

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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación y caracterización de la proteína
homóloga de TOR en trofozoítos de *Giardia duodenalis*”**

TESIS

Que presenta

ESTEBAN TORRES DIMAS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de Tesis: Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Ciudad de México

Agosto, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (CVU 774162), que fue indispensable para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por todas sus enseñanzas y su paciencia, por la atención incesante y sus consejos siempre útiles, pero sobre todo por creer en mí y brindarme un lugar y materiales apropiados para sacar adelante este proyecto.

A mis asesores, el Dr. Bulmaro Cisneros Vega y el Dr. Javier Hernández Sánchez, por sus consejos y críticas constructivas, así como también por sus aportaciones y comentarios, a lo largo de la revisión y evaluación de este proyecto.

A la Dra. María Luisa Bazán Tejeda, por toda la paciencia y constante instrucción, por dedicar tanto tiempo para hacer de este proyecto una experiencia no solo formativa sino apasionante, gracias a ella aprendí en gran medida la parte práctica de la biología molecular.

A Gabriela Mora Macías, por su infatigable desempeño como secretaria académica y el apoyo brindado en los trámites realizados.

A mis compañeros de laboratorio Fabiola Núñez Jurado, Rubén Villalobos Rodríguez, José Alejandro Ramírez Rosas, Ulises Omar García Lepe, María Teresa Izaguirre Hernández, Francisco Alejandro Lagunas Rangel, Sara Espinoza Corona, Eduardo García Huerta y Juan Ismael Rea Hernández, por todo su apoyo y su valiosa amistad.

A mis hermanos, Paola, Gaby, Ximena y Manuel; también a Javier, quien es más que un amigo, porque su sola existencia me motiva a ser mejor y esforzarme tanto como me sea posible para llegar tan lejos como mi imaginación lo permita.

A mis Padres, María Elena y Esteban y a mis abuelos Manuel y María Teresa, porque todo lo que soy se lo debo a ellos y mi más grande anhelo es hacerlos sentir muy orgullosos.

A mis amigos: Santiago, Iñaki, Hugo, Miguel e Hilario, por compartir conmigo los mejores momentos.

CONTENIDO

Contenido

CONTENIDO.....	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Taxonomía.....	7
Características de <i>Giardia duodenalis</i>	7
Genoma de <i>Giardia duodenalis</i>	9
Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i>	11
PIKKs	13
ATM	15
TOR	18
ANTECEDENTES DIRECTOS	24
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
METODOLOGÍA.....	34
Identificación <i>in silico</i> de los blancos de gTOR.....	34
Diseño de iniciadores	34
Diseño para clonación en el vector de expresión pPROEX-I por ligación convencional:	34
Diseño para clonación en el vector de expresión PET100/D-TOPO por ligación de Gibson:	35
Cultivos y cepas:	36
Extracción de ADN genómico de <i>Giardia duodenalis</i> :.....	36
Control de integridad y especificidad del ADN genómico de <i>Giardia duodenalis</i>	37
Clonación de GdAKT en el vector de expresión pPROEX-I	38
Amplificación por PCR de GdAKT para su clonación en el vector pPROEX-I por ligación convencional:	38
Purificación de fragmentos de ADN por electroelución:	38
Ligación con pJET1.2/blunt y transformación	39
PCR de colonia.....	39

Extracción de plásmidos bacterianos por Easyprep.....	40
Extracción de plásmidos bacterianos por Miniprep.....	41
Purificación de fragmentos de ADN por electrodiálisis	41
Restricción y ligación con el vector de expresión pPROEX-I	42
Clonación de GdAKT en el vector de expresión PET100/D-TOPO.....	42
Amplificación por PCR de GdAKT para la clonación en el vector PET100/D-TOPO por ligación Gibson:	42
Extracción de plásmidos bacterianos por Midiprep.....	43
Restricción del vector de expresión PET100:GdRAD51.....	44
Ligación Gibson en el vector de expresión PET100 vacío	44
Análisis de candidatas por PCR	45
Análisis por restricción	46
Expresión de proteínas recombinantes	47
Purificación de proteínas recombinantes	47
Extracción total de proteínas de <i>Giardia duodenalis</i> :.....	48
Inmunopurificación de ATM-3HA.....	48
Electroforesis de proteína en SDS-PAGE y Western blot.....	48
Ensayo de actividad cinasa:.....	49
RESULTADOS	51
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES	91
PERSPECTIVAS	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93
ANEXOS	100

RESUMEN

El parásito protozoario *Giardia duodenalis* es un organismo de divergencia evolutiva temprana y ha sido denominado minimalista por poseer un genoma con estructura y contenido compactos con pocos intrones, así como una distancia intergénica promedio muy corta, en comparación con otros eucariontes y por codificar para maquinarias simplificadas de replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN y vías metabólicas. En este parásito minimalista solo se han identificado dos secuencias que se sugiere pertenecen a la familia de cinasas PIKK y una de ellas se ha caracterizado como ATM por nuestro grupo de trabajo y se ha denominado gTOR por otros autores.

El objetivo del presente trabajo fue identificar al ortólogo de la proteína TOR en *Giardia duodenalis* mediante la fosforilación de los blancos putativos de gTOR del parásito. La búsqueda *in silico* de los ortólogos de los tres blancos de fosforilación más estudiados de TOR que incluyen a S6K, 4EBP y AKT reveló solo un ortólogo de AKT, mientras que no se lograron identificar ortólogos putativos de S6K y 4EBP.

Con el fin de evaluar la posible actividad gTOR de la proteína ATM de *Giardia*, el gen del blanco de fosforilación AKT de *Giardia duodenalis* fue clonado en el vector de expresión PET100/D-TOPO y se usó para transfectar células de *Escherichia coli* XL1 Blue para posteriormente expresar la proteína recombinante, la cual se purificó por cromatografía de afinidad y su inmunodetección se llevó a cabo por Western blot, en donde se detectó una banda con el tamaño esperado de 67.58 kDa. Así mismo, se utilizaron trofozoítos transgénicos cuyo gen endógeno de ATM fue etiquetado con un tag que contiene 3 epítopes de hemaglutinina (ATM-3HA) para inmunopurificar esta proteína empleando perlas de agarosa recubiertas de anti-HA y ésta se detectó por Western blot con un tamaño esperado de 366.704 kDa. Se iniciaron los ensayos de cinasa para ver si gTOR/ATM-3HA inmunopurificada fosforilaba a la proteína recombinante GdAKT purificada, sin embargo, debido a problemas técnicos no fue posible verificar la actividad de gTOR/ATM-3HA usando a GdAKT como sustrato.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Giardia duodenalis* is an organism of early evolutionary divergence and has been called minimalist because it has a genome with compact structure and content with few introns, as well as a very short average intergenic distance, compared with other eukaryotes and by coding for simplified machineries of DNA replication, transcription, RNA processing and metabolic pathways. In this minimalist parasite, only two sequences have been identified that are suggested to belong to the PIKK kinase family and one of them has been characterized as ATM by our working group and has been denominated gTOR by other authors.

The objective of the present work was to identify the ortholog of the TOR protein in *Giardia duodenalis* by phosphorylation of the putative gTOR targets of the parasite. The *in silico* search of the orthologs of the three most studied phosphorylation targets of TOR including S6K, 4EBP and AKT revealed only one ortholog of AKT, whereas putative orthologs of S6K and 4EBP were not identified.

In order to evaluate the possible gTOR activity of the *Giardia* ATM protein, the AKT phosphorylation target gene from *Giardia duodenalis* was cloned into the PET100/D-TOPO expression vector and it was used to transfect *Escherichia coli* XL1 Blue cells for subsequently express the recombinant protein, which was purified by affinity chromatography and its immunodetection was carried out by Western blot, where a band with the expected size of 67.58 kDa was detected. Likewise, transgenic trophozoites were used whose endogenous ATM gene was tagged with a tag containing 3 epitopes of hemagglutinin (ATM-3HA) to immunopurify this protein using agar beads coated with anti-HA and this was detected by Western blot with an expected size of 366,704 kDa. The kinase assays were started to realize if the immunopurified gTOR/ATM-3HA kinase phosphorylated the purified recombinant protein GdAKT, however, due to technical problems it was not possible to verify the activity of gTOR/ATM-3HA using GdAKT as a substrate.

INTRODUCCIÓN

Taxonomía

Giardia duodenalis, también conocido como *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis*, es un parásito protozooario flagelado en el orden Diplomonadida que, aunque no haya evidencia que lo indique, parece pertenecer al grupo Metamonada dentro del supergrupo Excavata (Sina M. Adl, 2012, Nobuko Arisue, 2005).

El género *Giardia* comprende seis especies que infectan diferentes hospederos: *Giardia agilis* (anfibios), *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci* (aves), *Giardia microti* y *Giardia muris* (roedores) y *Giardia duodenalis* (mamíferos) (Johan Ankarklev, 2010 & Martin F. Heyworth, 2016).

Características de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis causa una de las infecciones parasitarias más comunes en todo el mundo. Contribuye a un estimado de 280 millones de infecciones sintomáticas humanas (llamadas giardiasis) por año y ha sido incluida en la Iniciativa de Enfermedades Descuidadas de la OMS desde el 2004 (WHO Neglected Disease Initiative). *G. duodenalis* es un patógeno zoonótico potencial, y la infección de animales jóvenes de granja puede tener un impacto económico resultando en la pérdida de productividad (Johan Ankarklev, 2010). El parásito posee un genoma minimalista compacto en estructura y contenido, sin embargo, las secuencias proteicas de *Giardia* comúnmente muestran inserciones de aminoácidos, comparado a otros eucariontes (Hilary G. Morrison, 2007). El parásito intestinal cicla entre una fase latente quística y una fase virulenta conocida como trofozoíto, ambos adaptados para sobrevivir en diferentes ambientes inhóspitos. El ciclo de vida comienza con la ingestión del quiste por un hospedero vertebrado. La exposición al ácido gástrico durante el paso a través del estómago del hospedero provoca el desenquistamiento y el parásito emerge en el intestino delgado después de la estimulación por factores intestinales. El excizoíto rápidamente se divide en dos trofozoítos binucleados que se adhieren al intestino delgado y lo colonizan. Los trofozoítos que son llevados corriente abajo por el flujo intestinal

se diferencian en quistes tetranucleados latentes. Los quistes son transportados dentro de las heces y pueden sobrevivir por meses en agua fría hasta que son ingeridos por un nuevo hospedero (**Gerard Manning, 2011**). La dosis infecciosa es baja (10 quistes) y la necesidad de controlar la transmisión llevada por barcos resulta en grandes pérdidas económicas para la industria. La giardiasis se caracteriza por diarrea acuosa, dolor epigástrico, náuseas, vómito y pérdida de peso. Estos síntomas aparecen de 6 a 15 días después de la infección, y el impacto clínico es más fuerte en niños y en individuos desnutridos o inmunodeficientes; el tratamiento usualmente es con Metronidazol u otros nitroimidazoles. Las infecciones crónicas son comunes, sin embargo, cerca de la mitad de las infecciones durante las epidemias son asintomáticas y la infección se resuelve espontáneamente de manera frecuente. Por lo tanto, la sintomatología es extremadamente variable. Existe una pequeña visión de cómo *Giardia spp* causa enfermedad; no son invasivos y no secretan toxinas identificadas hasta el momento (**Johan Ankarklev, 2010; Elin Einarsson, 2016**). A pesar de que la mayoría de las infecciones son controladas por una respuesta inmune efectiva, algunos individuos desarrollan una enfermedad crónica. Además de los anticuerpos, se ha propuesto que otros mecanismos diferentes también podrían ser capaces de eliminar a *Giardia*, entre ellos se incluyen péptidos antimicrobianos, NO (óxido nítrico) y productos de los mastocitos (**Erqiu Li, 2005**). El óxido nítrico es un antimicrobiano para una gran cantidad de bacterias y patógenos parasíticos, y tiene otras múltiples funciones, incluyendo su papel en la neurotransmisión y la regulación de la integridad de las barreras mucosas, así como el tono vascular en los intestinos. Debido a que los trofozoítos colonizan el intestino delgado en posición cercana a las células epiteliales, la producción epitelial de NO podría ser una defensa potencial del hospedero contra *G. duodenalis*. Se demostró que el NO inhibe el crecimiento, el enquistamiento y el desenquistamiento de *G. duodenalis*, pero no tiene efecto en la viabilidad de *Giardia*. Adicionalmente, la infección de cultivos de células epiteliales intestinales humanas por *G. duodenalis* inhibe la producción epitelial de NO, sugiriendo que el parásito ha desarrollado estrategias para evadir este mecanismo de defensa potencial del hospedero (**Lars Eckmann, 2000**).

Genoma de *Giardia duodenalis*

Como todos los diplomonádidos, *Giardia* posee dos núcleos equivalentes en tamaño y en la cantidad de ADN que contienen, además ambos son transcripcionalmente activos (**Johan Ankarklev, 2010; Elin Einarsson, 2016**). El genoma de *Giardia* es compacto en estructura y contenido, contiene pocos intrones o remanentes mitocondriales y tiene una maquinaria simplificada de replicación, transcripción, procesamiento del ARN y la mayoría de las vías metabólicas. Las cinasas comprenden el grupo más grande de proteínas y reflejan el requerimiento de una red de transducción de señales compleja para coordinar la diferenciación en el parásito. La transferencia horizontal de genes por parte de donadores bacterianos y arqueas ha moldeado el genoma de *Giardia*. Adicionalmente el genoma muestra baja heterociguidad, menor a 0.01 %, lo que apoyaba las especulaciones de que este organismo es sexual. El genoma de *G. duodenalis* WB clona C6 (ATCC50803) tiene un tamaño de ~11.7 Mb, distribuido en 5 cromosomas y es compacto. Se identificaron 6470 marcos abiertos de lectura (ORFs) con una distancia intergénica media de 372 pb. Análisis seriales de expresión de genes y secuencias de cDNA demostraron evidencia transcripcional de 4787 de estos ORFs (**Hillary G. Morrison, 2007**). Tiene una cantidad de secuencias no codificantes relativamente pequeña en comparación con otros eucariontes. Las regiones no traducidas de los ARNm son relativamente cortas y solo 8 genes (**Vanessa Gómez, 2016**) han demostrado tener intrones (**Johan Ankarklev, 2015**). Adicionalmente, *Giardia* contiene 4 genes *split*: el *spliceosoma* es conocido por llevar a cabo el *Splicing* de los intrones de los pre-mRNAs y unir a los exones que rodean a un intrón, sin embargo, los *spliceosomas* de algunos filos de animales y de algunos protistas pueden realizar una variante de la reacción de remoción de intrones, conocida como *trans-splicing*, en la cual los pre-mRNAs son transcritos por separado en regiones cromosomales no contiguas, luego se encuentran entre ellos por regiones de complementariedad y son subsecuentemente juntados en un gen *split* (**Ryoma Kamikawa, 2011 & Thomas Blumenthal, 2011**). El genoma de *Giardia* codifica para una forma más simplificada de la mayoría de los procesos celulares: menor cantidad y más subunidades básicas, enzimas tipo bacterianas o arqueas de un solo dominio y un repertorio metabólico limitado. Una explicación altamente improbable para explicar la

falta de proteínas estructurales o subunidades de maquinaria central es que el hospedero pueda proveer los productos metabólicos necesarios para una vía incompleta. Las secuencias proteicas de *Giardia* generalmente muestran inserciones de aminoácidos, usando alineamiento de 1518 proteínas, se encontraron inserciones en 44 ORFs, con un promedio de 1.5 inserciones por ORF, variando en tamaño de 8 a 101 aminoácidos, con un promedio de 20; en contraste, el número de inserciones detectado en otros organismos varió de 0 a 6. (**Hilary G. Morrison, 2007**).

Giardia duodenalis se divide en 8 genotipos o ensamblajes morfológicamente idénticos (A-H). Sin embargo, solo los ensamblajes A y B están asociados con infecciones humanas. Los ensamblajes A y B a su vez están divididos en: AI, AII, AIII, BIII y BIV. Se ha reportado que el genotipo AI es más frecuentemente encontrado en animales, mientras que el genotipo AII es principalmente encontrado en humanos. Algunos aislados del ensamblaje A han sido asociados a infecciones sintomáticas en humanos y se ha sugerido que otros poseen potencial zoonótico. Se han secuenciado y analizado los genomas de tres aislados de los dos ensamblajes que infectan humanos (AI, AII y BIV) y también el de un ensamblaje que infecta animales (E) (**Johan Ankarklev, 2015**). Los dos principales ensamblajes (A y B) tienen en promedio una identidad de aminoácidos solo del 78% en regiones codificantes. Los aislados del ensamblaje A son los mejor estudiados, sin embargo, datos epidemiológicos recientes sugieren que los aislados del ensamblaje B pueden ser los más comunes en humanos en todo el mundo. Estos dos ensamblajes pueden ser encontrados en otros animales como ganado, gatos, perros y ratas. Los parásitos que pertenecen al ensamblaje C y D han sido identificados en perros, lobos, coyotes y gatos; los aislados del ensamblaje E han sido identificados en gatos, ovejas, cerdos y cabras; los parásitos del ensamblaje F han sido identificados únicamente en gatos, los del ensamblaje G en ratas y los del ensamblaje H han sido identificados en animales marinos como focas (**Johan Ankarklev, 2010 & Martin F. Heyworth, 2016**).

Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*

La diferenciación a quistes infecciosos a través del proceso del enquistamiento es crucial para la transmisión y supervivencia del protozoario intestinal *Giardia duodenalis*. El parásito intestinal lleva a cabo cambios morfológicos y bioquímicos sustanciales para sobrevivir fuera del intestino delgado de su hospedero mamífero, diferenciándose en su forma infectiva: el quiste, el estímulo que provoca esta diferenciación se desconocía por completo, sin embargo, se demostró que la falta de colesterol es necesaria y suficiente para provocar la diferenciación de *Giardia* a quistes ambientalmente resistentes (**Elin Einarsson, 2016 & Hugo D. Luján, 1996**). El trofozoíto monitorea el ambiente externo e induce su enquistamiento en respuesta a la exposición estímulos tales como el aumento en el pH y la concentración de sales biliares, así como la disminución en la concentración de colesterol, a través de vías intracelulares, muchas de las cuales siguen siendo desconocidas. El enquistamiento se divide en dos fases: enquistamiento temprano y tardío. La célula pasa a un “punto sin retorno” durante el enquistamiento temprano, después del cual no le es posible reincidir al estadio proliferativo. Factores de transcripción tales como Myb2 activan genes específicos de enquistamiento, entre los cuales se encuentran los genes de proteínas de la pared del quiste (Cyst Wall Proteins CWP1-3). Un incremento general en la traducción puede ser observado en el enquistamiento temprano, debido a que la síntesis de CWPs se incrementa drásticamente, el azúcar UDP-GalNAc (giardina), es también sintetizado y secretado a través de vesículas de enquistamiento positivas para carbohidratos. Durante el enquistamiento tardío, la célula cambia de forma, mientras entra en estado de inactividad, y el disco ventral, así como los flagelos son desensamblados mientras que la construcción de la pared del quiste procede. El mecanismo de desensamble sigue siendo desconocido. Ocurren dos “rounds” de replicación del ADN sin que ocurra citocinesis, dando como resultado un quiste con cuatro núcleos, cada uno con una ploidía genética de 4N. Se forman interconexiones entre los núcleos del quiste y el material genético puede ser intercambiado a través del proceso “diplomixis”. Durante el enquistamiento, cada célula recibe un par de

núcleos no-hermanos (**Fig. 1**) (**Elin Einarsson, 2016**). El quiste tiene una pared celular resistente, compuesta por un 60% de carbohidratos y un 40% de proteína, además su metabolismo está regulado a la baja (**Johan Ankarklev, 2010**).

Una vez ingeridos los quistes, son expuestos al ácido gástrico y enzimas pancreáticas durante su paso a través del estómago y llevan a cabo el desenquistamiento, una diferenciación dramática con sorprendentes consecuencias, tales como cambios en el pH citoplasmático y rupturas específicas en proteínas del quiste, rearrreglos ultraestructurales y cambios en la regulación transcripcional de muchos genes, todo esto en un lapso de 15 minutos (**Johan Ankarklev, 2010 & Michael L. Hetsko, 1998**). Los flagelos aparecen primero a través de una abertura en uno de los polos del quiste, se cree que este proceso es mediado por proteasas de cisteína, liberadas por vesículas periféricas. El excizoíto liberado procede a realizar dos veces la citocinesis, produciendo así cuatro trofozoítos, durante estas divisiones, el excizoíto incrementa su metabolismo y expresión de genes, segregando organelos, ensamblando el disco adhesivo y sobrerregulando proteínas asociadas a la motilidad. El trofozoíto es el estadio causante de la enfermedad. El lado plano es la superficie ventral y el lado convexo es la superficie dorsal. El trofozoíto mide alrededor de 12-15 μm de largo y 5-9 μm de ancho. En comparación con otros eucariontes, *Giardia spp* es inusual, ya que tiene dos núcleos, no posee mitocondrias ni peroxisomas y posee un aparato de Golgi atípico, sin embargo, poseen remanentes mitocondriales como Cnp60, IscS e IscU. El citoesqueleto incluye cuatro pares de flagelos (los anteriores, ventrales, posteriores/laterales y los caudales). El cuerpo medio no tiene una función conocida, pero su localización le da al parásito su característica “sonrisa” vista al teñir con Giemsa. Los flagelos y el disco adhesivo están compuestos por proteínas de citoesqueleto clásicas como α -tubulina y β -tubulina, además de otras proteínas de la familia de las giardinas (α -giardina, β -giardina, γ -giardina y δ -giardina) (**Johan Ankarklev, 2010**).

Los cambios de ploidía que acontecen a lo largo de su ciclo de vida, generan en el parásito la necesidad de poseer mecanismos para mantener la integridad genómica y dichos mecanismos se encuentran regulados en eucariontes y procariontes por cinasas.

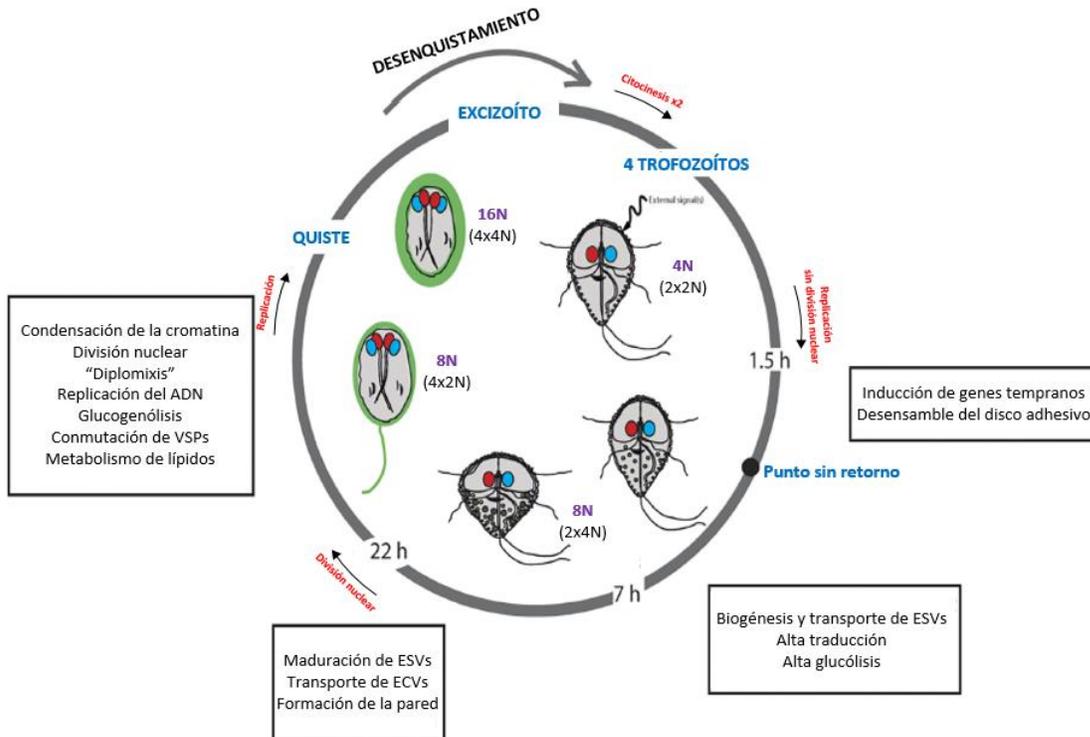


Fig. 1. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. Modificado de Elin Einarsson, 2016.

Las proteínas cinasas modulan la mayoría de las vías celulares, particularmente en la coordinación de procesos celulares complejos y en respuesta a señales ambientales. Cerca del 2% de los genes en la mayoría de las eucariotas codifican para cinasas, y estas cinasas fosforilan alrededor del 30% del proteoma. Las cinasas regulan la actividad, localización y la concentración existente de sus sustratos. La mayoría de las cinasas tienen docenas de sustratos, y operan en cascadas multi-cinasas complejas. Por lo tanto, los organismos con kinomas reducidos pueden proveer modelos simples para analizar la señalización por cinasas en organismos divergentes donde los hallazgos pueden ayudar a entender la evolución de las cinasas (Gerard Manning, 2011).

PIKKs

Entre las proteínas cinasas, existe una familia particularmente importante: la familia de cinasas relacionadas a la Fosfatidilinositol 3-cinasa (PIKK por sus siglas en inglés) e incluye en eucariotes superiores a las cinasas ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM and

Rad3-related), DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subdomain), mTOR (mammalian target of rapamycin), SMG1 (suppressor with morphological effect on genitalia family member) y TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) (Tanya T. Paull, 2015). Estas proteínas cinasas atípicas regulan las respuestas del daño al ADN, la señalización dependiente de nutrientes y el decaimiento de ARNm. El mantenimiento del genoma es crítico para prevenir enfermedades y sobrevivir, los desafíos para la integridad genómica provienen de mutágenos ambientales, subproductos de la respiración celular y errores durante el metabolismo de ácidos nucleicos, incluyendo la replicación del ADN. Las células tienen actividades de respuesta al daño al ADN (DDR por sus siglas en inglés) que continuamente monitorean la integridad del ADN y funcionan para prevenir la ocurrencia de mutaciones deletorias y rearrreglos. La respuesta al daño del ADN está regulada por las cinasas relacionadas a la Fosfatidilinositol 3-cinasa (PIKKs). Las PIKKs primeramente responsables de la señalización al daño del ADN incluyen ATM, ATR y DNA-PKcs. Estas PIKKs fosforilan cientos de proteínas que mantienen la integridad del genoma a través de la regulación de la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN a través de la fosforilación de la histona H2AX, la apoptosis y la senescencia celular (Courtney A. Lovejoy, 2009 & Tanya T. Paull, 2015).

El *motif* estructural que define a las PIKKs como miembros de una superfamilia es el dominio catalítico de cinasa. Como el nombre de la familia lo indica, este dominio muestra una homología significativa de secuencia de aminoácidos a los dominios catalíticos de las fosfatilinositol 3-cinasas. La homología de secuencia es particularmente alta con respecto a los residuos de aminoácidos envueltos en el sitio de unión al ATP de los dominios catalíticos de las PIKK. Sin importar la ubicación exacta, los dominios catalíticos de las PIKK están flanqueados por dos tramos de aminoácidos ligeramente conservados llamados FAT (FRAP, ATM and TRAPP) y FATC. El dominio FAT comprende aproximadamente 500 aminoácidos, mientras que el dominio FATC contiene solo 35 aminoácidos. La función exacta del dominio FAT aún no está clara, pero algunos estudios de mutagénesis y deleciones indican que la integridad del dominio FATC es crítica para la actividad cinasa. Una hipótesis razonable es que los dominios FAT y FATC interactúan en una estructura tridimensional del dominio

carboxilo terminal de las PIKK, configurando a la proteína en una forma apropiada para la unión con el ATP y la fosforilación del sustrato (**Robert T. Abraham, 2004**).

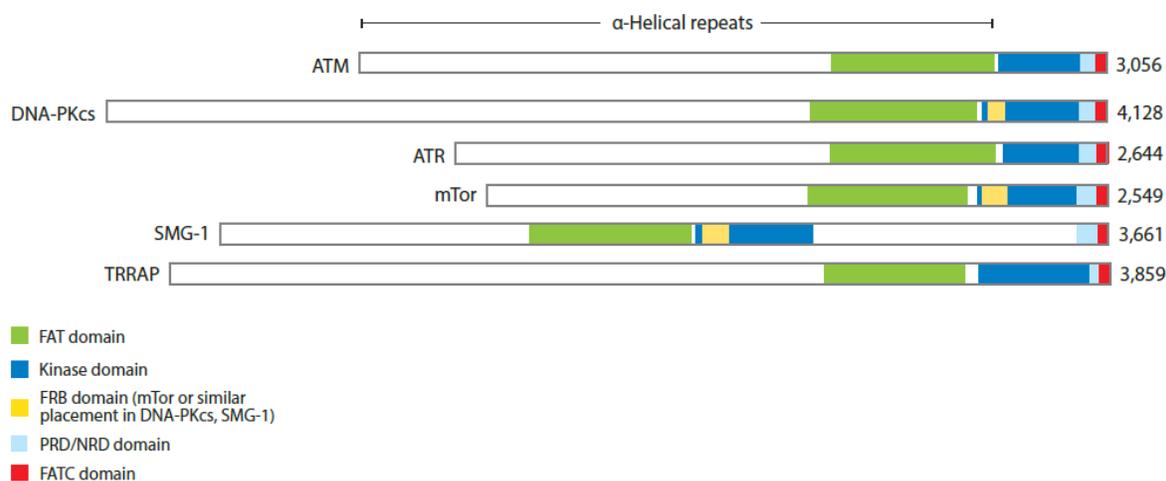


Fig. 2. Organización estructural de las PIKKs. Tomado de Tanya T. Paull, 2015

En el grupo de las PI3Ks, clase I, cada enzima consiste en una subunidad catalítica unida a una subunidad reguladora, las subunidades reguladoras pueden bloquear el sitio de unión al sustrato, inhibiendo la asociación de la enzima con la membrana, el sitio de activación. Entonces, en ausencia de estímulo, las enzimas de clase I están inactivas y localizadas en el citoplasma. De este modo, para activar completamente a estas enzimas, se debe liberar a éstas de autoinhibición y además se requiere su correcta localización para su actividad completa. ATM es inactivo en el estado de reposo, pero se activa rápidamente y se localiza cuando hay daño al ADN por el complejo MRN y otros factores en los sitios con rupturas de doble cadena, así como la activación de ATM mediada por la oxidación, independiente del complejo MRN (**Tanya T. Paull, 2015**).

