laboratorio se crece en medio de cultivo por lo que la posible pérdida de un gen para una VSP debida a la resección durante el proceso de reparación no comprometería la viabilidad del parásito.

En la primer versión de pJiVSP, la amplificación se realizó con una Taq recombinante dado que cambios pequeños en la secuencia no afectarían el proceso, a menos que las mutaciones ocurrieran en los sitios de restricción elegidos sobre los cuales se diseñó el proceso, sin embargo ocurrió en la primera versión: los sitios *SpeI* y *NsiI* se encontraban mutados y las enzimas no linealizaron esa primera versión y los cambios fueron evidentes hasta que se tuvo la secuencia. Esto nos permitió obtener un control positivo para la segunda versión de pJiVSP (figura 6). Por eso, aunque la secuencia no fuera un gen en cual sea importante conservar la fidelidad de la secuencia, fue necesario amplificar el iVSP con una polimerasas de alta fidelidad.

La reacción de ligación de Gibson nos ofreció las ventajas de clonar en un solo paso 2 insertos: 2xNLS y 3xMYC y de agregar un mínimo de bases extras, y por lo tanto aminoácidos, a la secuencia de la meganucleasa para ligarla. En este caso solo se agregaron dos bases para conservar el marco de lectura que se tradujeron en una glicina. Diseñamos pNlop\_2xNLS\_3xMYC de manera tal que

permitiera la elección de las bases extra y por lo tanto que el aminoácido sea el adecuado para cada inserto.

Para la construcción de pNlop\_2xNLS\_3xMYC se cuidó que el plásmido (pNlop4\_3Myc\_PAK\_N/BamHI\_NcoI) y los insertos (2xNLS y 3xMYC) empleados en las ligaciones estuvieran en condiciones óptimas (libres de bases no deseadas y purificados) sin embargo la primera versión de pNlop\_2xNLS\_3xMYC, carente de 54 pb del oligo 2xNLS, nos muestra que en este sistema se debe tener más cuidado con el DNA que se utiliza para la ligación y con la secuencia, ya que se cerró posiblemente por los repetidos de las NLS los cuales nos causaron un gran problema (bajo número de clonas positivas) cuando ligamos a I-SceI.

Diversas hipótesis surgen para explicar la falta de una base en I-SceI en el vector pNlop\_2xNLS\_3xMYC\_I-SceI como que la enzima carece de fidelidad o que la expresión de I-SceI (debida a la fuga transcripcional natural del promotor) a *E. coli*, TOP-10 le resultara tóxica y mutara la secuencia. Antes de elegir corregir la secuencia por mutagénesis dirigida se buscaron más candidatas mediante PCR sin éxito. La baja cantidad de clonas positivas se debe a que pNlop\_2xNLS\_3xMYC/BstEII se linealiza entre las dos NLS, quedando extremos sobrelapantes capaces de hibridar (principio de la reacción de ligación de Gibson [17]), posiblemente en las condiciones utilizadas (relación vector:inserto) era más probable que pNlop\_2xNLS\_3xMYC/BstEII se cerrara consigo mismo a que se ligara el inserto. También se intentó, sin éxito, realizar la ligación utilizando 3 componentes: el plásmido  $\Delta$ pNlop\_2xNLS\_3xMYC/NcoI, el oligo 2xNLS y el inserto I-SceI (en teoría cumplen con los requisitos de la reacción de ligación de Gibson), el poco o nulo éxito en la ligación se debió una vez más a que las condiciones utilizadas (relación vector:inserto), posiblemente, no fueron las adecuadas. Por último, se decidió completar la secuencia porque solo tenía deleción de una base y aunque la mutación dirigida tiene sus propias limitación no están relacionadas con la que se nos presentaron durante la reacción de ligación de Gibson.

En cuanto a la expresión de I-SceI en *Giardia*, se sabe que *Trypanosoma brucei* [18] fue posible su expresión con un sistema inducible con tetraciclina y aunado a que en pCBASceI, adicional a la secuencia de la proteína, se encuentra una etiqueta HA y una NLS lo cual nos habla de la plasticidad de la proteína, sin embargo por inmunodetección no ha sido posible detectar la presencia de la proteína con seguridad; ya sea por la existencia de fondo a la altura esperada de la proteína, porque co-migra con una proteína intrínseca de *Giardia*, porque se está degradando o porque su expresión es tan baja (debido a que no tiene un uso de codones optimizado para el parásito o porque se está degradando) que no es posible detectarla con el reactivo de quimioluminiscencia estándar.

En *Giardia* ya se han reportado problemas para expresar proteínas, por ejemplo la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) cuya expresión se detectó por fluorescencia, sin embargo la expresión no fue uniforme y además la variabilidad en la fluorescencia detectada no fue estable; una posible explicación fue la diferencia en el número de copias del episoma [50].

A pesar de las dificultades para detectar la expresión de I-SceI, en *Giardia* fue posible obtener trofozoítos transgénicos sbS, trofozoítos I-SceI (transfectados con el vector de expresión de I-SceI) y en el primer intento trofozoítos transgénicos sbS transfectados con el vector de expresión de I-SceI viables. Contrario a *Plasmodium falciparum* en el cual, en el primer intento, no obtuvieron parásitos viables que llevaran ambos vectores [30], para lograrlo emplearon el sistema de expresión inducible que se basa en la fusión de un dominio de desestabilización (degradación) a la proteína de interés, en consecuencia regularon negativamente la actividad de I-SceI hasta crear parásitos estables transformados y para estabilizar la expresión y actividad de I-SceI agregaron al cultivo Shield1 (escudo para el dominio de degradación) lo cual les permitió generar un DSB sitio específico y analizar los productos de la reparación. Consideramos que la estrategia utilizada en *Plasmodium* [30] nos podría permitir observar por inmunodetección la expresión de I-SceI en *Giardia*.

## 10 CONCLUSIONES

- ✓ Se construyó el plásmido pACSiVSPsbS para integrar en el genoma el Sitio Blanco para I-SceI. Se obtuvieron trofozoítos transgénicos con el Sitio Blanco para I-SceI (sbS).
- ✓ Se construyó el plásmido genérico pNlop\_2xN\_3xMYC, el cual es útil para clonar cualquier gen al cual se deseen añadir NLS y etiqueta 3xMYC para monitorear su expresión.
- ✓ Se construyó el plásmido de expresión inducible pNlop\_2xN\_3xMYC\_I-SceI.
- ✓ Se construyó un sistema de expresión inducible capaz de generar DSB dirigido en el genoma de *G. duodenalis* a través de transfección de trofozoítos transgénicos sbS con el plásmido pNlop\_2xN\_3xMYC\_I-SceI.

## 11 PERSPECTIVAS

- Estandarizar las condiciones de expresión de I-SceI para generar DSB dirigido.
- Explorar la posibilidad de que se establezca I-SceI mediante inhibidores del proteasoma o mediante la edición de etiquetas para promover su estabilidad.
- Utilizar el sistema estandarizado para estudiar el remodelado de la cromatina durante el proceso de reparación del DNA.
- Utilizar el sistema estandarizado para estudiar el reclutamiento en el sitio de daño de proteínas involucradas en reparación del DNA.

