



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización bioquímica de la proteína Rad52 de *Giardia
duodenalis* y su respuesta ante daño al DNA *in vivo*.”**

T E S I S

Que presenta

ROSA MARIA MARTINEZ MIGUEL

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis: Dra. MARÍA DEL REFUGIO BERMÚDEZ CRUZ

Ciudad de México.

Febrero, 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro de becario 82662, que apoyó este trabajo el cual fue realizado en el laboratorio 16 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por darme un espacio en su laboratorio, por su guía, asesoramiento, dirección, paciencia y confianza en mí y en este trabajo durante todo el tiempo que duró mi estancia doctoral.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, por su asesoría, sus consejos y sus críticas siempre oportunas al trabajo.

Al Dr. Manuel Hernández, por asesorar el proyecto y por estar siempre pendiente del desarrollo del mismo.

Al Dr. José Tapia, por su asesoría y sus críticas acertadas al trabajo.

Al Dr. Humberto González, por su asesoría, sus críticas y por seguir con interés el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Patrick Sung, por aceptarme por un año de estancia en su grupo de trabajo, por su apoyo económico durante ese tiempo, su apoyo incondicional en material, equipos, reactivos, y más, por su ejemplo como investigador, por sus enseñanzas tanto en el trabajo experimental como humano.

A los estudiantes del Dr. Patrick; especialmente Young-Ho que fue mi maestro durante la estancia, a Deniss por obtener las figuras de microscopia electrónica, a Dorina, Jimmy, Danielle, Will, Henyao, Simone, Tamara, Nurul, Wilson, Quiong, Lucy y Carlota que fueron también críticos y ofrecieron apoyo y consejos para mis experimentos, además de su gran cariño y amistad.

A la Dra. Ma Luisa Bazán, por su paciencia infinita, su apoyo incondicional en el laboratorio 16 como auxiliar, por su enorme corazón de oro, su gran amistad y cariño y su contribución en este trabajo.

A Israel Vázquez, por su apoyo técnico, por su amistad y sus consejos.

A Antonio Sandoval, primero por su amistad, por sus enseñanzas, su legado y su apoyo en el laboratorio, así como su contribución en este trabajo.

A Ana Laura Torres, por su amistad, por sus enseñanzas y su legado en el laboratorio y por permitirme trabajar en su proyecto.

A los estudiantes que han pasado por el laboratorio 16, Diego, Claudia, Bety, Angel, Mariana, Sara, Loan, Eduardo y Ulises por su apoyo en algún momento en mi trabajo experimental, por su compañía, su amistad y buen ánimo.

A mis amigos y compañeros en el Cinvestav; Viridiana, Ariana, Janet, Roberto, por contribuir con reactivos, consultas, etc. en el trabajo.

A la Secretaria Gaby Mora, por su trabajo muy muy eficiente, por apoyar siempre al estudiante en los trámites, por su buen ánimo y disposición en todo momento.

A Ernesto de becas, por su apoyo en el trámite especialmente de beca mixta.

A Lupita de secuenciación, por su eficiencia, su apoyo y consejo en su especialidad, por su gran amabilidad, buen ánimo y disposición.

A mis amigos del alma; Indra, por su gran amistad y amor, por escucharme siempre, por sus ánimos, consejos, honestidad y por confiar en mí; Liliana, por su gran amor y amistad, también por su honestidad, su interés y por hacerme ver otras posibilidades.

A mis amigos, Rafa, Ivone, Luismi, Daniel, por su amistad de muchos años.

A mis amigos; David, Paty, Miguel, Ale, Benji, Naty, Jorge, Ivan, Beto, Lety, Juan Carlos y a mi maestro Francisco, por ser un gran ejemplo de vida, por ser una maravillosa familia, por su apoyo invaluable y por abrir mis ojos y mi corazón a otra forma de vida, porque han sido un pilar muy fuerte en mi desarrollo humano.

A mi hermana Lena por su amor extraño, por confiar en mí, por ser siempre honesta, por su apoyo incondicional.

A Armando Ramirez por su ejemplo, sus enseñanzas, su apoyo, por ser mi familia.

A mi otra familia; mi suegra Ale, por su apoyo siempre incondicional, a la abuela Chelo, por su ánimo, su cariño y longevidad, los tíos Paty, Lety, Guty, Ofe, Magos, primos Tania, Rodri, Oscar Mary, Vero, Ivan, por su cariño y aceptación.

A mis cuñados Liz y Fer, el sobrino Leo y Sami, por su gran amor, confianza, apoyo incondicional en todos sentidos, buen ánimo, por abrirme las puertas de su casa y su corazón, por escucharme, aconsejarme y muchas cosas más.

A mis amados tíos-padres, Rodolfo y Rufina, que me criaron, me amaron y me apoyaron siempre.

A mis amados abuelos Procopio y Angélica que me criaron, educaron, guiaron, amaron, y me iniciaron e impulsaron en el mundo del estudio, por darlo todo por mí, por ser mis padres, por todo su ejemplo de vida, por enseñarme a respetar la vida y la tierra.

Al amor de mi vida Dani, por su gran amor, por confiar en mí, por su gran paciencia, por caminar hacia la misma dirección, por crecer conmigo, por aprender conmigo, por compartir conmigo sueños, otras realidades, ilusiones, otros mundos, otras vidas, otras muertes, por construir juntos un mundo donde quepan todos los mundos, por iniciar juntos una amorosa familia sin fronteras ni límites.

A mi mami Emi, por ser mi madre y mi amiga, por su amor inmenso, sus abrazos, sus besos, su ejemplo, por ser mi fuerza, mi ánimo, mi pilar, mi inspiración, por su fortaleza, su confianza, por sus sacrificios, por criarme, educarme, formarme, fortalecerme, impulsarme y darme todo lo que realmente importa en la vida. Por lo que me dio y lo que no me dio, por enseñarme lo que significa una madre y por mucho mucho más.

Índice

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
MARCO TEÓRICO	
<i>Giardia sp</i>	6
Patofisiología de la giardiasis.....	7
Ciclo de vida.....	10
<i>Giardia</i> como modelo de estudio.....	13
Reproducción	13
Reparación del daño al DNA.....	15
Vía de reparación por recombinación homóloga.....	17
Proteína mediadora de recombinación Rad52.....	20
ANTECEDENTES	
Reparación del DNA en <i>Giardia duodenalis</i>	25
Rad52 de <i>Giardia</i>	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO PRINCIPAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas.....	31
Extracción de DNA genómico de <i>Giardia duodenalis</i>	31
Oligonucleótidos utilizados.....	32
Amplificación por PCR de los genes rad52.....	33
Clonación en vector de expresión.....	33
PCR, restricción y secuenciación.....	35
Expresión y electroforesis de las proteínas recombinantes.....	35
Transferencias y western blot.....	36
Pruebas de solubilidad de las proteínas recombinantes.....	36
Purificación de GdRad52 recombinante.....	37

Purificación de GdRPA1 recombinante.....	38
ENSAYOS BIOQUÍMICOS	
Purificación de oligonucleótidos utilizados como sustrato para ensayos bioquímicos.....	39
Ensayo de cambio de movilidad electroforética.....	39
Ensayo de alineamiento de DNA complementario.....	40
Microscopía electrónica.....	41
Obtención de anticuerpos policlonales	41
Prueba de anticuerpo en ensayos de Western blot.....	42
Ensayos de Far western blot.....	43
ESTUDIOS <i>in vivo</i>	
Cultivos celulares	44
Extracción de RNA y análisis de qRT-PCR.....	44
Etiquetado de GdRad52 endógeno con HA.....	45
Caracterización de clona GdRad52-3HA candidata.....	48
Secuenciación del gen endógeno.....	48
Análisis por Western blot de GdRad52-3HA en trofozoítos irradiados.....	49
RRESULTADOS	
Clonación de GdRad52 en vector de expresión petTOPO.....	50
Integridad de los oligonucleótidos.....	50
Clonación y caracterización de clonas candidatas.....	51
Secuenciación de clonas candidatas.....	52
Expresión de la proteína recombinante.....	52
Solubilidad de la proteína.....	53
Purificación de la proteína recombinante.....	54
CARACTERIZACIÓN <i>in vitro</i> DE GdRad52	
GdRad52 posee la capacidad de unión a DNA.....	57
GdRPA1 se une a DNA de cadena sencilla.....	58
Rad52 de Giardia promueve el alineamiento de DNA complementario.....	59
GdRad52 puede mediar el alineamiento inhibido por GdRPA1.....	60
GdRad52 forma estructuras oligoméricas.....	61
Producción de anticuerpo policlonal anti-GdRad52.....	63

Interacción de GdRad52 con GdRPA1 y GdDMC1B.....	63
CARACTERIZACIÓN <i>in vivo</i> DE GdRad52	
Etiquetado del gen endógeno rad52 de <i>Giardia Duodenalis</i>	66
Secuenciación de la clona GdRad52-3HA candidata.....	68
Transfección del plásmido GdRad52-3HA-NEO en trofozoítos de <i>Giardia</i>	68
Caracterización de las clonas candidatas transgénicas GdRad52-3HA por PCR.....	69
Secuenciación de las clonas candidatas.....	70
Análisis de la expresión del gen rad52 inducida por daño con radiación gamma.....	71
Análisis por Western blot de la proteína GdRad52-3HA.....	72
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIONES.....	81
PERSPECTIVAS.....	81
REFERENCIAS.....	82

RESUMEN

Giardia duodenalis es un protozooario parásito binucleado, que coloniza el intestino delgado de en humanos y otros mamíferos causando la infección intestinal conocida como giardiasis. Debido a su minimalismo y divergencia temprana ha sido usado como un modelo para entender el surgimiento y evolución de diferentes procesos metabólicos tales como la replicación, transcripción, recombinación, etc. La recombinación genética es un proceso central en varias vías tal como la meiosis y la reparación del daño al DNA los cuales se encuentran conservados en la mayoría de los organismos eucariontes. El rompimiento de la doble cadena del DNA proveniente de manera endógena o exógena es el daño mas letal por lo que su reparación por recombinación homóloga es muy importante para mantener la estabilidad genómica. Durante la recombinación homóloga, Rad52 tiene una función clave al reclutar a la recombinasa Rad51 y alinear la segunda cadena dañada a la hebra desplazada de la estructura de loop-D. Entre las funciones caracterizadas de la proteína Rad52 en humano y levadura están unión a DNA de cadena sencilla y cadena doble, alineamiento de DNA complementario cubierto por RPA, formación de anillos multiméricos e interacción con las proteínas RPA y Rad51. En este trabajo, se buscaron dominios conservados en la secuencia de la proteína putativa Rad52 de *Giardia duodenalis* (GdRad52), la secuencia fue clonada, expresada y purificada para estudiar sus propiedades bioquímicas. Se obtuvo que rGdRad52 se une a DNA tanto de cadena sencilla como de cadena doble, presentando mayor afinidad a cadena sencilla. Además rGdRad52 promueve alineamiento de DNA complementario cubierto o no con GdRPA1. rGdRad52 interactúa con GdDMC1B y con GdRPA1, como se observó por ensayo de far western. Adicionalmente rGdRad52 forma anillos multiméricos como se observó por microscopía electrónica. Finalmente, GdRad52 se sobre expresa en respuesta a Daño al DNA causado a trofozoítos.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a protozoan parasite widely distributed around the world which causes intestinal infections in humans and other mammals. Due to its minimalism and early divergence *Giardia* has been used as a model to understand the emergence and evolution of different metabolic processes such as replication, transcription and recombination. Genetic recombination is a central process in several pathways such as meiosis and DNA damage repair which are present in most eukaryotic organisms. During homologous recombination, Rad52 has a key role: loading recombinase Rad51 and annealing the second DNA end to the displaced strand of the D-loop structure. Among the functions found in vitro in yeast and human Rad52 protein are: ssDNA or dsDNA binding activity, ability to anneal bare or RPA coated-ssDNA and to overcome RPA annealing inhibiting activity, as well as multimeric ring formation. In this work, we searched for conserved domains in a putative Rad52 protein from *Giardia duodenalis* (GdRad52), its coding sequence was cloned, expressed and purified to study its biochemical properties. rGdRad52 binds to dsDNA and ssDNA, with greater affinity for the latter. Likewise, rGdRad52 promotes annealing of DNA uncoated and coated with GdRPA1. rGdRad52 interacts with GdDMC1B and with RPA protein as shown by far western blotting assay. Additionally, rGdRad52 formed multimeric rings as observed by electronic microscopy. Finally, GdRad52 is over expressed in response upon DNA damage inflicted on trophozoites.

MARCO TEÓRICO

Giardia sp.

Giardia pertenece al linaje eucarionte de divergencia temprana, pertenece al *Phylum* Metamonada, clase Treponomadae, orden Diplomonadida y familia Hexamitidae, miembros de esta familia son flagelados binucleados que se encuentran en ambientes anaeróbicos o microaerofílicos (Cavalier-Smith, 1993). Análisis de RNA ribosomal, ATPasa vacuolar, factor de elongación, entre otros, colocan a *Giardia* en las ramas basales de árboles filogenéticos eucariontes. A pesar de ser un eucarionte verdadero, conserva varias propiedades procariontes como son, contar con mitosomas en vez de mitocondrias, carecer de peroxisomas, tener enzimas metabólicas parecidas a las de bacterias, entre otras características (Ankarklev et al., 2010).

El género *Giardia* comprende seis especies; *Giardia agilis* identificado en anfibios, *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci* en aves, *Giardia microti* and *Giardia muris* en roedores y *Giardia duodenalis* en humanos y varios en mamíferos. Estas especies se distinguen en la morfología y estructura del trofozoito.

Estudios genéticos han confirmado ocho genotipos o ensamblajes de *G. duodenalis* nombrados de A-H. Ensamblajes A y B se sabe que infectan a humanos, aunque B es el más común y se encuentra distribuido mundialmente, además estos ensamblajes se han encontrado también en animales, lo que sugiere que estos ensamblajes tienen potencial zoonótico (Feng and Xiao, 2011). Los ensamblajes C y D infectan perros, E infecta animales de pezuña, F infecta gatos, G infecta roedores, y H infecta focas. Sin embargo solo los ensamblajes A, B y E pueden ser cultivados *in vitro* (Feng and Xiao, 2011; Lasek-Nesselquist et al., 2010).

Giardia es un parásito protozoario que infecta el tracto digestivo, causando la infección intestinal conocida como giardiasis, de hospederos vertebrados incluyendo animales domésticos como roedores, perros, gatos, animales de granja y vida silvestre. La especie *Giardia duodenalis* (denominado también como *G. lamblia* o *G. intestinalis*), infecta y causa giardiasis tanto en humanos como en algunos animales (Feng and Xiao, 2011). Las infecciones causadas por este agente son las más comunes y tienen una incidencia mundial de alrededor de 280 millones de personas al año (Ankarklev et al., 2010; Lane and Lloyd, 2002), en México el reporte más reciente es de 11,578 casos en 2015 (tabla 1) (SSA). De una manera importante se han determinado

grandes pérdidas económicas debido a la infección por giardiasis en animales de granja (Feng and Xiao, 2011).

El parásito se transmite a través de la ingestión de quistes presentes en alimentos o agua contaminada, o directamente por la vía fecal oral (Roxstrom-Lindquist et al., 2006). La ingestión de los quistes provoca la giardiasis, infección cuyos síntomas pueden variar, desde asintomáticos hasta diarrea aguda, incluyendo náusea, pérdida de peso, hinchazón y dolor abdominal. Se han propuesto múltiples factores que contribuyen a la aparición de los síntomas mencionados y severidad de la infección como son; el estado del sistema inmune, edad y estado nutricional del hospedero, el genotipo de la cepa, dosis de infección y posibles coinfecciones, también se ha considerado la importancia de la pérdida de la microbiota durante la infección aguda con este parásito (Cotton et al., 2011; Roxstrom-Lindquist et al., 2006; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010).

Patofisiología de la giardiasis

Tras la ingestión de los quistes, se liberan de dos a cuatro trofozoítos los cuales se adhieren a la superficie epitelial del intestino a través del disco adhesivo ventral, donde se replican. Cuando se presentan síntomas, estos usualmente inician después de un periodo de incubación de entre 6 y 15 días post infección (Bartelt and Sartor, 2015). La adhesión del trofozoíto involucra liberación de factores celulares por parte del trofozoíto que le permiten mantener la infección, este fenómeno produce cambios en el intestino como; apoptosis de los enterocitos, disfunción de la barrera intestinal, activación de los linfocitos, acortamiento de las micro vellosidades, atrofia de los vellos de los enterocitos, deficiencia de disacaridasa, malabsorción en el intestino delgado, hiper secreción de iones y finalmente incremento del tránsito intestinal (Buret, 2008; Troeger et al., 2007).