ATM

La proteína cinasa ataxia-telangiectasia mutada (ATM) es una reguladora maestra de la respuesta al daño del ADN y coordina la activación de los puntos de control “checkpoint” del ciclo celular, reparación del ADN y cambios metabólicos en células eucariotas en respuesta a rupturas de doble cadena del ADN y estrés oxidativo. A la proteína cinasa ATM

se le llamó así debido al desorden autosomal recesivo ataxia-telangiectasia (A-T), o síndrome de Louis-Bar, una rara enfermedad causada por la pérdida de la actividad de esta cinasa y caracterizada por una pérdida progresiva de la función neural cerebelar resultando en ataxia debilitante, así como dilatación de los vasos sanguíneos (telangiectasia). Los pacientes con este desorden presentan también inmunodeficiencia, sensibilidad extrema a la radiación ionizante y una alta tasa de malignidades, principalmente linforreticulares (**Tanya T Paull, 2015 & Luciana Chessa, 2016**). Es la ataxia cerebelar recesivamente heredada más común en niños por debajo de los 5 años, con una prevalencia de 1/40,000 a 1/100,000 (Swift, 1985). Desde la identificación del gen causante, ATM, en el cromosoma 11 q22-q23 (Gatti et al., 1988; Savitsky et al., 1995), las bases moleculares de ciertos aspectos de la enfermedad han sido aclarados, a pesar de que otros continúan por ser elucidados. El gen ATM ocupa ~150 kb de 11q22.3-123.1. Se transcribe a partir de un promotor bidireccional que también dirige la expresión del gen NPAT/Cand3/E14. Existen 2 exones 1 alternativos, sin embargo, la expresión diferencial de las isoformas del ARNm en diferentes tejidos o en respuesta a diferentes estímulos no ha sido descrita, ni hay diferencia en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, pues la traducción inicia en el exón 3. El ARNm de 13 kb, con su secuencia codificante de 9,168 pb, parece ser expresado en todos los tejidos y en todas las etapas de desarrollo. La proteína ATM pesa 350 kDa se localiza principalmente en el núcleo, pero también se encuentra en vesículas citoplasmáticas (**Nancy Uhrhammer, 2002**).

ATM es una proteína cinasa de Ser/Thr y es miembro de la familia de cinasas relacionadas a la Fosfatidilinositol 3-cinasa (PIKKs). El dominio cinasa se encuentra cerca del extremo carboxilo, otros dominios presentes en ATM son el dominio FAT, el dominio FATC, el dominio de unión a sustrato N-terminal, un zipper de leucina, una región rica en prolinas que permite la unión con la cinasa ABL y una secuencia de localización peroxisomal. Se estima que ATM posee hasta 700 sustratos (**Martin F. Lavin, 2008**).

ATM existe *in vivo* como un multímero inactivo que se disocia en monómero activos ante el daño al ADN u otras formas de estrés celular. ATM fosforila blancos río abajo que inician el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN o la apoptosis. Se demostró que ATM es

activada por las rupturas de doble cadena de ADN a través del complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) y el ADN, pues el complejo por sí mismo favorece la fosforilación de histona H2AX con un incremento de 2 a 5 veces, mientras que el complejo MRN más ADN promueve la cantidad de producto fosforilado de 80 a 200 veces en comparación con ATM sola, siendo Nbs1 quien recluta a ATM y esta última fosforila a H2AX. Mre11 tiene actividad de endonucleasa de cadena sencilla dependiente de Mn^{2+} , así como actividad 3'-5' exonucleasa en cadena sencilla y cadena doble de ADN. Rad50 posee actividades regulatorias ATPasa y adenilato cinasa, interactúa con el DNA y en conjunto con Mre11 forma el núcleo del complejo MRN. Rad50 estimula la unión a ADN y la actividad nucleasa de Mre11 y facilita la unión a ADN del complejo MRN. Nbs1 no tiene actividades enzimáticas conocidas pero su reclutamiento a las rupturas de doble cadena es esencial para reclutar y activar a ATM, así como la iniciación de respuesta al daño al ADN. La estimulación óptima de ATM dimérica requiere que la longitud del fragmento de ADN sea de al menos 2 kb (**Ji-Hoon Lee, 2005 & Emil Mladenov, 2016**). Por otro lado, ATM puede ser activada independientemente del complejo MRN mediante la autofosforilación. La irradiación celular induce la rápida autofosforilación intermolecular de la serina 1981 que causa la disociación de los dímeros e inicia la actividad celular cinasa de ATM. La mayoría de las moléculas de ATM en la célula son rápidamente (3 min) fosforiladas en este sitio después de una dosis de radiación tan baja como 0.5 Gy, siendo detectadas por anticuerpos dirigidos a residuos de aminoácidos fosforilados como la serina 1981. La activación de la cinasa ATM parece ser el evento iniciador en respuesta a la irradiación, y los resultados parecen indicar que la activación de ATM no depende de la unión directa con rupturas de cadena de ADN, pero puede resultar de cambios en la estructura de la cromatina (**Christopher J. Bakkenist, 2003**). Por otro lado, se demostró en el 2000 que ATM es activada in vitro por Mn^{2+} , observando que la fosforilación de su blanco PHAS-I (EIF4EBP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1) es completamente dependiente de la presencia de Manganese e inhibida por wortmannina, un inhibidor de cinasas PI3Ks (**Doung W. Chan, 2000**). Entre otros, también se ha utilizado a la cafeína como inhibidor de las proteínas cinasas que juegan un papel central en la respuesta al daño al ADN (**Alex N. Zelensky, 2013**).

Durante los pasados 10 a 15 años de investigación, muchos investigadores se han interesado en la idea de que el estrés oxidativo puede ser importante para la disfunción neuronal observada en pacientes con A-T. Este interés se basó en las observaciones de que las células de pacientes A-T exhiben altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) comparado a las células normales. Adicionalmente, ATM responde a niveles incrementados de ROS con fosforilación de blancos río abajo y la activación de puntos de control en respuesta a ROS (**Tanya T. Paull, 2014**). Para probar la hipótesis de que ATM puede ser directamente activada por ROS, se trataron fibroblastos humanos primarios con el oxidante H_2O_2 , comparándolo con el agente genotóxico bleomicina que induce DSBs. Se encontró que el oxidante provocó la autofosforilación de ATM, así como la fosforilación de los blancos p53 y Chk2, sin embargo, la fosforilación de H2AX, un marcador de DSBs de ADN ocurrió solo con el tratamiento con bleomicina. Lo que indica que ATM puede ser activada directamente por estrés oxidativo y que el mecanismo de activación es diferente de aquél mediado por el complejo MRN/DSBs (**Zhi Guo, 2010**).

TOR

La proteína TOR, por sus siglas en inglés (target of rapamycin) o mTOR (mechanistic target of rapamycin, anteriormente conocida como mammalian target of rapamycin) es una cinasa de Serina/Treonina altamente conservada que pertenece a la familia de las PIKK (cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol 3' cinasa). Se trata de una enzima clave de la vía de señalización mTOR, la cual regula la acumulación de masa celular en muchos eucariontes (**Jose Aramburu, 2014 & A. A. Parkhitko, 2013**). La cinasa mTOR fue descubierta como resultado de estudios del agente antifúngico rapamicina, que ahora es utilizado como inmunosupresor y agente antitumoral con el nombre comercial de Sirolimus (**A. A. Parkhitko, 2013**). La rapamicina es un compuesto antifúngico, anticancerígeno e inmunosupresor producido por una bacteria del suelo de Rapa Nui (mejor conocido como Isla de Pascua), fue descubierta en 1975 por Vèzina et.al. El aislamiento de levaduras mutantes resistentes a las propiedades inhibitorias de crecimiento de la rapamicina llevó al descubrimiento de TOR (target of rapamycin) (**Charles Betz and Michael N. Hall, 2013**).

mTOR se organiza en dos complejos con diferentes efectos río abajo: el complejo mTOR 1 (mTORC1) está definido por su subunidad RAPTOR, la cual es remplazada por RICTOR en el complejo mTOR 2 (mTORC2).

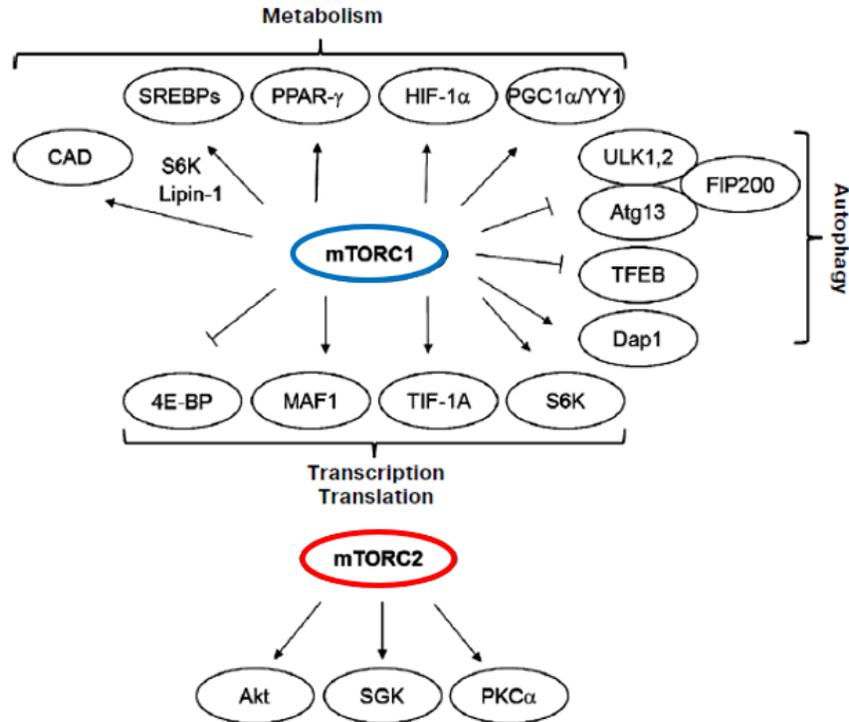


Fig. 3. Blancos de fosforilación de los complejos mTORC1 y mTORC2. Tomado de A. A. Parkhitko, 2013.

mTORC1 regula el crecimiento celular promoviendo la traducción, la biogénesis de ribosomas y la supresión de la autofagia. Su activación requiere nutrientes y aminoácidos, lo que resulta en el reclutamiento de mTORC1 a los lisosomas y endosomas tardíos mediado por RAPTOR y la co-localización con su activador, la GTPasa RHEB. Los sustratos de mTORC1 incluyen a 4EBP (proteína de unión a eIF4E) y a la cinasa ribosomal S6 (S6K), que controlan la iniciación y elongación de la traducción dependiente de cap, respectivamente. La fosforilación de 4EBP y S6K depende de su motif secuencia de señalización TOR (TOS), que se une a RAPTOR. Adicionalmente se ha encontrado que mTORC1 promueve la síntesis de proteínas indirectamente incrementando la actividad de las ARN polimerasas I y II, las cuales transcriben los genes que codifican para ARNr y ARNt ((Jose Aramburu, 2014). mTORC1 está constituido por las subunidades Deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein)

y PRAS40 (Proline Rich Akt Substrate 40 kDa) supresores de mTORC1, que funcionan como blancos competitivos, mLST8 (Mammalian Lethal with Sec13 proTein 8/6-protein), Tti1, Tel2 y Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR) que funciona como andamiaje y recluta los sustratos de mTORC1 (**A. A. Parkhitko, 2013**). En la figura 3 se ilustran los principales sustratos del complejo mTORC1 y 2.

Por otro lado, mTORC2 promueve la entrada al ciclo celular, la supervivencia celular, la polarización del citoesqueleto de actina y la salida anabólica. mTORC2 controla el crecimiento regulando la lipogénesis, el metabolismo de glucosa y la apoptosis. Los sustratos de mTORC2 incluyen AKT (PKB), SGK y PKC (**Haijuan Yang, 2013; Paul Zarogoulidis, 2014 & Charles Betz, 2013**) (**Fig. 3**). TOR y Lst8 son también componentes de mTORC2, sin embargo, a diferencia de mTORC1, éste no contiene a Raptor y no exhibe una sensibilidad directa a la inactivación por rapamicina. Además de TOR y Lst8, mTORC2 de mamíferos, *Dictyostelium* y *Saccharomyces cerevisiae* contienen subunidades tipo Rictor: en *Dictyostelium* están las subunidades PIA y RIP3, mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran las subunidades AVO3, AVO1 y la subunidad tipo SIN1.

Muchas de las funciones de mTORC2 son llevadas a cabo río abajo en la cascada de fosforilación por la proteína cinasa AKT, la cual es activada por fosforilación dentro de un *motif* hidrofóbico C-terminal (HM) por mTORC2 o también dentro del *loop* de activación de cinasa por PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1). En células de mamíferos, la actividad de AKT no requiere la fosforilación de HM por mTORC2; la fosforilación mediada por mTORC2 incrementa el rango de sustratos blanco de AKT. Además, en células de mamífero, mTORC1 puede inhibir la actividad de PI3K y suprimir la acumulación de Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato. Esta acción bloquea el reclutamiento de PDK1 y AKT a las membranas y suprime la fosforilación de AKT por PDK1. mTORC1 puede, entonces, inhibir la actividad de AKT, incluso en células con mTORC2 activado, indicando una intercomunicación antagónica entre los complejos TOR. Sin embargo, estas interacciones regulatorias no son universales. En *Dictyostelium*, las actividades de PDK1 y TORC2 son completamente independientes de PI3K, y por lo tanto no se observa una intercomunicación antagónica entre los complejos TOR 1 y 2 en el contexto de PI3K y AKT.

En *Dictyostelium*, PDK1 es incapaz de fosforilar a AKT en ausencia de la fosforilación del sitio HM, por lo que AKT requiere *in vivo* la fosforilación tanto del dominio cinasa como del dominio HM, y la sola fosforilación del sitio HM es insuficiente para llevar a cabo su actividad *in vivo* (**Daniel Rosel, 2012**).

mTORC2, originalmente conocido como insensible a rapamicina es probablemente también blanco de rapamicina y está envuelto en la regulación de la fosforilación y activación de AKT/PKB, PKC y SGK. Debido a que AKT regula positivamente a mTORC1, sería razonable especular que mTORC2 actúa como un regulador negativo de la autofagia. Y en efecto, la inhibición de mTORC2 induce la autofagia y la atrofia en células de músculo esquelético en condiciones de ayuno. Sin embargo, la inducción de la autofagia por la inhibición de mTORC2 está mediada principalmente por FoxO3, un factor de transcripción río debajo de AKT, envuelto en la expresión de genes de autofagia (**Chang Hwa Jung, 2010**).

En la célula, la rapamicina se une a la proteína citosólica FKBP12 y luego el complejo Rapamicina-FKBP12 interactúa directamente con la cinasa mTOR e inhibe su actividad. Inicialmente se creía que la rapamicina inhibía solamente al complejo mTORC1, mientras que el complejo mTORC2 era relativamente insensible a ésta, inhibiéndose solo en ciertas líneas celulares cuando eran incubadas con rapamicina por largos periodos de tiempo. Sin embargo, se demostró recientemente que la actividad de mTORC1 no se inhibía por completo con rapamicina. Hasta hace poco, no estaba claro por qué la rapamicina inhibía eficazmente la fosforilación de algunos blancos (S6K) e inhibía pobremente la fosforilación de otros blancos (4EBP). Finalmente se demostró que para mTORC1, la composición aminoacídica del sitio de fosforilación determina la reacción de este sitio ante la presencia/ausencia de factores de crecimiento y aminoácidos en el medio, o al efecto de la rapamicina (**A. A. Parkhitko, 2013**).

TOR ha sido encontrada en muchas localizaciones celulares: mTORC1 se encuentra principalmente en los lisosomas, aunque también en menor medida se encuentra en el núcleo, mitocondria, gránulos de estrés y membrana plasmática. En *Saccharomyces cerevisiae* TORC1 se encuentra en la membrana de las vacuolas, el equivalente de los

lisosomas en organismos superiores. mTORC2 se encuentra principalmente en MAM (Mitochondria-Associated ER Membrane), sin embargo, también se ha encontrado en la membrana plasmática y en el núcleo. TORC2 se encuentra en o cerca de la membrana plasmática (**Charles Betz and Michael N. Hall, 2013**).

mTORC1 es activado directamente por Rheb en la superficie de los lisosomas. Dos condiciones deben cumplirse para que mTORC1 sea activado: la primera es que mTORC1 sea translocado al lisosoma, un proceso estimulado por nutrientes y los Rag (GTPasas heterodiméricas que consisten en RagA o RagB en complejo con RAGC o RagD). La otra condición es que Rheb sea activado. Cuando los niveles citoplasmáticos de aminoácidos son bajos, mTORC1 se encuentra en el citoplasma. La adición de aminoácidos estimula el reclutamiento de mTORC1 a la superficie de lisosomas de una manera dependiente de Rag. Bajo la estimulación con factores de crecimiento, PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa) produce PIP3 en la membrana plasmática, lo que activa a PDK1 y AKT. Una vez que PDK1 fosforila a AKT, esta última fosforila e inhibe el complejo TSC (Tuberous Sclerosis Complex), posiblemente en el lisosoma y el peroxisoma. La actividad GAP reducida del complejo TSC lleva a un incremento de Rheb-GTP. Rheb unido a GTP se une directamente a mTORC1 en la superficie de los lisosomas y lo activa. Se han propuesto varios mecanismos para describir cómo Rag detecta los aminoácidos para activar a mTORC1. Zoncu y colaboradores propusieron que los aminoácidos son detectados en el lumen del lisosoma por la v-ATPasa, que después activa a Rag vía el *Ragulator*, que es el complejo que une a las Rag con el lisosoma (**Roberto Zoncu, 2011**). Ögmundsdóttir y colaboradores reportaron que el transportador lisosomal de aminoácidos asistido por protones PAT1, interactúa directamente con Rag para activar a mTORC1 (**Margrét H. Ögmundsdóttir, 2012**). Durán y colaboradores propusieron que la Leucina y la Glutamina son detectadas vía glutaminólisis (**Raúl V. Durán, 2012**). Interesantemente, bajo periodos prolongados de falta de aminoácidos, mTORC1 es reactivado por aminoácidos provenientes de lisis autofagosomal, previniendo así la autofagia adicional (**Charles Betz & Michael N. Hall, 2013**).

TOR funciona como un sensor del estado nutricional, el cual es inhibido en condiciones de falta de nutrientes, un paso crucial para la inducción de la autofagia en eucariotas. La

función de TOR en levaduras y eucariontes superiores comprende la regulación de la traducción, metabolismo y transcripción en respuesta a los nutrientes y factores de crecimiento. La glucosa puede regular a mTORC1 a través de al menos tres diferentes vías: la falta de glucosa reduce la proporción de ATP y AMP, activando AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), como consecuencia la AMPK activada inhibe a mTORC1 a través de la fosforilación y activación de TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) un regulador negativo de mTORC1. AMPK también puede inhibir mTORC1 sin depender de TSC2. Además, se ha propuesto una tercera vía que censa la glucosa, la cual involucra la participación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que regula negativamente la señalización RHEB-mTORC1 independientemente de TSC2. Por otro lado, TOR también funciona como un sensor de estrés: la hipoxia regula mTORC1 vía REDD1 y las especies reactivas de oxígeno y sus efectos inhibitorios en la función mitocondrial pueden, de alguna manera, desencadenar la autofagia mitocondrial de una manera dependiente de mTORC1 (**Chang Hwa Jung, 2010**).

La autofagia es el principal proceso catabólico que participa en la entrega y degradación lisosomal de componentes de larga vida intracelulares tales como: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y organelos. El proceso comienza con la formación de una estructura preautofagosomal, de la cual se produce una membrana fagofora. Una vez que se toma el contenido citoplasmático y se cierra la fagofora, se produce un autofagosoma, el cual después se fusiona con un lisosoma, formando un autolisosoma. La autofagia se activa rápidamente en células con insuficiencia de aminoácidos. El complejo mTORC1 es el principal sensor celular que reacciona a la presencia de aminoácidos en el medio. En la presencia de aminoácidos, este complejo es activado y fosforila directamente proteínas del complejo ULK1,2- Atg13-FIP200, inactivándolo, lo cual lleva a la inhibición de la autofagia. Correspondientemente, usando el inhibidor rapamicina o la ausencia de aminoácidos causan la inhibición de mTORC1 y la activación del complejo ULK1, 2- Atg13-FIP200, a su vez, mTORC1 puede fosforilar a la proteína DAP1 (Death Associated Protein 1), la cual inhibe la autofagia, esto podría funcionar como una protección contra la sobreactivación de la autofagia (**A. A. Parkhitko, 2013 & Chang Hwa Jung, 2010**).

Además de regular la traducción y el metabolismo dependiendo de la presencia de nutrientes y oxígeno, mTORC1 puede además recibir señales de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y daño al ADN. La proteína supresora de tumor p53 es una mediadora de estas señales. Bajo condiciones genotóxicas y estrés oxidativo, la proteína p53 activa la transcripción de los genes PTEN, TSC2 y Redd1, que han mostrado ser capaces de inhibir la actividad de mTORC1 (A. A. Parkhitko, 2013).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En 2011 se catalogaron los kinomas de tres cepas secuenciadas de *Giardia* y la comparación de éstos con los kinomas publicados de *Trichomonas vaginalis* y *Leishmania major* demostró que las 80 cinasas centrales de *Giardia* constituyen el kinoma más pequeño conocido para cualquier eucarionte que pueda crecer en cultivo puro, reflejando tanto su origen temprano como la pérdida secundaria de genes. De las 80 cinasas centrales del kinoma de *Giardia*, 61 pueden clasificarse en 49 clases distintas (familias o subfamilias) que están conservadas en muchos otros eucariontes, las 19 restantes incluyen 5 en dos familias específicas de *Giardia*, y 14 sin homólogos cercanos. Así mismo, los autores mencionan que *Giardia* es el único organismo eucarionte al que le faltan 3 de las PIKKs: ATM, ATR y DNAPK, proteínas cinasas envueltas en el reconocimiento y reparación de rupturas de ADN y que *Giardia* tiene homólogos de proteínas de reparación de rupturas de ADN, incluidos MRE11 y RAD50, aunque interesantemente el tercer componente no fue identificado y por eso se refiere como el complejo MR, y se demostró que las proteínas Mre11 y Rad50 de *Giardia* poseen las actividades catalíticas típicas y que la reparación de rupturas de ADN es funcional (Torres-Huerta y cols 2016; A. Sandoval-Cabrera y cols, 2015). Por lo cual se concluyó que el kinoma reducido de *Giardia* arroja nueva luz en la evolución temprana de las cinasas, y sus secuencias altamente divergentes definen nuevas familias de cinasas y ofrecen blancos terapéuticos (Gerard Manning, 2011).

Así mismo, en 2007 se describió al genoma de *Giardia duodenalis* como minimalista, al ser compacto en estructura y contenido y por poseer maquinarias simplificadas de replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN y vías metabólicas. En muchas vías que

requieren complejos multiproteicos, es notorio que *Giardia* posee menos componentes que otros organismos. Tal vez esto se deba a la divergencia temprana o a reducción genómica, la composición del genoma revela valiosos hallazgos de cuáles son componentes mínimos necesarios para que el parásito lleve a cabo procesos celulares complejos (Hilary G. Morrison, 2007).

Utilizando BLAST, Hilary G. Morrison y colaboradores detectaron en 2002 una PIKK en el genoma de *Giardia duodenalis*, a la cual denominaron como gTOR, identificando los dominios conservados en la PIKK predicha, por búsqueda PFAM, las secuencias predichas de la proteína fueron alineadas a homólogos eucarióticos, encontrando que el sitio de unión a rapamicina no se encuentra conservado en *Giardia* (Fig. 4). Predijeron un marco abierto de lectura de 7812 nucleótidos que codifica para una proteína de 2604 aminoácidos. El análisis de PFAM de los homólogos PIKK de *Giardia* identificó tres regiones funcionales presentes en todas las PIKK: los dominios FAT, PI3_PI4K y FATC. No obstante, se encontró que el dominio de unión al complejo FKBP12-Rapamicina (Dominio FRB) no se encuentra bien conservado en *Giardia duodenalis*, específicamente tres de los siete residuos críticos para la unión no se encuentran conservados.

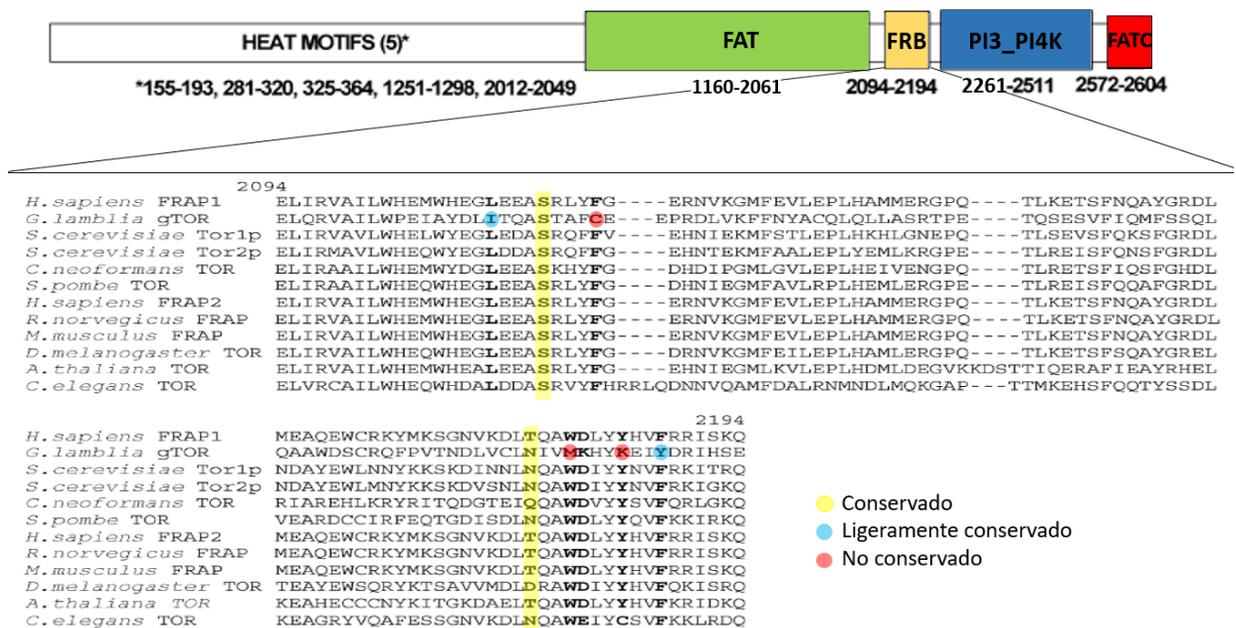


Fig. 4. Organización estructural de la proteína gTOR (superior) y demostración de la pérdida de los residuos de unión al complejo FKBP12-Rapamicina. Los números indican los límites de cada región identificados por REP (repetidos HEAT) o PFAM (dominios FAT, PI3_PI4K y FATC). Además de estos tres dominios característicos de las PIKK, identificaron una región de unión a FKBP-Rapamicina (región FRB). Debido a las semejanzas, llamaron gTOR a esta PIKK predicha en *Giardia*, sin embargo, encontraron que los residuos críticos de la región FRB de las proteínas FRAP/TOR para la unión con rapamicina no se encuentran bien conservados en el homólogo PIKK de *Giardia*. El alineamiento abarca los aminoácidos 2094 a 2194 de gTOR. Modificado de Hilary G. Morrison, 2002.

Adicionalmente detectaron un homólogo bien conservado de la proteína FKBP con un tamaño predicho de 109 aminoácidos. La inspección del alineamiento revela que gFKBP retiene 10 de los 12 residuos críticos para la unión con rapamicina de la FKBP12 humana.

(Fig. 5)



Fig. 5. Alineamiento del homólogo FKBP12 de *Giardia* con otros FKBP12s eucarióticos. Se indican los residuos importantes para la unión por puentes de hidrógeno (+) y contactos hidrofóbicos (*) entre la FKBP12 humana y rapamicina. Las letras mayúsculas indican un match de 66% a la secuencia consenso. Tomado de Hilary G. Morrison, 2002.

Finalmente demostraron la expresión del gen gTOR a través de ensayos Northern blot (Hilary G. Morrison, 2002).

Por otro lado, Valdez y colaboradores encontraron que el mismo gen, detectado *in silico* y nombrado como gTOR por Morrison y colaboradores e identificado en la base de datos de *Giardia* con el número de acceso GL50803_35180, es el mejor candidato como gen putativo de ATM en *Giardia*, con un valor E estadísticamente confiable de $8e-114$ y que la expresión del transcrito de este gen tiene un aumento estadísticamente significativo 60 min después de irradiar trofozoítos con una dosis de 100 Gy de radiación ionizante (**Fig. 6**).

Sin embargo, ni el uso del inhibidor específico de ATM, KU-55933 (**Fig. 7**), ni el uso del inhibidor específico de TOR llamado rapamicina (**Fig. 8**) lograron inhibir la actividad cinasa de la proteína putativa ATM/Tel1 observada como fosforilación de la histona H2A, lo cual podría deberse a que dichos inhibidores no penetraron a través de la membrana celular de los trofozoítos, por lo cual se sugirió realizar ensayos *in vitro* con sustratos específicos de TOR y ATM en estudios posteriores. (**Claudia Valdez Vargas, 2014**).

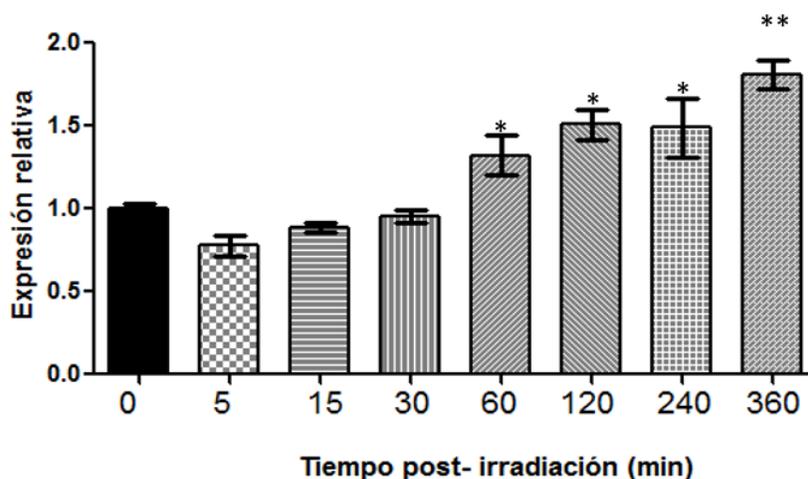


Fig. 6. Determinación de la expresión relativa de GdATM. Las muestras analizadas corresponden a la cinética post-irradiación de 3 ensayos biológicos por duplicado. Extraído de Claudia Valdez Vargas, 2014.