## 12 REFERENCIAS

- [1] Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia* Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews*. 14, 3 (2001), 447–469.
- [2] Alsford, S., Kawahara, T., Glover, L. and Horn, D. Tagging a *T. brucei* RRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 144, 2 (2005), 142–148.
- [3] Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. and Svärd, S.G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature reviews. Microbiology*. 8, 6 (2010), 413–422.
- [4] Berghammer, H. and Auer, B. "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *BioTechniques*. 14, 4 (Apr. 1993), 524, 528.
- [5] Bernander, R., Palm, J.E.D. and Svärd, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*. 3, 1 (2001), 55–62.
- [6] Bos, JL, Heyting, C, Borst, P, Arnberg, AC, V.B. and EF. An insert in the single gene for the large ribosomal RNA in yeast mitochondrial DNA. *Nature*. 275, (1978), 336–338.
- [7] Buchel, L.A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J. and Gobert, J.G. 1987. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *The Journal of parasitology*. 73, 3 (1987), 487–493.
- [8] Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology*. 5, 7 (2003), 675–679.
- [9] Chevalier, B.S. and Stoddard, B.L. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic acids research*. 29, 18 (2001), 3757–3774.
- [10] Colleaux, L., d'Auriol, L., Betermier, M., Cottarel, G., Jacquier, A., Galibert, F. and Dujon, B. Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell*. 44, 4 (1986), 521–533.
- [11] Colleaux, L., D'Auriol, L., Galibert, F. and Dujon, B. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85, 16 (1988), 6022–6026.
- [12] Dujon, B. Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the omega and rib-1 loci. *Cell*. 20, 1 (1980), 185–197.
- [13] Erlandsen, S. L., Macechko, P. T., van Keulen, H. & Jarroll, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold

- labeling and high resolution field emission SEM. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, (1996), 416–429.
- [14] Farthing, M.J. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 24, 1 (1997), 79–88.
- [15] Faye, G., Dennebouy, N., Kujawa, C. and Jacq, C. Inserted sequence in the mitochondrial 23S ribosomal RNA gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 168, 1 (1979), 101–109.
- [16] Gerwig, G.J., van Kuik, J.A., Leeflang, B.R., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., Karr, C.D. and Jarroll, E.L. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology.* 12, 8 (2002), 499–505.
- [17] Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C. a, Smith, H.O., Iij, C.A.H. and America, N. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods.* 6, 5 (2009), 343–5.
- [18] Glover, L., Alford, S., Beattie, C. and Horn, D. Deletion of a *Trypanosome* telomere leads to loss of silencing and progressive loss of terminal DNA in the absence of cell cycle arrest. *Nucleic Acids Research.* 35, 3 (2007), 872–880.
- [19] Gourguechon, S. and Cande, W.Z. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell.* 10, 1 (2011), 142–145.
- [20] Gouy, M., Guindon, S. and Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution.* 27, 2 (2010), 221–4.
- [21] Hafez, M., Hausner, G. and Bonen, L. Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome.* 55, 8 (2012), 553–569.
- [22] Huang, D.B. and White, A. C. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics of North America.* 35, 2 (2006), 291–314.
- [23] Jacquier, A. and Dujon, B. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell.* 41, 2 (1985), 383–394.
- [24] Jarroll, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Coggins, J.R. and Erlandsen, S.L. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Molecular and biochemical parasitology.* 32, 2-3 (1989), 121–131.
- [25] Jerlström-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestedt, S., Hellman, U. and Svärd, S.G. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: Purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryotic Cell.* 11, 7 (2012), 864–873.
- [26] Jiménez-García, L.F., Zavala, G., Chávez-Munguía, B., Ramos-Godínez, M. del P., López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. de L., Montañez, C., Hehl, A.B., Argüello-García, R. and Ortega-Pierres, G. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal for*

- Parasitology*. 38, 11 (2008), 1297–1304.
- [27] Kabnick, K.S. and Peattie, D.A. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of cell science*. 95 ( Pt 3), (1990), 353–360.
- [28] Keeney, S. and Neale, M.J. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society transactions*. 34, Pt 4 (2006), 523–525.
- [29] Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77, 4 (1983), 487–8.
- [30] Kirkman, L.A., Lawrence, E.A. and Deitsch, K.W. Malaria parasites utilize both homologous recombination and alternative end joining pathways to maintain genome integrity. *Nucleic Acids Research*. 42, 1 (2014), 370–379.
- [31] Lane, S. and Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical reviews in microbiology*. 28, 2 (2002), 123–147.
- [32] Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P. Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell*. 22, 2 Pt 2 (1980), 333–348.
- [33] Macreadie, I.G., Scott, R.M., Zinn, A.R. and Butow, R.A. Transposition of an intron in yeast mitochondria requires a protein encoded by that intron. *Cell*. 41, 2 (1985), 395–402.
- [34] Morrison, H.G. et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science (New York, N.Y.)*. 317, 5846 (2007), 1921–1926.
- [35] Pâques, F. and Duchateau, P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Current gene therapy*. 7, 1 (2007), 49–66.
- [36] Pâques, F. and Haber, J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 63, 2 (1999), 349–404.
- [37] Pardo, B., Gómez-González, B. and Aguilera, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 66, 6 (2009), 1039–1056.
- [38] Plessis, A., Perrin, A., Habert, J.E. and Dujon, B. Site-Specific Recombination Determined by I-SceI, a Mitochondrial Group I Intron-Encoded Endonuclease Expressed in the Yeast Nucleus. *Genetics*. 130, (1992), 451–460.
- [39] Poxleitner, M.K., Carpenter, M.L., Mancuso, J.J., Wang, C.-J.R., Dawson, S.C. and Cande, W.Z. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science (New York, N.Y.)*. 319, 5869 (2008), 1530–1533.
- [40] Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V, Rivero, F.D., Saura, A.,

- Carranza, P.G. and Luján, H.D. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 456, 7223 (2008), 750–4.
- [41] Ramesh, M.A., Malik, S.B. and Logsdon, J.M. A phylogenomic inventory of meiotic genes: Evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*. 15, 2 (2005), 185–191.
- [42] Rich, T., Allen, R.L. and Wyllie, A.H. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature*. 407, 6805 (2000), 777–783.
- [43] Richardson, C., Moynahan, M.E. and Jasin, M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: Suppression of chromosomal translocations. *Genes and Development*. 12, 24 (1998), 3831–3842.
- [44] Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 10 (1998), 5858–5868.
- [45] Roger, A.J., Svärd, S.G., Tovar, J., Clark, C.G., Smith, M.W., Gillin, F.D. and Sogin, M.L. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 1 (1998), 229–234.
- [46] Sandoval-Cabrera, A., Zarzosa-Alvarez, A. L., Martínez-Miguel, R.M., Bermúdez-Cruz, R.M. Biochimie MR ( Mre11-Rad50 ) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. 111, (2015), 45–57.
- [47] Savioli, L., Smith, H. and Thompson, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends in Parasitology*. 22, 5 (2006), 203–208.
- [48] Shinohara, Akjra, Ogawa, T. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Elsevier Science Ltd*. 0968, Reviews (1995), 387–391.
- [49] Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P. and Pâques, F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current gene therapy*. 11, 1 (2011), 11–27.
- [50] Singer, S.M., Yee, J. and Nash, T.E. Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 92, 1 (1998), 59–69.
- [51] Stoddard, B.L. Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mobile DNA*. 5, 1 (2014), 7.
- [52] Sun, C.-H. and Tai, J.-H. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 105, 1 (2000), 51–60.
- [53] Takumi, K., Swart, A., Mank, T., Lasek-Nesselquist, E., Lebbad, M., Cacciò, S.M. and Sprong, H. Population-based analyses of *Giardia duodenalis* is consistent with the clonal assemblage structure. *Parasites & Vectors*. 5, 1

(2012), 168.