Se ha estimado que 1/3 de los pacientes infectados con giardiasis presentan síntomas extra intestinales de periodos largos, como son; patologías oculares (Halliez and Buret, 2013), artritis (Carlson and Finger, 2004), alergias, complicaciones musculares (Cervello et al., 1993), consecuencias metabólicas (retraso en el crecimiento, alteración en las funciones cognitivas (Berkman et al., 2002), síndrome de fatiga crónica (Naess et al., 2012), desorden gastrointestinal crónico (Dizdar et al., 2007) y cáncer (Kurita et al., 2010).

Tabla 1. Incidencia estimada de Giardiasis en la población mexicana.

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html

SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2015.

Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad
Estados Unidos Mexicanos 2015
Población General

Procedimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Total	Grupos de edad											65 y +	
			< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64			
Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	A02.0, A03.0	148 283	122.54	7994	25868	22225	15355	12205	11192	22973	8707	9457	4182	4845	180
Fiebre Paratifoidea A	A01.1	12 473	10.31	77	487	751	1035	1410	1563	3813	1141	1267	352	568	9
Fiebre amarilla	A05	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fiebre del Oeste del Nilo	A02.3	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fiebre hemorrágica por dengue	A91	5 626	4.65	115	279	537	788	686	686	1801	282	496	165	352	0
Fiebre manchada	A77.0	272	0.22	6	19	28	24	29	102	24	16	35	2	11	0
Fiebre por dengue	A90	61 710	51.00	697	877	2902	6616	8298	7465	20986	3546	5357	1567	3309	0
Fiebre reumática aguda	B00-02	904	0.75	1	7	47	59	46	39	240	85	164	76	124	16
Fiebre tifoidea	A01.0	46 503	38.43	139	891	2204	3735	4702	5338	16005	4565	4975	1568	2316	65
Giardiasis	A07.1	11 578	9.57	333	2508	2153	1495	944	621	1566	520	644	335	411	48
Gingivitis y enfermedades periodontales	K05	1 146 950	947.85	2242	14191	49601	67616	99092	133855	362439	100401	143950	69190	103734	639
Hepatitis vírica A	B15	9 413	7.78	36	1357	3343	1900	865	593	901	118	169	45	83	3
Hepatitis vírica B	B16	760	0.63	6	4	9	12	17	61	388	77	102	40	44	0
Hepatitis vírica C	B17.1, B18.2	2 192	1.81	8	6	7	12	22	90	804	260	523	174	283	3
Hepatitis víricas, otras	B17-B19 excepto B17.1, B18.2	1 615	1.33	44	175	265	207	134	140	340	61	115	38	95	1
Herida por arma de fuego y punzocortantes	W32-W34	38 137	31.52	70	1518	2337	2678	5034	5935	12699	2378	2650	988	1799	51
Herpes genital*	A60.0	3 843	3.89	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	298	683	1806	340	373	121	192	0
Hiperplasia de la próstata ¹	N40	83 158	267.91	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2281	3774	16616	15042	45104	341
Hipertensión arterial*	I10-I15	440 322	502.89	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1340	6387	91601	58615	110858	56564	113624	1333
Hipotermia	T68	249	0.21	18	20	10	4	4	9	40	18	46	29	51	0
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A06-A09 excepto A08.0	4 899 424	4,048.92	288519	878302	512214	358884	267455	360722	1080057	265543	378569	163478	342925	2756
Infecciones invasivas por <i>Haemophilus influenzae</i>	A41.3, G00.0, J14	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infecciones respiratorias agudas	J06-J08, J09, J21 excepto J02.0 y J03.0	23 755 831	19,631.97	2020753	4932859	3188115	1946761	1267419	1310276	4059438	1176277	1712790	774640	1355237	11266
Infección asintomática por VIH	Z21	5 719	4.73	4	15	8	7	341	1367	3327	286	271	56	37	0
Infección de vías urinarias	N30, N34, N39.0	4 098 042	3,386.65	22333	141198	185919	153907	302682	436648	1274065	338765	509980	230918	498250	3377
Infección gonocócica del tracto genitourinario*	A54.0-A54.2	2 081	2.11	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	49	236	421	948	147	148	40	91
Infección por Virus Zika	A92.5	19	0.02	0	0	0	1	1	4	6	3	2	0	1	0
Infección por virus del papiloma humano	B97.7	33 427	27.62	4	14	7	52	1221	3670	17547	4521	4595	1143	620	33
Influenza	J09-J11	23 644	19.54	1792	3654	1508	1032	926	1491	5696	1310	2067	852	3314	2
Insuficiencia venosa periférica	I87.2	192 099	158.75	15	24	49	174	804	4329	52144	25266	46106	21411	41424	353
Intoxicación aguda por alcohol	F10.0	42 958	35.50	0	29	354	4563	6702	19782	4334	4404	4404	1316	1348	126
Intoxicación alimentaria bacteriana	A05	31 846	26.32	745	4401	4532	3368	2603	2871	6965	1806	2189	850	1470	46
Intoxicación por monóxido de carbono	T58	419	0.35	5	38	59	49	47	30	110	28	21	10	22	0
Intoxicación por picadura de alfilerín	T63.2, X22	272 695	225.36	1748	20133	24738	28508	30174	292557	75487	15153	21237	8466	17141	653
Intoxicación por plaguicidas	T60	4 025	3.33	58	502	136	142	544	576	1272	203	261	88	242	1
Intoxicación por ranofofa de animales	T63, X21, X27, excepto T63.2	47 619	39.35	794	4722	4225	4336	4085	4747	14155	2658	3722	1335	2812	28
Labio y pablar hendido	Q35-Q37	1 295	1.07	1168	53	18	11	7	4	13	3	2	0	9	7
Leishmaniasis cutánea	B55.1	447	0.37	2	3	14	31	69	57	126	23	56	31	35	0
Leishmaniasis visceral	B55.0	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lepra	A30	173	0.14	0	0	0	3	7	3	50	14	28	22	46	0
Leptospirosis	A27	336	0.28	1	11	14	15	26	42	135	18	35	13	26	0
Linfogranuloma venéreo por clamidia*	A55	203	0.21	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	4	23	60	85	10	13	2	6
Mal del pinto	A67	255	0.21	5	10	23	21	24	27	64	19	33	8	21	0
Meningitis	G00-G03 excepto G00.0, G00.1	723	0.60	141	76	55	56	25	37	169	43	54	31	36	0
Meningitis meningocócica	A39.0	10	0.01	0	2	2	0	0	0	4	0	2	0	0	0
Meningoencefalitis amebiana primaria	B60.2	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mordedura por serpiente	X20	4 525	3.74	11	113	249	370	434	446	1392	354	503	216	433	4
Mordeduras por otros mamíferos	W55	8 914	7.37	85	636	797	741	728	742	2268	590	939	388	995	5

* Tasa por 100 000 habitantes
¹ Tasa por 100 000 habitantes masculinos mayores de 25 años
² Tasa por 100 000 habitantes mayores de 14 años

NOTA: Las tasas se calculan con Proyecciones de la Población de México 1990-2030, Censo 2010, CONAPO

Ciclo de vida

Giardia tiene un ciclo de vida que comprende dos estadios; la fase infectiva y resistente que es el quiste, en el que el parásito se encuentra encapsulado en una gruesa pared quística compuesta por carbohidratos y proteínas que lo protegen del ambiente hostil, en esta fase el parásito se encuentra en estado latente, es decir, su actividad metabólica está reducida, cuando el quiste llega al estómago la pared quística inicia a degradarse inducido por las condiciones gástricas del hospedero, esto libera a los trofozoítos (fase vegetativa del parásito), estos colonizan el intestino delgado causando las manifestaciones clínicas características de la infección (Ankarklev et al., 2010; Eckmann, 2003). El quiste se caracteriza por presentar cuatro núcleos tetraploides, que en seguida de desenquistarse, lleva a cabo dos eventos de citocinesis, sin necesidad de síntesis de DNA (Bernander et al., 2001), esto implica un incremento en el metabolismo celular debido a la expresión de genes para la segregación de organelos, síntesis de proteínas asociadas con la motilidad, ensamble del disco adhesivo, entre otras necesidades, de modo que estos cambios resultan en dos divisiones celulares que finalmente producen cuatro trofozoítos por cada quiste (Svard et al., 2003). Los trofozoítos miden entre 12 y 15 μm de largo y entre 5 y 9 μm de ancho, tiene una superficie dorsal y una superficie ventral convexa por el cual se encuentra el disco ventral, este disco está formado por citoesqueleto de tubulina y giardina, al igual que el cuerpo medio y los cuatro pares de flagelos (ventral, lateral, caudal y anterior) (Ankarklev et al., 2010). Después de ser liberados por el quiste, los trofozoítos se replican rápidamente colonizando el intestino delgado, lo cual causa una gran variedad de síntomas clínicos, (Bernander et al., 2001; Svard et al., 2003). Para explicar el establecimiento de este parásito se han propuesto mecanismos que involucran la participación de proteínas como arginina deiminasa, ornitina carbamoil transferasa y enolasa (Ringqvist et al., 2008), los cuales son liberados por el parásito al medio una vez que éste ha interactuado brevemente con células epiteliales intestinales, dichas proteínas también han demostrado ser inmunoreactivas durante infecciones murinas y humanas (Ringqvist et al., 2008). Proteasas tipo cisteína también secretadas por los trofozoítos sugieren que estas juegan un importante papel en la adhesión de *Giardia* a las células epiteliales (Rodríguez-Fuentes et al., 2006). Por otra parte la habilidad de *Giardia* de evadir la respuesta inmune del hospedero se observa al inducir una pobre inflamación de la mucosa, sin embargo cuando las infecciones son severas, causa rearrreglos en proteínas como F-actina, α -actinina y ZO-1 ocasionando un incremento en la permeabilidad intestinal, así mismo los

trofozoítos pueden inducir apoptosis en enterocitos y acortamiento de microvellosidades (Eckmann, 2003; Ringqvist et al., 2008). Otro mecanismo que contribuye a la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero es el conocido como variación antigénica el cual consiste en la alteración de la composición de proteínas de superficie celular, estas proteínas son ricas en cisteínas y se conocen con el nombre de proteínas variante de superficie (VSPs) (Lane and Lloyd, 2002; Prucca and Lujan, 2009). Se sabe que este parásito solo expresa una VSP en particular a la vez, pero tiene la habilidad de cambiar a otra variación antigénica (Rivero et al., 2010).

El ciclo de vida termina cuando el trofozoíto al avanzar por el intestino encuentra condiciones como altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y un pH básico conduciéndolo al enquistamiento. En éste proceso, los dos núcleos del trofozoíto llevan a cabo dos rondas de replicación sin citocinesis subsecuente, dando origen a un quiste maduro con cuatro núcleos tetraploides (Caccio and Sprong, 2009; Poxleitner et al., 2008). Dentro de los eventos celulares evidentes está la síntesis de pared quística, internalización de los flagelos, pérdida de la capacidad de adhesión y disminución de la actividad metabólica (Bernander et al., 2001), en este estado el quiste es fácilmente liberado del hospedero a través de las heces y es potencialmente infeccioso.

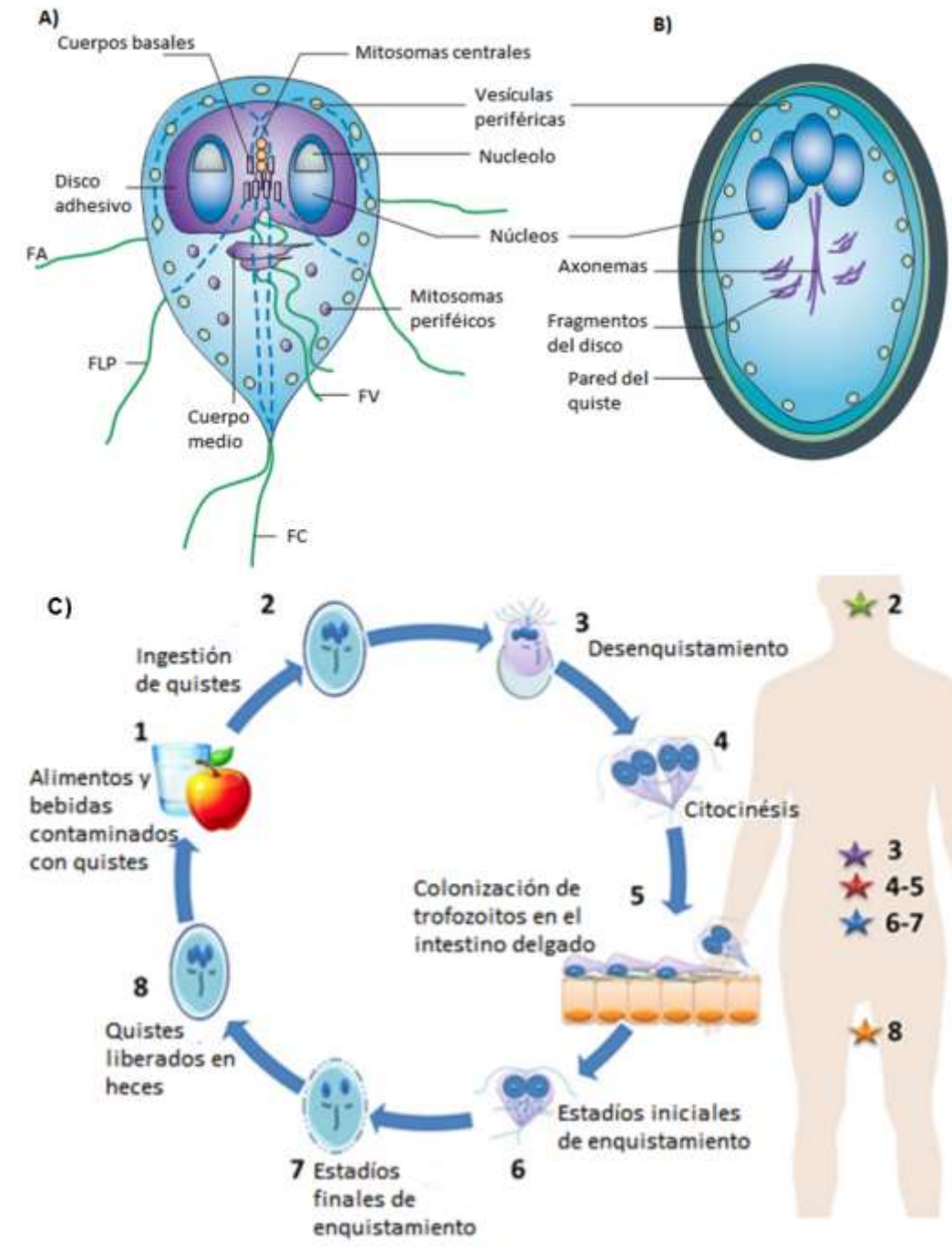


Fig. 1.- Características generales del trofozoíto y quiste y ciclo de vida de *Giardia*. El trofozoíto (tomado y modificado de (Ankarklev et al., 2010)) (A), que mide de 12 a 15 μm de longitud y de 5 a 9 μm de grosor, tiene 4 pares de flagelos (flagelos anteriores (FA), flagelos laterales posteriores (FLP), flagelos caudales (FC) y flagelos ventrales (FV)), cuerpos basales; donde se originan los flagelos, cuerpos medios, un gran disco ventral adhesivo, mitosomas, vesículas y dos núcleos con

nucléolo. El quiste (tomado y modificado de (Ankarklev et al., 2010)) **(B)**, tiene forma ovalada que mide de 8 a 12 μm de longitud y de 7 a 10 μm de grosor, la pared quística tiene un grosor de 0.3 a 0.5 μm de grosor compuesta por tres diferentes proteínas de pared (CWP1, CWP2 y CWP3) y N- acetilglucosamina y 4 núcleos tetraploides. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (tomado y modificado de (Lopez-Romero et al., 2015)) **(C)** Inicia con la ingestión del quiste a través de alimentos contaminados (1 y 2), al llegar al estómago se desenquista e inicia la colonización intestinal (3, 4 y 5), el enquistamiento inicia con la replicación del material genético sin división celular, síntesis de pared celular y finalmente pérdida de motilidad que lo lleva a la liberación por las heces (6, 7 y 8).

***Giardia* como modelo de estudio**

Giardia es de notable importancia evolutiva ya que está considerado como un organismo de divergencia temprana y por ello el eucarionte más primitivo. *Giardia* se puede considerar un organismo modelo bastante útil para estudios evolutivos, debido a su posición basal en arboles filogenéticos. Dichos estudios pueden proveer respuestas de cómo algunos procesos celulares han evolucionado, de como otros se han conservado a través del tiempo y del mismo modo *Giardia* podría dar pistas sobre el origen de procesos y estructuras de los eucariontes (Lane and Lloyd, 2002).