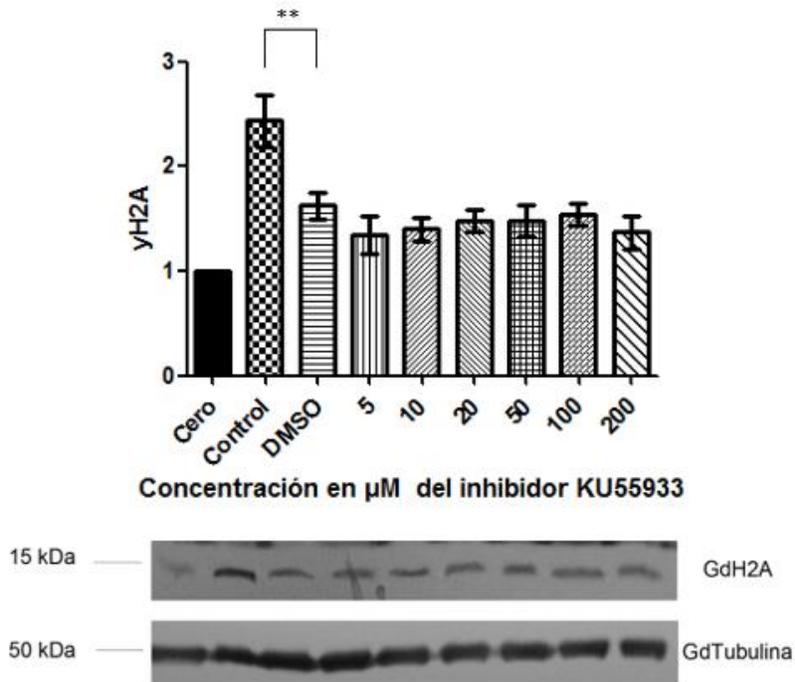


Fig. 7. Determinación de GdH2A fosforilada en extractos de trofozoítos de *Giardia duodenalis* a 1 hora post-irradiación e incubados con inhibidor KU55933. Tomado de Claudia Valdez Vargas, 2014.

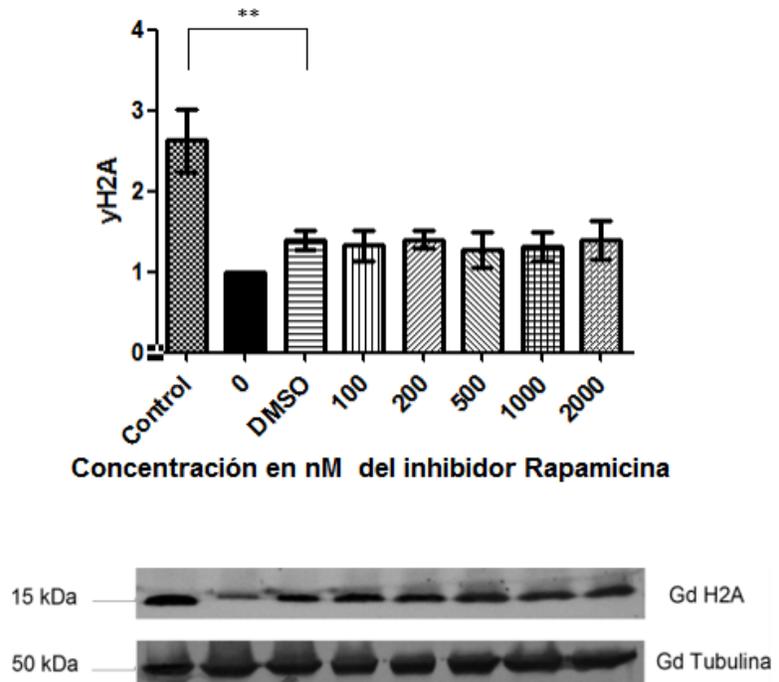


Fig. 8. Determinación de GdH2A fosforilada en extractos de trofozoítos de *Giardia duodenalis* a 1 hora post-irradiación e incubados con el inhibidor Rapamicina. Tomado de Claudia Valdez Vargas, 2014.

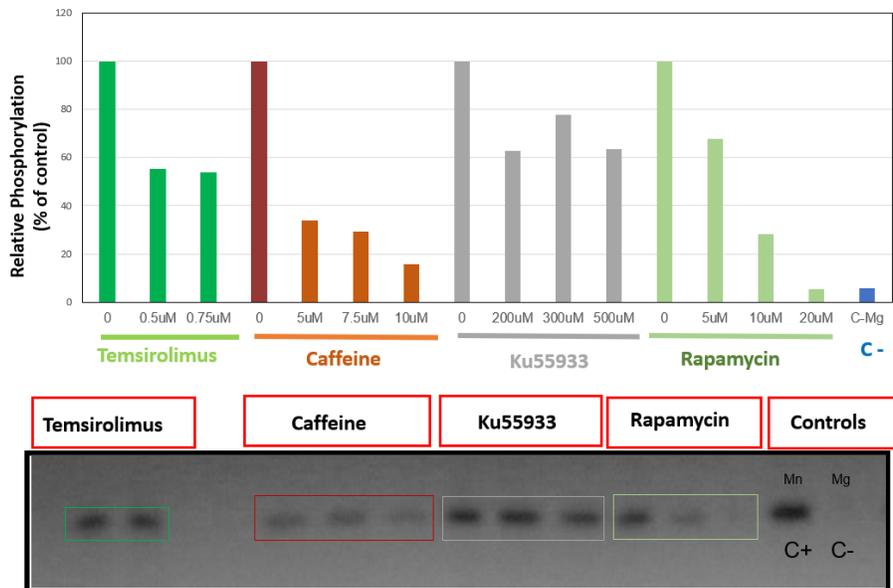


Fig. 9. Ensayo de actividad de cinasa *in vitro* utilizando la proteína gTOR/ATM-3HA y el sustrato PHAS-I de *Homo sapiens* (4EBP) (Dra. Bazán Tejeda, datos no publicados).

Posteriormente, debido a que los inhibidores no tuvieron efecto *in vivo*, en nuestro grupo de trabajo se encontró, mediante ensayos de actividad de cinasa *in vitro* utilizando a la proteína gTOR/ATM-3HA y el sustrato PHAS-I humano (conocido también como 4EBP), que en efecto la proteína gTOR/ATM-3HA pertenece a la familia PIKK puesto que el uso de un inhibidor específico de los miembros de esta familia disminuyó la actividad de cinasa observada como fosforilación del blanco PHAS-I. Así mismo, se encontró que si bien el dominio FRB no se encuentra del todo conservado en *Giardia* (Fig. 4), sí es funcional, ya que el uso de inhibidores específicos de TOR como Rapamicina y Temeirolimus disminuyen la actividad cinasa de esta proteína de manera semejante a la cafeína e interesantemente, el uso del inhibidor específico de ATM KU55933, disminuyó también la actividad *in vitro* de cinasa de esta proteína gTOR/ATM-3HA (Fig. 9).

Interesantemente, Kyu-Tae Kim y colaboradores reportaron en 2005 un homólogo de AKT en *Giardia duodenalis* y que parece estar involucrada en vías de señalización y es diferencialmente expresada durante el enquistamiento, habiendo un aumento significativo en la expresión de GiPKB a partir de las 17 horas después de la inducción del enquistamiento (Fig. 10) (Kyu-Tae Kim, 2005).

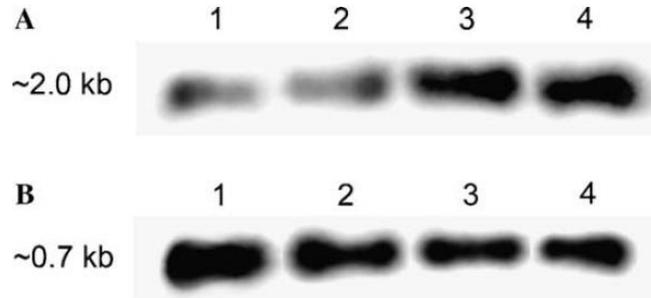


Fig. 10. Expresión de GiPKB (sonda A). El ARN total usado fue extraído de trofozoítos sin enquistar, línea 1; trofozoítos 8 horas después de la inducción a enquistamiento, línea 2; trofozoítos 17 horas después de la inducción a enquistamiento, línea 3; y trofozoítos 24 horas después de la inducción a enquistamiento, línea 4. Tomado de Kyu-Tae Kim, 2005.

Cabe destacar que AKT (PKB) es un blanco del complejo mTORC2 en eucariontes superiores, y una de las funciones de este complejo es la señalización involucrada en rearrreglos del citoesqueleto, proceso requerido durante el enquistamiento.

Finalmente, en 2011 se reportó que el uso de inhibidores de mTOR, como rapamicina, en células de cáncer de mama resulta en una radiosensibilización que ocurre vía interrupción de las dos principales vías de reparación de rupturas de doble cadena de ADN: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ), resultando en la acumulación de rupturas de doble cadena después de someter a las células MCF7 a 8 Gy de radiación ionizante (**Fig. 11**).

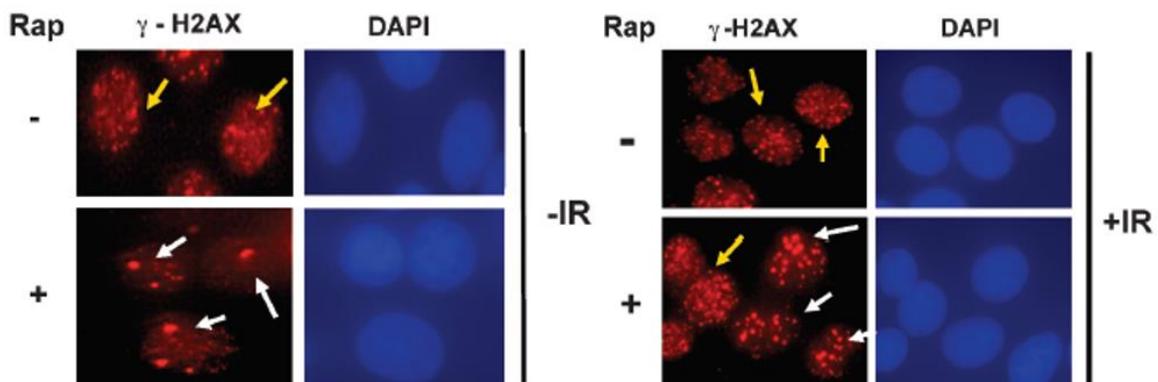


Fig. 11. El pretratamiento de células de cáncer mama con inhibidores de mTOR produce la acumulación de rupturas de doble cadena de ADN (DSBs) inducidas con radiación ionizante. Tomado de Honghong Chen, 2011).

Esto resulta de gran interés porque relaciona directamente a la proteína mTOR con la reparación del ADN, y por ende establece una relación entre las cinasas mTOR y ATM. Este fenómeno se atribuyó al desapareamiento del reclutamiento de BRCA1 y Rad51 a los focos de reparación del ADN, ambos esenciales para la recombinación homóloga (**Honghong Chen, 2011**).

Debido a lo anterior mencionado y a que no se tiene conocimiento de la función de TOR en *Giardia*, y a que existe la posibilidad de que ATM/Tel1 tenga una función dual como gTOR dado el minimalismo de *Giardia*, en este trabajo nos proponemos caracterizar la función y caracterización del gen putativo TOR de *Giardia*.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que no se tiene conocimiento de la función de TOR en *Giardia*, al kinoma reducido y al minimalismo característico de *Giardia duodenalis*, es posible que ATM pudiera tener una función dual como gTOR. Las proteínas cinasas son bien estudiadas en otros organismos, controlan la mayoría de los aspectos de las funciones celulares y son potencialmente blancos terapéuticos. Por lo tanto, estudiar la posible actividad gTOR de la cinasa ATM de *Giardia* podría dar una visión valiosa de la biología del parásito y la evolución de la señalización.

HIPÓTESIS

La proteína ATM/Tel1 de *Giardia duodenalis* tiene un papel dual como gTOR y es capaz de fosforilar a los blancos putativos de mTOR en *Giardia*.

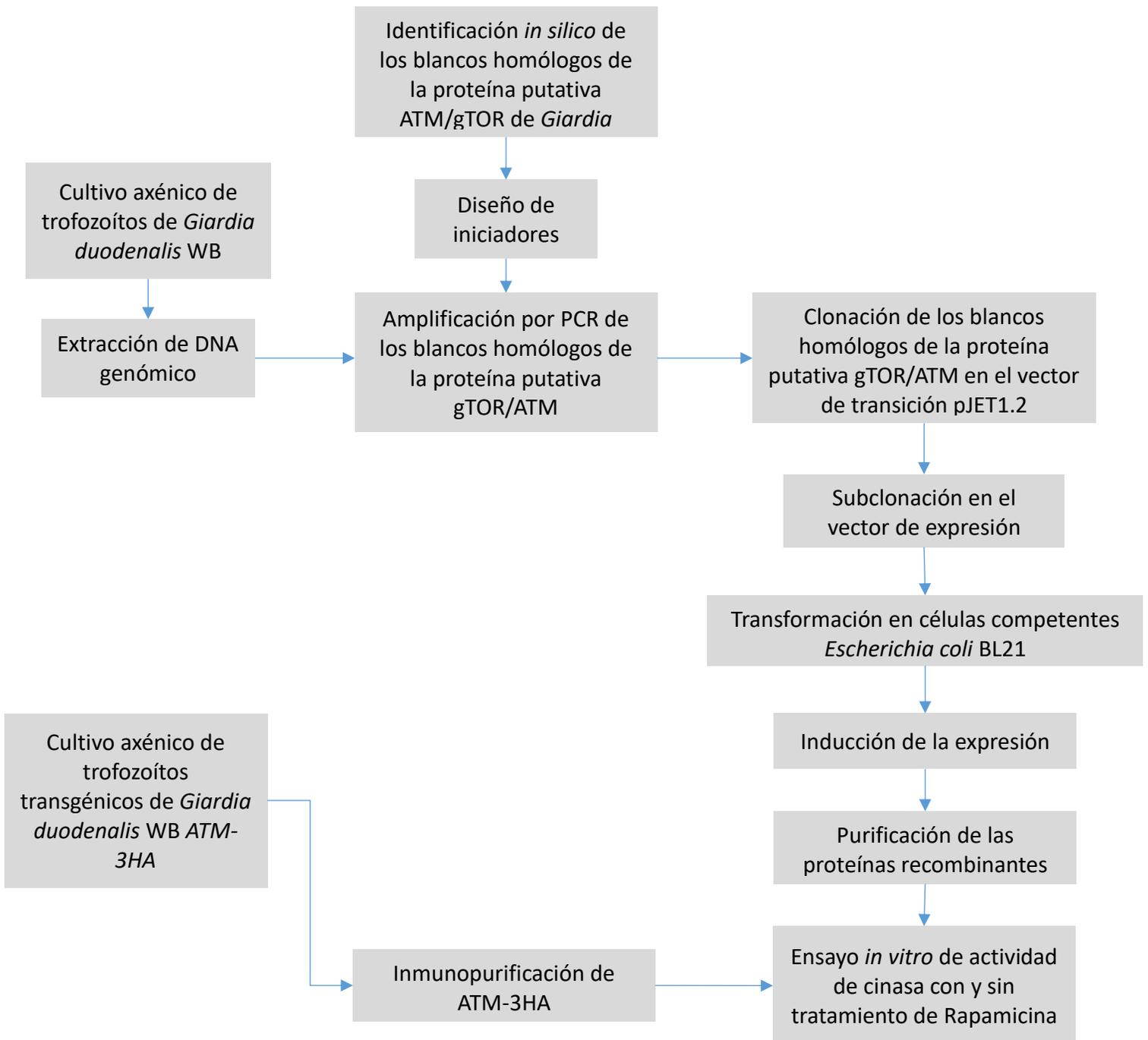
OBJETIVO GENERAL

Identificar la posible actividad gTOR de la proteína ATM/Tel1 de *Giardia duodenalis* mediante la fosforilación de los blancos putativos de mTOR s6k, 4EBP y Akt del parásito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar *in silico* los genes putativos s6k, 4EBP y Akt de gTOR en *Giardia duodenalis*.
2. Clonar, purificar y expresar algunos de los blancos de gTOR putativo.
3. Purificar la proteína putativa gTOR/ATM
4. Determinar la actividad *in vitro* de cinasa de gTOR/ATM en los blancos putativos de gTOR de *Giardia duodenalis* recombinantes con y sin tratamiento de rapamicina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Identificación *in silico* de los blancos de gTOR

Se buscaron los blancos putativos de fosforilación de gTOR a través de las herramientas bioinformáticas Delta BLAST, BLASTn y BLASTx de NCBI, así como la herramienta BLASTp de la base de datos de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb>), ingresando las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, según corresponda, de los tres blancos de fosforilación más estudiados de TOR: S6K, 4EBP y AKT de *Homo sapiens* o de organismos evolutivamente más relacionados con *Giardia duodenalis*.

Para identificar los motifs funcionales y estructurales importantes para los blancos putativos de gTOR, se hizo un alineamiento con base en la estructura secundaria y a partir de un archivo de la proteína cristalizada de cada blanco de fosforilación utilizando el programa ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). Primero se generó un alineamiento con el programa ClustalW, las secuencias ingresadas son las siguientes: AKT1-001 (*Homo sapiens*, ENST00000349310.7), Sch9 (*Saccharomyces cerevisiae*, NP_012075.1), Ypk1p (*Saccharomyces cerevisiae*, EGA85896.1), AKT (*Giardia duodenalis*, EES98311.1) y AGC Family Protein Kinase (*Trichomonas vaginalis*, XP_001329056_1). Una vez disponible el archivo con extensión aln fue introducido en ESPript 3.0, subiendo además el archivo con la estructura cristalizada de la proteína AKT1 de *Homo sapiens*, con extensión pdb (Identificada como 4EKL en RCSB Protein Data Bank).

Diseño de iniciadores

Diseño para clonación en el vector de expresión pPROEX-I por ligación convencional:

Una vez obtenidas las secuencias de los ortólogos putativos de los blancos de gTOR identificados en formato FASTA, se ingresaron en el programa Oligo7, Versión 7.57 (Molecular Biology Insights, Inc.) y se modificó el tamaño de los iniciadores sentido y antisentido hasta obtener el tamaño mínimo con el cual no se generaran estructuras secundarias y a su vez, que las temperaturas de alineamiento de ambos iniciadores fueran cercanas entre sí y que la temperatura de alineamiento del iniciador con menor T_m y el

producto fuera menor a 29° C (según lo indicado en el manual del programa Oligo 7). Adicionalmente, al iniciador sentido se le agregó el sitio de restricción EcoRI en la posición 5'; por otro lado, al iniciador antisentido se le agregó el sitio de restricción BamHI en la posición 5'.

AKT de <i>Giardia duodenalis</i> (diseñados en este trabajo)	
AKT-F1:	5'-GAATTCTGATGAGCGACACAGACGTGC-3'
AKT-R1:	5'-GGATCCCTATAGTTTATCAAATGCGTCCTGTGC-3'
Tamaño del producto de PCR: 1775 pb	

Diseño para clonación en el vector de expresión PET100/D-TOPO por ligación de Gibson: Una vez obtenida la secuencia en formato FASTA de los ortólogos putativos identificados de gTOR, se clonaron *in silico* en el programa Vector NTI Advance, Versión 11.0 (Invitrogen Corporation) y las secuencias resultantes se ingresaron en el programa Oligo7, Versión 7.57 (Molecular Biology Insights, Inc.), a continuación se modificó el tamaño de los iniciadores sentido y antisentido hasta obtener el tamaño mínimo con el cual no se generaran estructuras secundarias y a su vez, que las temperaturas de alineamiento de ambos iniciadores fueran cercanas entre sí y que la temperatura de alineamiento del iniciador con menor Tm y el producto fuera menor a 29° C. Después se agregaron 20-pb complementarias al vector de expresión PET100/D-TOPO en el extremo 5' de ambos iniciadores, así como las bases necesarias para mantener los sitios de restricción NheI en el iniciador sentido y SacI en el iniciador antisentido, finalmente se verificó la ausencia de formación de estructuras secundarias.

AKT de <i>Giardia duodenalis</i> (diseñados en este trabajo)	
AKT-F2:	5'-TCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGAGCGACACAGACGTGC-3'
AKT-R2	5' AGCAGCCGGATCGTTGAGCTCCTATAGTTTATCAAATGCGTCCTGTGC-3'
Tamaño del producto de PCR: 1807 pb	

Cultivos y cepas:

Los trofozoítos de *Giardia duodenalis* de la cepa WB, genotipo A1, se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33, pH= 6.8, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone®) y 1% de antibiótico-antimicótico (Hyclone®) y se mantuvieron a 37°C en condiciones microaerófilas.

Los trofozoítos transgénicos de *Giardia duodenalis* (ATM-3HA), se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33, pH=6.8, suplementado con 0% de suero fetal bovino (Hyclone®), 1% de antibiótico-antimicótico (Hyclone®) y Geneticina a una concentración final de 200 µg/mL y se mantuvieron a 37° C en condiciones microaerófilas.

La cepa de *Escherichia coli* Sure-2 (e14⁻(McrA^e) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]), se creció en medio LB y se incubó a 37°C; se adicionó Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL cuando fue requerido.

La cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]), se creció en medio LB y se incubó a 37°C; se adicionó Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL cuando fue requerido.

La cepa de *Escherichia coli* SOLUBL21 (Catherine L. Deatherage, 2012), se creció en medio LB y se incubó a 37°C; se adicionó Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL cuando fue requerido.

Extracción de ADN genómico de *Giardia duodenalis*:

Se partió de un cultivo confluyente de trofozoítos de *Giardia duodenalis* del aislado WB, genotipo A1, contenido en un tubo Falcon de 15 mL, éste se incubó de 30 min a 4° C para despegar las células adheridas en la pared del tubo, posteriormente se centrifugó a 8,000 xg por 3 min a 4° C para formar el botón celular. Se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1X frío (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4), resuspendiendo el paquete celular en cada lavado. A continuación, se incubó 16 h a 65° C en 350 µL de buffer

de lisis de *Giardia* (20 mM tris-HCl pH 7.4, 25 mM EDTA, 25 mM NaCl, 1% SDS, pH=7.4). Posteriormente, se incubó con RNasa a una concentración final de 10 µg/mL por 2 h a 65° C, transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción del ADN por la técnica de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), agregando un volumen igual a la muestra, se mezcló hasta formar una emulsión y se centrifugó a 16,000 xg/ 10 min, se recuperó la fase acuosa y el ADN se precipitó con 10% de acetato de sodio 3 M más dos volúmenes de etanol absoluto frío, a continuación se dejó a -20° C durante 16h, se centrifugó a 16,000 xg/ 20 min, se decantó el sobrenadante y se lavó tres veces con etanol al 70% a 16,000 xg/ 5 min para eliminar sales, se decantó y se secó a temperatura ambiente, finalmente se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua inyectable estéril.

La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrofotometría con Nanodrop 2000.

Control de integridad y especificidad del ADN genómico de *Giardia duodenalis*

La integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con regulador TBE 0.5X (0.0445 M Tris, 0.0445 M Ácido Bórico, 0.001 M EDTA). Adicionalmente, la especificidad del ADN genómico fue verificado mediante PCR del gen PDI-1 de *Giardia duodenalis* con los siguientes iniciadores (ver anexos):

PDI-1de <i>Giardia duodenalis</i>	
Iniciador sentido (PDI-F):	5'-ACTCCTCTGCTCCTTG TG-3'
Iniciador antisentido (PDI-R):	5'-CTCCTTCGCTGCTTTTCAC-3'
Tamaño del producto de PCR: 423 pb	

Condiciones de reacción		30 ciclos
Desnaturalización inicial	94° C, 5 min	
Desnaturalización	94° C, 30 s	
Alineamiento	55° C, 30 s	
Extensión	72° C, 30 s	
Extensión final	72° C, 7 min	
Incubación	4° C, ∞	

Clonación de GdAKT en el vector de expresión pPROEX-I

Amplificación por PCR de GdAKT para su clonación en el vector pPROEX-I por ligación convencional:

Se probaron los iniciadores GdAKT-F1 y GdAKTR1 (ver anexos) diseñados para la clonación del ortólogo putativo de GdAKT mediante una PCR, partiendo de ADN genómico de *Giardia duodenalis*, del aislado WB (genotipo A1), como molde. A continuación, se muestra el contenido de la reacción y las condiciones de reacción:

Contenido de la reacción	
2X Phusion® Master Mix (NEB)	75 µL
GdAKT-F1, 10 µM	7.5 µL
GdAKT-R1, 10 µM	7.5 µL
ADN molde, 100 ng	3 µL
Agua estéril libre de nucleasas	Hasta 150 µL

Condiciones de reacción		
Desnaturalización inicial	98° C, 30 s	25 ciclos
Desnaturalización	98° C, 10 s	
Alineamiento	59.5° C, 30 s	
Extensión	72° C, 53 s	
Extensión final	72° C, 10 min	
Incubación	4° C, ∞	

Purificación de fragmentos de ADN por electroelución:

Una vez terminada la amplificación del gen GdAKT por PCR, se cargó en un gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis de ADN a 100 V durante 1 h. A continuación se cortó la banda del amplicón de tamaño esperado y se colocó en el receptáculo de una cámara de electroelución cercano a los canales en forma de “V”, se cargaron 100 µL de acetato de

amonio 9 M y se electroeluyó a 100 V durante 1.5 h. Pasado el tiempo de electroelución, se tomaron aproximadamente 250 μL del canal V, y se agregó 10% de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol de grado biología molecular al 100%, se mezcló y se incubó a -20° durante 16 h. Después, se centrifugó a 16,000 xg por 20 minutos y se lavó 3 veces con etanol al 70%, finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μL de agua estéril libre de nucleasas. La concentración del inserto se evaluó por espectrofotometría con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Ligación con pJET1.2/blunt y transformación

Se hizo la siguiente mezcla de ligación, manteniendo en hielo:

2X Reaction Buffer	5 μL
Producto de PCR purificado	4 μL
pJET1.2/blunt 50 ng/ μL	0.5 μL
Ligasa T4	0.5 μL
Agua	Hasta 10 μL

Se dejó incubar en hielo por 10 minutos y después, la totalidad de la reacción de ligación se transformó en una alícuota de 50 μL de células quimiocompetentes *Escherichia coli* SURE2 (ver anexos), incubando 30 min en hielo, posteriormente se sometieron las células a choque térmico, incubando 1 min a 42°C e inmediatamente después se colocaron en hielo por 2 min. Se adicionó un volumen de 250 μL de medio LB sin ampicilina y se incubaron a 37°C durante 1 h en agitación constante. Finalmente, se plaqueó uniformemente la totalidad de la suspensión bacteriana transformada en una caja Petri con medio LB sólido conteniendo ampicilina a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C por 18 h.

PCR de colonia

Partiendo de colonias frescas, se suspendió cada una en 20 μL de agua estéril libre de nucleasas y se hirvieron las suspensiones durante 5 min. Después se centrifugaron 1 min a

16,000 xg. A continuación, éstas se tomaron como ADN molde y se incluyeron en la reacción de PCR como se indica:

Taq Buffer +KCl –MgCl ₂ 10X	2.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL
GdAKT-F1, 10 µM	0.5 µL
GdAKT-R1, 10 µM	0.5 µL
ADN molde, 5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL
Taq Polimerasa (Thermo Scientific®)	0.125 µL

Condiciones de reacción		
Desnaturalización inicial	94° C, 5 min	25 ciclos
Desnaturalización	94° C, 30 s	
Alineamiento	59.5° C, 30 s	
Extensión	72° C, 1 min	
Extensión final	72° C, 7 min	
Incubación	4° C, ∞	

Extracción de plásmidos bacterianos por Easyprep

Se siguió el protocolo del tomo 1, apartado 1.29 de Sambrook, partiendo de un cultivo puro de *Escherichia coli* de la cepa SURE2, XL1-Blue o SOLU-BL21 en medio LB líquido con 100 µg/mL de Ampicilina, se colectó el paquete celular y se agregó un volumen de 60 µL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM EDTA, 0.1 mg/mL BSA, 0.2 mg/mL RNAsa A, 15% m/v Sacarosa, 2mg/mL Lisozima) por cada 3 mL de cultivo, resuspendiendo la pastilla sin hacer burbujas. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y después se hirvió 1 min, inmediatamente después se colocó en hielo durante 1 min y se centrifugó a 16,000 xg durante 15 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20° C (**Joseph Sambrook, 1989**).

Extracción de plásmidos bacterianos por Miniprep

Se siguió el protocolo establecido en el tomo 1, apartado 1.34 de Sambrook, partiendo de un cultivo puro de *Escherichia coli* de la cepa SURE2, XL1-Blue o SOLU-BL21 (ver anexos) en medio LB líquido con 100 µg/mL de Ampicilina, se colectó el paquete celular y se lavó una vez con Buffer STET (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA pH=8, 5% Tritón X-100) para después resuspenderlo en 350 µL de Buffer STET por cada 3 mL de cultivo crecido durante 18h a 37° C y en agitación constante, se agregó un volumen de 25 mL de lisozima (10mg/mL) y se incubó 4 min a temperatura ambiente. El preparado se hirvió por 1.5min y en seguida se colocó en hielo por 30s. A continuación, se centrifugó a 14,000 xg por 10 min y al sobrenadante se agregó un volumen de 4 µL de RNAsa A (10mg/mL), se incubó 20 min a 65° C y después se agregó un volumen igual de Fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión y se centrifugó 5 min a 14,000 xg. A continuación, se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN agregando 10% de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% de grado biología molecular, incubando 16 h a -20° C. Después, se centrifugó a 14,000 xg por 20 min y se lavó 3 veces la pastilla de ADN con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió la pastilla de ADN en 50-100 µL de agua estéril libre de nucleasas (**Joseph Sambrook, 1989**).

Purificación de fragmentos de ADN por electrodiálisis

Para realizar la subclonación en el vector de expresión pPROEX-I, primero se digirió el vector de expresión con el par de enzimas EcoRI y BamHI, utilizando 20 µg de vector en un volumen total de reacción de digestión de 250 µL. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis de ADN a 100 V durante 1 h. Se cortó la banda del gel, correspondiente al vector vacío y se purificó de la siguiente manera: se colocó el fragmento de gel en una membrana Spectra/Por®2 (12-14 kDa), se aseguró un lado de la membrana con una pinza y se agregaron 300 µL de Buffer TBE en el interior, después se aseguró el otro lado de la membrana con otra pinza y se sumergió en una cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE, después, se dejó correr la electroforesis de ADN a 100 V hasta que

todo el ADN se saliera del gel, inspeccionando con una lámpara UV. Posteriormente, se recuperó el buffer TBE del interior de la bolsa, conteniendo ADN y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, agregando 10% de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% de grado biología molecular, se mezcló y se dejó precipitar por 16 h a -20° C. Finalmente, se centrifugó a 16,000 xg por 20 min, se lavó a pastilla 3 veces con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración se verificó por espectrofotometría con Nanodrop 2000.

Restricción y ligación con el vector de expresión pPROEX-I

Una vez clonado el gen GdAKT en el vector de transición pJET1.2/blunt, se digirió con el par de enzimas EcoRI (New England BioLabs®) y BamHI (New England BioLabs®), se cargó en un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo la electroforesis a 110 V durante 1 h, a continuación, se purificó la banda correspondiente al inserto GdAKT por electrodiálisis.

Una vez disponibles ambos fragmentos puros (vector vacío e inserto), se prepararon mezclas de ligación con volúmenes finales de 20 µL y con proporciones vector:inserto de 1:3, 1:5 1:6 y 1:10, estas reacciones de ligación se transformaron en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* SURE2 y XL1-blue y en células electrocompetentes de *Escherichia coli* SURE2.