- [54] Thierry, a and Dujon, B. Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*. 20, 21 (1992), 5625–5631.
- [55] Thierry, A, Perrin, A, Boyer, J., Fairhead, C., Dujon, B., Frey, B. and Schmitz, G. Cleavage of yeast and bacteriophage T7 genomes at a single site using the rare cutter endonuclease I-Sce I. *Nucleic acids research*. 19, 1 (1991), 189–190.
- [56] Torres-Huerta, A.L., Martínez-Miguel, R.M., Bazán-Tejeda, M.L. and Bermúdez-Cruz, R.M Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*. 127, (2016), 173–186.
- [57] Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. and Lucocq, J.M. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 426, 6963 (2003), 172–176.
- [58] Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J. a and Osley, M.A. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 438, 7066 (2005), 379–383.
- [59] Tůmová, P., Hofšetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O. and Král, J. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma*. 116, 1 (2007), 65–78.
- [60] Vanni, I., Cacciò, S.M., van Lith, L., Lebbad, M., Svärd, S.G., Pozio, E. and Tosini, F. Detection of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6, 8 (2012), 1–9.
- [61] Wang, T.Y., Wang, L., Zhang, J.H. and Dong, W.H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and molecular research : GMR*. 10, 1 (2011), 519–525.
- [62] Yu, L.Z., Birky, C.W. and Adam, R.D. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryotic Cell*. 1, 2 (2002), 191–199.

## 13 APENDICE

### 13.1 Secuencia de los plásmidos

#### 13.1.1 pJiVSP

GCCCCGTCAGCCGAATTATATTATTTTTGCCAAATAATTTTTAACAAAAGCTCTGAAGTCTTCTTCATTTAAATCTTAGATGATACTTCAT  
CTGGAAAATGTCCCAATTAGTAGCATCACGCTGTGAGTAAGTCTAAACCATTTTTTATTGTTGTATTATCTCTAACTTACTACTCGAT  
GAGTTTTCCGGTATTATCTCTATTTTTAACTTGGAGCAGGTTCCATTTCATGTTTTTTTTCATCATAGTGAATAAAATCAACTGCTTTAACT  
TGTGCCTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAA  
GATATGGAATCAACACTACCGGGTCTATCGCGAACACTACTCTGCAATCTGCAATCTCGGCACAGGGCCAGAAGGAGGTGGATTGAGCCGA  
ATAGAAGTGGACTGTCTCAATGTGGATGTCATACTAGTGCACCTCGTGGCTCCGTTGCAATCTTGCAGGACCATCCAGTGGCAGCCAAAGC  
TGCCACAGTGCCTGGGACAGCAGCGCCAGTACGGTCCAGAGCTTCAATGGCCCATCAACGGCCACCAGCACTGCAAGGGCGACC  
CCTGCAGCTCTGCACAACATGCATCCAAGGCCGAGAGGCAGTGCACAGCAACGAGCGTCTCTCAGATGCGTCAGGAGCCCGTCCCAAGGAG  
TGTTGAGCCCAATACTGCTTGGTGTGACTGTGCTGCGTCTCATAAGGCACCTTCTGCAGCAGGGCTAGGATCCATAACTGCGTTCTCCATT  
TGAAAAGTCAAAGGGAGCAGGACCGCCGACGAGGACCGGCCCGGGACGGCTGGGGCGGCACGCTGTCTGCGGACCATCCCGGGC  
TGTTGCGGTGCACCTCAGGCGTGTGGACACAGCAGCAGCCAGGGCGCTCCGCGGTTGCCGCGCCGAGTCCGATGGTCCGGTGGTCTCCCG  
CGCTACCGCACCAGCAGCAGCGCCGAGCACTGGCCCCGCTCCCTGGCTGTCTCCGCGGGCCGCTCGCATTGGAGCAGGGGAGAGCCGGAGA  
TACTTTGTCCCGGGGCCGCTCTGGGGCGCCGCTGCCAGGTGGAGCTGTCTGGGACGCGTCTGAGCGTGTGATTCTGTTAACTTAACTACA  
CCCAGAAAAGCGTTGACTGCATCTGGCGCATTTCCGGCAGACCTTCTGCGCTGGTGTGCTGATGGGACGAGGGGGGCACTCATAGCC  
CTCCGGTGGGCGGATGGGATTACGCTGCTAGTCTGAGCTCATTTCTAGAAGATCTCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCG  
ATGTTCTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAGAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCCACCTCATCAGGAACCGTTGTAG  
GTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACACGAGCTAAATATCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCGCATTTTT  
TTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTTATTAATAATTTAAATTTTGAAGAAAAGTTCAGGGTTAATAGCATC  
CATTTTTGCTTTGCAAGTCTCAGCATTTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTTGTTAT  
CCGCTCACAATCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTCACATTAATTCGCTT  
GCGCTCAGTGCATTTGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTGCTGCGCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGGGTA  
TTGGGCGCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTCCGCGCAGCGGATCAGCTCACTCAAAGCGCGTAATA  
CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAACCGTAAAAGGCCGCGTGTCT  
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATACAAAATCGACGCTCAAGTCAAGTCAAGGTGGCAGAACCCGACAGGACTATAAAGAT  
ACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCCGGGA  
AGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGTCCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGT  
TCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA  
ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAGTAGAAGGACAGTATTTGGT  
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCGTGGTAGCGGTGGTTTTTT  
TGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAA  
ACTCACGTTAAGGATTTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAAGAGTTTTAAATCAATCTAA  
AGTATATAAGTAACCTGAGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAAGCAGCTTCTCAGCGATCTGCTATTTTCTCATCCATAGT  
TGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCAC  
CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATT  
AATTTGGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTGTTCGCGAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTC  
GTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT  
TCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCAGTTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCATGCCA  
TCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTTGGCCGGCGTC  
AATACGGGATAAATACCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATATTGAAAACGTTCTTCCGGGGGCAAACTCTCAAGGATCTTAC  
CGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTCCAGCGTTTTTGGGTGAGCAAAA  
ACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCAT  
TTATCAGGTTTATGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAG  
TGCCACCTGACGCTAAGAAACCATATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAGGAGCC

#### 13.1.2 pJiVSPsbS

GCCCCGTCAGCCGAATTATATTATTTTTGCCAAATAATTTTTAACAAAAGCTCTGAAGTCTTCTTCATTTAAATCTTAGATGATACTTCAT  
CTGGAAAATGTCCCAATTAGTAGCATCACGCTGTGAGTAAGTCTAAACCATTTTTTATTGTTGTATTATCTCTAACTTACTACTCGAT  
GAGTTTTCCGGTATTATCTCTATTTTTAACTTGGAGCAGGTTCCATTTCATGTTTTTTTTCATCATAGTGAATAAAATCAACTGCTTTAACT  
TGTGCCTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAA  
GATATGGAATCAACACTACCGGGTCTATCGCGAACACTACTCTGCAATCTGCAATCTCGGCACAGGGCCAGAAGGAGGTGGATTGAGCCGA  
ATAGAAGTGGACTGTCTCAATGTGGATGTCATACTAGTAAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATGCATCCAAGGCCGAGAGGCAGTGCACAG  
CAACGAGCGTCTCTCAGATGCGTCAGGAGCCCGTCCCAAGGAGTGTTCAGCCCCAATACTGCTTGGTGTGACTGTGCTGCGTCTCATAAGGC  
ACCTTCTGCAGGAGGCTAGGATCCATAACTGCGTTCTCCATTGTAAGTCAAAGGGAGCAGGACCGCCGACGAGGAGCCGCGCCCGG  
GGACGGCTGAGGGCGCACGCTGTCTGCGGACCATCCCGGGCTGTTGCGGTGCACTCCAGGCGTGTGGACACAGCAGCAGCCAGGGCGCT  
CCGCGGTTGCGCGGCCGAGTCCGATGGTCCGGTGGTCTCCCGCGCTACCGCACCAGCAGCAGGCGGAGCACTGGCCCCGCTCCCTGGCTC  
TGTCGCGGGCCGCTCGCATTGGAGCAGGGGACAGCCGGAGATACTTTGTCGCCCGGGCCGCTCTGCGGGCGCCGCTGCCAGGTGGAGC