Estudios filogenéticos realizados con rRNA y proteínas, indican que *Giardia* es un eucarionte de divergencia temprana, sin embargo no se identifica como relacionado con algún grupo eucariótico en particular, por el contrario, se presenta como un linaje independiente. Por otra parte, el estudio de genes de origen mitocondrial (Tovar et al., 2003) y maquinaria de transcripción (Best et al., 2004) sugieren que más que divergencia temprana, *Giardia* es el producto de una evolución reductiva causada quizá por su estilo de vida parasitaria.

Reproducción

El sexo se ha considerado el modo común de reproducción en eucariontes, en el caso de protozoarios parásitos, se asume que la diploidía y la recombinación genética son una consecuencia de reproducción sexual (Tibayrenc et al., 1991). Tomando en cuenta que *Giardia* tiene dos núcleos, si los dos núcleos contienen el mismo complemento de genes y cromosomas, las

diferencias entre ellos podrían demostrarse como heterocigocidad de cromosomas homólogos y heterocigocidad de secuencia alélica, sin embargo este último es discrepante en *Giardia duodenalis*, en el cual se calcula una heterocigocidad de 0.01% (Morrison et al., 2007), por ello se propone que este parásito es potencialmente capaz de llevar a cabo reproducción sexual, como ha propuesto Ramesh y cols. (2005) quienes encontraron en el genoma de *Giardia* un set de genes requeridos específicamente para la recombinación meiótica (Dmc1, Spo11, Mnd1, Hop1 y Hop2) en otros eucariontes, estos genes demostraron ser homólogos a través de construcciones filogenéticas. Así mismo dmc1, spo11 y hop1 se transcriben diferencialmente durante su ciclo de vida sugiriendo una función crítica en el proceso de diferenciación de *Giardia* (Melo et al., 2008). Estudios de estos genes podrían llevar a entender el origen de la meiosis, como proponen algunos investigadores, ya que posiblemente pudieron tener funciones no precisamente meióticas, como se podría deducir al observar que muchos de estos genes están involucrados en la reparación del daño al DNA. Al respecto se han identificado también otros genes que participan tanto en mecanismos de recombinación como en reparación del daño al DNA; Rad50, Mre11, Msh2, Msh6 y Rad52 (Ramesh et al., 2005). De esta manera la maquinaria meiótica encontrada podría funcionar como maquinaria de recombinación/reparación de DNA entre los dos núcleos y de esta manera explicar la baja heterocigocidad observada (Caccio and Sprong, 2010).

Hasta el momento se cuenta con suficiente evidencia de recombinación en *Giardia duodenalis* como se enlista a continuación:

- Bajos niveles de heterocigocidad (0.01%) (Teodorovic et al., 2007).
- Reconocimiento de secuencias de posible origen recombinatorio (Cooper et al., 2007).
- Recombinación sexual y sus implicaciones en taxonomía y epidemiología molecular (Cacciò & Sprong, 2009).
- Intercambio genético inter e intra ensambles de *G. duodenalis* (Lasek-Nesselquist et al., 2009).
- Etiquetado e integración de genes mediante recombinación homóloga (Gourguechon et al., 2011).
- Evidencia de heterocogocidad y alelos recombinantes en un quiste de *G. duodenalis* (Aguilar et al., 2016).

- Trofozoítos y/o quistes resisten radiación ionizante y UV (Lenaghan, 2003 & Li et al., 2008).

Al respecto, estudios de genotipificación de aislados humanos y animales basados en aproximaciones de múltiples locus muestran discrepancias en la asignación del ensamble, es decir los resultados de genotipificación obtenidos con un locus fue inconsistente con aquellos obtenidos con otros tres loci, en varios casos tres loci (*tpi*, *gdh* y *ssrRNA*) clasificaron los aislados en el ensamble A mientras que el locus *bg* los clasificó en el ensamble B, estos resultados sugieren que existe recombinación meiótica entre el ensamble A y el ensamble B (Caccio et al., 2008), similares resultado fueron encontrados al observar que loci de diferentes cromosomas mostraron diferentes arboles filogenéticos indicando que no comparten la misma historia evolutiva (Cooper et al., 2007). Poxleitner y cols. (2008) demostraron que existe transferencia de material genético episomal entre los núcleos durante el enquistamiento y por microscopía electrónica demostraron que hay una fusión de envolturas nucleares durante dicho proceso lo cual puede facilitar la transferencia del plásmido. Se ha observado también la integración de material genético episomal por reemplazamiento en la cepa GS de *Giardia duodenalis*, se asume que se llevó a cabo mediante recombinación homóloga (Singer et al., 1998).

Reparación del daño al DNA

Dado que la alta tasa de replicación del DNA durante el ciclo de vida de *G. duodenalis* requiere de mecanismos para asegurar que esta se conserve intacta y a la presencia de genes que participan en la reparación del daño al DNA por recombinación, se propone la existencia del mecanismo de reparación del daño a la doble cadena del DNA.

El DNA está constantemente expuesto a una gran variedad de factores que van desde productos del metabolismo normal, hasta radiación ionizante (IR), radiación ultravioleta (UV) y agentes químicos los cuales pueden dañar su integridad. Sin embargo una importante proporción de estos daños son reparados gracias a la existencia de mecanismos celulares específicos. Las lesiones pueden interferir con funciones celulares normales tales como replicación y transcripción de DNA, y pueden llegar a ser letales (Scharer, 2003; Weiner et al., 2009). A nivel celular, el daño no reparado apropiadamente puede ocasionar inestabilidad genómica, senescencia o apoptosis, afectando procesos de desarrollo y envejecimiento del organismo, así mismo la pérdida de la

integridad genómica predispone al organismo a inmunodeficiencia, desordenes neurológicos, cáncer entre otras enfermedades genéticas (Friedberg, 2008; Hakem, 2008; Llorente et al., 2008).

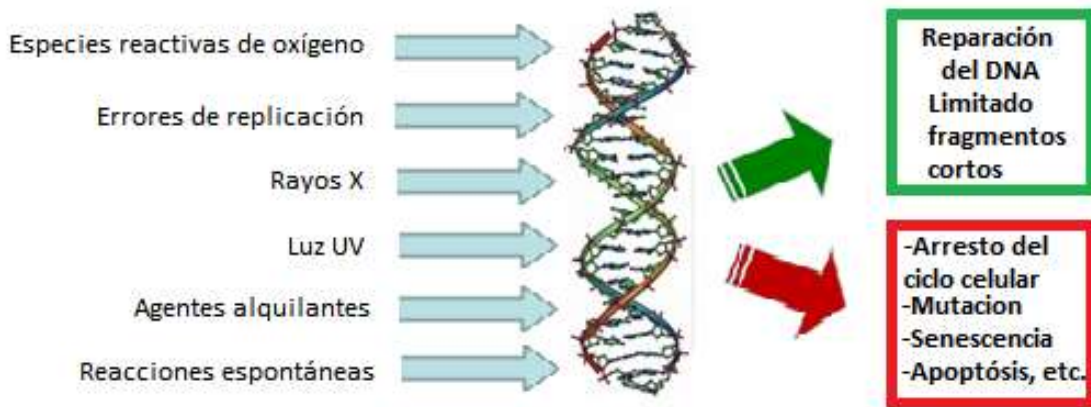


Fig. 2.- Respuesta al Daño del DNA. El daño al DNA puede ser causado por una gran variedad de factores. La respuesta de la célula ante el daño involucra activación de “checkpoint” del ciclo celular, activación de transcripción, activación de reparación, y cuando el daño es muy severo, inicia apoptosis.

Los procesos de reparación de los daños al DNA están regulados por proteínas que monitorean el genoma y censan los daños a diferentes niveles durante las etapas del ciclo celular; arrestan el ciclo celular y reclutan factores para que se lleve a cabo la reparación del daño, una vez reparado el DNA las células salen del arresto y continúan la progresión del ciclo (Heyer, 2007).

Existen diferentes mecanismos de reparación del DNA y éstos dependen del tipo de daño generado (Fig 3). Los daños generados en cadena sencilla son reparados por la vía de inversión directa, reparación por apareamiento incorrecto (MMR), reparación por escisión de nucleótido (NER) y por escisión de base (BER); los daños generados a la doble cadena son reparados por alineamiento de cadena sencilla, unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (HR)(Huertas, 2010; Kobayashi et al., 2008).

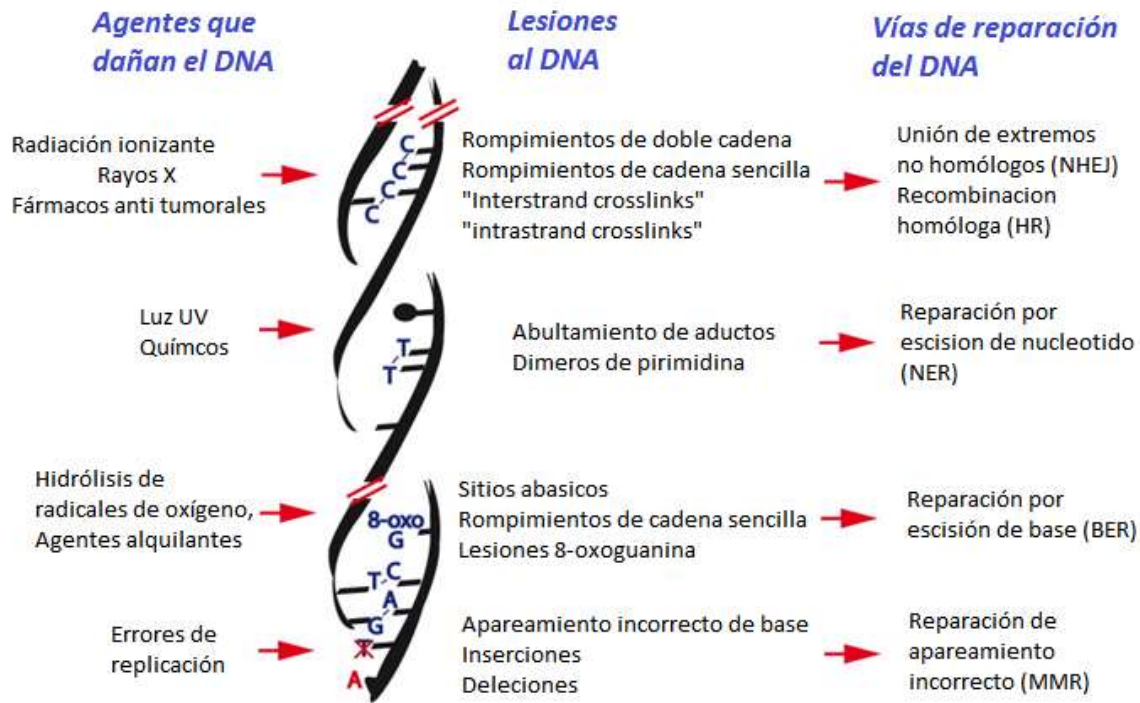


Fig. 3.- Fuentes de generación de daño al DNA, tipos de daño que generan y vías de reparación dependiendo del daño.

Vía de reparación por HR

La recombinación homóloga es un proceso de múltiples pasos, que utiliza una cadena de DNA intacta homóloga como molde para reparar de manera fidedigna el daño generado (Fig. 4). Opera principalmente en la fase S y G2 del ciclo celular y requiere la participación de varias proteínas (Hakem, 2008; Kobayashi et al., 2008).

Cuando se ha producido un rompimiento a la doble cadena del DNA, se recluta complejos como MRX (Mre11, Rad50 y Xrs2 (nbs1 en mamíferos) que procesa los extremos dañados en dirección 5'3' para generar cadenas sencillas de DNA en 3' libres, junto con la proteína Sae2 (CTIP en mamíferos) se unen a los dos extremos dañados, MRX interactúa con la cinasa Tell1 (ATM en eucariontes superiores) la cual fosforila la histona H2A (marcador específico de daño al DNA) (Huertas, 2010; Weiner et al., 2009). El procesamiento de los extremos los llevan a cabo varias nucleasas, con actividad 5'-- 3', que incluyen Mre11, Sae2, Dna2 y Exo1, posteriormente RPA se une a las cadenas sencillas del DNA para protegerlo y evitar la formación de estructuras

secundarias, también se reclutan a este sitio proteínas de puntos de control y de recombinación como Mec1-Ddc2, Rad24-RFC (Ddc1-Mec3 y Rad17) y Rad52, esta última se encarga de reclutar a Rad51 y Rad59, Rad51 unido a la hebra sencilla dañada lleva a cabo la búsqueda e invasión al DNA homólogo, Rad52 y Rad51 reclutan a Rdh54, el cual pertenece al complejo de remodelamiento de la cromatina, y a Rad55-Rad57, parálogos de Rad51 (Huertas, 2010; Lisby and Rothstein, 2009; Weiner et al., 2009). Una vez que la cadena sencilla invasora encuentra y se aparea en la secuencia homóloga, se lleva a cabo la polimerización de nuevos nucleótidos, utilizando a la cadena sencilla como iniciador, posteriormente se ligan las cadenas sintetizadas formando las estructuras de Holliday que pueden migrar a lo largo del DNA y finalmente éstas se resuelven por nucleasas Mus81-Mms4 para generar dos cadenas de DNA dúplex reparadas y recombinadas. Alternativamente los intermediarios de Holliday pueden formar productos no recombinados a través de la acción de topoisomerasas como Topo III y Sgs 1 (Dudas and Chovanec, 2004; Krogh and Symington, 2004; Lombard et al., 2005; Scharer, 2003).

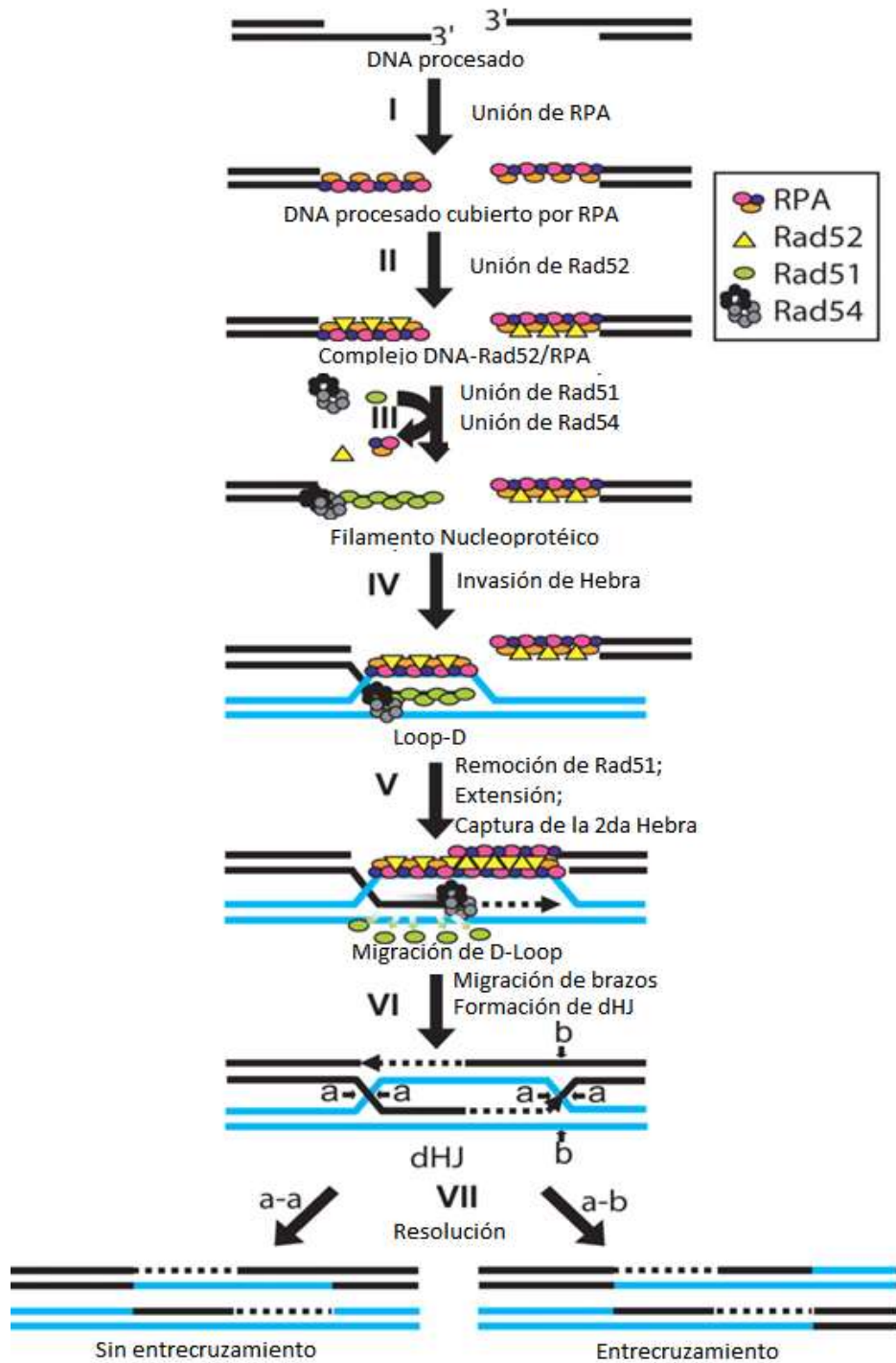


Fig. 4.- Vía de reparación del rompimiento de la doble cadena del DNA por recombinación homóloga. Consiste en generar extremos 3' de cadena sencilla que se usan para buscar homología en una cadena homóloga, esto permite la síntesis de nucleótidos para reparar el daño y finalmente por medio de ligación de fragmentos generados se pueden resolver las cadenas una vez reparadas.