Clonación de GdAKT en el vector de expresión PET100/D-TOPO

Amplificación por PCR de GdAKT para la clonación en el vector PET100/D-TOPO por ligación Gibson:

Se probaron los iniciadores GdAKT-F2 y GdAKT-R2 (ver anexos) diseñados para la clonación del ortólogo putativo de GdAKT mediante una PCR, partiendo de ADN genómico de *Giardia duodenalis*, del aislado WB (genotipo A1), como molde. A continuación, se muestra el contenido de la reacción y las condiciones de reacción:

Contenido de la reacción	
5X Phusion HF Buffer	50 μ L
GdAKT-F2, 10 μ M	12.5 μ L
GdAKT-R2, 10 μ M	12.5 μ L
dNTPs, 10 mM	5 μ L
ADN molde	2.5 μ L
Phusion DNA Polymerase	2.5 μ L
Agua estéril libre de nucleasas	Hasta 250 μ L

Condiciones de reacción		
Desnaturalización inicial	98° C, 30 s	
Desnaturalización	98° C, 10 s	5 ciclos
Alineamiento	58.1° C, 30 s	
Extensión	72° C, 1 min	
Desnaturalización	94° C, 30 s	30 ciclos
Alineamiento + Extensión	70° C, 2 min 10 s	
Extensión final	72° C, 10 min	
Incubación	4° C, ∞	

El volumen total de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% con regulador 1x TBE y se llevó a cabo la electroforesis por 1 h a 100 V, después se cortó la banda de tamaño esperado y se purificó por electrodiálisis.

Extracción de plásmidos bacterianos por Midiprep

Partiendo de un cultivo puro de 150 mL de bacterias transformadas con el vector de expresión PET100:GdRAD51, complementado con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL, se repartió en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 6,000 xg por 15 min a 4° C. Después se resuspendió la pastilla celular de 150 mL de cultivo en 4 mL de buffer P1 frío, a continuación, se agregaron 4 mL de buffer P2 y se agitó vigorosamente, incubando

5 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 4 mL de buffer P3 frío y se mezcló vigorosamente, incubando 15 min en hielo inmediatamente después. En seguida, se centrifugó a 16,000 xg por 10 min a 4° C. Después, se equilibró una columna QIAGEN-tip100 aplicando 4 mL de buffer QBT y permitiendo que se vaciara la resina por acción de la gravedad y se lavó la columna con 10 mL de buffer QC. En seguida, se eluyó el ADN con 5 mL de buffer QF y se precipitó agregando 3.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 16,000 xg por 30 min y lavando la pastilla de ADN con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 200 µL de agua estéril libre de nucleasas.

Restricción del vector de expresión PET100:GdRAD51

Se digirieron 30 µg de vector PET100 con el gen RAD51 e *Giardia duodenalis* como inserto, con el par de enzimas NheI y SacI como se indica a continuación:

SacI (New Engalnd BioLabs®)	15 µL
NheI (New Engalnd BioLabs®)	30 µL
NEBuffer 1.1	30 µL
PET100:GdRAD51	30 µg
Agua	Hasta 300 µL

La digestión se incubó por 16 h a 37° C y después se cargó en un gel de agarosa al 1% con regulador TBE, se cortó la banda correspondiente al vector vacío y se purificó por electrodiálisis.

Ligación Gibson en el vector de expresión PET100 vacío

Una vez purificados el inserto y el vector de expresión vacío, se concentraron en un concentrador de vacío (Vacufuge™ Eppendorf) y se preparó la mezcla de ligación de Gibson, con una proporción vector:inserto de 1:3:

PET100 vacío	500 ng
GdAKT	474 ng
Gibson mix	15 µL
Agua	Hasta 22 µL

A continuación, se incubó la reacción a 50° C, 1 h y se transformó la mitad de la mezcla en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* XL1-Blue.

Las candidatas se analizaron por PCR, restricción y secuenciación.

Análisis de candidatas por PCR

Primero se realizaron extracciones de plásmido Easyprep de las candidatas, y en seguida se prepararon los mix de PCR como se indica:

Taq Buffer +KCl –MgCl ₂ 10X	2.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL
GdAKT-F2, 10 µM	0.5 µL
GdAKT-R2, 10 µM	0.5 µL
ADN molde	0.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL
Taq Polimerasa (Thermo Scientific®)	0.125 µL
Agua	Hasta 25 µL

Condiciones de reacción		
Desnaturalización inicial	98° C, 30 s	
Desnaturalización	98° C, 10 s	5 ciclos
Alineamiento	58.1° C, 30 s	
Extensión	72°C, 1 min	
Desnaturalización	94° C, 30 s	
Alineamiento + Extensión	70° C, 2 min 10 s	
Extensión final	72° C, 10 min	
Incubación	4° C, ∞	

Utilizando el par de primers T7-F y T7-R:

Inserto del vector PET100:GdAKT	
T7-F:	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-R:	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'
Tamaño del producto de PCR: 1,966 pb	

Taq Buffer +KCl -MgCl ₂ 10X	2.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL
T7-F, 10 µM	0.5 µL
T7-R, 10 µM	0.5 µL
ADN molde	1 µL
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL
Taq Polimerasa (Thermo Scientific®)	0.125 µL
Agua	Hasta 25 µL

Condiciones de reacción		
Desnaturalización inicial	94° C, 5 min	25 ciclos
Desnaturalización	94° C, 30 s	
Alineamiento	59° C, 30 s	
Extensión	72° C, 2 min	
Extensión final	72° C, 7 min	
Incubación	4° C, ∞	

Análisis por restricción

Partiendo de plásmidos extraídos por Easyprep, se realizó una digestión con la enzima HindIII (New Engalnd BioLabs®):

HindIII (New Engalnd BioLabs®)	14.5 µL
NEBuffer 2.1	0.5 µL
ADN (PET100:GdAKT)	2.0 µL
Agua	Hasta 20 µL

Expresión de proteínas recombinantes

La construcción PET100:GdAKT fue transformada en células químicamente competentes de la cepa de *Escherichia coli* SOLUBL-21 (ver anexos) (Catherine L. Deatherage, 2012). Una colonia aislada se cultivó en medio LB (suplementado con 100 µg/mL de ampicilina) toda la noche a 37° C. Posteriormente se utilizó este cultivo para inocular 500 mL de medio LB (suplementado con 100 µg/mL de ampicilina) hasta alcanzar una OD₆₀₀= 0.5. A continuación, se indujo la expresión de la proteína con 0.5 mM IPTG y se incubó a 37°C, por 4 h en agitación constante, luego el cultivo se enfrió y se colectó el pellet bacteriano.

Purificación de proteínas recombinantes

El paquete celular de 500 mL de cultivo inducido con 0.5 mM IPTG durante 4 h a 37°C fue resuspendido en 6.25 mL de buffer A1 (1X Buffer de lisis (300 mM Tris pH=7.5, 2M NaCl, 20 mM MgCl₂), 30 mM Imidazol, 800 µM PMSF, 3.4 mM β-Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM Benzamidina) para sonicar 10 veces a 100% de potencia durante 5s, con descansos de 35s. El lisado crudo se clarificó por centrifugación (18,000 xg/ 40 min a 4° C), y el supernadante se filtró con un tamaño de poro de 0.22 µm para después hacerlo pasar por una columna con perlas de Agarosa-níquel a 4° C. La fracción no unida se recuperó y guardó. En seguida se realizó un primer lavado con 7 mL de Buffer A1, guardando la fracción eluida. A continuación, se realizó un segundo lavado haciendo pasar 7 mL de Buffer A2 (1X Buffer de, 50 mM Imidazol, 800 µM PMSF, 3.4 mM β-Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM Benzamidina), guardando la fracción eluida. Finalmente, se eluyó la proteína recombinante,

haciendo pasar 10 mL de Buffer B (1X Buffer de, 300 mM Imidazol, 800 μ M PMSF, 3.4 mM β -Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM Benzamidina) y recuperando 10 fracciones de 1 mL cada una. Estas fracciones se mezclaron y concentraron en unidades Amicon[®] Ultra-4 para filtración con centrifuga, se alicuotaron y guardaron a -80° C.

Extracción total de proteínas de *Giardia duodenalis*:

Para la obtención de extractos celulares de trofozoítos se cosecharon aproximadamente 50 millones de células por enfriamiento de los tubos de cultivo en hielo durante 30 min para permitir que las células se despeguen. Éstas se lavaron tres veces con PBS 1X centrifugando a 7,000 xg/10 min. La pastilla celular se resuspendió en 800 μ L de Buffer RIPA (50 mM Tris-HCl (pH=8), 0.5% desoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 0.1% SDS y 1% Tritón X-100) complementado con un coctel de inhibidores de proteasas cOmplete Mini, EDTA-free de (Roche[®]) a una concentración final de 3X. El preparado se incubará a 4°C, durante 30 min en agitación constante.

Inmunopurificación de ATM-3HA

El extracto total de proteínas de un cultivo confluyente de 50 mL trofozoítos transgénicos se incubó con 5 μ L de perlas de agarosa recubiertas de anti-HA (Pierce[™] Anti-HA Agarose. Thermo[®]) previamente incubadas con 0.1% BSA, 1 h, a 4° C) durante 2h a 4°C en agitación constante, una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 16,000 xg/ 1 min, se guardó el sobrenadante y se lavaron las perlas 3 veces con TBS-T (Thermo[®]) durante 5 min en agitación constante. Una vez lavadas se guardaron a 4° C para su posterior utilización.

Electroforesis de proteína en SDS-PAGE y Western blot

Para la identificación de los blancos de fosforilación putativos de gTOR las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE al 10% con buffer Laemmli 5X + 5% β -Mercaptoetanol (250 mM Tris-HCl pH=6.8, 10% SDS, 20% Glicerol, 0.01% Azul de bromofenol). Para la identificación de gTOR/ATM-3HA, las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE al 6%

conteniendo 8M Urea y cargando la muestra como sigue: (5 μ L de Inmunopurificación, 20% Laemmli 5X, 2.5% β -Mercaptoetanol, 40% Buffer de muestra Pierce[®] y 8M Urea en un volumen final de 80 μ L). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond C (Amersham Biosciences) en buffer de transferencia (48 mM Tris (pH 8.3), 39 mM glicina, 20% metanol (v/v), 0.037% SDS), en el caso de la detección de los blancos de fosforilación de gTOR, o bien a membranas de PVDF (PerkinElmer[®]) para la detección de gTOR/ATM-3HA. La membrana se bloqueó con 5% de leche Svelty por una hora y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario: anti-PolyHis para los blancos de fosforilación de gTOR durante 1h a 4° C; o bien anti-HA + 5% leche para gTOR/ATM-3HA durante 16h a 4° C. En seguida las membranas se lavaron 3 veces por 5 min con TBS-T (11.5 mM Tris, 38.45 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) y se incubaron una hora con el anticuerpo secundario (anti-Mouse), las membranas se lavaron nuevamente 3 veces por 5 min con TBS-T y se revelaron empleando placas autorradiográficas.

Ensayo de actividad cinasa:

Inmunodetección de la actividad de cinasa: La proteína gTOR/ATM-3HA, unida a perlas de agarosa recubiertas con anti-HA (Thermo[®]) fue incubada con 4 μ g de GdAKT en una reacción de 30 μ L, 1X buffer de cinasa (250 mM Tris-HCl, 200 mM MgCl₂, 0.2% Tween20, 500 mM KCl), 200 μ M ATP, 1X cOmplete (Roche[®]), 0.5 mM DTT; 10 mM MnCl₂ o 10 mM MgCl₂, según corresponda; 20 μ M Rapamicina, 0.75 μ M Temsirolimus, 500 μ M Ku55933 o 10 μ M Cafeína, según corresponda y agua hasta 30 μ L. A continuación, se incubaron las reacciones a 30° C durante 30 min e inmediatamente después se agregaron 7 μ L de Laemmli 5X + 5% β -Mercaptoetanol para detener la reacción, a continuación se hirvieron las reacciones durante 5 min y se centrifugaron a 14,000 xg por 5 min, se tomó el sobrenadante y se cargó en un gel SDS-PAGE al 10%, se llevó a cabo la electroforesis a 140 V durante 1.5 h, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 0.3 A (amperaje constante) por 30 min y la membrana se bloqueó con 5% de leche en TBS-T. Después se incubó la membrana con anticuerpo primario (anti P-Tr 1:5,000 o anti P-Ser 1:5,000, según corresponda) por 16 h, se

lavó 3 veces con TBS-T por 5 min/lavado y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-mouse 1:30,000) por 1 h, se lavó 3 veces nuevamente con TBS-T y se reveló, empleando placas autorradiográficas.

Detección radioactiva de la actividad de cinasa: La proteína gTOR/ATM-3HA, unida a perlas de agarosa recubiertas con anti-HA (Thermo®) fue incubada con 4 µg de GdAKT en una reacción de 30 µL, 1X buffer de cinasa (250 mM Tris-HCl, 200 mM MgCl₂, 0.2% Tween20, 500 mM KCl), 10 µM ATP frío, 2 µCi [γ^{32} P]ATP, 1X cOmplete (Roche®), 0.5 mM DTT; 10 mM MnCl₂ o 10 mM MgCl₂, según corresponda; 20 µM Rapamicina, 0.75 µM Temsirolimus, 500 µM Ku55933 o 10 µM Cafeína, según corresponda y agua hasta 30 µL. A continuación, se incubaron las reacciones a 30° C durante 30 min e inmediatamente después se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12%, se corrió la electroforesis durante 4 h a 140 V y se tiñó el gel con Coomassie (25% Metanol, 12.5% Ácido acético glacial y 2% Coomassie) durante 30 min. Posteriormente se destiñó el gel con solución desteñidora (25% Metanol, 12.5% Ácido acético glacial y agua) el tiempo necesario para observar bandas en el gel. Después se secó el gel y se expuso a éste una placa autorradiográfica por 6 h para finalmente revelar y fijar dicha placa.

RESULTADOS

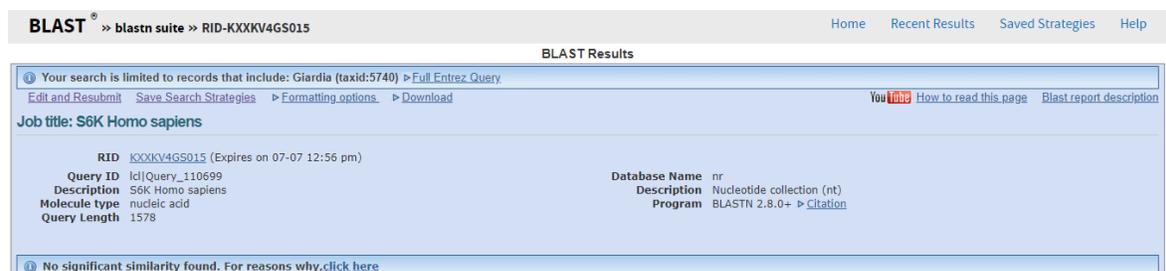
Objetivo 1: Identificación *in silico* de los blancos putativos genes putativos s6k, 4EBP y Akt de gTOR en *Giardia duodenalis*.

Dado el minimalismo que caracteriza a *Giardia duodenalis*, así como la tendencia del parásito a presentar una cantidad inusual de inserciones aminoacídicas que dificultan la tarea de encontrar ortólogos (Hilary G. Morrison, 2007), además de utilizar las herramientas bioinformáticas BLAST convencionales como BLASTn y BLASTp, se utilizó un algoritmo diferente para BLASTp llamado DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST), que realiza una búsqueda de dominios conservados en una base de datos antes de hacer el alineamiento local.

Identificación *in silico* de S6K:

Para identificar al posible ortólogo de S6K en *Giardia* primero se utilizaron las secuencias nucleotídica y aminoacídica de S6K1 de *Homo sapiens* utilizando las herramientas BLASTn, BLASTp y DELTA-BLAST de NCBI.

La búsqueda con BLASTn no arrojó resultados:

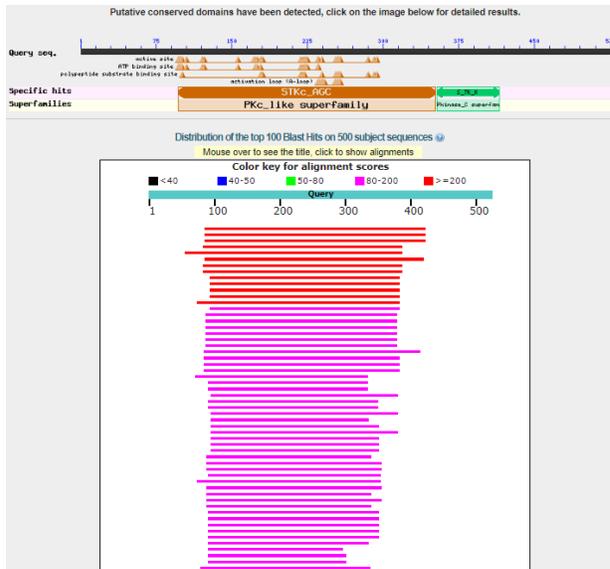


The screenshot shows the BLASTn interface with the following details:

- BLAST® » blastn suite » RID-KXXXK4GS015
- Home Recent Results Saved Strategies Help
- BLAST Results
- Your search is limited to records that include: *Giardia* (taxid:5740) > [Full Entrez Query](#)
- [Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [You Tube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)
- Job title: S6K Homo sapiens
- RID: KXXXK4GS015 (Expires on 07-07 12:56 pm)
- Query ID: IdlQuery_110699
- Description: S6K Homo sapiens
- Molecule type: nucleic acid
- Query Length: 1578
- Database Name: nr
- Description: Nucleotide collection (nt)
- Program: BLASTN 2.8.0+ > [Citation](#)
- No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Fig. 12. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Giardia duodenalis* por BLASTn, usando la secuencia S6K de *Homo sapiens*.

La búsqueda con BLASTp y DELTA-BLAST arrojó resultados poco fiables, puesto que ninguno es ortólogo de S6K:

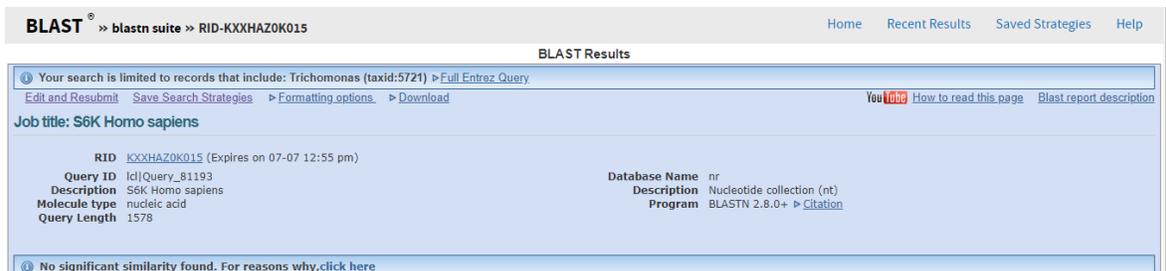


Sequences producing significant alignments with E-value BETTER than threshold

Alignments	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	Select for PDB blast
Serine/threonine protein kinase [Giardia intestinalis]	227	227	64%	3e-67	35%	ESU38323.1	✖
Kinase AGC AKT [Giardia lamblia ATCC 50803]	227	227	64%	3e-67	35%	XP_017042482.1	✖
Kinase AGC AKT [Giardia lamblia P18]	227	227	64%	4e-67	35%	EFQ63947.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia intestinalis ATCC 50803]	221	221	58%	2e-66	39%	EFU00952.1	✖
Kinase AGC PKA/ Serine/threonine-protein kinase [Giardia intestinalis assemblage B]	221	221	63%	2e-66	37%	KXX12120.1	✖
Kinase AGC AKT [Giardia intestinalis ATCC 50803]	225	225	63%	2e-66	35%	EF698311.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia lamblia ATCC 50803]	219	219	58%	7e-66	39%	XP_001704119.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia lamblia P18]	218	218	58%	2e-65	39%	EFQ62787.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia intestinalis ATCC 50803]	207	207	55%	5e-62	37%	EFU01308.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia lamblia ATCC 50803]	204	204	55%	7e-61	36%	XP_001708833.1	✖
cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit [Giardia intestinalis]	203	203	55%	2e-60	36%	ABW38743.1	✖
Kinase AGC PKA [Giardia lamblia P18]	202	202	55%	4e-60	36%	EFQ61750.1	✖
Kinase AGC PKA/ Serine/threonine-protein kinase [Giardia intestinalis assemblage B]	202	202	59%	5e-60	35%	KXX12108.1	✖
cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit [Giardia intestinalis]	196	196	55%	8e-58	36%	AAQ08429.1	✖
Hypothetical protein GL50803_221892 [Giardia lamblia ATCC 50803]	165	165	55%	1e-44	35%	XP_001707691.1	✖
Serine/threonine-protein kinase [Giardia intestinalis]	165	165	55%	3e-44	35%	ESU38944.1	✖
Serine/Threonine Kinase [Giardia intestinalis ATCC 50803]	164	164	55%	5e-44	35%	EFU00889.1	✖
Serine/threonine-protein kinase [Giardia lamblia P18]	164	164	55%	7e-44	35%	EFQ63184.1	✖
Serine/Threonine Kinase [Giardia intestinalis assemblage B]	163	163	55%	1e-43	34%	KXX12482.1	✖
Serine/threonine-protein kinase [Giardia intestinalis]	164	164	55%	1e-43	35%	ESU41320.1	✖
Kinase AGC NDR [Giardia lamblia ATCC 50803]	158	158	63%	2e-42	31%	XP_001708201.1	✖
Kinase AGC NDR [Giardia lamblia P18]	155	155	56%	2e-41	31%	EFQ64942.1	✖

Fig. 13. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Giardia duodenalis* por DELTA-BLAST, usando la secuencia S6K de *Homo sapiens*.

Del mismo modo, utilizando las secuencias de *Homo sapiens* se buscó el ortólogo de S6K en *Trichomonas vaginalis*, un parásito evolutivamente más relacionado a *Giardia*, para después utilizarlo para encontrar al ortólogo de *Giardia*, sin embargo, no se encontraron



similitudes significativas y no se ha reportado en la literatura.

Fig. 14. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Trichomonas vaginalis* por BLASTn, usando la secuencia S6K de *Homo sapiens*.

Por otro lado, sí se ha reportado un ortólogo de S6K en *Saccharomyces cerevisiae* (Yuehua Wei, 2009; Robbie Loewith, 2011; Yoko Otsubo, 2017), por lo que se utilizaron las secuencias correspondientes en las herramientas BLASTn, BLASTp y DELTA-BLAST para encontrar el ortólogo en *Giardia*:

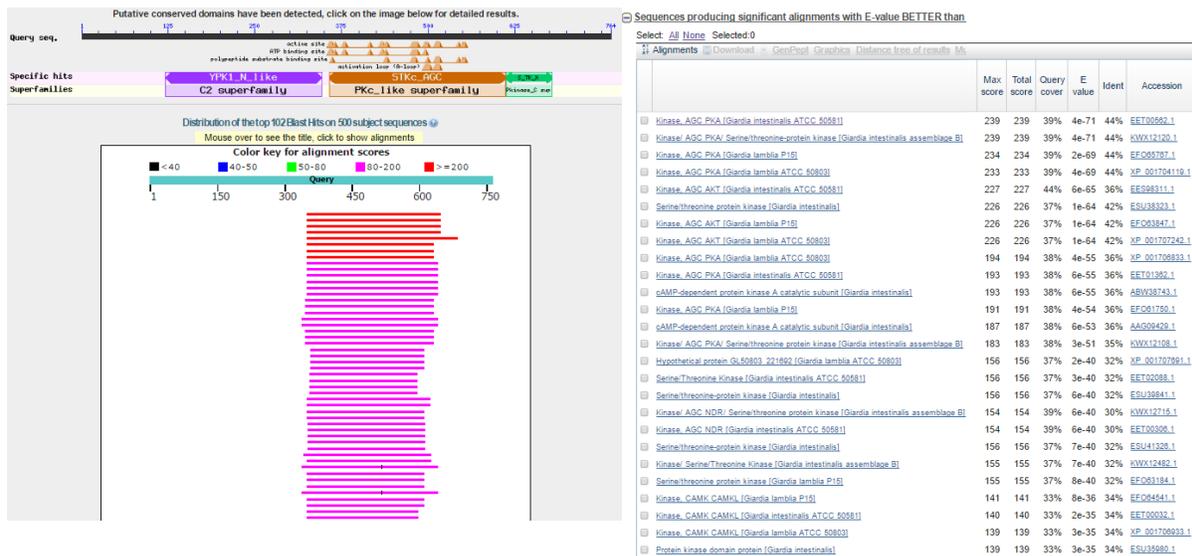


Fig. 15. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Giardia duodenalis* por DELTA-BLAST, usando la secuencia del ortólogo Sch9 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre los resultados destacan las cinasas PKA y AKT, sin embargo, no se encontró un ortólogo de S6K en *Giardia duodenalis*. Cabe mencionar que usando la secuencia de *Homo sapiens* para encontrar el ortólogo de S6K en *Saccharomyces*, el mejor resultado no es Sch9,



sino una cinasa llamada Ypk1p, este resultado será incluido en el alineamiento para encontrar los *motifs* funcionales conservados:

Fig. 16. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Saccharomyces cerevisiae* por DELTA-BLAST, usando la secuencia S6K de *Homo sapiens*.

Finalmente, utilizando la herramienta BLASTp de la base de datos de *Giardia*, se reafirmó la ausencia de un ortólogo bien conservado de S6K:

8 Genes from Step 1 [Revise](#)
 Strategy: BLAST

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Giardia					Spironucleus
		G. Assemblage A2	G. Assemblage A	G. Assemblage B		G. Assemblage E	S. salmonicida
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
50	11	8	8	8	8	9	9

Assemblage A Genes

Not Deprecated	Deprecated
8	0

	Score	E	
GL50803_11364-t26_1-p1 transcript=GL50803_11364-t26_1 gene=...	231	1e-67	Kinase AGC AKT
GL50803_86444-t26_1-p1 transcript=GL50803_86444-t26_1 gene=...	221	2e-65	Kinase AGC PKA
GL50803_11214-t26_1-p1 transcript=GL50803_11214-t26_1 gene=...	205	6e-60	Kinase AGC PKA
GL50803_221692-t26_1-p1 transcript=GL50803_221692-t26_1 gen...	169	2e-45	Hypothetical Protein
GL50803_8587-t26_1-p1 transcript=GL50803_8587-t26_1 gene=GL...	164	5e-44	Kinase AGC NDR
GL50803_17566-t26_1-p1 transcript=GL50803_17566-t26_1 gene=...	142	7e-36	
GL50803_14661-t26_1-p1 transcript=GL50803_14661-t26_1 gene=...	139	1e-35	
GL50803_16034-t26_1-p1 transcript=GL50803_16034-t26_1 gene=...	137	5e-35	

Fig. 17. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de S6K de *Giardia duodenalis* por BLASTp (base de datos de *Giardia duodenalis*), usando la secuencia del ortólogo Sch9 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Identificación *in silico* de 4EBP:

Dado a que no se identificaron ortólogos de EIF4EBP1 (4EBP) en *Saccharomyces* o *Trichomonas* en la literatura, se procedió a buscarlos directamente por BLAST. Para esto, se utilizaron las herramientas BLASTn y DELTA-BLAST, ingresando la secuencia nucleotídica y aminoacídica de *Homo sapiens*, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron ortólogos para ninguna especie.

Saccharomyces:

BLAST® » blastp suite » RID-M74V4NA4014

BLAST Results

Your search is limited to records that include: Saccharomyces (taxid:4930) > Full Entrez Query

Job title: 4EBP Homo sapiens

RID: M74V4NA4014 (Expires on 07-11 00:55 am)

Query ID: lcl|Query_120512

Description: 4EBP Homo sapiens

Molecule type: amino acid

Query Length: 118

Database Name: nr

Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SviasProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

Program: BLASTP 2.8.0+ > Citation

No significant similarity found. For reasons why, click here

Fig. 18. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de 4EBP de *Saccharomyces cerevisiae* por BLASTp, usando la secuencia 4EBP de *Homo sapiens*.

Trichomonas:

BLAST® » blastp suite » RID-M74YRSZ9014

BLAST Results

Your search is limited to records that include: Trichomonas (taxid:5721) > Full Entrez Query

Job title: 4EBP Homo sapiens

RID: M74YRSZ9014 (Expires on 07-11 00:56 am)

Query ID: lcl|Query_123527

Description: 4EBP Homo sapiens

Molecule type: amino acid

Query Length: 118

Database Name: nr

Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SviasProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

Program: BLASTP 2.8.0+ > Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results Multiple alignment MSA viewer

Graphic Summary

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. MSIGSSGSPFSAIFATRWAVLGGVIVLRFQVYSITRPGITLPSITTPGSTRIVYKPLFQCDQVQVATFPPRDLTIPVITSPSSQEPPEHSHLNSPETHRAGGEEVSRPQNTI

Specific hits: eIF_4EBP

Superfamilies: eIF_4EBP superFamily

Distribution of the top 2 Blast Hits on 2 subject sequences

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Purple
>=200	Red

Sequences producing significant alignments with E-value BETTER than threshold

Sequences with E-value WORSE than threshold

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	Select for PSI blast	Used to build PSSM
hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]	29.3	29.3	20%	0.68	52%	XP_001308024.1		
PEP-acylase mobile domain containing protein [Trichomonas vaginalis G3]	26.9	26.9	26%	4.4	42%	XP_001302139.1		

Fig. 19. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de 4EBP de *Trichomonas vaginalis* por BLASTp, usando la secuencia 4EBP de *Homo sapiens*.

A continuación, se realizó la búsqueda *in silico* del ortólogo en *Giardia duodenalis* con la secuencia 4EBP de *Homo sapiens*, a falta de ortólogos caracterizados en organismos evolutivamente más relacionados. Sin embargo, no se encontraron similitudes significativas usando las herramientas BLASTn, BLASTp o DELTA-BLAST de NCBI, esto se corroboró ingresando la secuencia aminoacídica de 4EBP humana en la herramienta BLASTp de la base de datos de *Giardia*:

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G. Assemblage A2</i>	<i>G. Assemblage A</i>	<i>G. Assemblage B</i>		<i>G. Assemblage E</i>	<i>S. salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
7	4	1	1	2	2	1	0

Assemblage A Genes

Not Deprecated	Deprecated
1	0

Score E
 GL50803_95908-t26_1-p1 | transcript=GL50803_95908-t26_1 | gene=... 28.5 1.6 Hypothetical Protein

Fig. 20. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de 4EBP de *Giardia duodenalis* por BLASTp (base de datos de *Giardia duodenalis*), usando la secuencia de 4EBP de *Homo sapiens*.

Identificación *in silico* de AKT:

Para esto se utilizó la herramienta DELTA-BLAST de NCBI, ingresando la secuencia aminoacídica de AKT de *Homo sapiens*, encontrando un homólogo en *Giardia* ya identificado en la base de datos como AKT.