CTGTCTGGGACGCGTCTAGCGTGTGATCTGTAACTACACCCAGAAAAGCGTTGACTGCATCTGGCGCATTTCCGGCAGACCTCTCT  
GCGCCTGGTGTCTGCTCAATGGGACGAGGGGGGCACTCATAGCCCTCCGGTGGGCGGATGGGATTACGCCTGCCTAGTCTGAGCTCATCTTT  
CTAGAAGATCTCTTACAATATCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATCTCTCTTTATTTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAGCT  
ATATTAAGAACTATGCTAACCACTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGTTCCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAA  
ATATTTCAATATGTTCTCTTACCAACTTTATTTCTGCATTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTA  
TTAAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCT  
TTTGACATGTTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTTCCACACATATATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG  
CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTCGCTTGCCTCACTGCCAATTTGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCAGCTG  
CATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGATTTGGGCGCTCTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGT  
TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA  
AAGGCCAGAAAAGGCCAGAACCGTAAAAGGCCGCTGTCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGA  
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCGTTCCGAC  
CCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT  
AGGTCTTTCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCAAC  
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGATTCTTGAA  
GTGGTGGCCTAACACGGCTACACTAGAAGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGGAGTTGGTAGCT  
CTTGATCCGGCAAACAAACACCCTGTTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT  
CCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCAGTTAAGGGATTTTGGTGTGATGAGATTATCAAAAAGGATCTTAC  
CTAGATCTTTTAAATTTAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG  
AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTACATAGTTAGTTAGTTCAGCCCGTGTGTAGATAACTACGAGGAGGGCTTACCA  
TCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG  
CAGAAGTGGTCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTGTGCGCAGTTAATAGTTTGC  
GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCCA  
GTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACT  
CATGGTTTGGCAGCACTGATAAATCTCTTACTGTCAAGCAATCCCTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTACTCAACCAAGTCAATCT  
GAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTTTCGCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATC  
ATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATC  
TTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAAT  
GTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG  
AAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCACCTGACGCTTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAA  
AAATAGCGGTATCACGAGGCC

### 13.1.3 pACSiVSPsbS

GTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC  
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCT  
TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACGGATCTCA  
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTTATCC  
CGTATTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCT  
TACGGATTGGCATGACAGTAAAGAAATTAAGAGTGTGCTGCATTAACCTAGAGTATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCCGAG  
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGTGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
AACGACGAGCGTGACACCAGATGCTGTAGCAATGGCAACAAGTGGCGAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTCCCTCAGTGAATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGCAAGGTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAAC  
GTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTG  
CAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGC  
GCAGATACCAAACTACTGCTCTTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCCTCAAGAATCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAA  
TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCG  
GGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGTACCTACAGCGTGTGAGTATGAGAAAGCGC  
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACG  
CCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCGACTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGAAAA  
AACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTCTGCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGA  
TAACCGTATTACCCTTTGAGTGTGATACCGCTCGCCGACCGCAACGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGCGGAGAGC  
GCCCAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGGCTTGGCCGATTCATTAATGACGCTGGCAGCAGAGGTTTCCCGACTGAAAAGCGGCGAGTGAG  
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTTGTGAG  
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGAAACAAAAGCTGGGTACCA  
GCTGATCGGCGCCGGGATGGGGTCTGGGGCAGATAGCCGTTGGAACGGACAGCGACTTCCGCATCGTCAAGCAGCCCGCTCAACCCGGA  
AAAGGTAATATTTCACTTACGCCCTCACTGAGGGCACCGGCTTGGGGTCAATGACCAGGTCGCGCGGCTCTTCCGGCACTCGACGCTCGG  
CGGTGACGCTGAAGCCGCTGTGAGAAGGGGAGGTTTCGCGGGCGGAGGTTCTCCAGAAAGCGGCGCACCCCGCGCTCGGCGCC  
TCCACTCCGGGGAGCAGCAGCGGCTGCCAGACCCTTGCCTGGTGGTGGGCGAGACGCGGAGGTTGGCCAGGAACACGCGGGCTCCTT  
GGGCGGTGCGGCGCCAGGAGCCCTTCCATCTGTTGCTGCGCGGCCAGCCGGAAACCGCTCAACTCGGCCATGCGCGGGCCGATCTCGGCGA  
ACACCGCCCCGCTTCAGCGCTCTCCGGCGTGGTCCAGACCGCCACCGCGCGCGCTCGTCCGCGACCCACACCTTGGCGATGTCGAGCCG  
ACGCGCGTGAAGAGGTTCTTGCAGCTCGGTGACCCGCTCGATGTGGCGGTCGGGTTCGACGGTGTGGCGGTTGGCGGGTGTGCGGCGA

CGCGGCGGCGAGGGTGCGTACGGCCCGGGGACGTCGTGCGGGGTGGCGAGGCGCACCGTGGGCTTGTACTCGGTGCCATGGATTTAAAA  
TCTGGGCGCCTGTAATTAAGGCGTATTGTGGTCAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATGCATCCAAGGCCGAGAGGCGAGTGCACAGCA  
ACGAGCGTCTCAGATGGCGTACGAGCCCGTCCCAAGGAGTTGTACGCCCAATACTGCTTGGTGTGACTGTGCTCATAAGCCAC  
CTTCTGCAGCAGGCTAGGATCCATAAATCGGTTCTCCATTTGAAAAGTCAAAGGGAGCAGGACCGCCGCCAGAGGACCGCCCGGG  
ACGGCTGGGGCGGCACGCTGTCTGCGGACCCATCCCGGGCTGTTGCGGTGCACTCCAGGCGTGTGGACACAGCAGCAGCCAGGGCGCTCC  
GCCGGTTGCCGCGCCGAGTGCATGGTCCGGTGGTCTCCCGGCGCTACCGCACAGCAGGCGGAGCACTGGCCCCGTCCCTGGCTGTG  
TCCGCGGGCGCTCGCATGGAGCAGGGGCAGAGCCGGAGATACTTTGTCCCCGGGGCCCGTCTCTGGGCGCGCTGCCAGGTGGAGCCT  
GTCTGGGACGCGTGTAGCGTGTGATTCGTAACTACACCCAGAAAAGCGTTGACTGCATCTGGCGCATTTCCGGCAGACCTCTTCTGC  
GCCGTGGTGTCTCGATGGGACGAGGGGGCACATAGCCCTCCGGTGGGCGGATGGGATTACGCCTGCCTAGTTCTGAGCTCCAATTCG  
CCTATAGTGAGTCGATTACGCGCGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCT  
GCAGCACATCCCCCTTTCCGCGAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGCGCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG  
GGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTACCCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTC  
CTTTCGCTTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGT  
GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTATTAGGGTGTGGTGTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC  
GTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATCTTTTATTGATTATAAGGGA  
TTTTGCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTAACAAAATATTACGCTTACAATTTAG