En algunos casos, se forman rompimientos de doble cadena en extremos sencillos, por ejemplo en los extremos de los cromosomas o en colapso de horquillas de replicación. Se ha propuesto que estos rompimientos son reparados por el mecanismo conocido como replicación inducida por rompimiento (BIR por sus siglas en inglés; break-induced replication) (Fig. 5A), en el cual la hebra sencilla invade una cadena doble homóloga seguida por replicación hasta el final del cromosoma (Kraus et al., 2001).

Adicionalmente cuando el rompimiento de la doble cadena está flanqueado por repetidos directos, el rompimiento puede ser reparado por el mecanismo conocido como alineamiento de cadena sencilla (SSA por sus siglas en inglés; single strand annealing) (Fig. 5B), mediado por secuencias de repetidos de DNA (Paques and Haber, 1999).

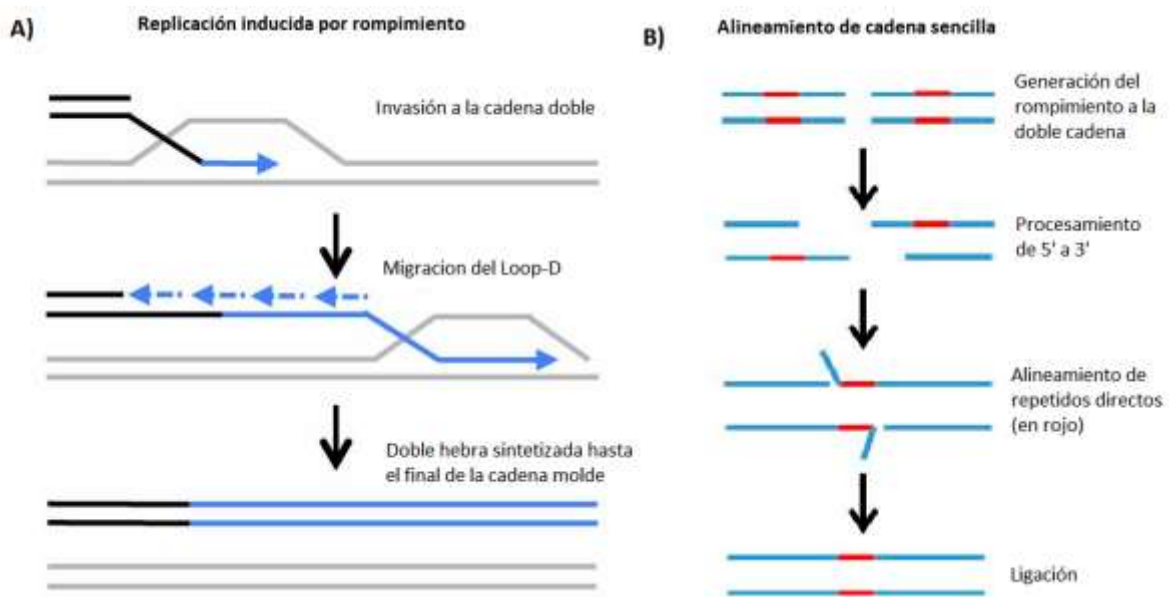


Fig. 5.- Mecanismos alternativos de reparación del rompimiento de la doble cadena del DNA. A) vía de reparación del rompimiento de la doble cadena del DNA por replicación inducida por rompimiento, se lleva a cabo cuando solo un extremo dañado encuentra homología en cadena doble, esta se usa como molde y se copia hasta terminar el final. B) alineamiento de cadena sencilla se lleva a cabo en regiones del DNA con secuencias repetidas, el DNA dañado se procesa generando cadenas sencillas, las cuales se alinean en los repetidos y se elimina el DNA intermedio.

Proteína mediadora de recombinación RAD52

Rad52 es un miembro del grupo epistático Rad52 de proteínas originalmente identificadas por su requerimiento en la reparación del daño al DNA inducido por radiación ionizante. La delección de rad52 en *S. cerevisiae* incrementa importantemente la sensibilidad a radiación, a Metil Metano Sulfonato y a muchos otros agentes que dañan al DNA, muestra también severos defectos en eventos de recombinación mitótica activado por daño al DNA inducido y espontáneo, defectos en el “mating type”, en mecanismos de conversión génica dependiente de Rad51, en la replicación inducida por rompimiento (BIR), en BIR acoplada a alineamiento de cadena sencilla (SSA), también en la formación de uniones de Holliday así como alteraciones en el proceso de recombinación meiótica (Dudas and Chovanec, 2004; Heyer, 2007; Symington, 2002), por lo tanto la función de la proteína Rad52 es indispensable en la reparación del rompimiento de doble cadena (DSB) y en general en eventos que involucran recombinación genética en *S. cerevisiae*. Sin embargo, en ratones RAD52 $-/-$ se han observado fenómenos completamente diferentes, son viables, fértiles y sin anomalías severas (Dudas and Chovanec, 2004), esto se debe a que en la mayoría de los organismos eucariontes existen proteínas homólogas a Rad52 y/o proteínas accesorias que pueden suplir las funciones de dicha proteína, como por ejemplo BRCA2 (Fradet-Turcotte et al., 2016).

La proteína RAD52 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScRAD52) consiste de 471 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 52.4 KDa, en humano y ratón la proteína es de 418 y 420 residuos de aminoácidos respectivamente. La identidad entre ambas es de 69% y similitud de 80%. Entre ScRad52 y HsRad52 la identidad y similitud es de 30% y 50% respectivamente, en el extremo amino terminal (Scharer, 2003; West, 2003).

Rad52 tiene dos dominios principales (Fig. 6); el N terminal es responsable de homooligomerización, de interactuar con Ubc9, de unión a Rad59 y también de unión a DNA de cadena sencilla. El dominio C terminal está fuera del dominio conservado y es responsable de las interacciones físicas con Rad51 y contiene el sitio donde interactúa con RPA y también en ella se encuentra una secuencia de localización nuclear, otro dominio de unión a DNA también en levaduras (Dudas and Chovanec, 2004; Krogh and Symington, 2004; Mortensen et al., 2009; Singleton et al., 2002).

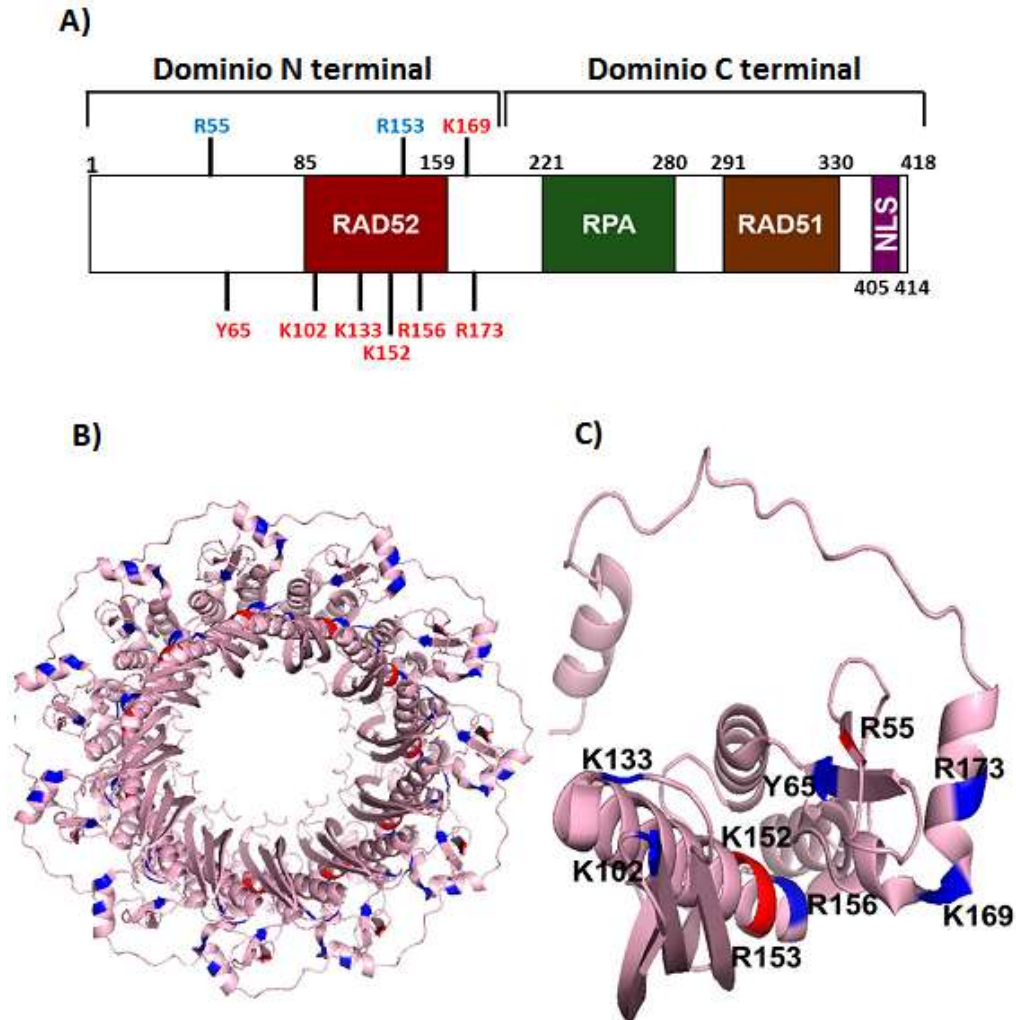


Fig. 6. Estructura de RAD52 humana (tomado y modificado de (Hanamshet et al., 2016). A) mapa de dominios de Rad52, en N terminal se encuentra el sitio de unión a DNA y la región de auto oligomerización. El C terminal se encuentra el dominio de interacción con Rad51, RPA y el dominio de localización nuclear. Estructura del anillo undecamerico formado por el dominio N terminal (1-212). C) estructura de un monómero del dominio N terminal de Rad52 humana, aminoácidos en rojo interaccionan con DNA de cadena sencilla y con DNA de cadena doble, aminoácidos en azul se unen solo a DNA de cadena sencilla (Hanamshet et al., 2016; Mortensen et al., 2009; Singleton et al., 2002).

La proteína Rad52 se une tanto al ssDNA como al dsDNA de manera no cooperativa. Esta actividad ha sido localizada tanto en el extremo N terminal como en el C terminal en levaduras, el cual se ha mostrado que posee aminoácidos cargado positivamente esenciales para su unión.

Debido a su dominio de homooligomerización, Rad52 forma estructuras como anillos con siete monómeros (se han observado anillos de hasta 11 monómeros) a los cuales se une el DNA (Dudas and Chovanec, 2004; Krogh and Symington, 2004).

Rad52 también promueve el alineamiento de ssDNA complementario, actividad que es estimulada con la presencia de RPA. Es una proteína mediadora en el intercambio de hebra del DNA dependiente de Rad51, facilitando el reclutamiento de Rad51 al sitio de recombinación. De esta manera ScRad52 forma un co-complejo con ScRPA-ssDNA y recluta a ScRad51 (Dudas and Chovanec, 2004; Li and Heyer, 2008; Singleton et al., 2002). Rad52 también lleva a cabo el alineamiento de la segunda cadena dañada en el evento de invasión de la segunda hebra, para dar como resultado el intermediario de Holliday (Li and Heyer, 2008; West, 2003).

Se ha observado que Rad52 es una proteína que como Rad51 lleva a cabo intercambio de cadena, aunque con menor eficiencia y sin necesidad de hidrolizar ATP u otro nucleótido como cofactor. Rad51 forma filamentos helicoidales al unirse al DNA, en contraste Rad52 forma estructuras nucleoprotéicas en forma de anillos que se apilan o que se juntan por los bordes, el DNA se enrolla alrededor de los anillos y también Rad52 humana desenrolla dobles cadenas como Rad51 (Hanamshet et al., 2016).

Adicional a la recombinación homóloga existen otros mecanismos que involucran recombinación como son replicación inducida por rompimiento (BIR), el cual consiste también en la invasión de la doble cadena donadora por la cadena rota, seguida por la replicación completa de la cadena donadora. Este proceso es importante para el mantenimiento del telómero en ausencia de telomerasa (Kraus et al., 2001). Otra vía de reparación dependiente de homología es el alineamiento de cadena sencilla (SSA) el cual se lleva a cabo en rompimiento de DSBs en cadenas con secuencias altamente repetidas. SSA involucra delección en los repetidos y por ello es considerado como mutagénico. Estos procesos son independientes de Rad51 pero dependientes de Rad52 (Krogh and Symington, 2004; Symington, 2002).

La expresión de la proteína RAD52 es inducida durante la meiosis, pero no en respuesta al daño al DNA. En meiosis la proteína forma focos de localización donde se observa colocalizado con RPA y RAD51 asociado con la formación de DSBs. Se ha observado que tanto en humanos como en levaduras, la proteína Rad52 interactúa con Rad51, con ella misma, RPA, Ubc9 y

SUMO-1/Ub11, así como con la tirosina cinasa c-Abl, TFIIH y forma complejos con Rad59 (Dudas and Chovanec, 2004; Singleton et al., 2002; West, 2003).

ANTECEDENTES

Reparación del DNA en *Giardia duodenalis*

Uno de los factores más importantes que contribuyen fuertemente a la resistencia a ambientes hostiles de *Giardia* es su capacidad de reparar eficientemente su material genético, para esto requiere de un sistema que le permita conservar la integridad del mismo, es decir, que logre una reparación fidedigna, el mecanismo mejor conocido que realiza este tipo de reparación es la reparación por recombinación homóloga. En *Giardia duodenalis* se han estudiado y caracterizado diferentes proteínas que participan en la vía de reparación por recombinación homóloga como el complejo MR (Mre11 y Rad50) (Sandoval-Cabrera et al., 2015) es el primero en reclutarse en el sitio de la lesión, se une a los extremos rotos para mantenerlos próximos y procesa las cadenas para generar hebras sencillas, también es responsable de reclutar a la cinasa ATM (tesis de maestría Claudia Valdez Vargas, 2014 y Beatriz Verdín, 2015) esta proteína fosforila a la Histona H2AX, dicha fosforilación es un marcador de daño a la doble cadena del DNA ya que muchas proteínas de reparación son reclutadas gracias a esa señal, en conjunto las proteínas previas reclutan a RPA (tesis de maestría Diego Armando Martínez Reyes, 2013), RPA se une a las cadenas sencillas generadas y a su vez recluta a Rad52 (objeto de este estudio) que interacciona con RPA desplazándola de la cadena sencilla y promoviendo la unión de la recombinasa DMC1B (realiza la función de Rad51) (Torres-Huerta et al., 2016) la cual lleva a cabo la búsqueda de homología en la cadena homóloga y con síntesis de nucleótidos y posterior resolución de estructuras de Holliday se obtienen las moléculas reparadas.

RAD52 de *Giardia duodenalis*

Rad52 es otra proteína clave en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga, sin embargo no ha sido estudiada en *Giardia duodenalis*, por ello el interés en caracterizarla en este trabajo. Su secuencia proteínica fue localizada en la base de datos de *Giardia* obtenida mediante un alineamiento con la proteína Rad52 de levadura (Fig. 7) (tesis de maestría Rosa María Martínez Miguel, 2010). Esta secuencia muestra cierto grado de similitud, siendo mayor en una región identificada en el extremo amino terminal correspondiente al dominio de unión a ssDNA y a una pequeña porción del dominio de unión a RPA. El análisis BLAST identificó también la región

amino terminal de unión a ssDNA similar a proteínas RAD52 de otras especies eucariontes (Fig. 8).