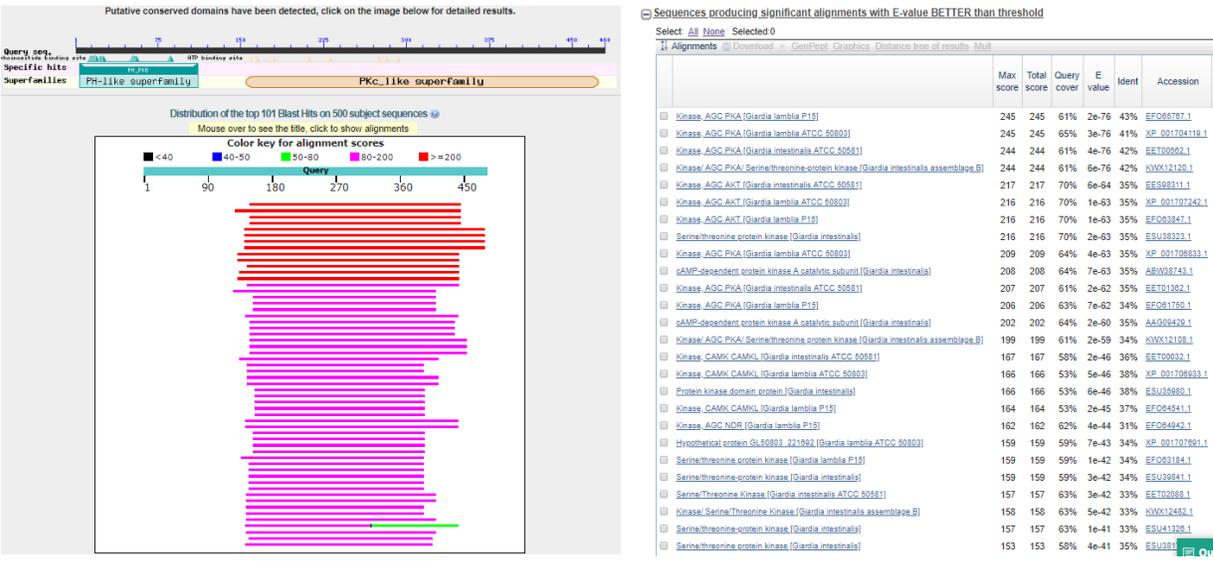


Fig. 21. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de AKT de *Giardia duodenalis* por DELTA-BLAST, usando la secuencia AKT1 de *Homo sapiens*.

Adicionalmente, este resultado se confirmó utilizando la herramienta BLASTp de la base de datos de *Giardia*:

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G. Assemblage A2</i>	<i>G. Assemblage A</i>	<i>G. Assemblage B</i>		<i>G. Assemblage E</i>	<i>S. salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
50	10	9	8	8	8	8	9

Assemblage A Genes

Not Deprecated	Deprecated
8	0

	Score	E	
GL50803_86444-t26_1-p1 transcript=GL50803_86444-t26_1 gene=...	247	1e-75	Kinase AGC PKA
GL50803_11364-t26_1-p1 transcript=GL50803_11364-t26_1 gene=...	219	2e-63	Kinase AGC AKT
GL50803_11214-t26_1-p1 transcript=GL50803_11214-t26_1 gene=...	210	2e-62	Kinase AGC PKA
GL50803_16034-t26_1-p1 transcript=GL50803_16034-t26_1 gene=...	170	9e-47	Kinase CAMK
GL50803_221692-t26_1-p1 transcript=GL50803_221692-t26_1 gen...	161	5e-43	Hypothetical Protein
GL50803_14364-t26_1-p1 transcript=GL50803_14364-t26_1 gene=...	153	5e-40	Kinase CAMK
GL50803_14661-t26_1-p1 transcript=GL50803_14661-t26_1 gene=...	153	2e-40	Kinase CAMK
GL50803_8587-t26_1-p1 transcript=GL50803_8587-t26_1 gene=GL...	147	2e-38	Kinase NDR

Fig. 22. Búsqueda *in silico* del ortólogo putativo de AKT de *Giardia duodenalis* por BLASTp (base de datos de *Giardia*), usando la secuencia de AKT de *Homo sapiens*.

El hallazgo del ortólogo de AKT en *Giardia duodenalis* es consistente con lo ya publicado, puesto que, en 2005 se reportó un ortólogo de AKT en *Giardia* (Kyu-Tae Kim, 2005). Por lo tanto, se verificó la existencia de un ortólogo de AKT en *Giardia*, con un valor E estadísticamente confiable de 2e-63.

A continuación, para identificar los motifs funcionales y estructurales importantes para los blancos putativos de gTOR, se hizo un alineamiento de la secuencia de las proteínas ortólogas de AKT de diferentes organismos modelo, tomando en cuenta la estructura secundaria de AKT de *H. sapiens*, utilizando el programa ESPrpt 3.0.

a)

```
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

```
H.sapiens ..... 1 10
H.sapiens .....MSDVAIVKEGWL
G.duodenalis .....YKKHYVMSDE
S.cerevisiae_SCH9 .....NGISSVNNNNNTDPTITTSQEEFNAGNVHGDPTGNSLQNSDDNFSSSTTKCLLSSTSLISINOREAAAAAYGPDTPRCKLEVTITTEARDLIVTRSK
S.cerevisiae_YPK1P .....MTIKVYVNGDDFILPFPITTSSEQILNKLASGVP.....PPHKEISKEVDALIAQLSRVQIKNQ.....GPADELISSESAKFPSTIMLPGSS
T.vaginalis_AGC .....MSVYKGTGWA
```

```
H.sapiens ..... 20 30 40 50
H.sapiens .....HKKRGEYIKTWRR...PRYFLKNDGTFICYKERQD.....VDQREAFQNNFS
G.duodenalis .....EGDTGFCAGVQVSDAPVSTEQKDR.....QRSLVLTSSKSVONMMGMSIQWERRVQEIYGIHRSTKEPKAFVLSFLQTYRFDEVSA
S.cerevisiae_SCH9 .....DSDQYVYVCTFE...SSEFISNGPEISGAINNNNNNNNNNNQHNQHNQHNINNNNENTNPDAAASHHNNNSGWNGSOLPSIKEHLKPKPLYTRSSSSQLDQLN
S.cerevisiae_YPK1P .....TLNPLLLYFTIE...FDNVTATIEAEYGTIAKPGFN.....KISTFDVTRKLPYLK
T.vaginalis_AGC .....TKQGMIRTKW...KRYEVLTDDELVYVDKPDGNE.....HGRKIPLDP
```

```
H.sapiens ..... 60 70 80 90 100 110 120 130
H.sapiens .....VAQCQIKRTERPNTFIIRCQWTT.....VIERTFHVETPEEREHWTTAQITVADGLKKQEBRE.....MDFRSGSPDSDNSGAEEM
G.duodenalis .....DQVPSIVSAFQRLMLGEVVDKDGAYGLQADKRG.....HRERTFHVETPEEREHWTTAQITVADGLKKQEBRE.....PVAAYKVRPPIF
S.cerevisiae_SCH9 .....SCSSVTDPSKRSSNSSSSGSSNCPKNDSSHPINHHHTFDVLDGSHSELDISVYDAAHDHMFLLGQVRYPMIHNLAHASQHWHSKPKPVIDEVVSGLDILIK
S.cerevisiae_YPK1P .....IDVFARIPSIILLPSKTWQOEMQLQDE...KLGTFDFKINSNODHLDSFHLPIINLSFDASAASIR.....LYNHHWITLDN...GLGKINIS
T.vaginalis_AGC .....TVVVPAPDCKKQPAYKIVTSG.....RIVYVVPETQAEVNEWVAVLTAJANNSSKNKRIP.....KAGVPLVQ
```

```
H.sapiens .....
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

```
H.sapiens .....
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

```
H.sapiens .....
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

```
H.sapiens .....
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