### 13.1.4 pNlop4\_3Myc\_PAK\_N

GTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC  
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCAATTTGCCT  
TCCTGTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAATGGATCTCA  
ACAGCGGTAAGATCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACTTTTCCAATGATAGCACATTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCC  
CGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG  
GACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCCCTGATCGGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCA  
AACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAAGTGGCGAAGTACTTACTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTGCAGGACACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGCGCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGGTGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC  
GTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG  
CAACAACAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGACAGC  
GCAGATACCAAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGATAGTACGCCACCACTTCAAGAACCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAA  
TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTG  
GGCTGACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGC  
CACCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCCGTAAAGCGGAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGAGGCTCCAGGGGAAACG  
CCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGACCTCTGACTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA  
AACCGCAGCAACGCGCCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGTGCTGACATGTTCTTCCCTGCTTATCCCTGATTTCTGTGGA  
TAACCGTATTACCCGCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGCGAAGCAGCAGCGAGCGAGTGAAGCGGAAAGCGGAAAGC  
GCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAG  
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTTGGAAATTTGAG  
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGAAACAAAAGCTGGGTACCG  
CTAGCAAGTCTAAAATAAATAAATCGAAATTAAGTCTTCTAGTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGTCCCTATAGCTGATAG  
AGACTAGGAAGCTTTCCATGGCATCAATGCAGAACTCTCCGAGGAGTCTGCTGCGTAGTGAAGAACAACAACTTATAAGTGAAGAA  
GATTTATTGAGGTGAGAGGAACAGAAATTAATTTAGAAAGAGGACCTTTATCCGGAATGTTCAAGAAGAAGAACAAGAAGATGCGTTTAA  
CGAACAGATCGAAAGCAGCTCCATCTCCAGCCCTTTGATCTTAAAGCGGGGATAAGTGTGCGGTACGATCCCGAGCGGGAAAGTTCACGTG  
GCTTACCGGAGGAGTGGCAAAAGCTGGGGCTTATCCAGAGTCTATGATAAGTACTATCACAGATATGGCCAACGCGAGCTCCTAGCTTAGAG  
GACGGTGGGAACGGTGACAAACCTCTCATTAAATATCTAGCCAGTCTATTGACAAGCAGATAGACTTTACACCGGTAACATAGTCTCCTC  
CTTCTTGGCCACAACGCTACTCTAGACTCTCTACCATATAGATCAGATGGACATTTCTACAGACGCGTGAACCCGACGCTTCCCTAGCA  
AGAAGCTGCTGCGCAGCTCCAAACGCAAAAACCTTCTCATCAGTAGACCCACCGGCTTTACACACAAGAATCACGTGACCGTAGATCTACT  
AATGCAACAAGGTACATTTGGTCTGCCGAAGGAGTGGGAGGCGAAGCTGGAGGCGTGGGGTTGGATATCCAGAAAATAGGGCAGAAACAGGA  
CGATCTGGACGCTCTCTGCGCAATCATGGATAACTTTTTATGATGATAAGATACCCATAAAACAGATGATCAGGATTTTATGATCCAGGCAT  
TTGATGGAACGGACAAGTATGAGTCCCAAGTTCACAGCCTCCCAAGCAGACACATATAATGACATTTCTCGAGAAGCTCCACGACAAC  
TTCACAGAAGTTAATAACAATTCAGATGTCTATAGCAATCCACAGGAGTCCGGCAGCGGTCGTCGCGGATGCTATCGCCACAGAGAT  
AAAGACTGGCAATGTCTGTTGCCATAAAATCTATATCTGCAATAAATTTCTTACAGACGATGGAAAGAAAGGTCGCTGACATAAAATCCGCG  
AAGCTGCGCACTCATGGCTCTGAAGAATGAAGTAGCCCTCATGTATCTTTCAAAGAGTGGAGTACATAGTAAAGCTCCACAAAAGTATAC  
TTTTCCAAGGCAGCAAGGAGTTTTATATGATTATGGATTACTGCAACGCTAACTGTCTGACCAACATCTTGTCCAGGACGGATACATAAA  
GAACGAGCGTGTCTCCTGTATGATTATTCGTGACATTTCAAAGCCCTGAACATTTACACGAGAACCATAGAATTTACCGGGATCTGAAGT  
CTGACAATGCTCTTCAAACGCTGAGCTCATCAACAGCTTAGCCACAGGCGGGCCATAACAAGAAGAAGAAGTTTTTCGCTAAAGCTGTCT  
GACTTTGGCTTTGAGTGAAGTGAATACGAAGCAGCTAGCCCAAGTCTGTGGTAGGCATCCATTTTGGTAGGCATCCATTTTGGTAGGCATC  
CGGCACAGAATACAACACAAAGGTAGATTGCTGGTCACTGGGAATTTGTTGTGCTGGAGCTTTGCGAGTCTCTTCCCCGCACATGGAGATGC  
AGCCACTCAAGGCTGTTTTCAAATTTGTCACCAGCCCTGCTCCAGCTTCAAGAAGCCATCGCAGTGGACACCAGAGCTCAACGACTTTTTG  
GCCAGGTGCTCGATAAGGACCTGATAGTAGATGGAGCTGTGCCAGCTCCTTGAGCATCCATGGATTAAGAGTGTGGACAACGCCCCCTT  
GGATTTAAGTGATTACTTCTAGGATCCTGAATCGAATTTTCCGTCGACCTTTGCATCATCGTTGCTCGGTGCTGCTCGCTTACGAC

CTGCTTGTTCCTGGCCCTCAATGGTTAGTGGTTTTCTCTTCCAACGGCGTTGGTCCATCCTCTGCAGGTAGTAAATGCGCTATCTTTCGG  
GCTAAGAAAAATAAATCGGTGGATGGCGGGGACCAGCTTATCTCTCCACTGCGCTACACCGGCATAAATCCACTGCAACTGACTTTCT  
GGGATAGCTATAAGCCGACCGTGTATGAAGACGGCGCTTCTTAGCGGTTTCGTTACATCGATACCGCTCGACAGCTCAATTTAGG  
CTTCAAAAAATACCGCAAAAAATGGCAATTCGGTTTTAAAAACATGGATCATCACCATCACCATCCTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTG  
ATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTAC  
ATTGTATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCCTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGACCATACTCAGTTTTGCCCCTTAG  
AAGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTA  
GGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAGGTTTTCTACTAGAGAAATGCATTATA  
TGCACTCAGCGCTGTGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAAGTCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAAGAAAGGAAACACCTACTA  
CTGATAGTATGCCGCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCCGGCCTTGAATTGATC  
ATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCTTAACTCGAGTGAGGGCTGAAGTGAATATTTACCTTTTCCGGGTTGACGG  
GCGTGCTTGACGATGCGGAAGTCCGCTGTCCGTTCCAACGGCTATCTGCCCCAGACCCCCATCCCGGCCCGATCAGGGGGTGGGCGAAGAA  
CTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCTCCCGGAAAACGATTCGGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGCGGGCGGTGG  
AATCGAAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGCGGTGCTTGGTTCGCTATTTCGAAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGGGAT  
AGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCATTAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCGCCAAAGCTTTCAGCAATATCA  
CGGGTAGCCAACGCTATGCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGAT  
ATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGAGTACGACGAGATCCTCGCGTCCGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGA  
GCCCTGATGCTCTTCGTCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGG  
TCGAATGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGACCAAGGTGAGATGA  
CAGGAGATCCTGCCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCCAGTGCAGTGCAGCACAGCTGCCGAAGGAACGCCCG  
TCGTGGCCAGCCAGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGCAGTTCATTAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCC  
TGCGGTGACAGCCGGAACAGGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGTGTCGCCAGTATAGCCGAATAGCCTTCCACCCAAAGCGGCCG  
AGAACCCTCGGTGCAATCCATCTTGTTCATCATCGAAACGATCCTCCTACTGCTCTTGATCAGATCGAAGCTGATGGGTGAGACATGC  
TACTCTCGGTTCCGCGTTAAAGTTTTAATTTTCGATTTAATTTTATTTTACGGCTATCAGCTCCTTGACAACCTTTTCTGTAACCTGGCAAT  
ATAAATAATAATCTGAAATCGAAGCATCTCGCCAAACCCAGTGGGACAGAACATCAGATGAAGTAAAGCCCGGTGGATAGCATCT  
GTCATTGAAGCGGCTCAGACGGCGCACTTCTATATCATTTGCCAGCCGGCCCTTGTGTGTTGTGTTGAGGGGGCGGACGATGATAGCAC  
AGTGAAGGCTCGCTGGGATCTCCCATGTCTGTTTCATCGAAAGCGGCTCCACGCTAATTTATGATACATATTTTCGTTCCGTTGCAAC  
GGAAGTACCACCTGCCCGCGATCACCTGTGGACTGCACAAACATCCCTTACAATGCAGATATCGAGTCTCTGCTGCAACTGCGGCATCTT  
GCTGCTAAGAAGTCCATCGTCCAACGCACCAACACCAGCAGAAGACCAGCAGGCACAGCAACCCGGGCTGTTCCGGGCTCACACGGTC  
ACGGAACCCATAACAGAGTTAGACTCCTGTCCATTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGCAT  
TACGCGCGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATACCCCTTT  
CGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCG  
GCGATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCGTTTCTTCCCT  
TCCTTTCTCGCCAGTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAATTCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA  
CCCCAAAAAATGATTAGGTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT  
TTAATAGTGACTCTGTTCCAAACCTGGAAACAACACTCAACCTATCTGGATCTATTCTTTTGATTTAAGGGGATTTGCGGATTTGCGCC  
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAAAATTAACGCTTACAATTTAG

### 13.1.5 $\Delta pNlop$ 2xNLS\_3xMYC

GTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC  
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTATFCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCCT  
TCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCA  
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCC  
CGTATTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCAGGATCAGCAAGAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATTAAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG  
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGTGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
AACGACGAGCGTGACACCAGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAACCTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC  
GTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG  
CAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACGAGC  
GCAGATACCAAACTACTGCTCTTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCGCTGCTAA  
TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCCGGATAAGCGCAGCGGCTCG  
GGCTGAACGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACGAGATACCTACAGCGTGGCTATGAGAAAGCGC  
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACG  
CCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCCACTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTACGGGGGGCGGAGCCTATGAAAA  
AACGCCAGCAACCGGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTGCTGCTTTTCCCTGCTTATCCCTGATTTCTGTGGA  
TAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGTGTGATACCGCTCGCCGACCGGAACCGGAGCGCAGCGAGTCAAGGAGCGGAAGGAAAGC  
GCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGGTTGGCCGATTATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAG  
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTTGTGAG  
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCG  
CTAGCAAGATCTAAAATAAATTAATCGAAATTAACCTTAAAGATCTCTAGTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGTCCCTATCAGTGATAG

AGACTAGGAAGCTTCCATGGCATCAATGCAGAAGCTGATCTCGGAGGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACAAAACCTATAAGTGAAGAA  
GATTTATTGAGGTGAGGAAACAGAAATTAATTCAGAAGAGGACCTTTTATGAGGATCCTGAATCGAATCTTTCCGTCGACCTTTGCATC  
ATCGTTGCTCGGTCGCTGCCTCGTTTACGACCTGCTTTTCCCTGGCCCTCAATGGTTAGTGGTTTCCCTTCTTCCAACGGCCTTGGTCCAT  
CCTCTGCAGGTAGTAAATCGCTATCTTTCCGGCTAAGAAAATAAATCCGTGGATGGCGGCGGACCGACTCTTATCTCTCCACTGCGCTAC  
ACCGGCATAACTCCACTTGAACCTGACTTTCTGGGGATAAGCTATAAGGCGCAGCGTGATGAAGACGGCGCTCTTCTAGCGGTTGCTTACAT  
CGATACCGTCGACCTCGACAGCTCAATTTGAGCTTCAAAAAATACCGCAAAAAATGGCAATTCGGTTTTAAAAACATGGATCATCACCATC  
ACCATCACTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGAATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTA  
CTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCTTAGCCATTGAGATGTT  
AGTAGGCCACCATACTCACTTTTCCCTTTAGAAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTATAGATGCTTAC  
TAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAAATCAATTAGCCTTTTTATGC  
CAACAAGGTTTTTACTAGAGAATGCATTTATATGCACTCAGCGCTGTGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATGGAAGATCAAGAGCATCA  
AGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACTACTACTGATAGTATGCGCCATTTATACGACAAGCTATCGAATTTATTTGATCACCAGGTGCAG  
AGCCAGCCTTCTTATTCGGCTTGAATTTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGCTTAACTCGAGTGAGGGCTG  
AAGTGAATATTTACCTTTCCGGGTTTCGACGGGCTGCTTACGATGCGGAAGTTCGCTGTCGGTCCAACGGCTATCTGCCACAGGACCCCT  
ATCCCGCCCGATCAGGGGTTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCTCCCGGAAAAACGATTCC  
GAAGCCAACTTTATAGAAGGCGGCTGGAATCGAAATCTCGTATGGCAGGTTGGGCGTCTGTTGGTGGTCAATTCGAACCCAGAG  
TCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAG  
CCCATTCCGCGCAAGCTCTTACGCAATATACAGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCGCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATG  
AATCCAGAAAAGCGCCATTTCCACCATGATTTCCGCAAGCAGGCTCCGCATGAGTCACGACGAGATCCTCGCCCTCGGGCATGCGCGC  
CTTGAGCCTGGCGAACACTTCGGCTGGCGGAGCCCTTCTCGATCCTCGATCAGCAAGAGCCGCTTCCATCGCAAGAGCTTCCATCGGATAC  
GTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTCGCTTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCATTTGCATCAGCCATGATG  
GATACTTTCTCGGAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGACTTCGCCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGTAC  
AACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCCGCTGCGGCGAGCCAGTACGCGCGCTGCTTCTGCTTCAAGTTCATTAGGGCACCGGACA  
GGTCGGCTTGTACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACGCGCGGAACCGGGCGCATCAGAGCAGCCGATTTGCTGTTGTGCCAGTCA  
TAGCCAAATAGCCCTCCACCCAAAGCGGCGGAGAACCTGCTGCAATCCATCTGTTCAATCATGCGAAACAGTCCCTACTCAGTCCGCTTG  
ATCAGATCTGAAGCTGATTTGGGTGAGACATGCTACTCTCGGTTCTCGGTTAAAGTTTTAATTTTCGATTTAATTTATTTTACGGCTATCACC  
TCCTTGACAACCTTTTCTGTAACGTTGGCAATATAAATATAAATCTTGAATCCAAGGCATCTCGCCAAACCCAGCTGGGACAGAACATCAGA  
TGAAGGTAAGACCCCGCTGGATAGCATCTGTCATTGAAGCGGCTCAGACGCGCCTTCTATATCATTGCCAGCCGGGCTCTTGTG  
TTTGTGTTGAGGGGGCGGACGATGATAGCACAGTGAAGGTCCTCGTGGGATCTCCCATGCTGTTTCATGCGAAAGCGGCTCCCACGCTAA  
TTATTGTATACATTTTCGTTCTGTTGCAACGGAAGTACCACCTGCCCCGATCACCTGTGGACTGCACAAACATCCCTTACAATGCAG  
ATATCGAGTCTCTGCAACTGCGGCATCTTGTCTGCTAAGAAGGTCCATCTGCAACGCAACAAACAGCAGAAAGACAGCAGGACGCAAG  
CAAACCGCGGCTGTTCCGCGCTCACACGGTACGGAACCCCTATAACAGAGTTAGACTCCTGTCCATTTCTAGAGCGCCGCCACCGCGGT  
GGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAAGTCTATTACGCGGCTCAGTGGCGCTGTTTTACAACGCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGCGTTACC  
CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCCGCGAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGCGCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG  
CCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGTTGTTGGTACGCGCAGCGTACCCTGACCTTGGCAGCG  
CCCTAGCGCCGCTCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCCCTTCTCGCCACGCTFCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTA  
GGGTTCCGATTTAGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT  
TTTTGCCCTTTGAGCTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTTCTT  
TTGATTTATAAGGATTTTGCAGTTTCCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAAATATTA  
ACGCTTACAATTTAG