Así, solo tenemos la secuencia de la proteína por lo que sería importante verificar si tiene las funciones de una proteína típica Rad52.

```

ScRAD52      MAFLSYFATENQQMQTRRLPRTAEGSGGFGVLLMNEIMDMDEKPKVFGNHSEDIQTKLTK 60
GrRad52      -----MANIQGRLPWGE-----RELSDAQRKQ-----AKAALSR 30
              ***  .*          .*: * :.*:          :: *.:

ScRAD52      KLGPEYISKRVGFGTISRRIAYIEGWVINLANQIFGYNGWSTEVKSVVIDFLDERQGKFSI 120
GrRad52      CLGSDHISTRQGPRNTRIPYLDVSTTIIRLANEAFRYDGWSSNIISITQDFIQEERGIWSC 90
              **.:**.* *  .:*.*:  .*.***: * *:*:*:  *: . **:*:*:* *

ScRAD52      GCTAIVRVTLTSGTYREDIGYGTVENERRKPAAFERAKKSAVTDALKRSLRGFGNALGNC 180
GrRad52      CYTALVRITLPLNGCYHEGIGVGNENRQLQADAIEKAKKSAVSDAMKRALRCFGEGLGNN 150
              **:*:*:*.* * :*.** *.** *  .: *:*:*:*:*:*:*:*:*:* *:*:*:*

ScRAD52      LYDKDFLAKIDKVKFDPDFDENLFRPTDEISESSRTNLHENQEQQQYPNKRRQLTKV 240
GrRad52      ITSDSATSRGSLVLSIYEDEFDVK----- 173
              : ...  :: . :.:  :** :

ScRAD52      TNTNPDSTKNLVKIENTVSRGTPMMAAPAEANSKNSSNKDIDLKSLDASKQDQDDLLDDS 300
GrRad52      --ENPD-----RVITASKDVVAAASTATSNAAPLN----- 201
              ***          ...: .. :*:.*: *.: :. :

ScRAD52      LMFSDDFQDDDLINMGNTNSNVLTTTEKDPVVAKQSPTASSNPEAEQITFVITAKAATSVQN 360
GrRad52      -----NSKRLHTTVSPVTSQGFNLGTGTALALQLSVADTPSNAN 243
              **: * *  .*:.*: *  :.:* *  :. . :.* *

ScRAD52      ERYIGEESIFDPKYQAQSIRHTVDQTTSKHIPASVLKDKTMTTARDSVYEKFAKPKGKQLS 420
GrRad52      -----EIDTIGNLPAQPCNTKPEINING--ANKAPPPTKILV 278
              : *  :*:. : * . . . . :* . * * *

ScRAD52      MKNNDKELGPHMLEGAGNVVPRETTPIKTNATAFPAAAPRFAPPKVVHPNGNGAVPAV 480
GrRad52      EK-----PSLFQIAATKRPTQFPQSDRKTILHAAAP-----DSNQEKTLPSE 321
              *          *  :.: *.: * * *  :.: :.: .** . . * : :*:

ScRAD52      PQQRSTRREVGRPKINPLHARKPT 504
GrRad52      PSLKQSHPMFSKARQSIFSK---- 341
              * . :.:  .:.*: . :

```

Fig. 7. Alineamiento de la secuencia peptídica de Rad52 de *G. duodenalis* y *S. cerevisiae*, se muestran regiones conservadas que corresponden al dominio de unión a ssDNA (aminoácidos 28 a 149) y una región de unión a RPA (del aminoácido 179 a 199), estas regiones fueron predichas por el mismo programa que realizó el alineamiento en la base de datos de Giardia DB.

JUSTIFICACIÓN

Giardia duodenalis es un organismo de importancia médica y también evolutiva, por lo tanto, estudios que permitan conocer la patofisiología del parásito ayudarán a controlar mejor las infecciones por giardiasis, de igual manera al ser un organismo ancestral minimalista, resulta útil como un modelo para entender los procesos celulares, bioquímicos y genéticos básicos además de evolutivos que podrían tener implicaciones en la mejora de estrategias médicas aplicadas y/o biotecnológicas para el beneficio común.

En este sentido, la secuenciación del genoma de este parásito ha facilitado la caracterización de sus proteínas y de sus procesos celulares. Uno de los mecanismos de gran interés por su naturaleza y sus implicaciones en la taxonomía y epidemiología molecular, es la recombinación genética, el cual, como se ha demostrado, es clave en la meiosis y en los procesos de reparación de los daños al DNA, por lo tanto es importante la caracterización de cada uno de los componentes de dicho sistema, entre estos componentes existen proteínas que participan en ambos mecanismos, como son Mre11/Rad50, RPA y Rad52. La proteína Rad52 se encuentra en la mayoría de los organismos eucariontes y juega un papel muy importante en mecanismos que involucran recombinación del material genético. En el genoma de *Giardia duodenalis* también se encuentra presente una única secuencia putativa de RAD52, el cual se propone que podría llevar a cabo una de las funciones claves en mecanismos de recombinación en el parásito como un componente necesario en todos los sistemas de recombinación de éste parásito y por ello su caracterización contribuirá al esclarecimiento de tan importantes mecanismos celulares.

HIPÓTESIS

Dado que la secuencia de RAD52 putativa de *Giardia duodenalis* presenta un alto grado de similitud con la secuencia de la proteína RAD52 de *Saccharomyces cerevisiae* y de otras especies, y que también se ha identificado el dominio de unión a ssDNA, determinante para las funciones de RAD52 en dicha secuencia, se predice que GdRAD52 putativa será capaz de llevar a cabo las funciones de autooligomerización, de unión a DNA, alineamiento de cadenas sencillas así como ser capaz de interactuar físicamente con GdRPA1 y GdRAD51, los cuales implican una actividad mediadora de recombinación. Así mismo la expresión de la proteína se verá afectado como respuesta ante daño genotóxico inducido al organismo.

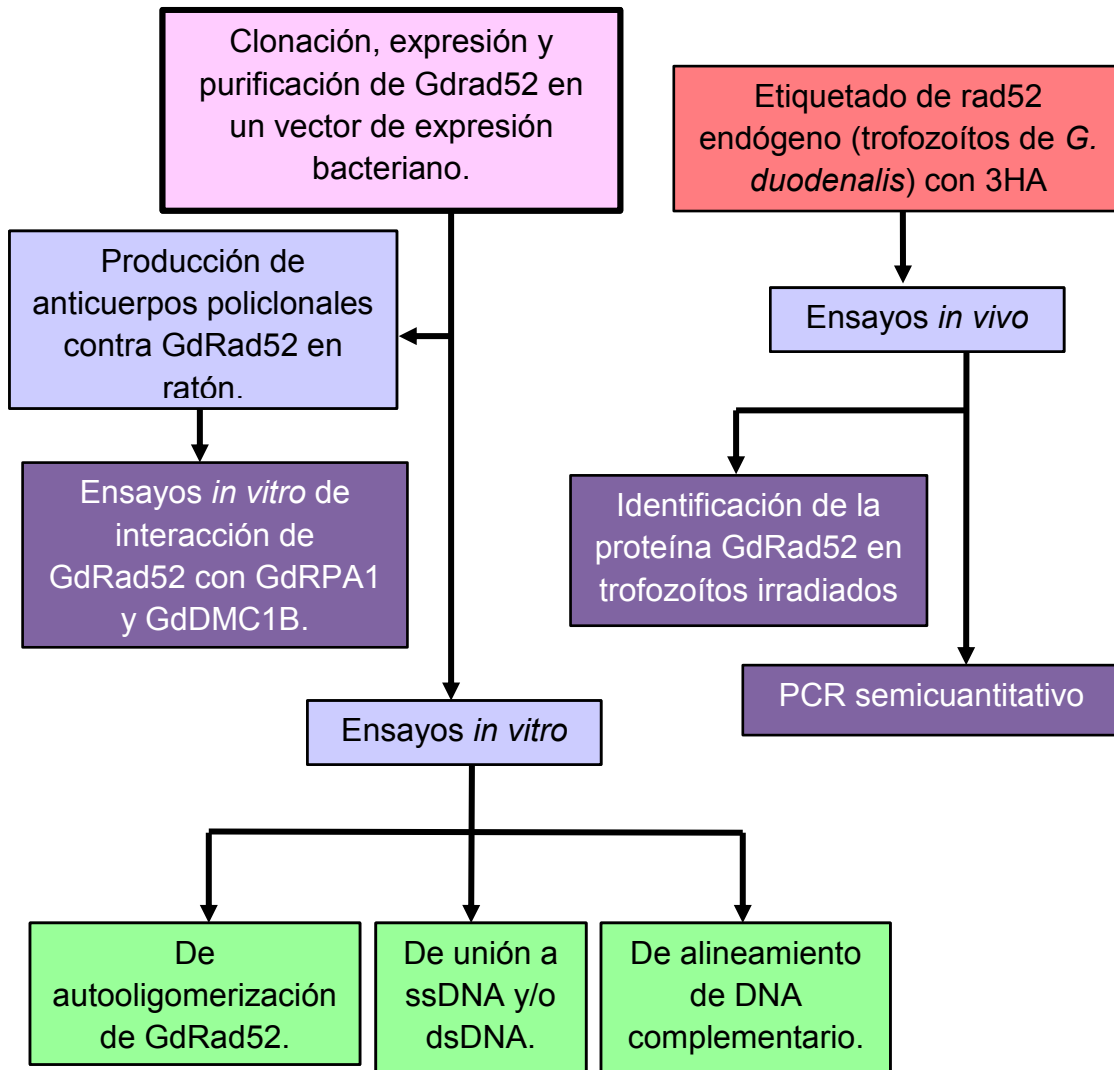
OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterización de las funciones bioquímicas de la proteína putativa RAD52 de *Giardia duodenalis* (GdRAD52), así como ver su respuesta ante daño en el parásito.

Objetivos particulares

- 1.- Clonar, expresar y purificar Rad52 de *Giardia duodenalis* en un vector de expresión bacteriano.
- 2.- Analizar la capacidad de unión al DNA de cadena sencilla y DNA de cadena doble de GdRAD52.
- 3.- Estudiar la capacidad de GdRAD52 putativa de llevar a cabo alineamiento de DNA complementario de cadena sencilla.
- 4.- Analizar la capacidad de GdRad52 de compensar la inhibición de GdRPA1 en el alineamiento de DNA complementario.
- 5.- Verificar la capacidad de autooligomerización de GdRAD52.
- 6.- Obtención de anticuerpos policlonales contra GdRAD52.
- 7.- Etiquetar el gen Gdrad52 en el genoma con 3 repetidos de hemaglutinina.
- 8.- Analizar la expresión del mRNA y proteína de GdRad52 ante daño generado por radiación gamma.
- 9.- Estudiar de capacidad de GdRAD52 de interaccionar con GdRAD51 y/o GdRPA1.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Los cultivos de trofozoitos de *G. duodenalis* utilizados para este trabajo fueron del ensamble A cepa WB clona 6 ATCC 30957 y estos fueron proporcionados por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV. Y la clona 99 fue proporcionada por la Dra Viviana Chavez Munguia del Depto de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav Zacatenco.

Extracción de DNA genómico de *G. duodenalis*

Para la extracción del DNA se partió de un cultivo de 15 ml de trofozoitos de *G. duodenalis* confluentes (crecidos en medio YTI-33). El tubo de cultivo se incubó por 30 min en hielo para permitir que los parásitos que se encontraban adheridos a la pared del tubo se despegaran, posteriormente los tubos de cultivo se centrifugaron a 484 x g en una centrifuga de Sorvall por 10 min a 4°C hasta concentrar los trofozoitos, en seguida se lavaron dos veces con 0.5 ml de solución buffer PBS frio (TRIS HCl 20mM, NaCl 137mM KCl 2.7mM, HNa₂PO₄ 10mM ajustado a pH 7.4) y nuevamente se centrifugaron a 484 x g por 10 minutos a 4°C. La pastilla resultante se incubó toda la noche (~16hr) a 42°C en solución de lisis (10mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 150mM NaCl, 0.4% SDS y 20mg/ml de proteinasa K (4µL)), usando 400µL por cada 10 millones de trofozoitos. Después de este tiempo se adicionó RNAsa a una concentración final de 20 µg/mL y se incubó a 37°C por 30 min. Se agregó un volumen de fenol, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 11300 x g por 5 minutos en una centrífuga mini spin plus Eppendorf. Se recuperó la fase acuosa, y se adicionó Acetato de Sodio a una concentración final de 0.3M y dos volúmenes de etanol absoluto frio, se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11300 x g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante (SN) y la pastilla se lavó

con 1 ml de etanol al 70%. Finalmente la pastilla se resuspendió en 50µL de agua bidestilada y se almacenó a -20°C.

Oligonucleótidos utilizados

	Nombre	Secuencia	Referencia
<i>Giardia duodenalis</i>	Gdrad52-F1	5'-GGATCCGAAACCAAGGACTCTATGGCTA-3'	Este estudio
	Gdrad52-F1B	5'-CACCGGATCCGAAACCAAGGACTCTATG-3'	
	Gdrad52-R2	5'-GTACCTCATTTGCTAAATATAGACTGACGC-3'	
	GdRad52-Fw3	5'-AGACCAACTGAGCAATTCCC	
	GdRad52-qRT-fw	5'-TTGATGTAAAGAGAACCCAGACC-3'	
	GdRad52-qRT-Rv	5'-TGCCTGTAAAGTTGAATTGTCCAC-3'	
	GdRad52-Neo-3HA-Fw	5'-cccggGACAATAAGATTAGCC-3'	
	GdRad52-Rv3	5'-GCGGACCAAAGCAGTATAGC	
	GdRad52-Neo-3HA-Rv	5'-CTCGAGTTTGCTAAATATAGACTG-3'	
	Ubi_Fw	5'-GAGCTCATGCAGATCTTCGTCAA-3'	
Ubi_Rv	5'-CCTTCTGGATGGAGTAGT-3'		
pET100TOPO	T7 Fw	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	
Ensayos de actividad bioquímica	PSLO2040	5'-AAATGAACATAAAGTAAATAAGTATAAGGAT AA TACAAAATAAGTAAATGAATAAACATAGAAA ATAAAGTAAAGGATATAAAA-3'	(Krejci et al., 2002)
	PSLO2041	Secuencia complementaria de PSOL 2040	
	PSLO1056	5'-TAATACAAAATAAGTAAATGAATAAACAGAG AAAATAAAG-3'	
	PSLO1057	Secuencia complementaria de PSOL 1056	
	Fw-Neo-Seq	5'-TAAAACGACGGCCAGTGAG-3'	
	Rv-Neo-Seq	5'-ATGCAAAGAATTCGATTCA GG-3'	

Tabla 2.- Lista de oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar y secuenciar los genes rad52 y oligos usados para ensayos de actividad *in vitro*.

Amplificación por PCR del gen rad52

Para la clonación del gen rad52 de *Giardia duodenalis* en un vector de expresión en bacteria, se diseñaron oligonucleótidos con una secuencia específica (CACC) en el extremo 5' del oligo "forward" para permitir la direccionalidad del fragmento de interés. Para tal fin se utilizó el programa Oligo 7.5.

El DNA genómico extraído de trofozoítos de *Giardia* y de levadura se utilizó como templado para realizar una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicamente diseñados para la amplificación del gen completo de Rad52 de cada especie, se utilizó 1 X de 10X AccuPrime Pfx Reaction mix (Taq polimerasa de alta fidelidad), 1.5 mM de dNTPs, 0.25 µM de oligonucleótidos y 1.25 U de AccuPrime Pfx DNA Polimerasa de Invitrogen. Las condiciones de amplificado del fragmento de 1050-pb que contiene gen Gdrad52, fueron: desnaturalización de cadenas molde iniciales 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de 95°C x 15 segundos para desnaturalización de cadenas molde generadas en el ciclo previo, 58°C x 30 segundos para alineamiento de oligonucleótidos a la cadena molde, 68°C x 1 minuto para amplificación y una extensión final de 68°C x 5 minutos.

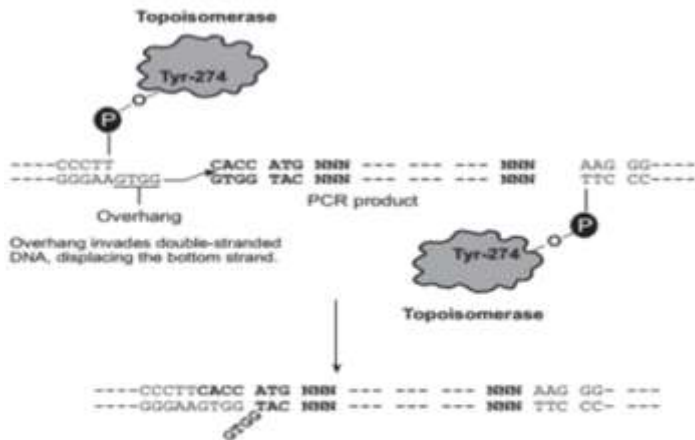
Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) 0.5 X teñido con bromuro de etidio y se analizó en un fotodocumentador (High Performance Ultraviolet Transilluminator UVP).