```
H.sapiens .....
H.sapiens .....
G.duodenalis .....
S.cerevisiae_SCH9 .....
S.cerevisiae_YPK1P .....
T.vaginalis_AGC .....
```

b)

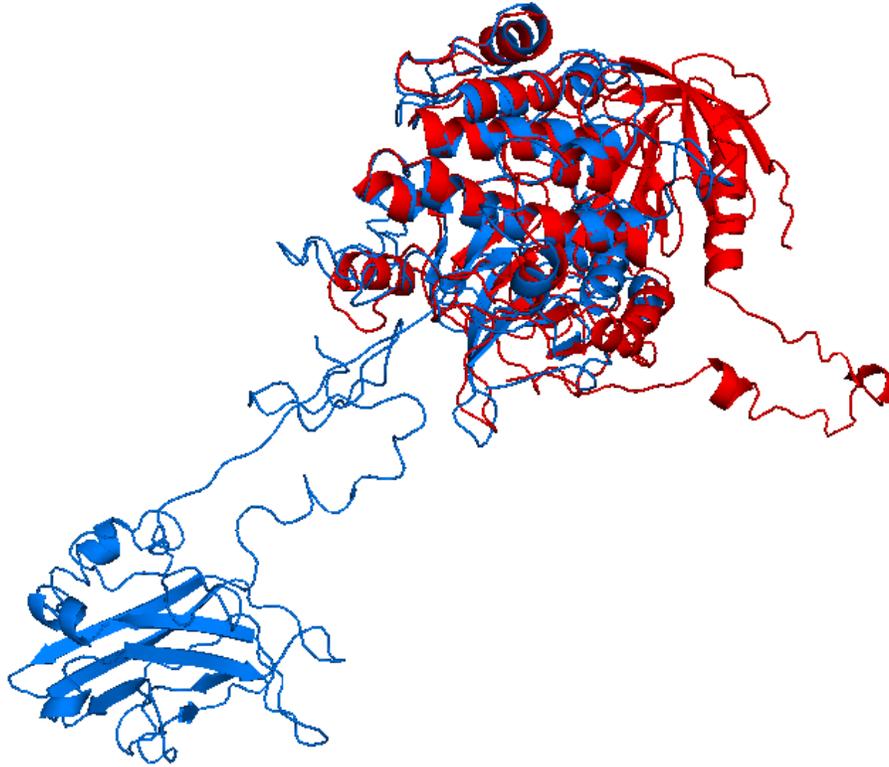


Fig. 23. Alineamiento de la proteína AKT de diferentes organismos modelo para la identificación de los *motifs* funcionales conservados y superposición estructural de las proteínas GdAKT (predicción) y HsAKT1 (porción cristalizada). a) En el alineamiento, los recuadros rojos con letras blancas marcan los residuos conservados y los recuadros con perímetro azul y letras rojas marcan residuos ligeramente conservados, con características químicas similares. El alineamiento basado en la estructura secundaria se realizó utilizando el programa ESPrpt 3.0 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>), en donde se alimentó un alineamiento previamente realizado con el programa ClustalW. b) Las estructura cristalizada de HsAKT1 (ROJO) se obtuvo de la base de datos de proteínas RCSB PDB (identificada con el número de acceso 3096) y la estructura de GdAKT (AZUL) se mandó modelar al servidor Itasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). El alineamiento estructural se realizó en el programa Pymol de The Pymol Molecular Graphic System ingresando las estructuras en formato pdb.

En el alineamiento anterior, se destaca en azul el dominio de cinasa, constituido por los residuos F150-F408 en la secuencia de *Homo sapiens*; y en rojo se resalta el sitio activo del dominio cinasa que abarca los residuos R273-D292. Se puede observar claramente una mayor homología en el dominio cinasa, entre los diferentes ortólogos e importante el residuo D274, que se ha reportado como el donador de protones del sitio activo, se encuentra conservado en la proteína AKT de los diferentes organismos. Cabe mencionar

que es evidente que la secuencia de *Giardia duodenalis*, tiene una mayor cantidad de inserciones aminoacídicas, una característica ya bien reportada con anterioridad (**Hilary G. Morrison, 2007**) en este parásito y que dificulta la tarea de encontrar genes ortólogos.

Así mismo, la proteína AKT humana tiene dos sitios de fosforilación (**Fig. 23**): T308 que es fosforilada por la proteína PDK1 y S473 que es fosforilada por mTORC2. Se ha reportado que la fosforilación de S473 no es indispensable en células de mamífero para que AKT lleve a cabo sus funciones, siendo que esta fosforilación solo aumenta el rango de sustratos blanco de AKT, no obstante, este comportamiento no es universal, siendo imprescindible la fosforilación de ambos residuos para la completa activación de AKT de otros organismos (**Daniel Rosel, 2012**). En el alineamiento se puede observar que ninguno de estos dos residuos se encuentra conservado en *Giardia duodenalis*, no obstante, existe una serina ocupando la posición de T308 y una treonina dos residuos después de la S473, que podrían ser fosforiladas en su lugar, lo cual es factible, dada la divergencia evolutiva y la tendencia de este parásito a presentar inserciones aminoacídicas.

La comparación de estructuras terciarias entre la estructura predicha de la proteína GdAKT comparada con una porción cristalizada de la proteína AKT1 humana revela que sí existe cierto nivel de conservación (**Fig. 24**).

Objetivo 2: Clonar, purificar y expresar algunos de los blancos de gTOR putativo.

Habiendo logrado identificar a GdAKT como único posible blanco de fosforilación putativo de gTOR/ATM, fue necesario clonar dicho gen en un vector de expresión bacteriano, luego se expresó y purificó la proteína.

Para esto, en un primer acercamiento, se optó por utilizar el vector de expresión pPROEX-I y para esto se diseñaron iniciadores agregando los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' del iniciador sentido (GdAKT-F1) y BamHI en el extremo 5' del iniciador antisentido (GdAKT-R1) (ver anexos), de tal modo que el producto amplificado esté flanqueado por los sitios de restricción EcoRI y BamHI en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Extracción de ADN genómico de *Giardia duodenalis* del aislado WB

Se realizó la extracción de ADN genómico de *Giardia duodenalis* del aislado WB, que pertenece al genotipo A1, cuyo genoma ya ha sido secuenciado. La concentración y pureza del material genético extraído fueron analizadas por espectrofotometría y la integridad y especificidad fueron comprobadas por amplificación del gen PDI-1 de *Giardia duodenalis* por PCR (Fig. 24).

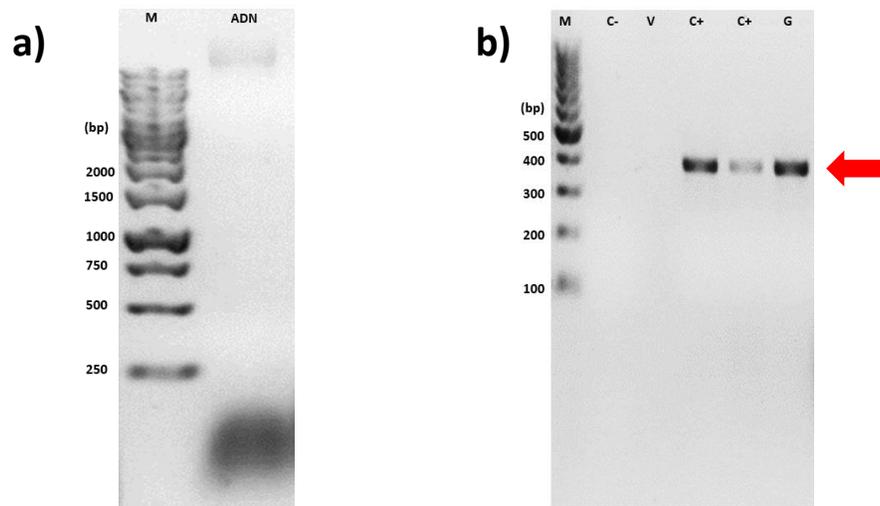


Fig. 24. PCR del gen PDI-1 de *Giardia duodenalis* a partir de ADN genómico. a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Carril 2: ADN genómico de *Giardia duodenalis*. b) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen). Carril 2: Control negativo. Carriles 4 y 5: Control positivo de PCR para PDI-1 de 423 pb con un ADN genómico funcional. Carril 6: Amplificación por PCR del gen PDI-1 con el ADN genómico extraído. Los productos obtenidos se analizaron un gel de agarosa al 1.5%.

Amplificación de GdAKT por PCR a partir de ADN genómico de *Giardia*

Primero se diseñaron los iniciadores en el programa Oligo7, agregando 20 pb complementarias al vector de expresión PET100 y las bases necesarias para mantener los sitios de restricción NheI y SacI.

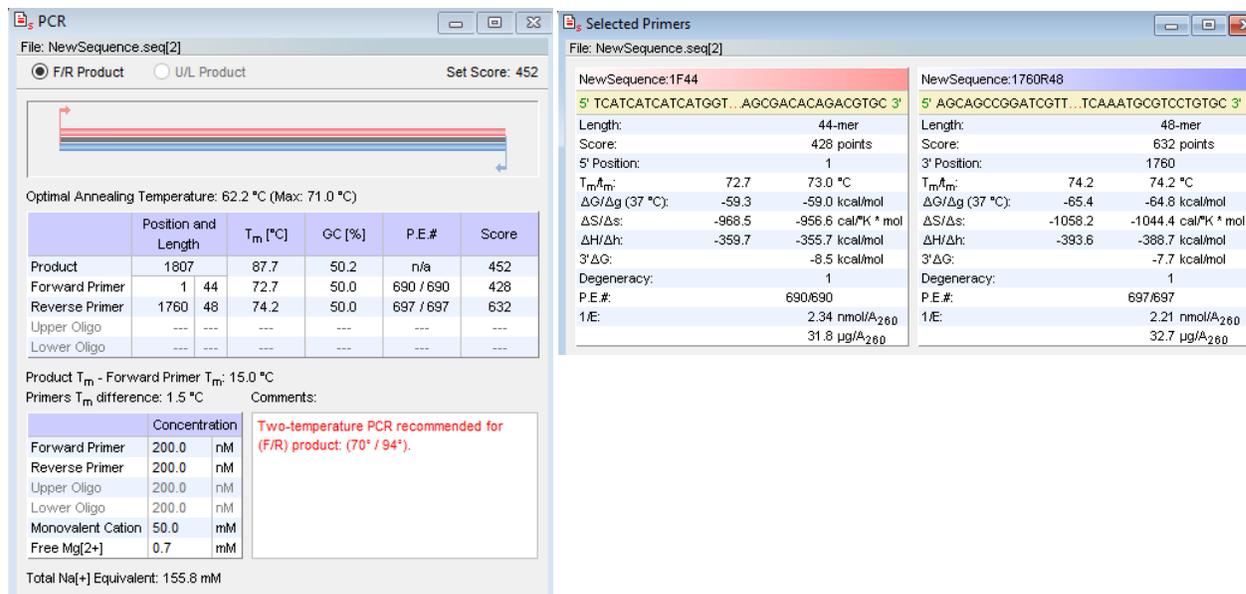


Fig. 25. Diseño de los iniciadores GdAKT-F2 y GdAKT-R2. El diseño de los iniciadores se realizó en el programa Oligo7, Versión 7.57 (Molecular Biology Insights, Inc.).

Para determinar si los iniciadores fueron diseñados correctamente, se realizó una PCR utilizando las condiciones establecidas por el programa Oligo7, donde fueron diseñados. El resultado fue una banda con el tamaño esperado de 1,775-pb, tanto en el control positivo como para el ADN genómico recién extraído. En el gel, aunque tenues, se podían apreciar amplicones inespecíficos, por lo cual se optó por aumentar la temperatura de alineamiento en +1° C para las futuras amplificaciones del gen GdAKT (**Fig. 26**).

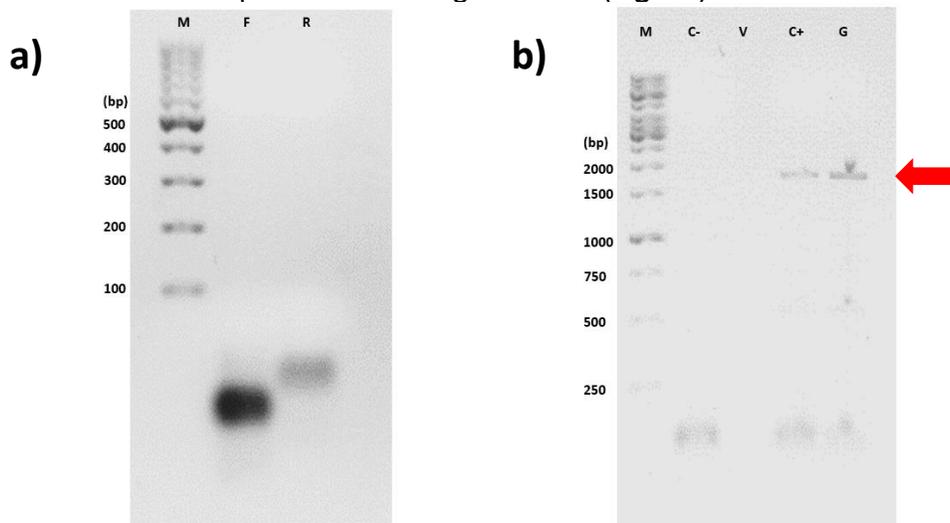


Fig. 26. Amplificación del gen GdAKT por PCR con a partir de ADN genómico de *Giardia*. a) Integridad de los primers diseñados. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1000 pb. Carril 2: Iniciador sentido (GdAKT-F1). Carril 3: Iniciador antisentido (GdAKT-R1). Los iniciadores se cargaron en un gel de agarosa al 2%. b) Amplificación por PCR de GdAKT. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: Control negativo. Carril 4: Control positivo (Amplificación de GdAKT a partir de un ADN genómico funcional). Carril 5: Amplificación del gen GdAKT a partir del ADN genómico recién extraído.

Clonación de GdAKT en el vector de transición pJET1.2/blunt

Una vez que se probó que los iniciadores diseñados amplificaban el producto con el tamaño esperado de 1,775-pb, se procedió a clonar dicho gen en el vector transitorio pJET1.2/blunt en una reacción de ligación. Para esto, se amplificó el gen GdAKT con una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion® NEB) y el amplicón de tamaño esperado se escindió del gel y se purificó por electroelución. Como se puede observar, el aumento en 1°C disminuyó drásticamente la amplificación de productos inespecíficos (**Fig. 27a**). Una vez que el inserto (GdAKT) se purificó, se verificó su integridad cargándolo en un gel de agarosa (**Fig. 27b**) y fue ligado con el vector de transición pJET1.2/blunt, para posteriormente transformar la construcción en células químicamente competentes de *Escherichia coli* SURE2 (ver anexos), misma cepa que fue seleccionada debido a sus características genotípicas, que reducen la capacidad de la bacteria para llevar a cabo eventos de recombinación o escisión inespecífica de ADN de doble cadena en la construcción transfectada, entre la cuales destacan los genes mutados con pérdida de función de las recombinasas *recB* y *recJ*, así como la endonucleasa *endA1*.

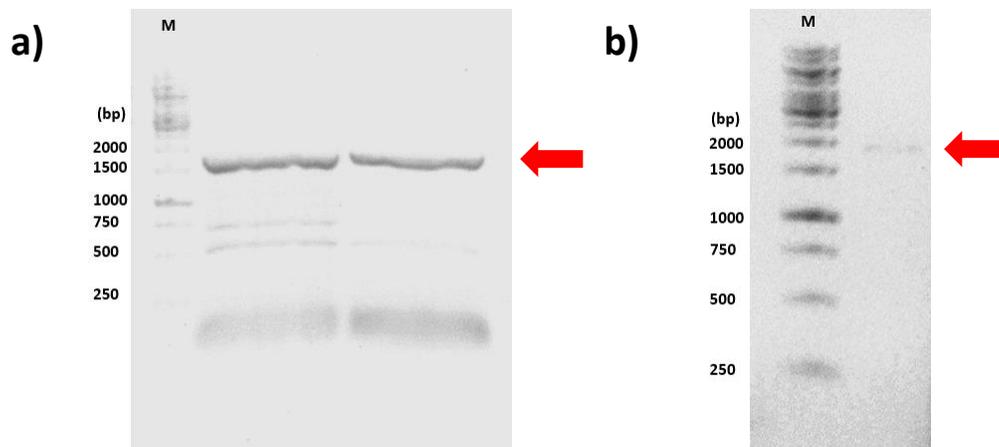
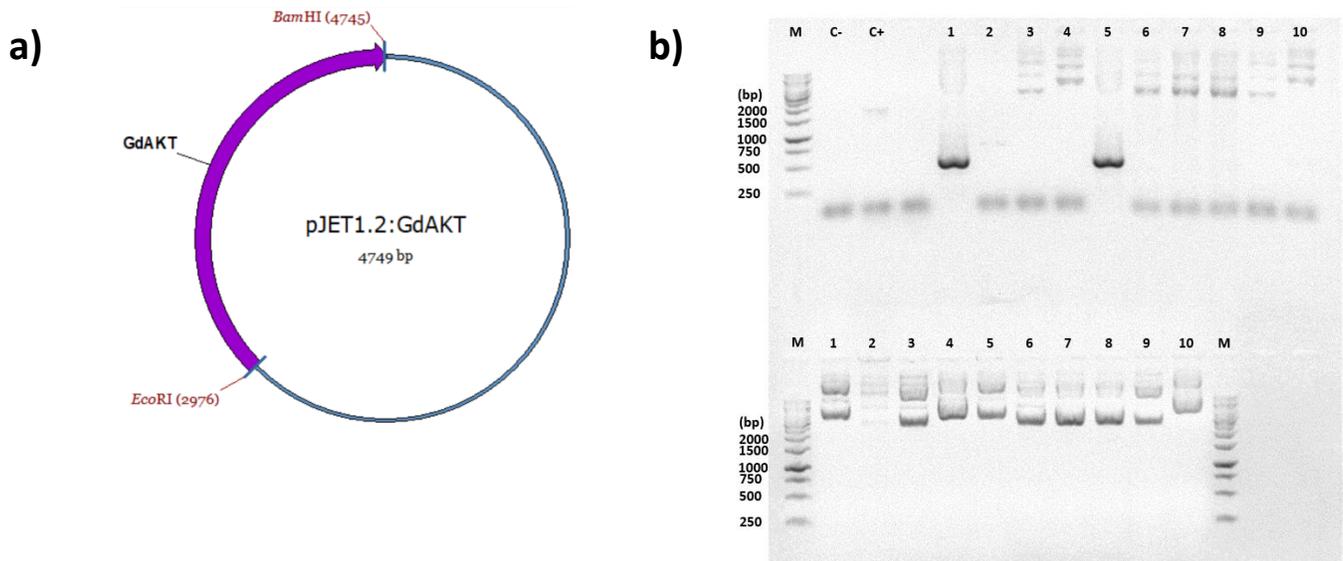
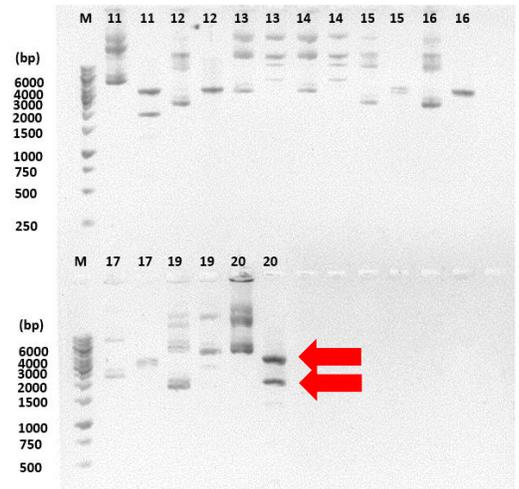
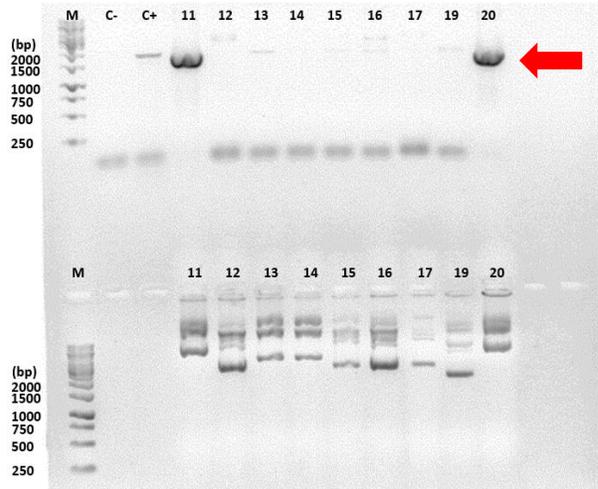


Fig. 27. Amplificación de GdAKT con ADN Polimerasa Phusion® de alta fidelidad. a) PCR de GdAKT a partir ADN genómico. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: Amplificación de GdAKT con una temperatura de alineamiento de 58.5° C. Carril 3: Amplificación de GdAKT con una temperatura de alineamiento de 59.5° C. b) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: Fragmento de GdAKT purificado, amplificado con Phusion® ADN Polimerasa.

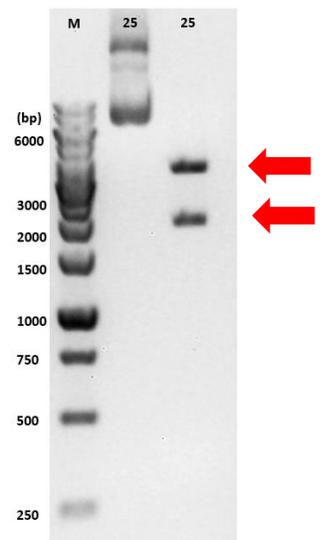
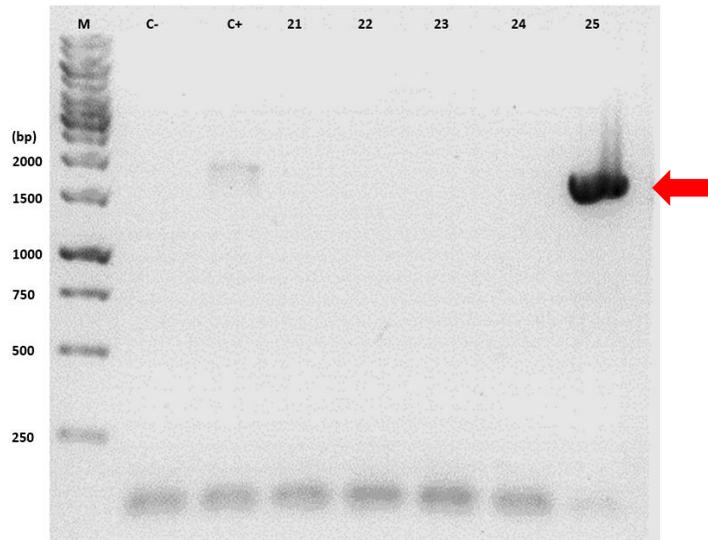
De la transformación en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* SURE2 (ver anexos) se obtuvieron 25 candidatas, las cuales fueron analizadas para verificar la presencia del inserto por PCR y restricción, siendo posible esta última gracias a la inclusión de los sitios de restricción EcoRI y BamHI en los extremos 5' y 3' del gen GdAKT, respectivamente, amplificado por PCR, ya que forman parte del diseño de los iniciadores. De estas candidatas, primero se verificó la presencia del inserto en las últimas 5 por PCR de colonia, antes de la extracción de plásmidos, obteniendo un amplicón del tamaño esperado (1,775 pb) para la candidata 25 (**Fig. 28d**). Posteriormente se realizó la extracción de plásmidos por Easyprep para las candidatas 1-10 y por Miniprep para las candidatas 11-25 y se utilizaron para analizar la presencia de inserto por PCR y restricción, obteniendo amplicones del tamaño esperado para las candidatas 11 y 20, mismas que presentaron el patrón de restricción esperado, con dos bandas de 2,980 y 1769-pb (**Fig. 28c**).



c)



d)



e)

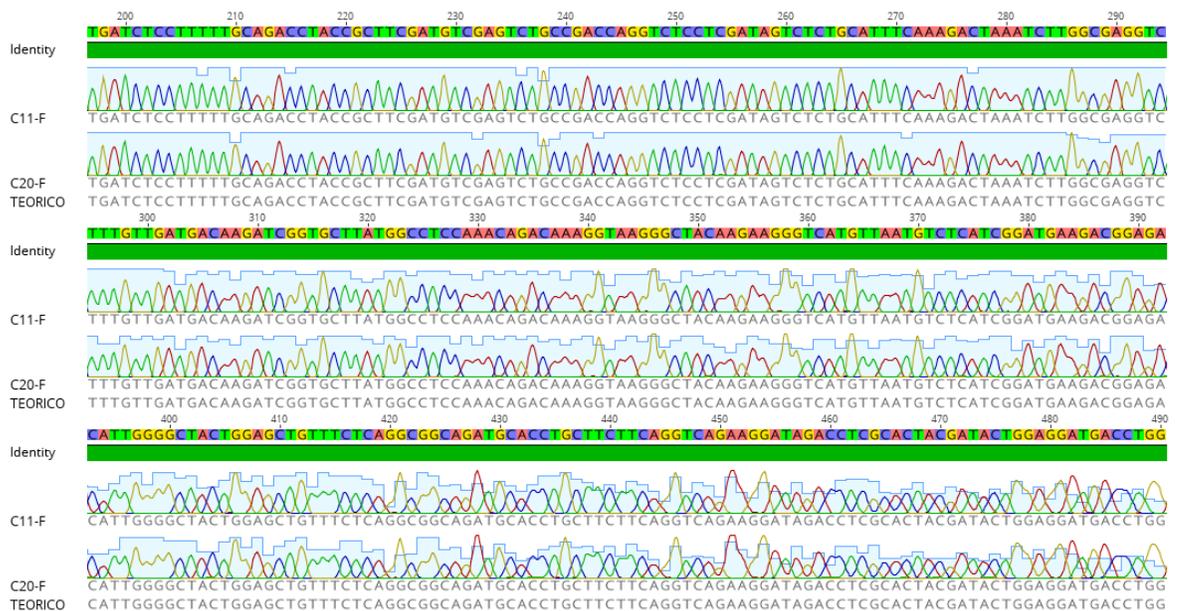


Fig. 28. Clonación del gen GdAKT en el vector de transición pJET1.2/blunt: Análisis de candidatas. Para el análisis de candidatas por PCR se utilizó ADN genómico como control positivo y para el análisis por restricción se hicieron digestiones dobles con las enzimas EcoRI y BamHI en NEBuffer 3.1. Se utilizaron geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio. a) Representación esquemática de la construcción esperada, es posible obtener la construcción con el gen invertido. b) Análisis de las candidatas 1-10 por PCR (arriba) y verificación de la integridad de los plásmidos extraídos por Easyprep (abajo). c) Análisis de las candidatas 11-20 por PCR (izquierda, arriba) y verificación de la integridad de los plásmidos extraídos por Miniprep (izquierda, abajo). Análisis por restricción de las candidatas 11-20 por restricción (derecha), se colocaron controles sin digerir después de cada muestra digerida. d) Análisis de las candidatas 21-25 por PCR de colonia (izquierda) y restricción (derecha). e) Secuenciación del plásmido de las candidatas 11 y 20, utilizando el iniciador sentido de GdAKT (GdAKT-F1) (ver anexos), el alineamiento se generó con el programa Geneious v.3.6.1.

Subclonación de GdAKT en el vector de expresión pPROEX-I

Una vez que se determinó la integridad del inserto en el vector transitorio pJET1.2/blunt, se procedió a subclonarlo en el vector de expresión pPROEX-1, con la finalidad de expresar la proteína con una etiqueta de 6 Histidinas en el extremo amino terminal, que facilitan su posterior purificación por cromatografía de afinidad con una columna de níquel.

Para esto, el vector pJET1.2:GdAKT se sometió a una doble restricción con las enzimas EcoRI y BamHI, para liberar el inserto GdAKT, a continuación, se digirió también el vector de expresión pPROEX-I con las mismas enzimas, ambos fragmentos, vector e inserto, se purificaron por electrodiálisis y se ligaron con una proporción vector:inserto de 1:3, utilizando 50 ng (0.020 pmol) de vector y 37.5 ng (0.060 pmol) de inserto. La ligación se incubó por 15 min a temperatura ambiente, según el inserto de la ligasa T4 (New England BioLabs®) y se transformó en células de *Escherichia coli* SURE2, sin embargo, no se obtuvieron colonias transformantes, posiblemente debido a que el vector digerido y purificado por electrodiálisis no se podía resuspender, probablemente debido a altas concentraciones de sal (acetato de sodio 3 M), utilizada para precipitar el ADN purificado. El problema se abordó utilizando una menor cantidad de acetato de sodio 3 M recién preparado, específicamente 7%, en vez de 10%; adicionalmente, se probó precipitar el ADN purificado con 20% de acetato de amonio 10M e incluso precipitar el ADN sin ninguna sal, y se utilizaron diferentes proporciones vector:inserto (1:1 y 1:6), sin embargo, los

problemas de resuspensión del vector continuaron (**Fig. 29**), y en algunos casos no se pudo recuperar fragmento puro, como fue el caso de la precipitación con acetato de amonio. Aun así, con las precipitaciones donde sí se recuperó vector puro, no se lograron obtener colonias transformantes con las ligaciones hechas con estos fragmentos. Finalmente, se realizó la purificación de ambos fragmentos, vector e inserto, utilizando columnas Zymo-Spin™ (Zymo Research®) para evitar el paso de la precipitación del ADN. Los fragmentos fueron ligados con proporciones 1:3, 1:5, 1:6 y 1:10, incubando la reacción de ligación por 24 h a temperatura de cajón y transformados en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* SURE2 quimio y electrocompetentes, sin embargo, no fue posible obtener candidatas.

Ligación	Proporción	Precipitación pPROEX-1	Precipitación pJET1.2:GdAKT	t ligación	Transformación
1	1:3	10% C2H3NaO2 3M	10% C2H3NaO2 3M	15 min	SURE2 quimiocompetentes
2	1:6	-	10% C2H3NaO2 3M	15 min	SURE2 quimiocompetentes
3	1:3	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	15 min	SURE2 quimiocompetentes
	1:5	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	15 min	XL1blue quimiocompetentes
4	1:3	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	72 h	SURE2 electrocompetentes 1
5	1:3	5% C2H3NaO2 3M	10% C2H3NaO2 3M	16 h	SURE2 electrocompetentes 2
	1:6	5% C2H3NaO2 3M	10% C2H3NaO2 3M	16 h	SURE2 electrocompetentes 2
6	1:1	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	16 h	SURE2 quimiocompetentes
	1:6	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	16 h	SURE2 quimiocompetentes
	1:6	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	16 h	SURE2 quimiocompetentes
	1:10	Zymo-Spin™	Zymo-Spin™	16 h	SURE2 quimiocompetentes

Tabla 1. Ligaciones realizadas para obtener la construcción pPROEX-I:GdAKT

Para verificar si los fragmentos se estaban ligando, se cargó una ligación 1:6 en un gel de agarosa al 1% teñido con Vistra Green (ChemicalBook®), compuesto que tiene un límite de detección ~2.5 veces más alto que el bromuro de etidio, permitiendo detectar tan poco ADN como 25 pg en un gel de agarosa y 10 pg en un gel de acrilamida. El resultado fue un conjunto de bandas de diferentes tamaños, varias con tamaños superiores a la del inserto (1,769 pb) y a la del vector vacío (4,683 pb), lo cual indica que sí había varios productos de ligación, de los cuales se esperaba uno de 6,452 pb (**Fig. 30b**).

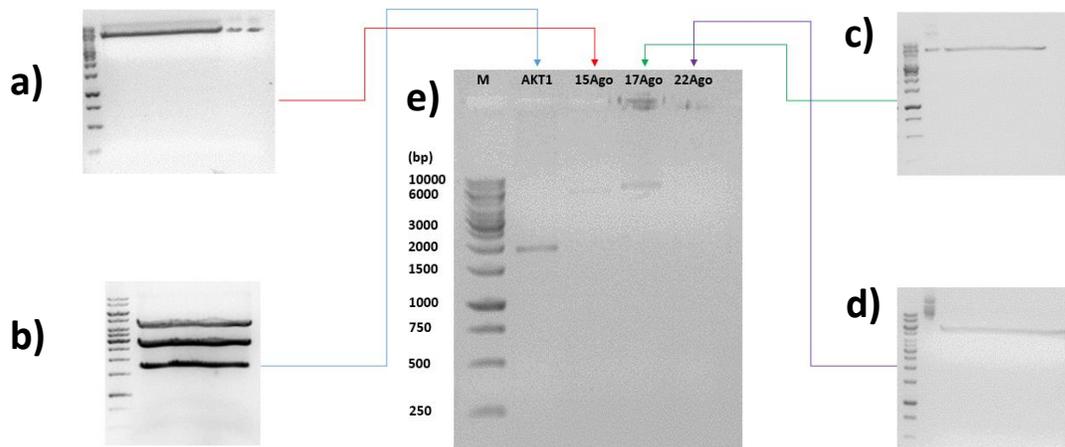
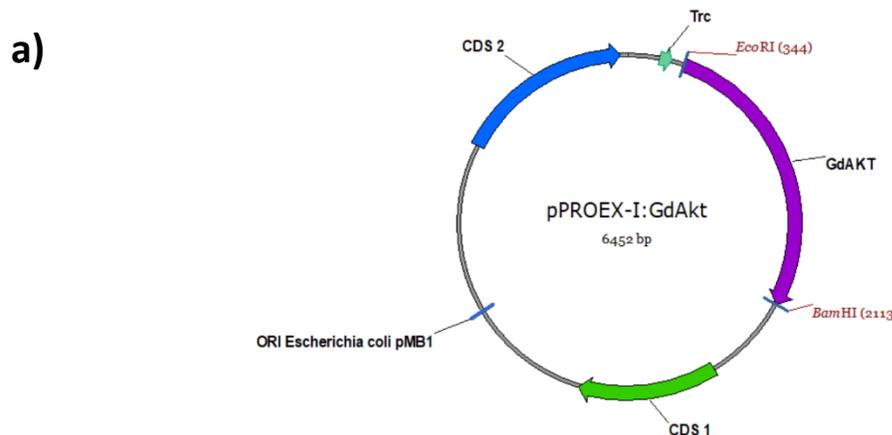


Fig. 29. Digestiones y purificaciones representativas de los fragmentos utilizados en las ligaciones. b) Digestión de pJET1.2:GdAKT (transformante 11) con el par de enzimas EcoRI HF (New England BioLabs®) y BamHI en NEBuffer CutSmart 1X durante 30 min a 37° C, precipitación con 10% acetato de sodio 3M. a) Digestión con el par de enzimas EcoRI HF y BamHI en NEBuffer CutSmart por 2 h a 37° C, precipitación con 10% de acetato de sodio 3M. c): Digestión secuencial de pPROEX-I con el par de enzimas EcoRI HF y BamHI en NEBuffer CutSmart por 2 h a 37° C, cada una, precipitación con 10% acetato de sodio 3M recién preparado. d) Digestión secuencial de pPROEX-I con el par de enzimas EcoRI HF y BamHI en NEBuffer CutSmart por 2 h a 37° C cada digestión, precipitación con 20% de acetato de amonio 10 M. e) Fragmentos purificados. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: GdAKT purificado, sin problemas de resuspensión. Carriles 3, 4 y 5: pPROEX-I purificado, precipitado con diferentes sales. En todos los casos hubo problemas de resuspensión del ADN, incluso calentando las muestras a 65° C por 20 min. Se utilizaron geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

Cabe mencionar que dichas bandas no provienen de las extracciones de plásmido utilizadas para digerir ninguno de los plásmidos de procedencia de los fragmentos, pues dichos fragmentos se observan puros al cargarlos en un gel de agarosa al 1% (**Fig. 30c**).



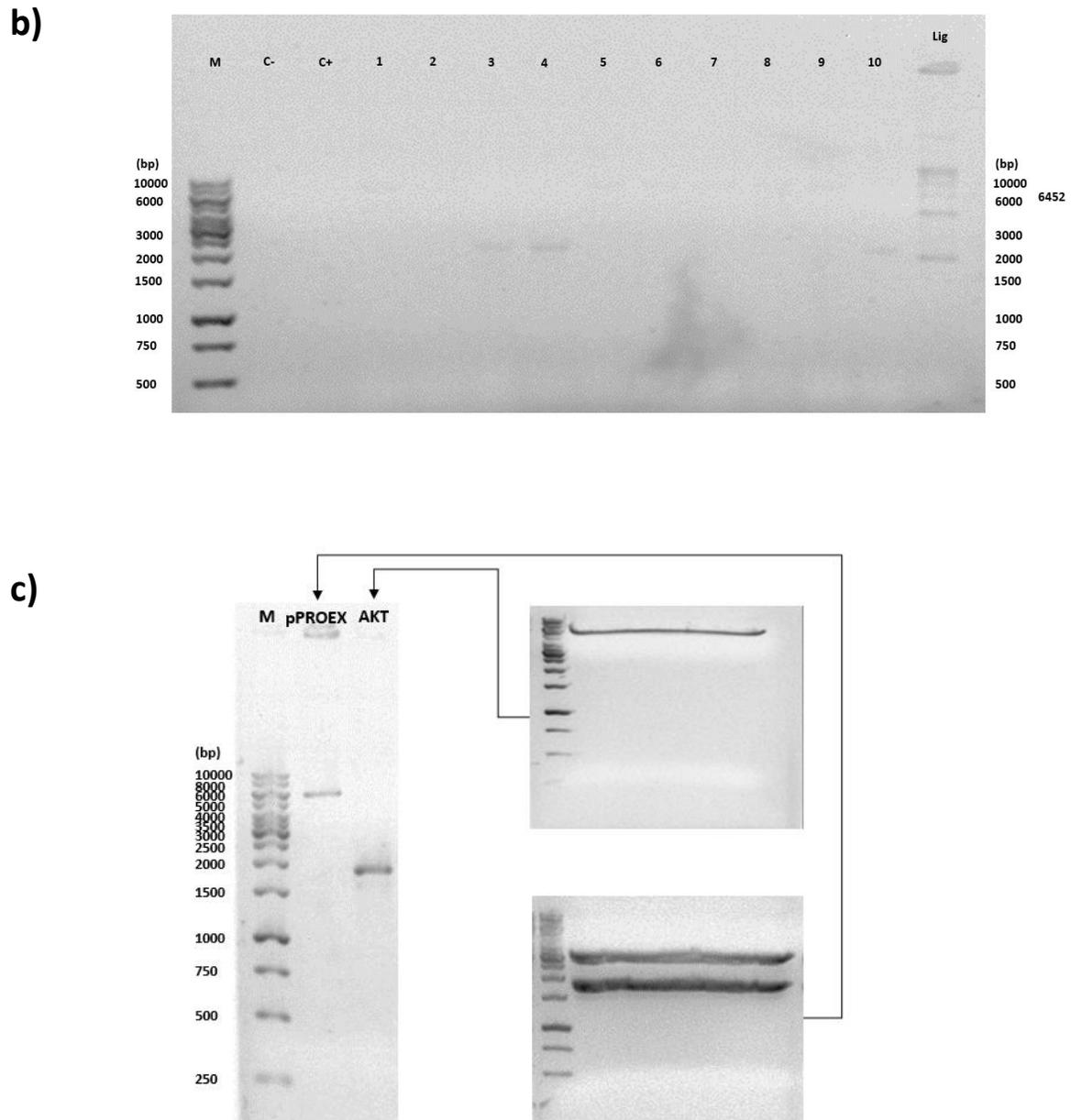


Fig. 30. Ligación del vector pPROEX-I y el inserto GdAKT con una proporción 1:6. a) Gel de agarosa al 1%, teñido con Vistra Green. En el último carril se cargaron 10 μ L (25 ng pPROEX+ 56 ng de GdAKT) de ligación con una proporción 1:6 incubada por 16 h a temperatura de cajón. b) Fragmentos purificados utilizados en la ligación 1:6 cargada en el gel de agarosa al 1% teñido con Vistra Green. Del lado derecho se muestran las digestiones que se purificaron y debido a los problemas de resuspensión ocurridos al utilizar sales para

precipitar dichos fragmentos, se utilizaron columnas Zymo-Spin™ para evitar este paso. Se utilizaron geles a agarosa al 1%.

Se ha reportado que una de las desventajas de utilizar plásmidos con el promotor sintético *trc*, es el alto nivel basal de transcripción (en otras palabras, fuga transcripcional). El vector pPROEX-1, tiene precisamente el promotor *trc* (Fig. 30a y 31), que deriva de la porción -35 del promotor *trp* de *Escherichia coli* (del operón de triptófano) y la porción -10 del promotor *lac UV5*, regulado por represión catabólica y el estado metabólico de la bacteria. (Hanna Tegel, 2011). Con base en la información anterior y lo observado durante el proceso de subclonación del gen GdAKT en el vector de expresión pPROEX-1, concluimos que la proteína se estaba expresando en las cepas SURE2 y XL1-Blue de *Escherichia coli*, debido al alto nivel de transcripción basal o fuga transcripcional y que esta proteína le estaba resultando tóxica a la bacteria, por lo cual no logramos obtener colonias transformantes.

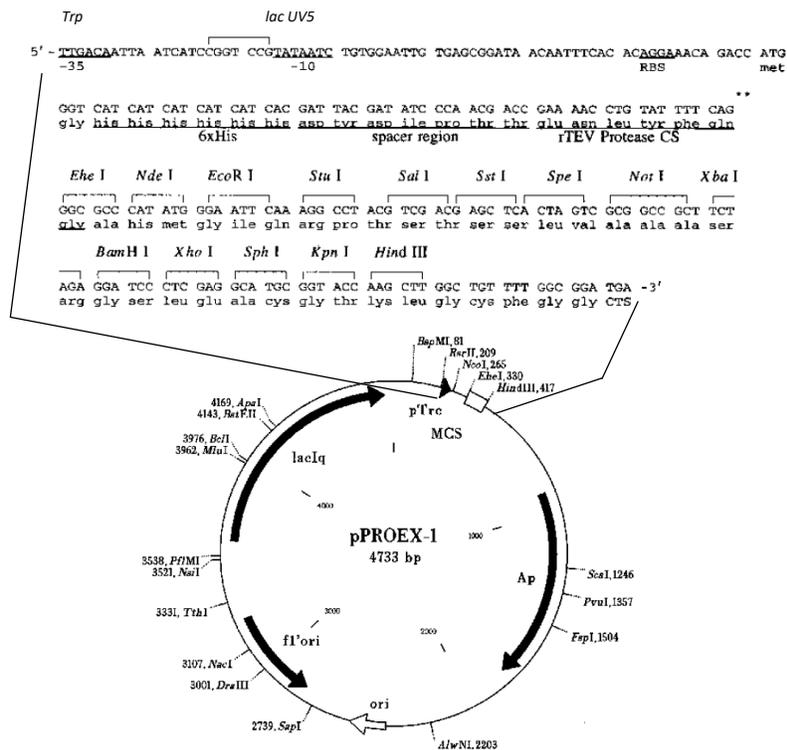


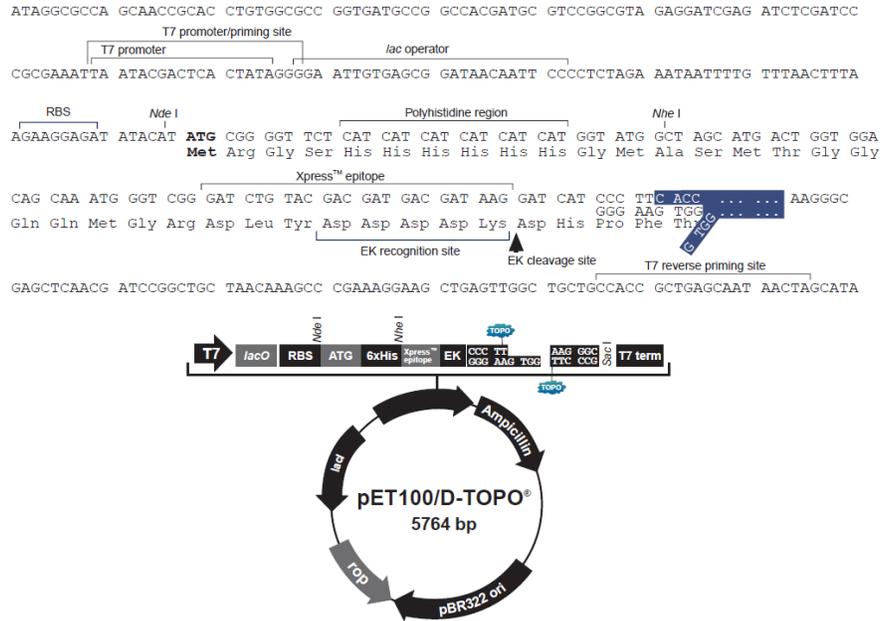
Fig. 31: Características del vector pPROEX-I. El vector de expresión pPROEX-I posee un sitio de clonación múltiple gobernado por el promotor sintético *trc*, constituido por la región -35 del promotor *trp* de *Escherichia coli* y la región -10 del promotor *lac UV5*. Posee una regulación de un solo paso, en donde el gen *laqI* está mutado para producir mayores niveles de represor, que se une a la región -10 del promotor *trc* reprimiendo, en teoría, la transcripción de los genes río abajo.

Clonación en el vector de expresión PET100/D-TOPO

Debido a que no se logró clonar el gen GdAKT (único blanco de fosforilación identificado) en el vector de expresión pPROEX-I, procedimos a reiniciar la clonación del gen GdAKT en otro vector de expresión que tuviera un sistema de regulación más fino, ya que un promotor más estrechamente regulado tiene un mínimo de transcripción basal, lo cual resulta particularmente importante si la proteína de interés es tóxica para la bacteria receptora. La opción más viable nos pareció la clonación en el vector de expresión PET100, disponible en el laboratorio.

Este vector posee un sistema de regulación de dos pasos: Por un lado, el vector PET100 contiene el gen *lacI*, gobernado por un promotor constitutivo que se transcribe de manera constante, produciendo finalmente al represor Lac I, a su vez, los genes clonados en el vector PET100 están gobernados por un promotor T7, que es transcrito por la ARN Polimerasa del fago T7, gen que se encuentra codificado solo en el genoma de ciertas cepas de *Escherichia coli* diseñadas para la expresión de proteínas y se encuentra gobernado por el promotor *lac UV5*. La proteína represora Lac I transcrita a partir del gen codificado en el vector, reconoce el promotor *lac UV5* en el genoma de *Escherichia coli* y se une, impidiendo la transcripción de la ARN Polimerasa del fago T7, adicionalmente, existe también una región operadora del operón *lac* en el vector, a donde se puede unir el represor (**Fig. 32**). Sin embargo, en presencia de lactosa (o un galactósido, que se metaboliza a un análogo de la lactosa, como el IPTG), ésta se une al represor Lac I, provocando un cambio conformacional que lo libera del promotor *lac UV5* o de la región operadora *lacO* del vector, provocando la transcripción de la T7 ARN Polimerasa, que después se une al promotor T7 para transcribir los genes clonados en el vector de expresión.

a)



b)

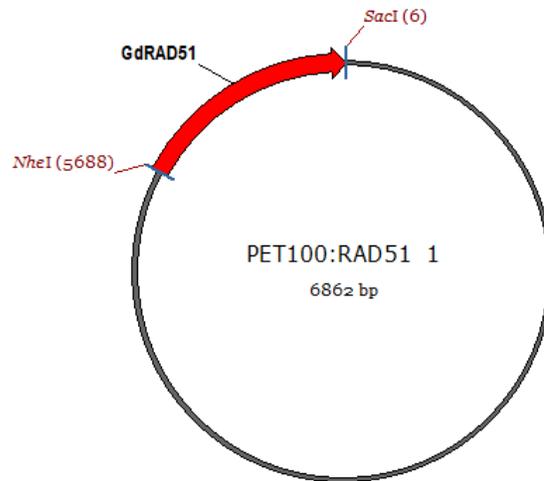


Fig.32. Características del vector PET100/D/TOPO. a) El vector de expresión PET100/D-TOPO, posee un promotor T7 y permite agregar una etiqueta de 6 Histidinas en el extremo amino terminal de la proteína clonada, que facilita la purificación por cromatografía de afinidad. b) El vector PET100, disponible en el laboratorio, tiene como inserto al gen RAD51 de *Giardia duodenalis*.

La clonación del gen GdAKT se llevó a cabo mediante ligación de Gibson (**Daniel G. Gibson, 2009**), para clonar el gen directamente en el vector de expresión PET100 disponible en el laboratorio, que posee como inserto al gen RAD51 de *Giardia duodenalis*, flanqueado por los sitios de restricción NheI en el extremo 5' y SacI en el extremo 3'. Debido a estas dos

condiciones, se diseñaron los iniciadores sentido (GdAKT-F2) y antisentido (GdAKT-R2), agregando 20-pb bases complementarias al vector de expresión PET100 vacío, en el extremo 5' de ambos iniciadores, y las bases necesarias para mantener los sitios de restricción ya mencionados (ver anexos).

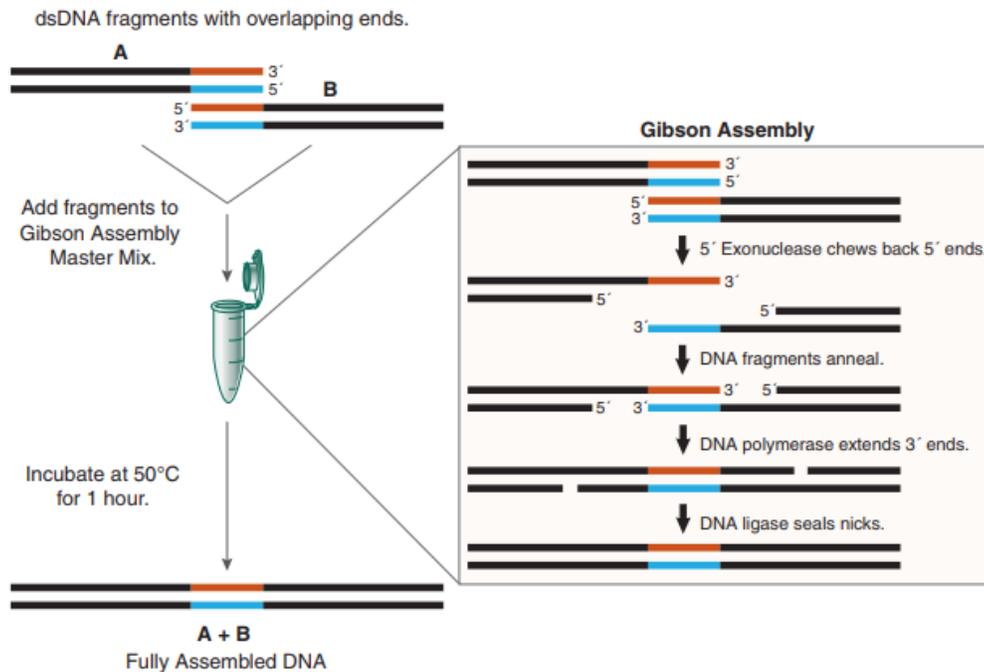


Fig. 33. Resumen de la ligación de Gibson.

La ligación de Gibson es un método de recombinación *in vitro*, en un solo paso de manera isotérmica, acercamiento que puede ser usado para unir moléculas de ADN con un tamaño total tan largo como 583 kb y para clonar productos unidos de ADN tan largos como 300 kb en *Escherichia coli*. El método de ensamblaje isotérmico se optimizó a una temperatura de 50° C, conteniendo tres enzimas: 5' exonucleasa T5 (Epicentre®), ADN Polimerasa Phusion (New England BioLabs®) y *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs®) (Daniel G. Gibson, 2009). El racional de esta técnica es que, a esa temperatura, la 5' exonucleasa remueve nucleótidos en dirección 5' a 3', a continuación, ambos fragmentos, vector e inserto hibridan por complementariedad de bases (agregadas en el inserto por PCR, a través de la inclusión de ~20 pb en los iniciadores), a continuación, una ADN polimerasa extiende las cadenas en

dirección 5' a 3' y finalmente, una ADN ligasa une covalentemente ambos fragmentos (**Fig. 33**).

Amplificación por PCR del gen GdAKT a partir de ADN genómico de *Giardia*

Una vez disponibles los iniciadores diseñados, se cargaron en un gel de agarosa al 2% para verificar su integridad y para comprobar que fueron diseñados correctamente se amplificó por PCR el gen GdAKT a partir de ADN genómico de *Giardia duodenalis* del aislado WB y utilizando *Taq* polimerasa (**Fig. 34b**). El resultado fue una banda del tamaño esperado de 1,807 pb.