### 13.1.6 pNlop 2xNLS\_3xMYC

GTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC  
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGATGAGTATTCACATTTCCGCTGCGCCCTATTCCTTTTTTTCGGGATTTTGCCT  
TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCA  
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGGCTATTTACC  
CGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCAAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATTAAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG  
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCTTGAATCGGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
AACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGAAGCTGGGCTCGCGGATCATTTGAGCACTGGGCGCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCAGTATTAAGCATTTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATA  
TACTTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA  
GTGAGTTTTTCGTTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCGCGCTAATCTGCTGGT  
CAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGAGC  
GCAGATACCAAACTAGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACCTGTAGCAGCCCTACATACTCGCTCTGTATA  
TCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCG  
GGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAATGAGAAAGCGC  
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGCAGGAGGACTTCCAGGGGAAACG  
CCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA  
AACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTCAGATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGA  
TAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGACCGAAGCAGCGAGCGAGTCAAGTGAAGGAGGAGCGGAAAGGAGC  
GCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGGCTTGGCCGATTCTAATGACAGTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGA

CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAAATTTGTGAG  
CGGATAACAAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCCGCGCAATTAACCCCTACTAAAGGGAAACAAAAGCTGGGTACCG  
CTAGCAAGATCTAAAATAAATTAATCGAAATTAACACTTTAAGATCTCCGTAGCTTATCAGTGATAGAGACTAGTCCCTATCAGTGATAG  
AGACTAGGAAGCTTTCCATGGGACCCAAAGAAAGAGGAAAGTGGGGGTGACCCCAAGAAAGAGAGGAAAGTGGCATCAATGCAGAAGCTG  
ATCTCGGAGGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACAACAACTTATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTCAGAGGAACAGAAATTAATTTGAGA  
AGAGGACCTTTTATGAGGATCCTGAATCGAATCTTCCGTCGACCTTTGCATCATCGTTGCTCGGTCGCTCGCTCGTTTACGACCTGCTT  
GTTCTGGGCTCAATGGTTAGTGGTTTTCTTCTTCCAACGGCGTTGGTCCATCCTCTGCAGGTAGTAAATGCGCTATCTTTTGGGCTAAG  
AAAATAAATCGGTGGATGGCGGGGACCGACTCTTATCTTCCACTGCGCTACACGGCATAACTCCACTTGAACCTGACTTTCTGGGGAT  
AAGCTATAAGGCGCAGCGTGATGAAGACGGCGCTCTTCTAGCGTTCGTTACATCGATACCGCTCGACCTCGACAGCTCAATTTGAGCTCAA  
AAAATACCGCCAAAAATGGCAATTCGGTTTTAAAAACATGGATCATCACCATCACCATCACTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAAC  
AGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACACCCGTAACCTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCTACATTGTA  
TTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGGCCTTTAGAAGGGG  
AAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACA  
CGGCTACAGAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTATGCCAAACAAGGTTTTTCTACTAGAGAATGCATTATATGCATG  
CAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGATCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATA  
GTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTAATTTGATCACAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCCGGCTTGAATTTGATCATATGC  
GGATTAGAAAAACAACTTAATGTGAAAGTGGGTCTTAACTCGAGTGAGGGCTGAAGTGAATATTTACCTTTTCCGGGTTTCGACGGCGTGC  
TTGACGATGCGGAAGTCTGCTGCTCCGTTCCAACGGCTATCTGCCCCAGGACCCCATCCCGGCGCGATCAGGGGGTGGGCGAAGAATCCAG  
CATGAGATCCCCCGCTGGAGATCATCCAGCCGGCTCCCGGAAAACGATCCGAAGCCCACTTTTATAGAAGCGGGCGGTGGAATCGA  
AATCTCGTATGGCAGGTTGGGCTCGTTCGTTGCTTTCGAACCCAGATCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAAGGCGGATAGAAGG  
CGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGACGCCATTCGCGCCAAAGCTCTTACGCAATATCACGGGTA  
GCCAACGCTATGCTGTATAGCGGTCCGCCACACCCAGCGGGCCAGTGCATGAATCCAGAAAAGCGGGCATTTCACCATGATATTGCG  
CAAGCAGGCTCGCCATGAGTCACGACGAGATCCTCGCGTCCGGCATGCGCGCTTGAAGCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGGAGCCCT  
GATGCTCTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCCGAA  
GGCAGGTAGCCGATCAAGCTATGACGCCCGCATGTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAG  
ATCCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGTCAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTG  
CCAGCCAGATAGCCGCTGCTCGCT  
GACAGCCGAACCGCGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
TGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCTACTGTCTCTTGTATGATCATGAAAGTGAATGGGTGAGATGCTACTCT  
CGTTCTGGGTTAAAGTTTTAATTCGATTTAATTTATTTTACCGCTATCACTCTTGACAACCTTTTCTGTAACGTTGCAATATAAAC  
TATAATCTTGAATCCAAGCATCTCGCCAAACCCAGCTGGGACAGAACATCAGATGAAGGTAAGAACCCCGCTGGATAGCATCTGTCT  
GAAGCGGCTCAGACGGCGCACTTCTATATCATTTGCCAGCCGGCCCTCTGTGTTTGTGTTGAGGGGGCGGACGATGATAGCACAGTGAA  
GGTCTCGTGGGATCTCCCATGCTGTTTCATGCGAAAGCGGCTCCAGCGTAATTTATGATACATAATTTGCTTCTGTTGCAACGGAGT  
ACCACCTGCCCCCGATCAGCTGTGACTGCACAAACATCCCTTACAATGACAGATATCGAGTCTCTGCTGCAACTGCGGCATCTGCTGCT  
AAGAAGTCCATCGTCCAACGCCAACCAACAGCAGAGACAGGACAGGACAGCAAAACCCCGGCTGTTCCGGGCTCACAGGTCACGGAA  
CCCTATAACAGAGTATGACTCCTTCCCATTTCTAGAGCGGCGCCACCGCGGTGGAGTCCAAATTCGCCCTATAGTGAAGTCTGATACGCG  
CGTCACTGGCGTCTGTTTTACAACGTCGTCGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAG  
CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCGCCGACCCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCAT  
TAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTCTT  
CTCGCCAGGTTCCCGGCTTCCCGCTCAAGCTTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAA  
AAAACCTGATTAGGTGATGGTTACGTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGCAGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA  
GTGGACTCTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTCCCGATTTCCGGCCTATTGG  
TTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGAATTTTAAACAAATATTTAACGCTTACAATTTAG

### 13.1.7 pNlop 2xNLS\_3xMYC\_I-Scel

GTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC  
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGCTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGGATTTTGCCT  
TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCA  
ACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACATTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTTATCC  
CGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATATGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG  
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
AACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAACCTGGGCAACTACTTACTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGAAGCTGGGTTCTCGCGGTATCATTTGACGACTGGGCGAGATGGTAAAGCCCTCCGCTATCGTATCTACACAGCGGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATA  
TATACTTTAGATTGATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGAATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAC  
GTGAGTTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCGCTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG  
CAACAAAAAACCACCGCTACCAGGTGGTTTTGTTTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGC  
GCAGATACCAAAATCTGCTTCTAGTGTAGCCGATAGTGGCCACCCTCAAGAACCTGTGATGACACCCCTACATACTCGCTCTGCTAA  
TCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTG  
GGCTGACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGC  
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACG  
CCTGGTATCTTTATAGTCTGCTCGGTTTTCCGACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTACGGGGGCGGAGCCTATGGAAA

AACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA  
TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGCCGCAACGACCGGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGGAAGAGC  
GCCCAATACGCAAAACCCCTCTCCCGCGGCTTGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTCGCCACTGGAAGCGGCGAGTGAG  
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTTAGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAAATTGTGAG  
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCG  
CTAGCAAGATCTAAAATAAATTAATCGAAATTAACCTTTAAGATCTCCTAGTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGTCCCTATCAGTGATAG  
AGACTAGGAAGCTTTCCATGGGACCCAAGAAGAAGAGGAGGTTGGGGTGACCTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGTATGAAAAAC  
ATCAAAAAAACAGGTAATGAACCTGGGTCCGAACCTAAACTGCTGAAAGAATACAAATCCCAGCTGATCGAAGTGAACATCGAACAGTT  
CGAAGCAGTATCGGTCTGATCCCTGGGTGATGCTTACATCCGTCTCTGCTGATGAAGGTAAAACCTACTGTATGCAGTTCCGAGTGGAAAAACA  
AAGCATACATGGACCAGCTATGTCTGCTGACGATCAGTGGGTACTGTCCCGCCGACAAAAAAGAAGCTGTTAACCACCTGGGTAACTCG  
GTAATCACCTGGGGCCGACAGCTTTCAACACCAAGCTTTCAACAACTGGTAACTGTTTCATCGTTAACAACAAAAAACCATCCCGAA  
CAACCTGGTTGAAACTACTGACCCCGATGTCCTGGCATACTGGTTTCATGGATGATGGTGGTAAATGGGATTACAACAAAAACTCTACCA  
ACAAATCGATCGTACTGAACACCCAGTCTTTCACTTTTCAAGAAGTAGAATACCTGGTTAAGGGTCTGCGTAACAAATCCAAGTGAAGT  
TAGTAAAAATCAACAAAAACAAACCGATCATCTACATCGATTCTATGTCTTACCTGATCTTCTACAACCTGATCAAAACCGTACTGATCCC  
GCAGATGATGTACAACTGCCGAACACTATCTCTCCGAACTTTCTGAAAGGGGTGACCCCAAGAAGAAGAGGAGGTTGGCATCAATGC  
AGAAGCTGATCTCGGAGGAGGATCTGCTGCGTAGTGAAGAACAAAACTTATAAGTGAAGAAGATTTATTGAGGTGAGAGAACGAAATTA  
ATTCAGAAGAGGACCTTTATGAGGATCCTGAATCGAATCTTTCCGTCGACCTTTGTCATCCTGCTCGGTCTGCTCGCTGCTGCTGCTTACG  
ACCTGCTTGTTCCTGGCCCTCAATGGTTAGTGGTTTTCTCTTCCAACGCGCTTGGTCCATCCTCTGACGGTAGTAAATGCGCTATCTTTC  
GGGCTAAGAAAATAAATCGGTGGATGGCGGCGGACGACTCTTATCTCTCCACTGCGCTACACCGCATAACTCCACTTGAAGTGAAGTACTTT  
CTGGGATAAAGCTATAAGGCGCAGCGTGTGAAGACGCGCTCTCTAGCGGTTCTGTTACATCGATACCGCTCGACCTCGACAGTCAATTTG  
AGCTTCAAAAAATACCGCAAAAAATGGCAATTCGGTTTTAAAAACATGGATCATCACCATCACCATCACTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAG  
TGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTGCGAATCGAAGGTTAACAACCCGTAACCTGCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCT  
ACATTTGATTTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTT  
AGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATT  
TAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAACTAATGAGCTTTTATGCCAACAAGGTTTTTACTAGAGAAATGCATTA  
TATGCACTCAGCGCTGTGGGCATTTTTACTTTAGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCTGCTAAAGAAGAAGGGAACACCTAC  
TACTGATAGTATGCCCATTTATACGACAAGCTATCGAATTTATTTGATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCTTGAATTGA  
TCATATGCCGATTAGAAAAACACTTAAATGTGAAAGTGGGCTTAACTCGAGTGAGGCTGAAGTGAATATTACCTTTCCGGGTTGAC  
GGGCGTGTGACGATGCGGAAGTCTGCTGCTTCCAACGGCTATCTGCCCCAGGACCCCATCCCGCGCCGATCAGGGGGTGGGCGAAG  
AATCCAGCATGAGATCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCGCGCTCCCGGAAACAGATTCGGAAGCCCAACCTTTTATAGAGGCGGCGGT  
GGAAATCGAAATCTCGTATGGCAGGTTGGCGCTGCTTGGTCTGCTTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAGAATCGTCAAGAAGCGC  
ATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTCGCGCCAAGCTCTTCAGCAATAT  
CACGGGTAGCCAAGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCGGCGCAGAGTGCATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCACCATG  
ATATTCGGCAAGCAGGATCGCCATGAGTACGACGAGATCTCGCGCTCGGGATGCGCGCTTGAAGCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGC  
GAGCCCTGATGCTCTTCGTCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGT  
GGTGAATGGGCGAGTACCGGATCAAGCGTATGCAGCGCGCCGATTCGATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGAGGAGCAAGGTGAGAT  
GACAGGATCTGCCCCGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGTACACGTCGAGCAGAGTGCAGAACGGAACGCC  
CGTCTGGCCAGCCAGATAGCCGCGCTGCCTGCTCCTGCAGTTCATTAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCAGGCGCC  
CCTGCGCTGACAGCGGAACACGCGCGCATCAGAGCAGCGATGTCTGTTGTGCCAGTCAAGCCGAATAGCTCTCCACCAAGCGGCC  
GGAGAACCTGCGTGAATCCATCTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCCTACTGTCTCTTGAATCAGATCTGAAGTGAATGGGTGAGCAT  
GCTACTCTCGGTTCTGGGTTAAAGTTTTAATTTGATTTAATTTTACGGCTATCACCTCTTGACAACTTTTTCTGTAACAGTGGCA  
ATATAAACTATAATCTTGAATCCAAGGCATCTCGCAAACCCAGCTGGGACAGAACATCAGATGAAGGTAAAGACCCCGCTGGATAGCAT  
CTGTCAATGAAGCGGCTCAGACGGCGCACTTCTATATCATTTGCCAGCGGGCCCTCTGTGTTTGTGTTGAGGGGCGCGACGATGATAGC  
ACAGTGAAGGTCTCGCTGGGATCTCCCATGCTGTTTCATGCGAAAGCGGCTCCACGCTAATTTATTGATACATATTTCGTTCTGTGCA  
ACGGAAGTACCACCTGCCCCGATCACCTGTGGACTGCACAACATCCCTTACAATGCAGATATCGAGTCTCTGCTGCAACTGCGGCATC  
TTGCTGCTAAGAAGTCCATCGTCAACGCACCAACACCAGCAGAAGACCAGGCACAGCAAACCCGGCTGTTCCGCGGCTCACACGG  
TCACGGAAACCTATAACAGAGTTAGACTCCTGTCCATTTCTAGAGCGCCGCCACCGCGGTGAGCTCAATTCGCCCTATAGTGTGATCGT  
ATTACGCGGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAACGCTGCTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCT  
TTCCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCGCCAGCATGCGCCTTCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAG  
CGGCGCATTAAGCGCGCGGTTGTTGTTACGCGCAGCGTACACCTGCGAGCGCCTAGCGCCGCTCTTTTCGCTTTCTTCC  
CTTCTTTCTCGCCAGTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAACTCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTC  
GACCCAAAAAATGATTAGGGTGTGTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGGTT  
CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATCTTTTGAATTTATAAGGATTTTGGCGATTTCCG  
CCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCAATTTTAAACAAATATTACGCTTACAATTTAG