Clonación en vector de expresión

El vector de expresión en bacteria; Champion™pET100 Directional TOPO® Expression Kit, como se muestra en la figura 9A, tiene un sistema que permite la clonación direccionada del producto de PCR, a través de una cola de 4 nucleótidos que termina en 3' en el vector, el cual se aparea con la secuencia complementaria en 5' del producto de PCR, una vez apareado, una enzima Topoisomerasa realiza la ligación en ambos extremos. Para realizar la clonación, se preparó una reacción que contiene; producto fresco de PCR 0.5 µl, solución salina 1 µl, agua estéril 3.5 µl, TOPO® vector 1 µl, se mezcló bien y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo se usó 3 ul de la reacción para transformar células *E. coli* DH5α químicamente competentes, se sembró en placas de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C toda la noche (esquema de la figura 9B). Una vez obtenidas las colonias candidatas, se seleccionaron 10 de ellas

para la posterior extracción de plásmido por el método de miniprep. El plásmido obtenido de cada colonia candidata fue sujeto a análisis de PCR y restricción para la verificación de la clonación deseada.

A



B

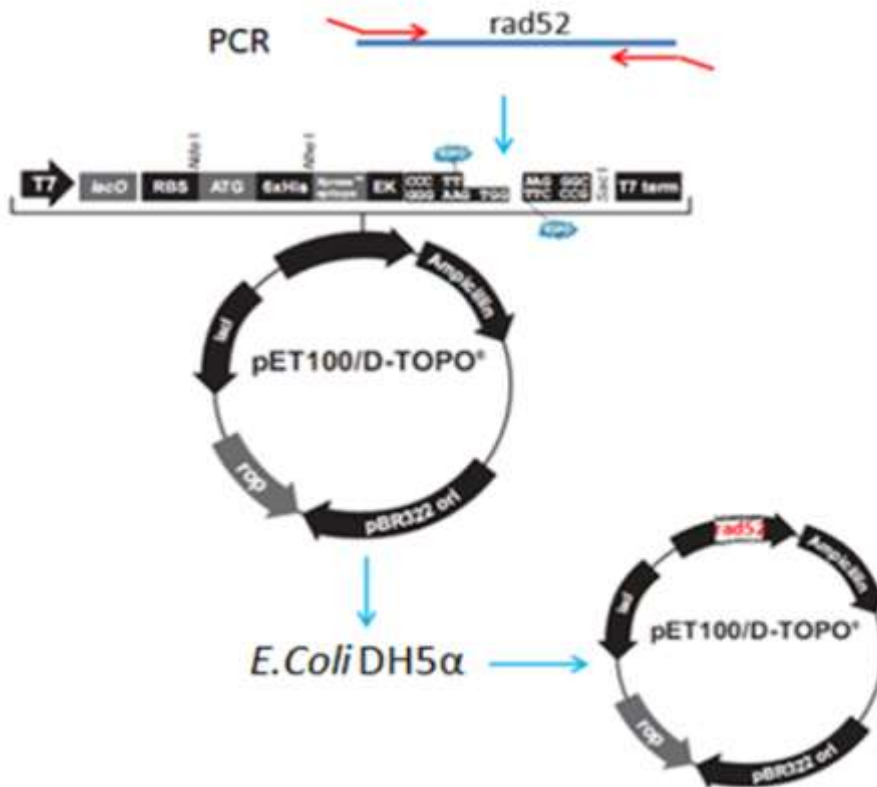


Fig. 9.- En A; esquema que muestra el sitio de apareamiento y ligación en el vector donde se inserta el producto de PCR para la clonación dirigida. B; esquema del procedimiento de clonación que se llevó a cabo para obtener el vector heterólogo que expresa GdRad52.

PCR, restricción y secuenciación

Se realizó un ensayo de PCR con 10 clonas de cada gen usando las condiciones previas, utilizando oligonucleótidos específicos localizados en el plásmido, flanqueando el inserto.

Algunas clonas de cada gen fueron sujetas a un ensayo de restricción utilizando una unidad de enzima por cada microgramo de plásmido. Se usaron las enzimas NdeI e Hind III (NEB) Lo cual permite la liberación del inserto de interés. Los resultados fueron resueltos en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y revelado en un fotodocumentador.

Se secuenciaron 4 clonas (4, 6 14 y 15) para verificar la clonación en marco con la etiqueta de histidinas, para este fin se realizó una reacción utilizando 10 picomoles de oligo “forward” T7 localizado en el extremo 5’ del inserto; 4 ul de una mezcla del kit de secuenciación (ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit) que contiene la enzima y los nucleótidos marcados con fluorocromos. La clona 14 de GdRad52 fue completamente secuenciada usando los oligos T7-Fw, GdRad52-F2, GdRad52-R2 siguiendo el procedimiento previo.

Expresión y electroforesis de las proteínas recombinantes

Se extrajo plásmido petTOP100-Gdrad52-His por el método de miniprep y se usó para transformar células *E. coli* cepa BL21 star (*F-ompT hsdS_B (r_B, m_B) galdcmmne131* (DE3)) para poder inducir la expresión de las proteínas recombinantes.

Una vez transformadas las cepas se tomó una colonia de cada placa y se inoculó un cultivo semilla de 5 ml se agregó ampicilina a una concentración de 100 ug/ml y se incubó toda la noche a 37°C en agitación (200 rpm). Dos ml del cultivo semilla fue utilizado para inocular dos botellas de 20 ml de cultivo con ampicilina, se incubó a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica alcanzó 0.5 - 0.8, a este punto se agregó Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína recombinante, a una concentración de 0.5 mM para una botella y 1 mM para la segunda botella, se incubó a 37°C en agitación y se tomaron muestras a los 30 min, a una,

dos, tres, 4 y 5 hrs post inducción. Estas muestras se ajustaron a 500 μ l a una OD=0.5, se centrifugaron y se agregó 80 μ l de buffer Laemmli (60 mM Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol o DTT, 0.01% azul de bromofenol), se hirvió por 5 min, se resolvió SDS-PAGE.

Transferencia y western blot

Las proteínas resueltas en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, (100 V por 1 hr o 0.3 A por 30 min) en buffer de transferencia que contiene 25 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 192 mM de Glicina, esta se bloqueó con leche descremada (0% grasa Svelty Nestle) al 5% por una hr en agitación, después de tres lavados con buffer TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20) se incubó con anticuerpo monoclonal primario anti-Histidina (Sigma Aldrich), a una dilución de 1:7000 por una hr en agitación a temperatura ambiente, luego de tres lavados con buffer TBST se incubó con anticuerpo policlonal secundario anti-ratón acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:30000) por una hr a temperatura ambiente, se lavó tres veces con buffer TBST y se reveló con el sustrato de la enzima (Western Lightning Plus-ECL de PerkinElmer) lo cual emite una fluorescencia que se revela al exponer sobre ella una placa fotográfica.

Prueba de solubilidad de la proteína recombinante

Una vez obtenidas las clonas que expresan las proteínas recombinantes, se realizó una prueba para verificar la localización de las proteínas recombinantes (de manera soluble en el citoplasma o de manera insoluble en cuerpos de inclusión en la célula) este paso es de gran importancia debido a que esto influye en el método de purificación, si se encuentran de manera insoluble se requiere de condiciones más drásticas como por ejemplo, altas concentraciones de urea (de 5 a 8M) para romper las membranas de los cuerpos de inclusión, esto afecta de manera negativa la estructura nativa de la proteína, lo cual requerirá un proceso adicional de renaturalización. Para esto se puso un cultivo semilla de 5 ml en incubación toda la noche a condiciones óptimas (37°C en agitación), posteriormente se inoculó con 100 μ l un tubo con 10 ml de medio fresco adicionado con ampicilina 100 μ g/ml, se incubó a 37°C en agitación hasta que la OD₆₀₀ alcanzó 0.5, a este punto se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM, se incubó por dos hrs. Pasado este tiempo, se tomó una alícuota de cada cultivo, se ajustó a una OD=0.5 en 500 μ l, se centrifugó y la pastilla

celular fue lisada por sonicación (85 % amplitud, 6 pulsos de 10 seg) con 200 ul de una solución lisis (50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, 0.25% Triton-X100), el lisado fue centrifugado a máxima velocidad (12 000g) por 20 min, el sobrenadante (fracción soluble) fue separado y reservado, la pastilla restante (fracción insoluble) fue tratada con 200 ul de buffer lisis adicionado con 5 M de urea, y sonicada nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores, finalmente a cada fracción se le agregó Laemmli buffer y cada muestra fue hervida por 5 min, se usó 30 ul de cada fracción para realizar SDS-PAGE y posteriormente western blot.

Purificación de GdRad52 recombinante

Se partió de un cultivo semilla de la cepa *E. coli* BL21 star, transformado con el plásmido petTOP100-GdRad52 y fue incubado toda la noche bajo condiciones óptimas, se inoculó 3 ml de este cultivo a 300 ml de medio fresco con ampicilina, se incubó por 3 hr, cuando la densidad óptica llegó a 0.5 se agregó 0.5 mM de IPTG y se incubó por dos hr mas, el cultivo fue centrifugado para obtener una pastilla celular, el cual fue lisado con 50 ml de buffer de lisis adicionado con PMSF 1 mM, se lisó por sonicación (6 pulsos de 10 seg.), se centrifugó a máxima velocidad por 20min para clarificar el extracto. Se preparó una columna con 1 ml de perlas de agarosa-niquel (diluidas al 50 % con etanol), se lavó con un volumen de agua bidestilada y un volumen con buffer de lisis, se hizo pasar dos veces el extracto clarificado controlando la velocidad del flujo para permitir la interacción de las proteínas recombinantes con las perlas de agarosa-niquel. La columna fue lavada con 50 ml de buffer lisis recuperando 30 ul del eluido, posteriormente se lavó con 50 ml de buffer de lisis adicionado con 30 mM de Imidazole, luego con 50 ml del mismo buffer adicionado con 50 mM de imidazole, finalmente se eluyó en 10 fracciones de 1 ml cada uno con buffer lisis adicionado con 200 mM de imidazole. Se recuperó 30 ul de cada uno de los lavados así como cada una de las fracciones de elución y se agregó 20 ul de Laemmli buffer, se hirvió por 5 min y se resolvió en SDS-PAGE, se tiñó con solución de azul de Coomassie (0.2% azul de Coomassie, 25% metanol, 12.5% ácido acético) y se destiñó con solución desteñidora (25% metanol, 12.5 % ácido acético).

Para realizar los ensayos bioquímicos in vitro se requiere que las proteínas se obtengan altamente puras, para esto se requiere de un proceso de purificación que involucra el uso de diferentes resinas de afinidad. Para la purificación de GdRad52 se siguió el siguiente procedimiento; el

eluido con 200 mM de imidazole que se obtiene de la columna de agarosa níquel se aplicó a una columna de 6 ml Macro-HAP el cual fue colocado en un equipo FPLC y programado para colectar 70 ml en fracciones de 0.5 ml con un gradiente de 0 a 300 mM de KH₂PO₄ en buffer K (20 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.01% Igepal, 1 mM DTT, 10% glicerol and 150 mM KCl que también contiene inhibidor de proteasas aprotinin, chymostatin, leupeptin, and pepstatin A a 5 ug/ml cada uno), Ciertas fracciones (donde la gráfica muestra que contienen la proteína) se resolvieron en SDS-PAGE, se tiñó con solución de Coomassie y se destiñó con solución desteñidora. Se juntaron las fracciones que contienen la proteína de interés (6 ml volumen final) y se aplicaron a una columna de un ml de Source Q, del cual se eluyó 30 ml en fracciones de un ml de un gradiente de 150 a 500 mM de KCl en buffer K, así mismo se colectaron fracciones para SDS-PAGE. Las fracciones obtenidas de esta columna (5 ml total) tienen una concentración de 120 mM de KH₂PO₄ se reunieron en un solo tubo y fue diluido dos veces con buffer K y aplicado a la columna Source S de 6 ml, el cual fue eluido con 90 ml en fracciones de 1 ml de un gradiente de 100 a 600 mM de KCl. Ciertas fracciones fueron resueltas en SDS-PAGE. Las fracciones que contienen el pico de GdRad52 (12 ml 320 mM de KCl) fueron colectadas y concentradas a 2 mg/ml en una columna de Amicon Ultra-4 concentrator (Millipore).

Purificación de GdRPA1

En este trabajo se utilizó la proteína recombinante GdRPA1 cuyo gen fue clonado y expresado previamente (tesis de maestría, Diego Armando Martínez Reyes, 2013). GdRPA1 se purificó de *E. coli* cepa Rosetta (B⁻ F⁻ ompT gal dcm lon[?] hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5] [malB⁺]_{K-12}(λ^S) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)), el lisado celular se preparó por sonicación en buffer K con 300 mM de KCl que también contiene Urea 5 M, fue centrifugado a 45 000g por 1 hr, el extracto fue clarificado e incubado con perlas de agarosa-níquel por media hr, una vez separado el extracto de las perlas, estas se lavaron con 50 ml de buffer K con 5, 4, 3, 2, 1 y 0 M de urea consecutivamente para permitir la renaturalización de la proteína de interés, después se lavaron las perlas con buffer K que contiene 30 y 50 mM de imidazol. Finalmente GdRPA1 fue eluido con 25 ml de 200 mM imidazole en buffer K. Este eluido fue diluido a 100 mM de KCl con buffer K y fue aplicado a una columna de 6 ml de Q-sepharose, del cual se recolectaron fracciones (72 ml totales) con gradiente de 100 mM a 1 M de KCl. El pico que contenía GdRPA1 (20 ml; 550 mM KCl) fue colectado y aplicado a una columna

de 2 ml de resina Source Q, del cual fue eluido con 74 ml en un gradiente de 0 a 300 mM de KCl en buffer K. Las fracciones que contienen la proteína (12 ml) fueron diluidas con 24 ml de buffer K y aplicado a una columna de 1 ml de resina Mono S del cual fue eluido con 45 ml de KCl en un gradiente de 100 a 500 mM de KCl, eluyendo la proteína alrededor de 150 mM de KCl, el eluido fue colectado y concentrado a un volumen final de 100 ul a una concentración de 2.5 mg/ml en columnas Amicon Ultra-4 concentrator (Millipore).

ENSAYOS BIOQUIMICOS *IN VITRO*

Purificación de oligonucleótidos utilizados como sustrato para ensayos bioquímicos

Los oligonucleótidos PSLO2040 (83 bases); PSLO2041 (83 bases) complemento exacto de PSLO2040; PSOL1056, (40 bases) y PSOL1057 (40 bases) el complemento exacto de PSOL1056, fueron usados como sustratos de DNA para unión a DNA de cadena sencilla o de cadena doble como se indica en cada experimento. Estos oligonucleótidos fueron purificados en geles al 15% de poliacrilamida desnaturalizantes que contienen 7 M de urea y 20% de formamida, la corrida se realizó a 55°C en buffer TBE (100 mM Tris borato pH 8.0, y 2 mM EDTA). Después del corrimiento, se cortaron las bandas de cada oligo y se electroeluyeron, se dializaron con agua bidestilada y se concentraron en columnas Centricon 10 microconcentrators. Los oligos PSLO2041 y PSOL1057, fueron marcados radiactivamente en el extremo 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP en una reacción utilizando la enzima T4 polinucleotido cinasa, una fracción de estos oligos se alineo con sus respectivos complementarios para obtener los sustratos de doble cadena necesarios.

Ensayos de cambio de movilidad electroforética

Cantidades crecientes de rGdRad52 y GdRPA1, como se indica en resultados, fue incubado con el oligo de cadena sencilla PSLO2041 de 83 bases (10 nM) o PSLO2040/PSLO2041 de doble cadena (10 nM) para ensayos de cadena sencilla y cadena doble respectivamente (Fig. 5), en 10 ul de una reacción estándar que contiene 50 mM de Tris, pH 7.5, 5 mM de DTT, 3 mM de MgCl_2 y 100 ng/ml de BSA, fue incubado por 5 min a 37°C. Después de la incubación, a las muestras se le agregó 5 ul de buffer de carga (50% de glicerol, 30 mM de Tris-HCl (pH 7.5) y 0.1% de orange G) en buffer TAE [40 mM de Tris-acetato (pH 7.5) y 0.5 mM de EDTA]), todo esto fue resuelto en un gel nativo al 10% de poliacrilamida, corrido en buffer TAE por aproximadamente 40 min,

luego fue procesado en un secador de geles (BioRad). Una vez secos los geles, estos fueron expuestos a una pantalla toda la noche y fueron revelados en un equipo Typhoon y cuantificado con el programa Quantity-One.