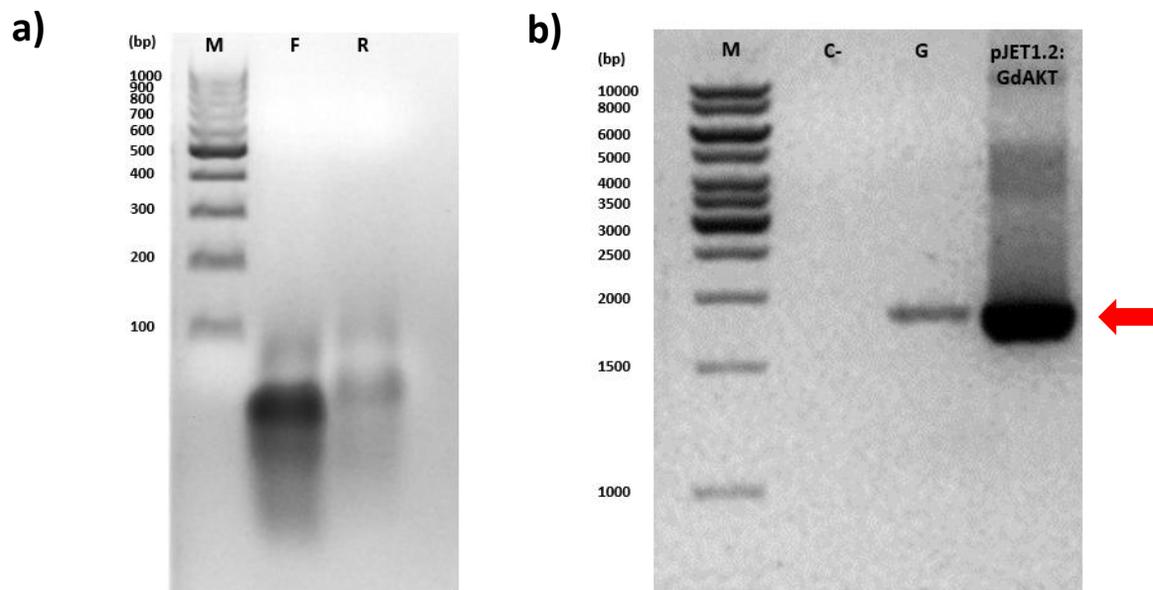


Fig. 34. Amplificación del gen GdAKT por PCR a partir de ADN genómico de *Giardia*. a) verificación de la integridad de los iniciadores diseñados en un gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1000 pb. Carril 2: Iniciador sentido (GdAKT-F2). Carril 3: Iniciador antisentido (GdAKT-R2). b) PCR del gen GdAKT a partir de ADN genómico de *Giardia duodenalis*, del aislado WB. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: PCR GdAKT.

Clonación de GdAKT en el vector de expresión PET100

Una vez que se probó que los iniciadores diseñados amplificaban el producto con el tamaño esperado de 1,807 pb, se procedió a clonar dicho gen en el vector de expresión PET100. Para esto, se amplificó el gen GdAKT con una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion®

NEB) y el amplicón de tamaño esperado se escindió del gel y se purificó por electroelución (Fig. 35a).

Por otro lado, se transformaron células químicamente competentes de *Escherichia coli* SURE2 con el plásmido PET100:GdRAD51, una colonia transformante aislada se cultivó en 150 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final 100 µg/mL durante 16 h y se realizó extracción de plásmido por Easyprep. A continuación, se digirieron secuencialmente 30 µg de PET100:GdRAD51 con la enzima de restricción NheI en NEBuffer 2.1 por 16 h, se precipitó en el mismo tubo, con 10% de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% de grado biología molecular durante 30 min a -80° C, a continuación se colectó y lavo la pastilla de ADN y se resuspendió en la siguiente reacción de digestión con la enzima de restricción SacI en NEBuffer 1.1 y se digirió por 16. Finalmente, esta digestión secuencial se cargó en un gel preparativo de agarosa al 1% (Fig. 35b), se cortó la banda correspondiente al vector vacío y se purificó por electrodiálisis.

Una vez disponibles ambos fragmentos purificados, se concentraron en un concentrador de vacío hasta sequedad, se resuspendieron en un volumen adecuado de agua estéril libre de nucleasas y se incluyeron en la reacción de ligación de Gibson. La reacción de ligación de Gibson se incubó a 50° C durante 1 h. A continuación, se transformó la mitad de esta ligación (250 ng PET100 vacío + 237 ng GdAKT) en células químicamente competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue (ver anexos), cepa seleccionada por sus características genotípicas, que reducen la capacidad de la bacteria para llevar a cabo eventos de recombinación o escisión inespecífica de ADN de doble cadena en la construcción transfectada, entre la cuales destacan los genes mutados con pérdida de función de la recombinasa *recA1*, y las endonucleasas *endA1* y *hsdR17*.

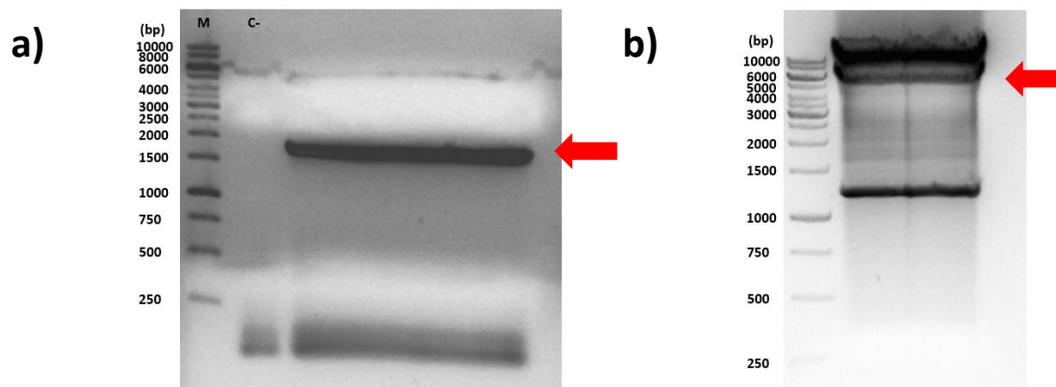
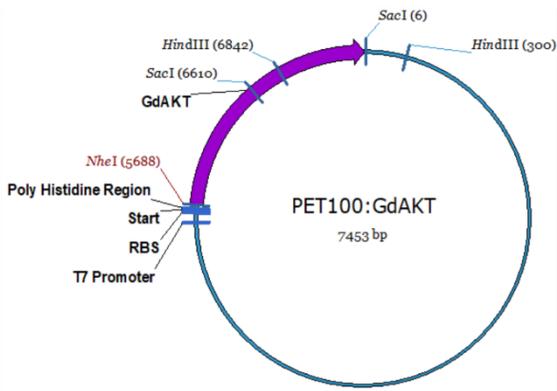


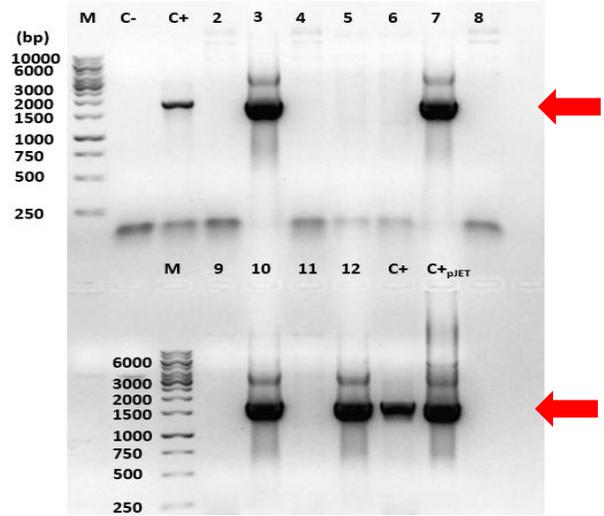
Fig. 35. Vector e inserto utilizados para la reacción de ligación. a) Inserto: Amplificación del gen GdAKT con una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion® NEB) a partir de ADN genómico de *Giardia duodenalis*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: PCR con Phusion ADN Polimerasa. b) Vector: digestión secuencial del vector de expresión PET100:GdRAD51. Geles de agarosa al 1%.

De la transformación en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* XL1-Blue se obtuvieron 25 candidatas, las cuales fueron analizadas para verificar la presencia del inserto por PCR y restricción. En el caso del análisis por PCR, se analizaron las primeras 12 candidatas y se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (1,087 pb) para las candidatas 3, 7, 10 y 12. Como controles positivos se utilizaron ADN genómico de *Giardia duodenalis* y la construcción pJET1.2:GdAKT (**Fig. 36b**), realizada en el primer intento de clonación del gen GdAKT por ligación convencional. Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* para seleccionar una enzima de restricción que generara un patrón fácilmente reconocible, para esto se identificaron los sitios de restricción presentes en la construcción teórica (**Fig. 36a**) y se seleccionó la enzima HindIII, debido a que solo había dos sitios presentes a lo largo de la construcción, por lo tanto, la digestión con esta enzima generaría dos fragmentos: uno de 911 y otro de 6,542-pb (**Fig. 36c**). De este modo, se digirieron los plásmidos de las candidatas 3, 7, 10 y 12 que amplificaron el gen GdAKT con un tamaño esperado, esta digestión se incubó por 16 a 37° C y se cargaron en un gel de agarosa al 1%, obteniendo el patrón de restricción esperado para las cuatro candidatas (**Fig. 36d**). Finalmente, se mandó secuenciar la construcción de las candidatas 3 y 7, concluyendo que la clonación se realizó exitosamente (**Fig. 36e**).

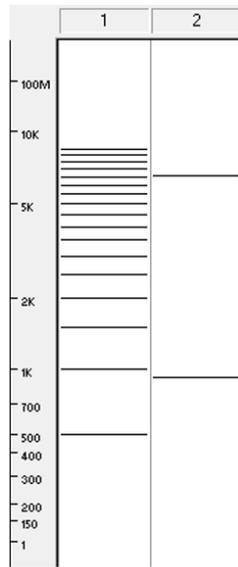
a)



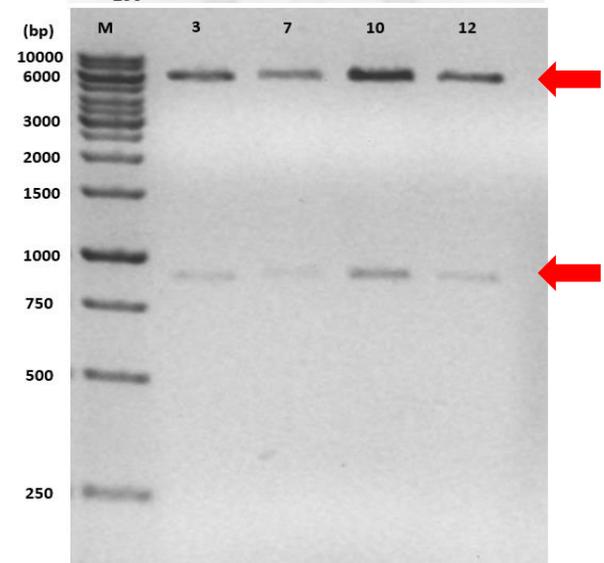
b)



c)



d)



e)

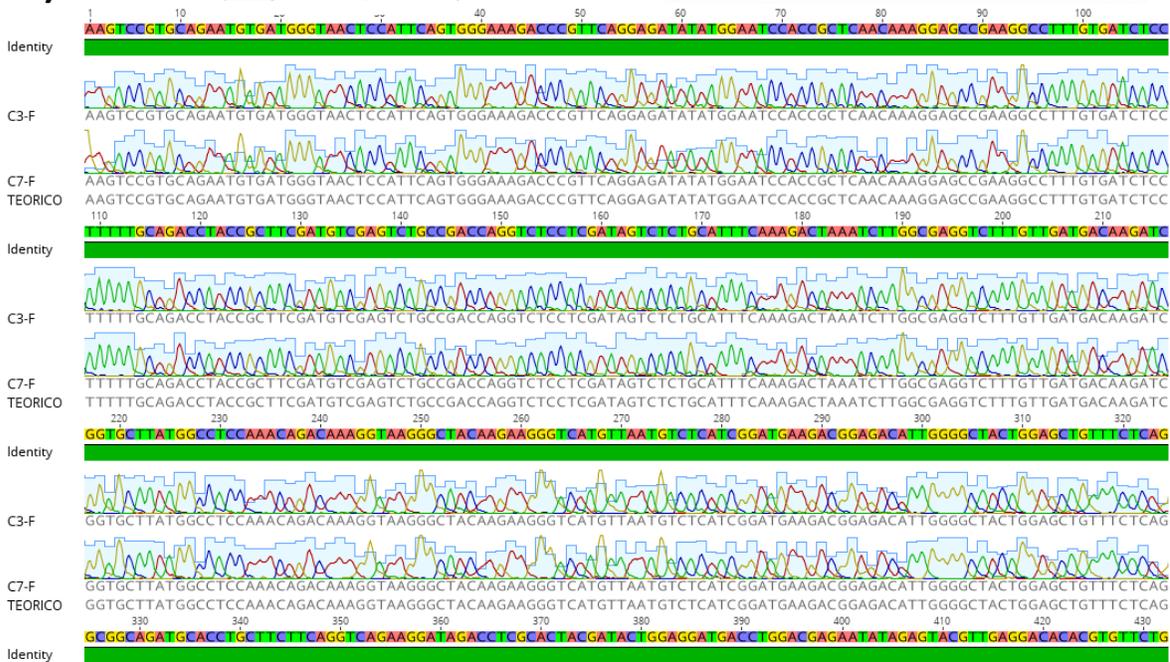


Fig. 36. Análisis de candidatas por PCR, restricción y secuenciación de la construcción PET100:GdAKT. a) Construcción *in silico* PET100:GdAKT, se muestran los sitios de restricción más destacables. b) Análisis por PCR de las candidatas 1-12, utilizando los iniciadores diseñados para la clonación por ligación de Gibson (GdAKT-F2 y GdAKT-R2). Arriba: Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carril2: Control negativo. Carril 3: Control positivo, utilizando ADN genómico de *Giardia duodenalis* del aislado WB. Carriles 4-10: análisis de las candidatas 2-8. Abajo: Carril 3: Marcador de peso molecular de 1 kb. Carriles 4-7: Análisis por PCR de las candidatas 9-12. Carril 8: Control positivo, utilizando ADN genómico de *Giardia duodenalis* del aislado WB. Carril 9: Control positivo, utilizando como molde la construcción PJET1.2:GdAKT. c) Digestión *in silico* de la construcción PET100:GdAKT con HindIII, utilizando el programa Vector NTI Advance™ 11.0 (Invitrogen®). d) Digestión de los plásmidos de las candidatas 3, 7, 10 y 12 con HindIII en NEBuffer 1.2 1X, por 16 h a 37° C. Marcador de peso molecular de 1 kb. d) Secuenciación de las candidatas 3 y 10 de la construcción PET100:GdAKT. El alineamiento se realizó con el programa Geneious v.3.6.1.

Adicionalmente, se comprobó por PCR la clonación del gen GdAKT en el vector de expresión PET100, utilizando los iniciadores T7-F y T7-R, que amplifican el inserto clonado en el vector de expresión PET100, pero diseñados a partir de la secuencia del vector. Para esto, inicialmente se verificó la integridad de los iniciadores, cargándolos en un gel de agarosa al 2%. Habiendo comprobado la integridad de los iniciadores, se realizó la PCR. Como control positivo se utilizaron los mismos iniciadores, pero usando como molde la construcción PET100:GdRAD51, el resultado fue una banda del tamaño esperado de 1,966 pb, para la construcción realizada en este trabajo PET100:GdAKT y una banda del tamaño esperado para el control positivo de 1,375-pb (**Fig. 37b**).

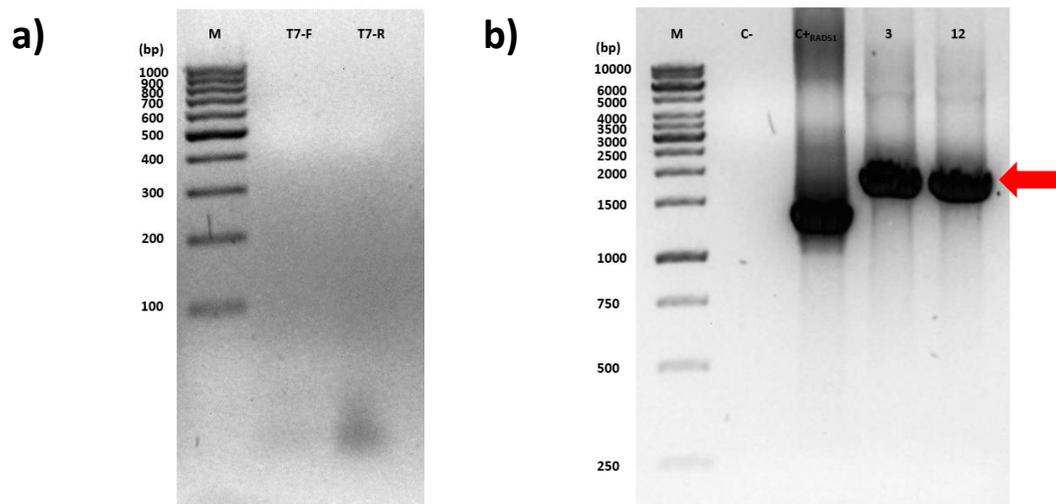


Fig. 37. Amplificación del inserto GdAKT en la construcción PET100:GdAKT con el par de iniciadores T7F y T7R. a) Integridad de los indicadores T7F y T7R. Gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1,000 pb. Carril 2: Iniciador sentido (T7-F). Carril 3: Iniciador antisentido (T7-R). b) Amplificación de los insertos en las construcciones PET100:GdRAD51 (control positivo) y PET100:GdAKT. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo. Carril 4: Amplificación del inserto en la construcción GdAKT de la candidata 3. Carril 5: Amplificación del inserto en la construcción GdAKT de la candidata 12.

Expresión de la proteína recombinante GdAKT en *Escherichia coli* SOLUBL21

Determinación de las condiciones de inducción de GdAKT recombinante

Habiendo comprobado la correcta clonación, se procedió a determinar las condiciones óptimas de inducción de la expresión de la proteína GdAKT recombinante. Para esto, se realizó una prueba piloto de inducción de la expresión de GdAKT a diferentes tiempos con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Inicialmente, se prepararon y transformaron células químicamente competentes de la cepa SOLUBL21, de *Escherichia coli* con las construcciones PET100:GdAKT de las candidatas positivas 3, 7, 10 y 12. Si bien su genotipo no ha sido reportado, se trata de una cepa mutante de *Escherichia coli* BL21 (DE3) que mejora la expresión de proteínas tóxicas y de manera soluble (**Catherine L. Deatherage, 2012**), razón por la cual seleccionamos esta cepa para la expresión de proteínas, dados los resultados de este trabajo, en donde aparentemente, la proteína resulta tóxica para las bacterias, pues la fuga transcripcional del vector de expresión pPROEX-I, no nos permitió obtener colonias transformantes. Una vez transformadas las bacterias, se procedió a tomar una colonia aislada y crecer un cultivo semilla toda la noche en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, para al día siguiente inocular 10 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. A continuación, el cultivo se llevó a una OD₆₀₀=0.5 y se separó 1 mL de este cultivo, como muestra no inducida y al resto se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Inmediatamente después de la adición del galactósido IPTG, se separó 1 mL de cultivo como muestra a tiempo 0 después de la inducción. En seguida, se indujo la expresión de proteína a diferentes tiempos: 1, 2, 4 y 6 h, separando 1 mL de cultivo cada hora, como muestras del tiempo de inducción en cuestión.

El paquete celular de estas muestras fue inmediatamente colectado y congelado a -20°C . Una vez obtenidas todas las muestras inducidas a diferentes tiempos, se resuspendieron los paquetes celulares en $200\ \mu\text{L}$ de Buffer Laemmli 2X + 5% de β -Mercaptoetanol y se hirvieron por 5 min y se cargaron $15\ \mu\text{L}$ de cada muestra en un gel SDS-PAGE al 10%, se llevó a cabo la electroforesis por 1.5 h a 100 V y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente esta membrana se bloqueó con 5% de leche en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante y después se incubó con anticuerpo primario (Anti-PolyHis 1:7:000) por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Después, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T, agitando 5 min a temperatura ambiente en cada lavado y finalmente se incubó con anticuerpo secundario (Anti-Mouse 1:30,000) 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se dejó secar y se reveló.

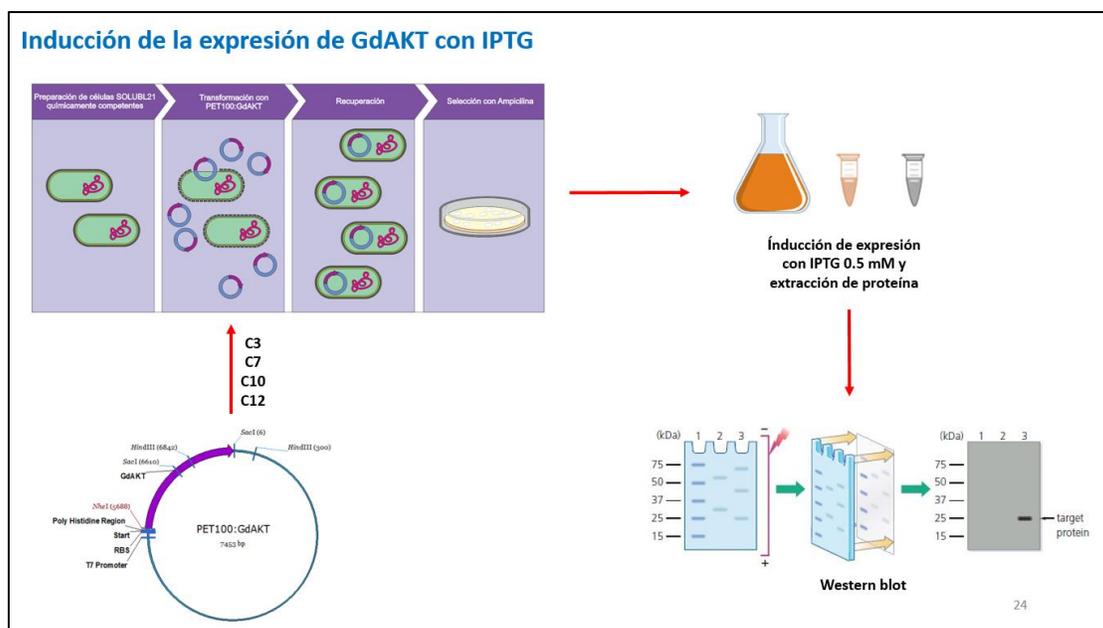


Fig. 38. Resumen de la metodología utilizada como prueba piloto para la inducción de la expresión de la proteína recombinante GdAKT.

No se observó expresión basal de la proteína en la muestra sin inducir, ni en las muestras a tiempo 0 y 1 h después de la inducción con 0.5 mM IPTG, esto en la transformación de las 4 construcciones de las candidatas positivas 3, 7, 10 y 12. Por otro lado, la proteína recombinante comienza a detectarse con un tamaño esperado de 67.58 kDa a partir de las 2 h y hasta las 6 h después de la inducción, observando, en todos los casos, la mayor

cantidad de proteína a las 4 h después de la inducción con 0.5 mM IPTG (**Fig. 39**), por lo tanto estas condiciones de inducción se utilizaron para las inducciones posteriores.

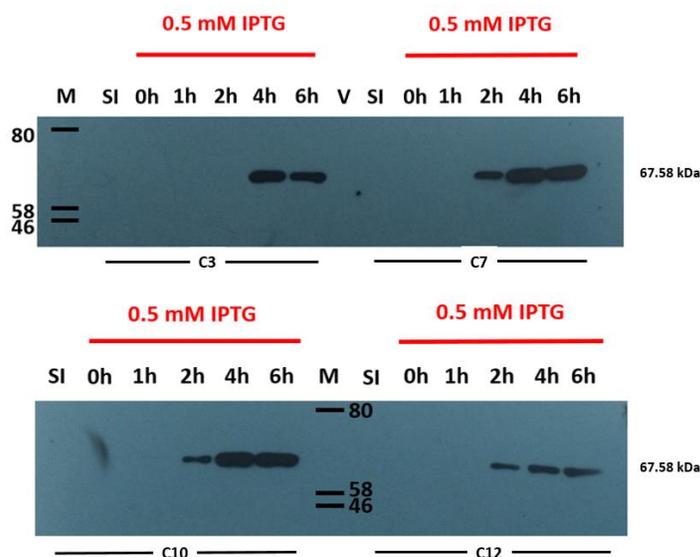


Fig. 39. Visualización de la inducción de la expresión de la proteína recombinante GdAKT con 0.5 mM IPTG. Arriba: Inducción de la expresión de la proteína recombinante GdAKT en células de *Escherichia coli* SOLUBL21 transformadas con la construcción PET100:GdAKT de las candidatas 3 (carriles 2-7) y 7 (carriles 9-14) a diferentes tiempos. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB®, prestained protein marker, broad range 7-175 kDa). Abajo: inducción de la expresión de la proteína recombinante GdAKT en células de *Escherichia coli* SOLUBL21 transformadas con la construcción PET100:GdAKT de las candidatas 10 (carriles 1-6) y 12 (carriles 8-13) a diferentes tiempos. Carril 7: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175 kDa). Se corrieron geles SDS-PAGE al 10%.

Purificación de la proteína recombinante GdAKT

Habiendo determinado la inducción con 0.5 mM IPTG durante 4 h a 37° C y en agitación constante, como condiciones ideales para la expresión de la proteína recombinante GdAKT, se procedió a expresarla en un cultivo de 500 mL para purificarla por cromatografía de afinidad con una columna de Agarosa-Níquel. Para esto, se inoculó con un cultivo semilla un volumen de 500 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, se llevó a OD₆₀₀=0.5 y se indujo la expresión con las condiciones establecidas. Se colectó el paquete celular y se lisaron las células por sonicación, según el protocolo establecido. el extracto total se filtró y se hizo pasar por una columna de agarosa níquel, se hicieron dos

lavados, uno con un buffer de lavado conteniendo una concentración de 30 mM de Imidazol y otro con un buffer con una concentración de 50 mM de Imidazol, se agregó el buffer de elución con una concentración de Imidazol de 300 mM y se colectaron 10 fracciones de 1 mL cada una, de estas fracciones se tomaron muestras de 20 mL y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10%. Se realizó un western blot usando como anticuerpo primario anti-PolyHis 1:7,000 y como secundario anti-mouse 1:30,000, en esta inmunodetección se observa que la proteína recombinante GdAKT eluye mayoritariamente en las fracciones 2-6 (**Fig. 40a**), por lo tanto, estas fracciones se mezclaron y concentraron, lo mismo se hizo para las fracciones con menor cantidad de proteína y se cargaron muestras de las mismas en geles SDS-PAGE al 10% para verlas por western blot y tinción Coomassie. En el Coomassie se observan dos bandas de tamaños similares, siendo la banda superior la correspondiente a GdAKT, con un peso de 67.58-kDa (**Fig. 40b**). No obstante, en el western blot se aprecia únicamente una banda del tamaño esperado y algunas bandas con un peso menor a 55 kDa que parecen ser degradación de la misma proteína, al ser reactivas al anticuerpo anti-PolyHis (**Fig. 40c**). Estos concentrados de proteína GdAKT fueron utilizados para los ensayos de actividad de cinasa.

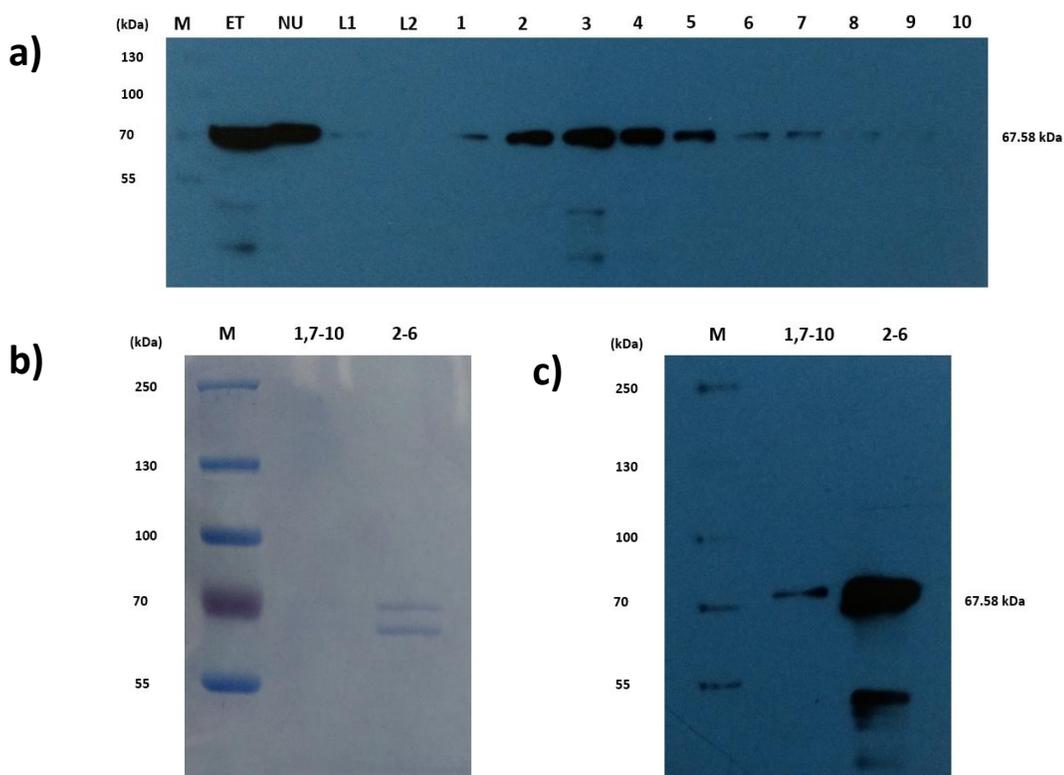


Fig. 40. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones la proteína recombinante GdAKT purificada por cromatografía de afinidad con una columna de agarosa-níquel. a) Purificación de la proteína GdAKT por cromatografía de afinidad con columna de níquel. Carril 2: Extracto total. Carril 3: Fracción no unida a las perlas de agarosa-níquel. Carril 4: Lavado 1: concentración de Imidazol del buffer de 30 mM. Carril 5: Lavado 2: concentración de Imidazol del buffer de 50 mM. Carriles 6-15: fracciones eluidas con el buffer de elución que tiene una concentración de Imidazol de 300 mM. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10%. b) SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie para visualizar el concentrado de las fracciones 1,7, 8, 9 y 10 (Carril 2) y de las fracciones 2-6 (Carril 3). c) Western blot usando anti-PolyHis de los concentrados de las fracciones 1,7, 8, 9 y 10 (Carril 2) y de las fracciones 2-6 (Carril 3). Para los tres casos se usó el Marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa (ThermoFisher Scientific™).

Objetivo 3: Inmunopurificar la proteína putativa gTOR/ATM-3HA

Se utilizaron trofozoítos transgénicos cuyo gen endógeno de ATM fue etiquetado en nuestro grupo de trabajo (**María Luisa Bazán Tejeda, Resultados no publicados**), con una etiqueta que contiene tres epítopes de hemaglutinina (-3HA) en el extremo carboxilo terminal, mediante recombinación homóloga como se reportó anteriormente (**Stéphane Gourguechon, 2011**). Esta técnica resulta de gran utilidad, puesto que, dada su alta divergencia, muchos de los anticuerpos útiles en biología molecular no reconocen proteínas de *Giardia* y el etiquetado de genes con epítopes bien caracterizados representa una aproximación rápida para solucionar este obstáculo, ya que el desarrollo de anticuerpos específicos es largo y laborioso, requiriendo típicamente varios meses. La técnica consiste en clonar la porción C-terminal del gen de interés en marco con una etiqueta epítope en un vector que contiene un cassette de resistencia seleccionable. Esta región debe contener un sitio de restricción, que sea único en el vector resultante; adicionalmente, este sitio debe estar localizado al menos a 90-pb ya sea del sitio de clonación 5' o 3'. El plásmido resultante es después linealizado usando la enzima de restricción seleccionada (para inducir la recombinación homóloga) e introducido en las células que son seleccionadas usando el antibiótico seleccionado (**Stéphane Gourguechon, 2011**).

La adición de la etiqueta-3HA en la proteína gTOR/ATM endógena permite no solo detectar a la proteína con un anticuerpo específico contra esta etiqueta, sino que además permite la inmunopurificación con perlas de agarosa recubiertas de anti-HA. Para esto, se cultivaron

trofozoítos transgénicos, recuperando el paquete celular y lisándolo con RIPA, el extracto total se incubó con perlas de agarosa recubiertas de anti-HA y se agregaron los inhibidores de proteasas 1 mM TLCK y 2mM Benzamidina, después estas perlas fueron colectadas por centrifugación y lavadas. A continuación, se liberó la proteína con buffer Laemmli 5X + 5% de β -Mercaptoetanol y se cargó en un gel UREA-PAGE al 6% con a una concentración final de 8 M. El resultado fue una banda del tamaño esperado, de 366.704 kDa (**Fig. 41**).

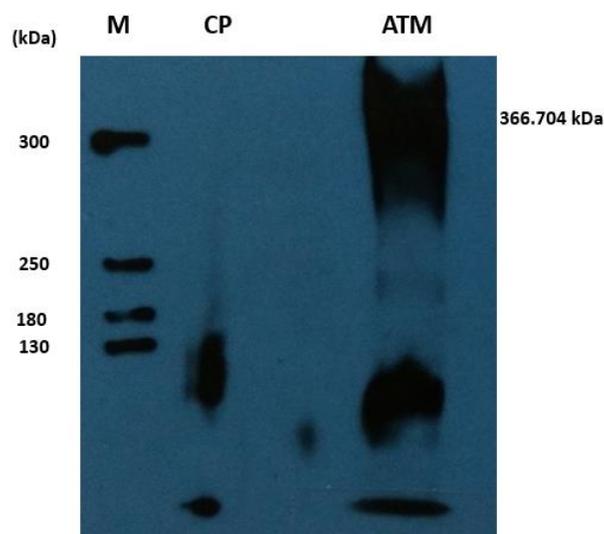


Fig. 41. Western blot de la proteína gTOR/ATM-3HA inmunopurificada. Carril 1: Marcador de peso molecular (Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder. Thermo®). Carril 2: Control positivo, proteína etiquetada con 3HA, incluida con las perlas de agarosa. Carril 4: Inmunoprecipitación de la proteína gTOR/ATM-3HA.

Para realizar los ensayos de actividad de cinasa *in vitro*, se utilizó la proteína recombinante purificada y concentrada GdAKT como sustrato y se inmunopurificó la proteína gTOR/ATM-3HA cuando para cada ensayo.

Objetivo 4: Determinar la actividad *in vitro* de cinasa de gTOR/ATM en los blancos putativos de gTOR de *Giardia duodenalis* recombinantes con y sin tratamiento de rapamicina.

Una vez que se purificaron tanto el sustrato, GdAKT, como la enzima cinasa, gTOR/ATM-3HA, se procedió a realizar el ensayo de actividad de cinasa *in vitro*. Para esto, primero se probó inmunodetectar la actividad *in vitro* de cinasa, utilizando los anticuerpos anti-P-Thr y anti-P-Ser, debido a la falta de conservación de los residuos que son fosforilados en la

proteína GdAKT, respecto al ortólogo de *Homo sapiens* (Thr308 y Ser473). Se utilizó una concentración saturante de ATP (200 μM), ya que la mayoría de las MAPK tienen valores de K_m para el ATP en el rango de 10-150 μM . Adicionalmente se usaron las siguientes concentraciones de los componentes de la reacción, basándonos en un protocolo publicado hace algunos años (Doug W. Chan, 2000): 1X Buffer de cinasa, 1X cOmplete, 0.5 mM DTT, 10 mM MnCl_2 y cuando fue necesario se agregó 10 mM MgCl_2 , 20 μM Rapamicina, 0.75 μM Temsirolimus, 300 μM KU55933 o 10 μM Cafeína y se agregaron las proteínas gTOR/ATM-3HA y GdAKT.

Las reacciones se incubaron 30 min a 30° C y a continuación se agregó buffer Laemmli 5X + 5% β -Mercaptoetanol para detener la reacción, las muestras se hirvieron por 5 min y se cargaron en geles SDS-PAGE al 10%, a continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó un western blot utilizando Anti-P-Thr 1:5,000 o anti-P-Ser 1:5,000 como anticuerpo primario y anti-Mouse como anticuerpo secundario. No obstante, no se obtuvieron resultados concluyentes, puesto que no se observó un patrón claro de fosforilación ni se observa un efecto inhibitorio por parte de los cuatro inhibidores utilizados, en comparación a como se pudo apreciar en los ensayos realizados en nuestro grupo de trabajo (María Luisa Bazán Tejeda, 2016. Datos no publicados) con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ utilizando el sustrato PHAS-I humano (4EBP) (**Fig. 9**).

Adicionalmente, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bajo las siguientes condiciones: 1X Buffer de cinasa, 10 μM ATP frío, 2 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por reacción, 1X cOmplete, 0.5 mM DTT, 10 mM MnCl_2 y cuando fue necesario se agregó 10 mM MgCl_2 , 20 μM Rapamicina, 0.75 μM Temsirolimus, 300 μM KU55933 o 10 μM Cafeína y se agregaron las proteínas gTOR/ATM-3HA y GdAKT. Las reacciones se incubaron 30 min a 30° C. Sin embargo, debido a problemas técnicos, no fue posible determinar la actividad *in vitro* de cinasa usando el sustrato GdAKT.

DISCUSIÓN

Giardia duodenalis es un parásito protozoario flagelado que causa una de las infecciones parasitarias más comunes en el mundo. Se le considera un organismo de divergencia evolutiva temprana y posee un genoma minimalista tanto en estructura como en contenido, entre sus características minimalistas destacan: distancias intergénicas muy cortas en comparación con otros eucariontes, secuencias no codificantes cortas, solo 8 de sus genes poseen intrones y sus maquinarias de replicación, procesamiento de ARN, transcripción y vías metabólicas contienen menos componentes (Johan Ankarklev, 2010; Martin F. Heyworth, 2016; Hilary G. Morrison, 2007). Desde el punto de vista médico, es un patógeno de importancia de médica, puesto que contribuye a un estimado de 280 millones de infecciones sintomáticas por año, razón por la que la giardiasis ha sido incluida en la iniciativa de enfermedades descuidadas de la Organización Mundial de la Salud desde el 2004. Por otro lado, desde el punto de vista económico, *Giardia duodenalis* es un patógeno zoonótico potencial y la infección de animales de granja puede tener un impacto negativo, resultando en la pérdida de productividad (Johan Akarklev, 2010; Elin Einarsson, 2016).

Giardia duodenalis posee dos estadios morfológica y metabólicamente diferentes: un estadio virulento llamado trofozoíto y un estadio latente llamado quiste, cada uno adaptado para sobrevivir en diferentes ambientes inhóspitos. La diferenciación a quistes infecciosos a través del proceso de enquistamiento es crítica para la transmisión y supervivencia del protozoario intestinal y a través de ésta lleva a cabo una serie de cambios morfológicos y bioquímicos sustanciales, entre los cuales destacan cambios en el pH citoplasmático, modificaciones ultraestructurales que incluyen rearrreglos del citoesqueleto como el desensamble de los flagelos y del disco ventral, cambios en la expresión génica y cambios en la ploidía genética del parásito, conseguida a través de dos rondas de replicación del ADN. Los cambios de ploidía que acontecen a lo largo de su ciclo de vida, generan en el parásito la necesidad de poseer mecanismos para mantener la integridad genómica y dichos mecanismos se encuentran regulados por cinasas, las cuales modulan la mayoría de las