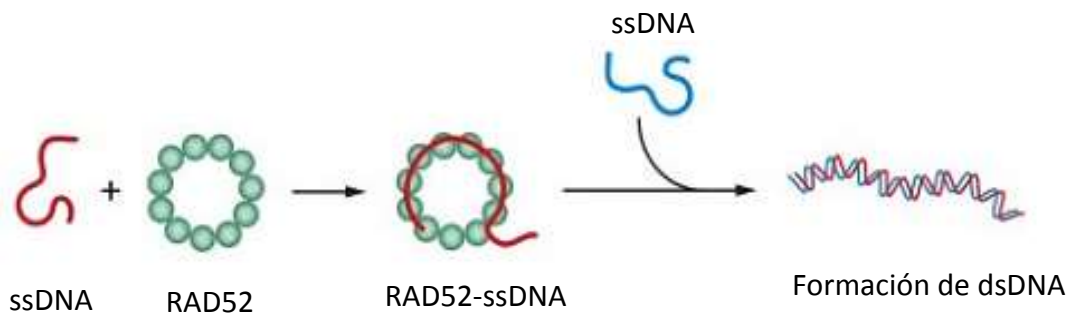


Fig. 10.- Esquema del ensayo de retardamiento (EMSA).

Ensayo de alineamiento de DNA complementario

10 nM de oligo 5' Oligo PSLO2041 marcado radiactivamente y 10 nM de oligo PSLO2040 no marcado fueron incubados en tubos separados con cantidades crecientes de rGdRad52 purificado en ausencia o presencia de 150 nM de rGdRPA1 purificado, en una reacción de 25 μ l con buffer que contiene 50 mM de Tris, pH 7.5, 5 mM de DTT, 3 mM de $MgCl_2$ y 100 μ g/ml de BSA, fueron incubados a 37°C por 5 min. Después de este tiempo los tubos fueron mezclados con sus respectivos oligos complementarios y la reacción completa (50 μ l) fue incubada a 37°C para empezar la reacción de alineamiento, a tiempos que se indican en resultados se tomó 10 μ l de cada reacción y se trató con 0.5% de SDS, 0.5 mg/ml de proteinasa K, y un exceso de oligo PSLO2041 (60 nM) no marcado, se incubó a 37°C por 5 min más en un volumen total de 15 μ l. Todas las muestras resultantes fueron resueltas en un gel nativo al 12% de poliacrilamida y corrido en buffer TAE, el gel fue secado y expuesto a una pantalla que fue revelada por un equipo Typhon. El alineamiento de DNA complementario fue cuantificado como el porcentaje de oligo de cadena sencilla marcado que fue convertido a doble cadena.

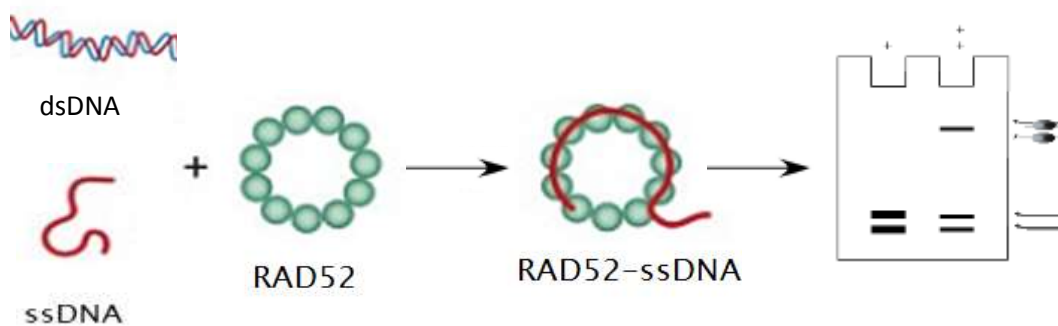


Fig. 11.- Representación esquemática del ensayo de alineamiento de DNA complementario.

Microscopía electrónica

Para evaluar la capacidad de rGdRad52 de formar oligómeros, se preparó una reacción que contiene 50 nM de la proteína en buffer K que fue incubada a 37°C por 5 min. La reacción fue aplicada en una rejilla cubierta con carbón que se le aplicó una descarga de luz en un aparato de aclarado con plasma y teñido con 2% (peso/ volumen) de formato de uranilo. La rejilla fue examinada en un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 operado a 120 kV con una magnificación nominal de 42,000. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Gatan Ultrascan4000 4kx4k CCD con un tamaño de pixel de 5.6 °A. El desplazamiento de foco usado fue de 0.7 um.

Obtención de anticuerpos policlonales

Para analizar la interacción entre la proteína GdRad52 con GdRPA1 se generó un anticuerpo policlonal en ratón (Fig. 12), el cual consistió en inyectar un extracto preparado de la siguiente manera; la proteína recombinante GdRad52 purificada de bacteria fue resuelta en un gel de poliacrilamida, este fue teñido y desteñido hasta que la proteína fue visible. La banda correspondiente a la proteína de interés fue cortada y triturada con buffer PBS, este extracto fue pasado varias veces por una jeringa de insulina hasta que se llegó a una homogenización adecuada, 200 µl (6 µg de proteína) fue inyectado por vía intraperitoneal a cada uno de 4 ratones Balb-C hembras de 20 días de edad, el procedimiento se repitió una vez por semana por 5 semanas, previo a la primera administración se extrajo aproximadamente 200 µl de sangre periférica por vía intraorbital a cada ratón, después una extracción más a la semana 4, pasados 5 semanas de inoculación los ratones fueron sedados con una dosis de una mezcla 50%:50% (v/v) de fármaco Xilazina (20 mg/ml) y Ketamina (100 mg/ml). Una vez que los ratones no respondieron a

estímulos físicos se les extrajo toda la sangre posible por vía intracardiaca, toda la sangre fue colectada y se realizó la separación del suero que contenía anticuerpos el cual fue reservada para los ensayos de western blot.

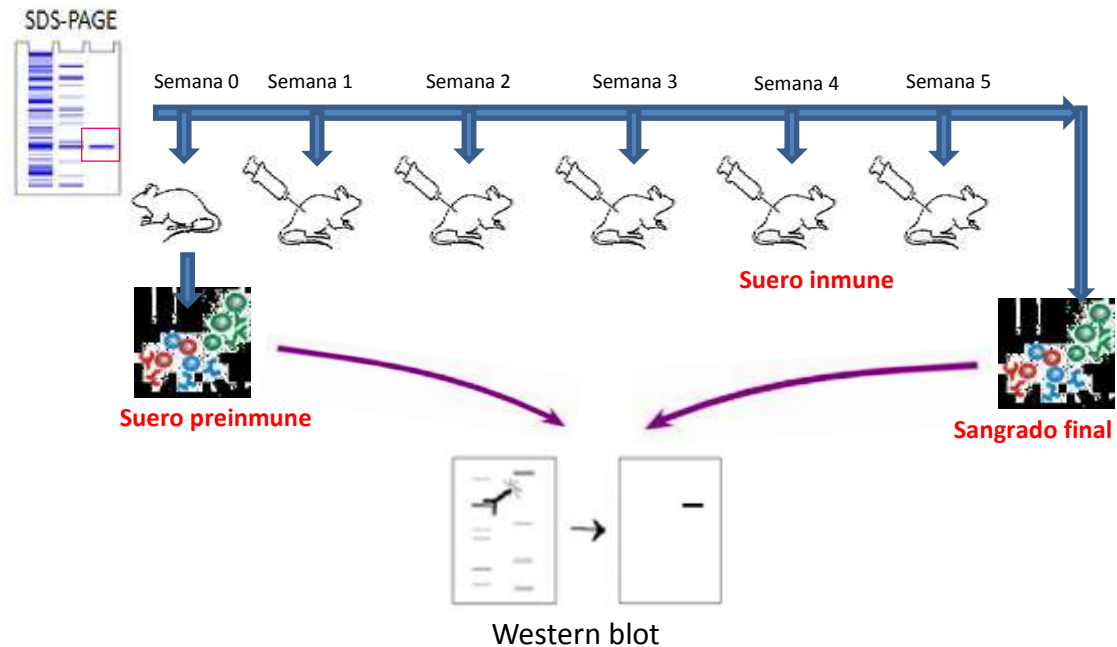


Fig.12.- Esquema de inmunización a ratones con GdRad52 recombinante, en el cual se recortó la banda correspondiente y se inoculó junto con la matriz de poliacrilamida, inicialmente se extrajo suero preinmune, en la semana 4 se volvió a extraer suero y un sangrado final en la semana 6, todos estos sueros fueron examinados en un western blot contra la proteína recombinante y el extracto completo de trofozoítos de *Giardia*.

Prueba de anticuerpos en ensayos de western blot.

Se realizó un ensayo de western blot resolviendo proteína recombinante GdRad52 y extracto total de trofozoítos de *Giardia duodenalis* en SDS-PAGE al 10%, después de transferir a una membrana de nitrocelulosa, ésta fue incubada con diferentes diluciones del anticuerpo extraído de ratón, fue incubado toda la noche a 4°C en agitación, posteriormente incubado con anticuerpo secundario anti-ratón-HRP, y finalmente revelado en placas fotográficas.

Ensayo Far western

Para analizar la interacción entre GdRad52 y GdDMC1B o RPA1 se realizó lo siguiente; BSA como control negativo, GdRad52-His purificado como control positivo y GdDMC1B-3HA (Torres-Huerta et al., 2016) endógeno purificado de trofozoítos de *Giardia duodenalis* usando el Kit de Thermo Scientific Pierce HA-Tag IP/Co-IP o GdRPA1-His (tesis de maestría Diego A. Martínez Reyes, 2013) purificado de bacteria (usado en lugar de GdDMC1B-3HA en experimentos independientes), 0.5 µg de cada proteína fue resuelto PAGE nativo al 6%, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y bloqueada toda la noche en agitación en TBST con 5% de leche a temperatura ambiente, posteriormente fue incubada con 5 µg de proteína GdRad52-His (para la interacción GdRad52-GdDMC1B) o 1.6 µg de la misma proteína (para la interacción GdRad52-GdRPA1) en PBS 1% de leche descremada por dos hrs a temperatura ambiente y lavado con TBST. La membrana fue incubada con anticuerpo primario anti-His (dilución 1:7000 en TBST para GdRad52-GdDMC1B) o anticuerpo primario anti-GdRad52 (dilución 1:5000 para GdRad52-GdRPA1) por una hr a temperatura ambiente. La membrana fue lavada e incubada con anticuerpo secundario anti-ratón-HRP dilución 1:30000 en TBST con 1% de leche descremada. Finalmente la membrana fue revelada en placas radiográficas.

Para el ensayo complementario de la interacción GdRad52-GdDMC1B, se usó BSA, GdDMC1B-His y GdRad52-His, los cuales fueron tratados como se menciona arriba, usando 5 µg de GdDMC1B-His para incubar la membrana, posteriormente fue incubado con anticuerpo primario anti-GdDMC1B (dilución 1:60).

Adicionalmente, se realizó el ensayo complementario de la interacción GdRad52-GdRPA1, para esto la etiqueta de histidinas fue eliminada de GdRad52-His con la enzima enterocinasa (Sigma) 0.001 unidades por cada 0.5 µg de proteína, esta proteína junto con BSA (control

negativo) y GdRPA1-His (control positivo) fueron transferidas a una membrana fue incubada con proteína 1.6 µg de GdRPA1-His, finalmente incubada con anticuerpo primario anti-His y tratado como se menciona arriba.

ENSAYOS *In vivo*

Cultivos celulares

Los trofozoítos de *Giardia duodenalis*, fueron cultivados en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino fetal al 10% (IN VITRO sa.) y antibiótico/antimicótico (Penicilina (100 u/ml), streptomycin and amfotericina (100 ug/ml each) IN VITRO sa). Los cultivos fueron incubados en tubos cónicos de plástico con tapa de 15 ml a 37°C.

Extracción de RNA y análisis de qRT-PCR

Cultivos confluyente (1×10^7 células) de trofozoitos de *G. duodenalis* fue expuesto a 100 Gry de radiación ionizante (Co-60, Gammabeam 651-PT, ICN-UNAM), las células fueron colectadas por centrifugación a tiempos indicados según los resultados después de la irradiación en tubos de 1.5 ml y lavadas con PBS (NaCl 37 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, and KH₂PO₄ 2 mM at pH 7.4). El RNA total fue extraído con TRIzol® (Invitrogen, USA) agregando 800 µl por cada 10 millones de células, se agitó vigorosamente y se incubó a (TA) temperatura ambiente por 5 min, se agitó por inversión 15 seg y se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente en vortex, y se incubó 15 min a TA, posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C, una vez centrifugado se recuperó la fase acuosa cuidadosamente evitando tomar la fase orgánica, se le agregó 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, se mezcló por inversión e incubó a TA por 10 min, se volvió a centrifugar a 12,000g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó etanol al 75% para lavar la pastilla el cual fue centrifugado nuevamente por 5 min, este procedimiento se repitió una vez más para después secar la pastilla al aire libre, una vez seco se resuspendió en 20 µl de agua DEPC. Para verificar la correcta extracción del RNA se analizó mediante electroforesis de agarosa y posteriormente se cuantificó con espectrofotómetro.

Antes de realizar el ensayo de qRT PCR se verificó por PCR convencional que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA genómico. Para esto se utilizaron las mismas

condiciones antes mencionadas y además se incluyó una muestra con DNA genómico tratado con DNAsa I como templado como control positivo. Para esto se utilizó 1U/ μ g de RNA, se incubó 30 min a 37°C y se adicionó 1 μ l de EDTA 50 mM y se incubó 10 min a 65°C para desnaturalizar a la enzima. Una vez realizado este tratamiento se llevó a cabo nuevamente un ensayo de PCR convencional para verificar la degradación del DNA genómico.

El ensayo de PCR cuantitativo fue realizado utilizando el Kit KAPA SYBR FAST One-step qRT-PCR (KAPA® BIOSYSTEMS KK4650), usando 100 pg de RNA tratado con DNAsa I y oligonucleótidos específicos (GdRad52-qRT-fw, GdRad52-qRT-Rv) y normalizados con la expresión de ubiquitina (Ubi_Fw, Ubi_Rv) como gen endógeno de referencia la reacción se llevó a cabo en un equipo Step One Plus™ de Applied Biosystems. Los datos obtenidos fueron analizados con el software v2.3 usando el método $\Delta\Delta$ Ct comparativo para cuantificación relativa y anova una vía.

Etiquetado de GdRad52 endógeno con HA

Para estudiar la proteína GdRad52 directamente en el parásito se realizó un procedimiento que tiene como finalidad marcar el gen endógeno de manera que pueda utilizarse un anticuerpo para reconocer dicha marca y como consiguiente la proteína de interés.

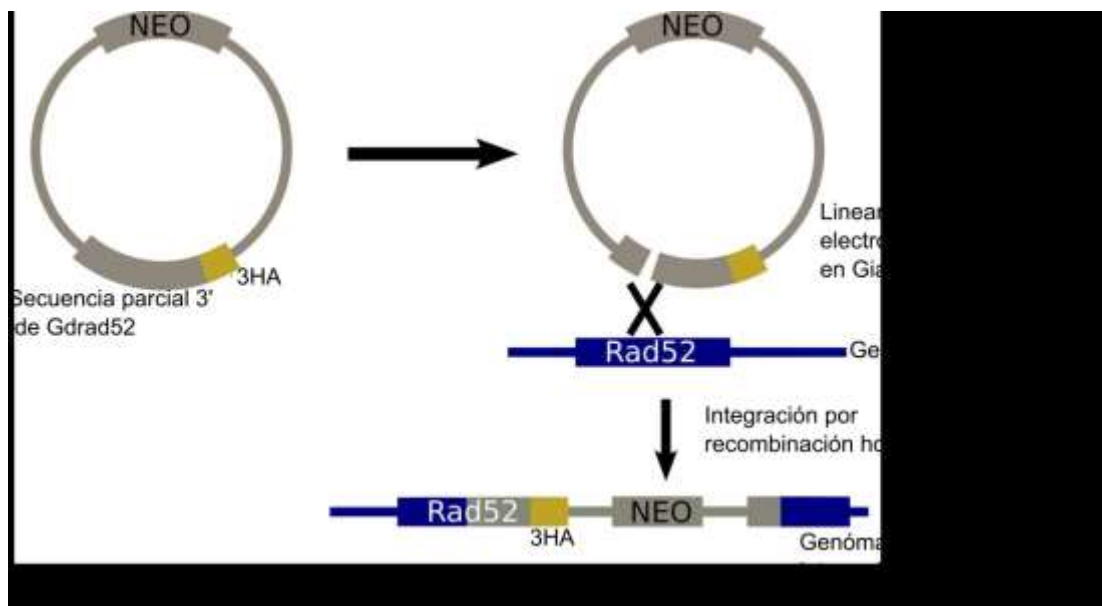


Fig 13.- Esquema de clonación e integración de una etiqueta (3HA) a la proteína endógena rad52 de *Giardia*. En gris se muestra el plásmido con la secuencia parcial 3' del gen de interés, en amarillo la etiqueta que está incluida en el plásmido, después de la linearización y transformación a las células, se muestra en azul la secuencia genómica y en gris y amarillo el plásmido y la etiqueta mostrando la manera correcta de integración.