funciones celulares en respuesta a señales ambientales (Elin Einarsson, 2016; Hugo D. Luján, 1996; Johan Ankarklev, 2010; Michael L. Hetsko, 1998; Gerard Manning, 2011).

Entre las proteínas cinasas existe una familia particularmente importante, conocida como Cinasas Relacionadas con la Fosfatidilinositol-3 Cinasa (PIKKs), conformada por seis cinasas: ATM, mTOR, ATR, DNA-PK, SMG1 y TRRAP, sin embargo, en *Giardia duodenalis* solo se han identificado *in silico* 2 genes homólogos de PIKKs, con números de acceso GL50803_16805 y GL50803_35180 (Claudia Valdez Vargas, 2014), lo cual concuerda con el kinoma reducido que se ha descrito en *Giardia duodenalis* mediante análisis *in silico* (Gerard Manning, 2012). De los dos genes homólogos de PIKKs en *Giardia duodenalis*, GL50803_35180 ya había sido identificado *in silico* como gTOR (Hilary G. Morrison, 2002), sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se encontró que dicho gen es el mejor candidato como gen putativo de la proteína ATM y se comprobó su capacidad para fosforilar a la histona GdH2A, así como también se observó un aumento en la expresión de su transcrito después de irradiar trofozoítos con una dosis de 100 Gy de radiación ionizante (Claudia Valdez Vargas, 2014).

Dado el minimalismo que caracteriza a este parásito protozoario, y a que no se ha caracterizado un ortólogo de TOR en *Giardia*, se evaluó la posibilidad de que el mismo gen identificado en la base de datos de *Giardia* como GL50803_35180 tuviera una doble función como ATM y gTOR, dada su homología estructural. Se realizó una búsqueda *in silico* de blancos de fosforilación putativos de gTOR de *Giardia duodenalis*, no obstante, no se encontraron homólogos de S6K y 4EBP en el parásito, lo cual no descarta la posibilidad de que existan, es posible que sí tenga genes homólogos de estos blancos de fosforilación, pero podrían tener secuencias muy divergentes, aunado al hecho de las secuencias proteicas de *Giardia* generalmente muestran una mayor cantidad de inserciones aminoacídicas que dificultan la tarea de encontrar genes homólogos en este modelo de estudio (Hilary G. Morrison, 2007). Por otro lado, se encontró *in silico* un ortólogo del blanco de fosforilación AKT, lo cual es consistente con lo ya reportado, pues también se había reportado *in silico* previamente (Gerard Manning, 2012) e incluso se estudiaron sus niveles de transcrito a lo largo del enquistamiento (Kyu-Tae Kim, 2005). Si bien este ortólogo identificado de AKT de *Giardia duodenalis* presenta una alta identidad en el dominio cinasa y su región catalítica,

se observó que los residuos que corresponden a aquéllos que son fosforilados en *Homo sapiens* (Thr308 y Ser473) no se encuentran conservados y que, de hecho, en su lugar hay residuos que no pueden ser fosforilados. No obstante, se ha reportado que todos los blancos de mTORC2 o TORC2 son cinasas de la familia AGC y que para su completa activación son fosforiladas en un residuo ya sea Serina o Treonina en un *motif* hidrofóbico C-terminal (Dominio HM), en donde se encuentra el residuo Ser473 de *Homo sapiens* (Prashanth T. Bashkar, 2007) y en un residuo de Serina o Treonina en un *turn motif*. Adicionalmente, la fosforilación de una Treonina por parte de PDK1 en un *loop* de activación es necesaria (en esta región se encuentra el residuo Thr308 de *Homo sapiens*). De tal modo que existen organismos como *Dictyostelium discoideum* cuyo ortólogo de AKT es fosforilado por TORC2 en un residuo de Treonina (Thr435) e incluso en *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Ypk2, es fosforilada por TORC2 en el residuo Thr659 (Nadine Cibulski, 2009), además se ha reportado que la proteína Sch9 de *Saccharomyces cerevisiae* es un ortólogo funcional de los blancos de fosforilación AKT y S6K (Karin Voordeckers, 2011; Isable Rodríguez Escudero, 2009), aunque más relacionado a S6K (Jörg Urban, 2007) y como se vio en la Fig. 23, el residuo correspondiente a la Ser473 de *Homo sapiens* tampoco se encuentra conservado lo cual concuerda con lo la literatura, pues se reportado que es fosforilado en el residuo Thr737 por TORC1 (Marta Moreno Torres, 2017; Jörg Urban, 2007). Con base en lo anterior, es posible que otro u otros residuos sean fosforilados por gTOR, y sugerimos que un posible blanco de fosforilación es la Thr579 dada su cercanía en el alineamiento al residuo correspondiente a la Ser478 de la proteína AKT1 humana, pues se encuentra localizado a solo dos residuos de distancia.

Habiendo logrado identificar únicamente al gen GdAKT como blanco de fosforilación putativo de gTOR se procedió a clonarlo en el vector de transición pJET1.2/blunt, clonación que se comprobó mediante análisis por PCR, restricción y secuenciación, para posteriormente subclonarlo en el vector de expresión pPROEX-I. No obstante, no se logró realizar la subclonación en el vector de expresión. Se ha reportado que los vectores de expresión que utilizan el promotor *trc* (como es el caso del vector d expresión pPROEX-I), tienen un alto nivel de transcripción basal o fuga transcripcional (Hanna Tegel, 2011), lo

cual resulta particularmente importante si la proteína de interés es tóxica para la bacteria receptora.

Debido a lo anterior, se reinició el proceso de clonación utilizando un vector de expresión con un sistema de regulación más fino, seleccionando al vector de expresión PET100 disponible en el laboratorio. De esta manera, se clonó exitosamente el gen GdAKT en este vector de expresión y se transfectó en células químicamente competentes de *Escherichia coli* XL1 Blue, seleccionando a las células transformantes con Ampicilina, a una concentración final de 100 µg/mL. Las células transformantes fueron analizadas por PCR, restricción, secuenciación e inducción de la proteína recombinante, estableciendo con ésta última las condiciones óptimas de expresión de la proteína, siendo 4 h de inducción con 0.5 mM IPTG a 37° C en agitación constante las condiciones en donde se detectó una mayor cantidad de proteína GdAKT recombinante con un peso esperado de 67.58 kDa. No se detectó fuga transcripcional en las células sin inducir ni tampoco en las células con 0- 1 h de inducción con 0.5 mM IPTG, lo cual indica que, en efecto, el vector de expresión PET100 posee una regulación de la transcripción basal más fina. Habiendo establecido las condiciones óptimas para la expresión de la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad con Perlas de agarosa-níquel, lo cual fue posible debido a la inclusión de un tag de 6 Histidinas presente en el vector de expresión PET100, utilizando 300 mM de Imidazol para eluir la proteína recombinante e inhibidores de proteasas para disminuir la degradación de la misma, se observó que la proteína con un tamaño esperado de 67.58 kDa eluye en mayor proporción en las fracciones 2-6/10. Estas fracciones se mezclaron y concentraron y también se mezclaron y concentraron las fracciones restantes, las mezclas concentradas se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% y se observó la banda del tamaño esperado y otra banda inespecífica de menor tamaño ~60 kDa que no es reactiva al anticuerpo anti Poly-His. Una vez que se purificó el sustrato GdAKT, se realizó la inmunopurificación de la proteína gTOR/ATM-3HA utilizando trofozoítos transgénicos cuyo gen endógeno de ATM fue marcado con una etiqueta que contiene 3 epítopes de hemaglutinina (-3HA)(María Luisa Bazán Tejeda, Resultados no publicados) mediante una técnica basada en recombinación homóloga (Stéphane Gourguechon, 2011), utilizando perlas de agarosa recubiertas con

anti-HA. Las muestras se cargaron en un gel Urea-PAGE con una concentración final de urea de 8M y se observó por Western blot, usando anti-HA una banda del tamaño esperado de 366.7 kDa. Se iniciaron los ensayos de cinasa para ver si gTOR/ATM-3HA inmunopurificada fosforilaba la proteína recombinante purificada GdAKT, sin embargo, debido a problemas técnicos no fue posible verificar la actividad de GdATM usando a GdAKT como sustrato.

CONCLUSIONES

- Se detectó un ortólogo del blanco de fosforilación S6K de gTOR de *Giardia duodenalis*.
- No se encontraron ortólogos putativos de los blancos de fosforilación S6K y 4EBP de gTOR de *Giardia duodenalis*.
- Se realizó la construcción del plásmido inducible PET100:GdAKT
- Se establecieron las condiciones de inducción de la expresión de la proteína recombinante GdAKT de *Giardia duodenalis*, siendo 4h de inducción a 37° C y en agitación constante con 0.5 mM IPTG
- Se purificó la proteína recombinante GdAKT mediante cromatografía de afinidad con columna de níquel
- Se inmunopurificó la proteína gTOR/ATM-3HA a partir de un cultivo de trofozoítos transgénicos utilizando

PERSPECTIVAS

- Confirmar la actividad gTOR de la proteína gTOR/ATM-3HA mediante ensayos de actividad de cinasa *in vitro* utilizando [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, utilizando el blanco de fosforilación recombinante GdAKT e inhibidores de PIKKs
- Identificar *in silico* más blancos de fosforilación de gTOR
- Determinar proteínas que interactúan con gTOR/ATM-3HA mediante espectrometría de masas
- Determinar la localización de la proteína gTOR/ATM-3HA en trofozoítos de *Giardia duodenalis*

BIBLIOGRAFÍA

1. A. A. Parkhitko, O. O. Favorova, D. I. Khabibullin, V. N. Anisimov & E. P. Henske. 2013. Kinase mTOR: Regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development, and aging. *Biochemistry (Moscow)*. 79:88-101.
2. A. Sandoval-Cabrera, A. L. Zarzosa-Álvarez, R. M. Martínez-Miguel, R. M. Bermúdez-Cruz. 2015. MR (Mre11- Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: in vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*. 111: 45-57.
3. Alex N. Zelensky, Humberto Sánchez, Dejan Ristic, Iztok Vidic, Sari E. van Rossum-Fikert, Jeroen Essers, Claire Wyman & Roland Kanaar. 2013. Caffeine suppresses homologous recombination through interference with RAD51-mediated joint molecule formation. *Nucleic Acids Research*. 41: 6475-6489.
4. Ana Laura Torres-Huerta, Rosa María Martínez-Miguel, María Luis Bazán-Tejeda & Rosa María Bermúdez-Cruz. 2016. Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*. 127: 173-186.
5. Catherine L. Deatherage, Arina Hadziselimovic & Charles R. Sanders. 2012. Purification and characterization of the human γ -secretase activating protein. *Biochemistry*. 51: 5153-5159.
6. Chang Hwa Jung, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto & Do-Hyung Kim. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*. 584:1287-1295.
7. Charles Betz & Michael N. Hall. 2013. Where is mTOR and what is it doing there? *The Journal of Cell Biology*. 203:563-574.
8. Christopher J. Bakkenist & Michael B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421: 499-506.
9. Claudia Valdez-Vargas. 2014. Identificación y participación de la proteína putativa de ATM//Tel1 en trofozoítos de *Giardia duodenalis* durante el proceso de reparación del DNA. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Genética y Biología Molecular.

10. Courtney A. Lovejoy & David Cortez. 2009. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair*. 8(9): 1-12.
11. Daniel G. Gibson, Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison III & Hamilton O. Smith. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 6: 343-345.
12. Daniel Rosel, Taruna Khurana, Amit Majithia, Xiuli Huang, Ramanath Bhandari & Alan R. Kimmel. 2012. TOR complex 2 (TORC2) in *Dictyostelium* suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1-mediated nutrient sensing. *Journal of Cell Science*. 125: 37-48
13. Doug W. Chan, Seong-Cheol Son, Wesley Block, Ruiqiong Ye, Kum Kum Khanna, Marc S. Wold, Pauline Douglas, aaron A. Goodarzi, Jennifer Pelley, Yoichi Taya, Martin F. Lavin & Susan P. Lees-Miller. 2000. Purification and characterization of ATM from human placenta a magnese-dependent, wortmannin-sensitive serine/threonine protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 7803-7810.
14. Doug W. Chan, Seong-Cheol Son, Wesley Block, Ruiqiong Ye, Kum Kum Khanna, Marc S. Wold, Pauline Douglast, aaron A. Goodazi, Jennifer Pelley, Yoichi Taya, Martin F. Lavin & Susan P. Lees-Miller. 2000. Purification and characterization of ATM from Human Placenta: a manganese-dependent, wortmannin-sensitive serine/threonine protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 7803-7810.
15. Elin Einarsson, Karin Troell, Marc P. Hoepfner, Manfred Grabherr, Ulf Ribacke & Staffan G. Svärd. 2016. Coordinate changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 1-22.
16. Elin Einarsson, Showgy Ma'ayeh & Staffan G. Svärd. 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Science*. 34: 47-52.
17. Elin Einarsson, Staffan Svärd & Karin Troell. 2015. UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology*. 1-8.
18. Emil Mladenov, Simon Magin, Aashish Soni & George Iliakis. 2016. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and

- cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in Cancer Biology*. 1-14.
19. Erqiu Li, Ping Zhou & Steven M. Singer. 2005. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *The Journal of Immunology*. 176: 516-521.
 20. Gerard Manning, David S Reiner, Tineke Lauwaet, Michael Dacre, Alias Smith, Yufeng Zhai, Staffan Svard & Frances D Gillin. 2012. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biology*. 12:1-19.
 21. Haijuan Yang, Derek G. Rudge, Joseph D. Koos, Bhamini Vaidialingam, Hyo J. Yang & Nikola P. Pavletich. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 497:217-224.
 22. Hanna Tegel, Jenny Ottosson & Sophia Hober. Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *The FEBS Journal*. 278: 729-739.
 23. Hilary G. Morrison, Andrew G. McArthur, Frances D. Gillin, Stephen B. Aley, Rodney D. Adam, Gary J. Olsen, Aaron A. Best, W. Zacheus Cande, Feng Chen, Michael J. Cipriano, Barbara J. Davids, Scott C. Dawson, Heidi G. Elmendorf, Adrian B. Hehl, Michael E. Holders, Susan M. Huse, Ulandt U. Kim, Erica Lasek-Nesselquist, Gerard Manning, Anuranjini Nigam, Julie E. J. Nixon, Daniel Palm, Nora E. Passamaneck, Anjali Prabhu, Claudia I. Reich, David S. Reiner, John Samuelson, Staffan G. Svard, Mitchell L. Sogin. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 317: 1921-1926.
 24. Hilary G. Morrison, Gus Zamora, Robert K. Campbell & Mitchell L. Sogin. 2002. Inferring protein function from genomic sequence: *Giardia lamblia* expresses a phosphatidylinositol kinase-related kinase similar to yeast and mammalian TOR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 133: 477-491.
 25. Honghong Chen, Zhefu Ma, Robert P. Vanderwaal, Zhihui Feng, Ignacio Gonzalez-Suarez, Shenming Wang, Jiuqin Zhang, Joseph L. Roti Roti, Susana Gonzalo & Junran

- Zhang. 2011. The mTOR inhibitor rapamycin supresses DNA doubleé-strand break repair. *Radiation Research*. 175: 214-224.
26. Hugo D. Luján, Michael R. Mowatt, Linda G. Byrd & Theodore E. Nash. 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Cell Biology*. 93: 7628-7633.
27. Isabel Rodríguez Escudero, Amparo Andrés-Pons, Rafael Pulido, María Molina & Victor J. Cid. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of mammalian protein kinase B/Akt in *Saccharomyces cerevisiae*, an *in vivo* model for functional study of Akt mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 13373-13383.
28. Ji-Hoon Lee & Tanya T. Paull. 2005. ATM activation by DNA double-Strand Breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science*. 308:551-554.
29. Johan Ankarklev, Jon Jerlström-Hultqvist, Emma Ringqvist, Karin Troell & Staffan G Svärd. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Microbiology*. 8:413-422.
30. Johan Ankarklev, Oscar Franzén, Dimitra Peirasmaki, Jon Jerlström-Hultqvist, Marianne Lebbad, Jan Andersson, Björn Andersson & Staffan Svärd. 2015. Comparative genomic analyses of freshly isolated *Giardia intestinalis* assemblage A isolates. *BMC Genomics*. 16:1-14.
31. Jörg Urban, Alexandre Soulard, Alexandre Huber, Soyeon Lippman, Debdyuti Mukhopadhyay, Oliver Deloche, Valeria Wanke, Dorothea Anrather, Gustav Ammerer, Howard Riezman, James R. Broach, Claudio de Virgilio, Michael N. Hall & Robbie Loewith. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*. 26: 663-674.
32. Jose Aramburu, M. Carmen Ortells, Sonia Tejedor, Maria Buxadé & Cristina López-Rodríguez. 2014. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Science Signaling*. 7:1-11.
33. Joseph Sambrook, E. F. Fritsch & Tom Maniatis. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

34. Karin Voordeckers, Marlies Kimpe, Steven Haesendonckx, Wendy Lowet, Matthias Versele & Johan M. Thevelein. 2011. Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs, PKH1-3, differentially regulate phosphorylation of PKA and the PKB/S6K orthologs, Sch9. *Journal of Biological Chemistry*. 1-25.
35. Kyu-Tae Kim, Myth T.S. Mok & Michael R. Edwards. 2005. Protein kinase B from *Giardia intestinalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 334: 333-341.
36. Lars Eckmann, Fabrice Laurent, T. Dianne Langford, Michael L. Hetsko, Jennifer R. Smith, Martin F. Kagnoff & Frances D. Gillin. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology*. 164: 1478- 1487.
37. Luciana Chessa, Roberto Micheli & Anna Molinaro. 2016. Focusing new ataxia telangiectasia therapeutic approaches. *iMedPub Journals*. 2:1-9.
38. Margrét H. Ögmundsdóttir, Sabine Heublein, Shubana Kazi, Bruno Reynolds, Shivanthy M. Visvalingam, Michael K. Shawn, Deborah C. I. Goberdhan. 2012. Proton-assisted amino acid transporter PAT1 complexes with rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes. *PLoS One*. 7: 1-13.
39. María Luisa Bazán Tejeda. 2006. Análisis y caracterización funcional de la proteína cinasa C tipo β durante el enquistamiento de *Giardia duodenalis*. Tesis de Doctorado.
40. Marta Moreno Torres, Malika Jaquenoud, Marie-Pierre Péli-Gulli, Raffaele Nicastro & Claudio de Virgilio. TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. 2017. *Nature: Cell Discovery*. 1-12.
41. Martin F. Heyworth, 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23: 1-5.
42. Martin F. Lavin. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. *Nature*. 9:759-770.

43. Michael L. Hetsko, J. Michael McCaffery, Staffan G. Svärd, Tze-Chiang Meng, Xuchu Que & Frances D Gillin. 1998. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Experimental Parasitology*. 88:172-183.
44. Nadine Cybulski & Michael N. Hall. 2009. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Cell Press*. 1-8.
45. Nancy Uhrhammer, Jacques-Olivier Bay, Susan Perlman & Richard A Gatti. 2002. Ataxia-Telangiectasia and variants. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 313-322.
46. Nobuko Arisue, Masami Hasegawa & Tetsuo Hashimoto. 2005. Root of the eukaryote tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data. *Molecular Biology and Evolution*. 409-420.
47. Paul Zarogoulidis, Sofia Lampaki, J. Francis Turner, Haidong Huang, Stylianos Kakolyris, Konstantinos Sygiros & Konstantinos Zarogoulidis. 2014. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review. *Oncology letters*. 8:2367-2370.
48. Prashanth T. Bhaskar & Nissim Hay. 2007. The two TORCs and Akt. *Developmental Cell*. 12: 487- 502.
49. Raúl V. Durán, Wolfgang Oppliger, Aaron M. Robitaille, Lisa Heiserich, Roswitha Skendaj, Eyal Gottlieb & Michael N. Hall. 2012. Glutaminolysis activates rag-mTORC1 signaling. *Molecular Cell*. 47: 349-358.
50. Robbie Loewith & Michael N. Hall. 2011. Target of Rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*. 189: 1177-1201.
51. Robert T. Abraham. 2004. PI 3-kinase related kinases: “big” players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair*. 3:883-887.
52. Roberto Zoncu, Liron Bar-Peled, Alejo Efeyan, Shuyu Wang, Yasemin Sancak & David M. Sebastini. 2011. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science*. 334: 678- 683.
53. Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Masaharu Tokoro, Andrew J. Roger & Tetsuo Hashimoto. 2011. Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated *trans*-splicing. *Current Biology*. 21: 311-315.

54. Sina M. Adl, Alastair G. B. Simpson, Christopher E. Lane, Julius Lukes, David Bass, Samuel S. Bowser, Matthew W. Brown, Fabien Burki, Micah Dunthorn, Vladimir Hampl, Aaron Heiss, Mona Hoppenrath, Enrique Lara, Line Le Gall, Denis H. Lynn, Hilary Mcmanus, Edward A. D. Mitchell, Sharon E. Mozley-Stanridge, Laura W. Parfrey, Jan Pawlowski, Sonja Rueckert, Laura Shadwick, Conrad L. Schoch, Alexey Sminorv & Frederick W. Spiegel. 2012. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59: 429- 493.
55. Stéphane Gourguechon & W. Zacheus Cande. 2011. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*. 10: 142-145.
56. Tanya T. Paull. 2015. Mechanisms of ATM activation. *Annu. Rev. Biochem.* 84:12.1-12.28.
57. Thomas Blumenthal. 2011. Split genes: another surprise from *Giardia*. *Current Biology*. 21: R162.
58. Vanessa Gómez & Moisés Wasserman. 2016. Inhibición parcial de dos genes que codifican para proteínas del empalmosoma en *Giardia intestinalis*. *Biomédica*. 128-136.
59. Yoko Otsubo, Akio Nakashima, Masayuki Yamamoto & Akira Yamashita. 2017. TORC1- dependent phosphorylation targets in fission yeast. *Biomolecules*. 7: 1-11.
60. Yuehua Wei, Chi Kwan Tsang & XF Steven Zheng. 2009. Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *The EMBO Journal*. 28: 2220-2230.
61. Zhi Guo, Rajashree Deshpande & Tanya T Paull. 2010. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle*. 9: 4805-4811.

ANEXOS

Secuencia de oligonucleótidos utilizados

Nombre del Primer	Secuencia y sitio de restricción añadido, si aplica (subrayado)	Referencia
PDI-F	5'-ACTCCTCTGCTCCTTGTG-3'	(María Luisa Bazán Tejeda, 2006)
PDI-R	5'-CTCCTTCGCTGCTTTCAC-3'	(María Luisa Bazán Tejeda, 2006)
GdAKT-F1	5'- <u>GAATTC</u> TGATGAGCGACACAGACGTGC-3'	Este trabajo
GdAKT-R1	5'- <u>GGATCC</u> CTATAGTTTATCAAATGCGTCCTGTGC-3'	Este trabajo
GdAKT-F2	5'-TCATCATCATCATGGTATGG <u>CTAGC</u> ATGAGCGACACAGACGTGC-3'	Este trabajo
GdAKT-R2	5' AGCAGCCGGATCGTTGAGCT <u>C</u> TATAGTTTATCAAATGCGTCCTGTGC-3'	Este trabajo
T7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Thermo
T7-R	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'	Thermo

Cepas utilizadas

Microorganismo	<i>Escherichia coli</i> SURE2	<i>Escherichia coli</i> XL1 BLue
Tipo celular	Bacteria, gram negativa	Bacteria, gram negativa
Medio de crecimiento	Medio LB	Medio LB
Genotipo	<p>(<i>e14⁻(McrA^e) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>)</p> <p>Le faltan componentes de las vías que catalizan el rearrreglo y delección de estructuras secundarias y terciarias no estándar, incluyendo cruciformes (causadas por repetidos invertidos) y Z-ADN que ocurren frecuentemente en ADN eucariótico y que impiden su clonación en cepas convencionales.</p>	<p>(<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>)</p> <p>La mutación en <i>recA1</i>, mejora la estabilidad del inserto, la mutación en el gen de la endonucleasa <i>endA1</i> mejora la calidad del ADN obtenido por miniprep y la mutación en el gen de la endonucleasa <i>hsdR17</i> previene la ruptura del ADN clonado por el sistema de endonucleasas EcoK.</p>
Resistencia	Tetraciclina Kanamicina Ácido Nalidíxico Cloranfenicol	Tetraciclina