Los oligonucleótidos GdRad52-Neo-3HA-Fw y GdRad52-Neo-3HA-Rv (con sitios de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción XmaI y XhoI respectivamente) se usaron para amplificar por PCR un fragmento de 880-pb con la enzima Gene Amp High Fidelity con condiciones de 94°C por dos min para desnaturizado del DNA templado, 35 ciclos de 94°C por 15 seg alineamiento de 59°C por 30 seg y amplificado a 72°C por un min y una extensión final a 72°C por 7 min. El fragmento de tamaño esperado fue ligado en un vector transicional comercial pCR 2.1 TOPO (invitrogen) y transformado en células *E. coli* DH5 α químico-competentes y sembrado en placas de medio LB-Ampicilina e incubado a 37°C toda la noche. Las colonias obtenidas fueron caracterizadas por PCR y restricción utilizando diferentes combinaciones de enzimas.

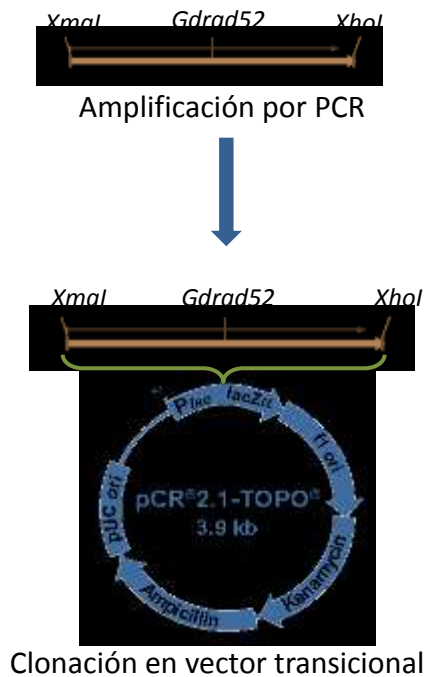


Fig 14.- Esquema del procedimiento de amplificación y clonación de Gdrad52 en el vector transicional.

Una vez obtenida una clona positiva, se realizó una restricción de 2 ug de plásmido utilizando las enzimas XhoI y XmaI para liberar el fragmento clonado. La banda correspondiente al fragmento de interés fue recortada del gel de agarosa, electroeluido por 1:30 hrs a 100 Volts y el DNA resultante fue cuantificado por goteo usando diferentes estándares de DNA como referencia.

El plásmido pcAUK-3HA-NEO fue donado por el doctor Zacheus Cande (University of California at Berkeley, USA) diseñado específicamente para integración en Giardia. Debido a que este plásmido tiene integrado un fragmento de la proteína aurora cinasa, fue necesario eliminar esta secuencia usando las enzimas de restricción XhoI y XmaI, posteriormente el plásmido restante linearizado fue defosforilado para evitar la ligación consigo mismo. El fragmento de GdRad52 liberado de TOPO y el plásmido defosforilado fueron ligados con la enzima ligasa T4 para obtener un producto final pcRAD52-3HA-NEO. La reacción de ligación fue precipitada y transfectada en células E. coli DH5α químico-competentes y sembrado en medio LB-ampicilina, y cultivado en condiciones óptimas. Se obtuvieron clonas candidatas que fueron caracterizadas parcialmente por restricción, PCR. Las clonas positivas fueron confirmadas por secuenciación usando oligonucleótidos localizados en el plásmido (Neo-Seq-Fw y Neo-Seq-Rv) que flanquean el

fragmento clonado. Una vez confirmada la integración correcta del fragmento de interés, este fue linearizado usando una enzima de restricción MfeI que reconoce y corta una región localizada en el inserto linearizando el plásmido. Este plásmido linearizado fue transfectado por electroporación a 10 millones de trofozoitos de *Giardia duodenalis* cepa WB C99, también se electroporaron células con agua en vez de plásmido como control, las condiciones de electroporación fueron: Voltaje: 350 V, Capacitancia: 1000 μ F, Resistencia: 700 Ω , celda de 4 mm, decaimiento exponencial Tc (ms): 98.6. Todas las células electroporadas fueron cultivadas en medio TYI-S-33 suplementado con 20% de suero bovino fetal y antibiótico/antimicótico a 37°C por 24 hrs, pasado este tiempo se agregó 200 μ g/ml de Geneticina (para seleccionar las clonas transfectadas, e incubadas por 8 días realizando un cambio de medio al cuarto día. A este tiempo, todas las células control murieron en presencia de Geneticina a diferencia de aquellas que fueron transfectadas con el plásmido. Estas células se contaron y se hizo la selección clonal diluyendo las células de manera que se tuvo una célula por cada 200 μ l de medio, se sembraron en placas de elisa de 96 pozos (200 μ l/pozo) y se incubaron a 37°C por 5 días en condiciones anaerobias utilizando bolsas de anaerobiosis, a este tiempo, las células que crecieron fueron transferidas a tubos de 4.5 ml y posteriormente a tubos de 15 ml donde se obtuvieron suficientes células para ser caracterizadas.

Caracterización de clonas GdRad52-HA candidatas

Para la caracterización de las clonas, se extrajo DNA genómico de 10 clonas y se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos (Gdrad52-F1B y Rv-Neo-Seq) localizados en sitios específicos que permiten amplificar un fragmento solo si se llevó a cabo la inserción del plásmido de manera deseada, como se muestra en la siguiente figura.



Fig 15.- Diseño esquemático de la integración del plásmido que contiene el fragmento de Gdrad52 con la etiqueta 3HA en el genoma de *Giardia*, marcado en flechas rojas los oligonucleótidos que amplifican únicamente la integración correcta.

Secuenciación del gen endógeno

Una vez identificadas las clonas positivas por PCR, se seleccionaron tres para realizar una secuenciación parcial utilizando el oligo Rv-Neo-Seq y como templado se usó el producto de PCR amplificado con oligos Gdrad52-F1B y Rv-Neo-Seq. Las clonas candidatas fueron seleccionadas para ser secuenciada por completo. Para tal fin se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: GdRad52-F1B, GdRad52-F2, GdRad52-Fw3, GdRad52-Rv3 y Rv-Neo-Seq.

Análisis por western blot de GdRad52-3HA en trofozoítos irradiados.

Cultivos confluentes de 15 ml (16 millones de células) de la clona A12 de trofozoitos de *G. duodenalis* fueron expuestos a 100 Gy de radiación ionizante, las células fueron colectadas por centrifugación a 30 min y una hr post- irradiación en tubos de 1.5 ml y lavadas con PBS, la pastilla celular se lisó con buffer RIPA (Tris pH8 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 0.5% y Triton 1%) al cual se adicionó inhibidor de proteasas complete (Mini EDTA-free, Roche) a 1X y PMSF (Fenilmetanosulfonilfluoruro, SIGMA) a 1 mM, se resuspendió perfectamente y se sonicó (6 pulsos de 10 seg), la muestra se cuantificó por el método de Bradford y se resolvió en SDS-PAGE al 10% cargando 80 µg de proteína total, y usando como control positivo GdMRE11-HA, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrucelulosa y se realizó western blot con las siguientes modificaciones; se utilizó como anticuerpo primario anti-HA producido en ratón (SIGMA) diluido 1:3000 en TBST, se incubó toda la noche (16 hr aproximadamente) en agitación a 4°C después de eso se siguió el procedimiento estándar.

RESULTADOS

Clonación de GdRad52 en vector de expresión pETTOPO

Integridad de los oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos con la secuencia CACC en el extremo 5' de los oligos "forward" para permitir la clonación dirigida en el vector de expresión pETTOPO.

Al recibir los oligonucleótidos se realizó una electroforesis en ge para verificar la integridad de cada oligo, posteriormente se cuantificó y fraccionó en alícuotas de 10 uM para la utilización en ensayos de PCR.

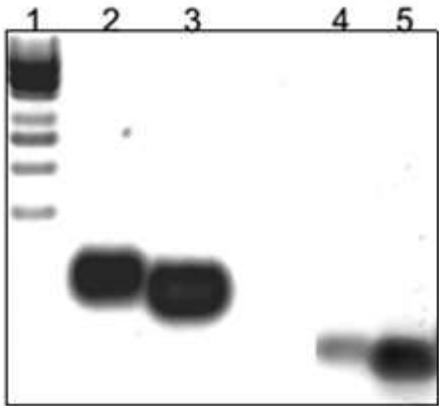


Fig. 16- Electroforesis que muestra la resolución de los oligonucleótidos; 1 marcador de peso molecular de DNA como referencia, 2.- GdRad52- F1B, 3.- Scrad52-F1B, 4.- GdRad52-F1, 5.- GdRad52-R2

PCR

Se realizó un ensayo de PCR utilizando como templado DNA genómico de *Giardia duodenalis*, en la Fig.17 se puede apreciar la amplificación de un fragmento de tamaño esperado para cada par de oligos. Este producto de PCR fue usado para la clonación en el vector de expresión bacteriano.

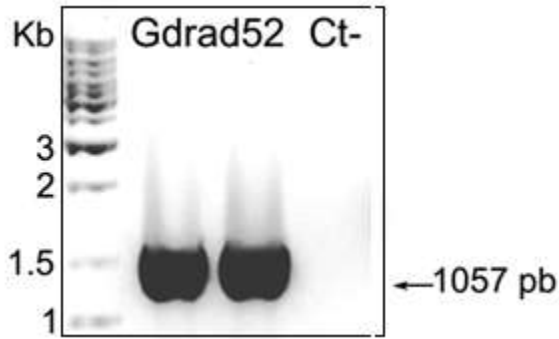


Fig 17.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR que muestran amplificados de tamaño esperado para el gen analizado.

Clonación y caracterización de clonas candidatas

Después de clonar las secuencias Rad52 en el vector de expresión y transformado en bacterias competentes se obtuvieron clonas candidatas y se analizaron por PCR y restricción enzimática. El producto de PCR fue resuelto en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y revelado con un fotodocumentador. Se observan amplificados del tamaño esperado para Gdras52 (1057 pb) solo para las clonas 4, 7 y 14 (fig. 18). Para la caracterización por restricción se utilizaron las clonas 4, 7, 14 y 15.

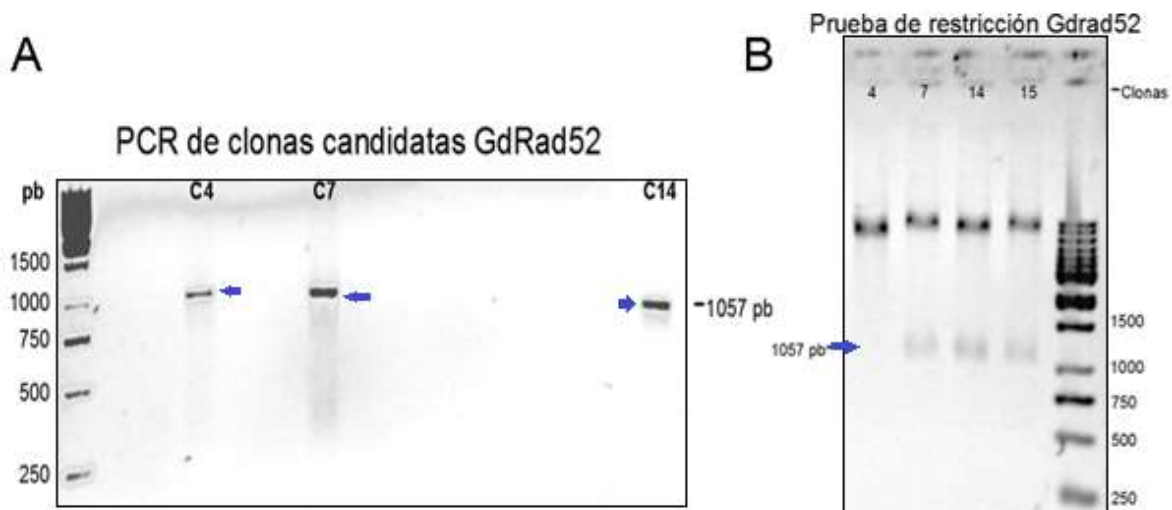


Fig 18.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% del análisis de productos de PCR y restricción de clonas candidatas de GdRad52; (A) amplificados positivos en las clonas 4, 7 y 14; en (B) liberación de fragmentos de tamaño esperado en las clonas 7, 14 y 15.

Secuenciación de clonas candidatas

De las 4 clonas secuenciadas (4, 6 14 y 15), dos de ellas resultaron estar en marco con el sitio de inicio de la transcripción del plásmido y por lo tanto en marco con la secuencia de histidinas que se traduce en el extremo N terminal del producto proteico. En la figura se encuentra marcada con recuadros azules los sitios de inicio de la traducción, subrayado en verde la secuencia de 6 histidinas, en rojo el sitio de reconocimiento y corte de la enzima enterocinasa y en recuadros rosa el sitio CACC donde el producto de PCR se aparea con la secuencia complementaria del vector, todos estos sitios importantes en la secuenciación coinciden con la secuencia de referencia del vector. De esta manera se obtuvieron dos clonas (C14 y C15) que fueron correctas para la inducción de la expresión de las proteínas codificadas.

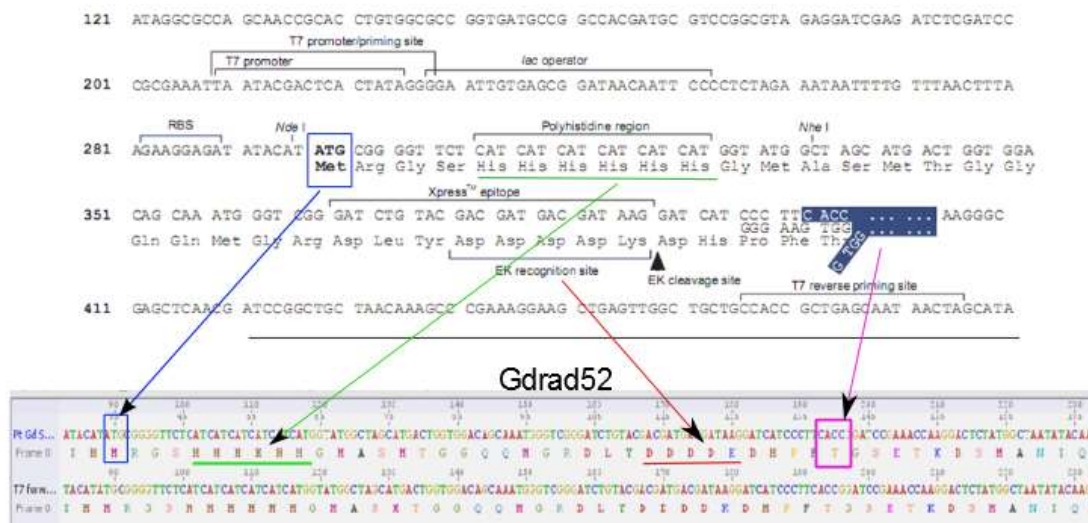


Fig. 19.- Fragmento 5' de las secuenciaciones de dos clonas del gen GdRad52, se puede identificar desde el sitio de inicio de la traducción en recuadros azules, hasta el sitio de inserción del producto de PCR así como la secuencia donde inicia propiamente la proteína.

Expresión de la proteína recombinante.

Se realizó una curva de expresión de la proteína GdRad52 dependiente del tiempo y de la concentración de IPTG. Los resultados obtenidos se observan en la figura 20A y B, en la cual hay un claro aumento en el tamaño de la banda correspondiente a cada proteína a partir de las dos hrs de inducción de la expresión permaneciendo hasta las 6 hrs post inducción, adicionalmente, la concentración de IPTG no causó gran diferencia en el nivel de expresión de las proteínas. Tomando en cuenta esta observación se utilizó 0.5 mM de IPTG para inducir la expresión de las proteínas recombinantes por dos hrs de incubación. Este tiempo fue establecido ya que en la curva de expresión GdRad52 a las dos hrs hay una expresión significativa y se observa una sola banda en el western blot, la presencia de bandas adicionales en los tiempos consiguientes podría indicar degradación de la proteína. Interesantemente se observa que las dos clonas de cada proteína se expresan de la misma manera.

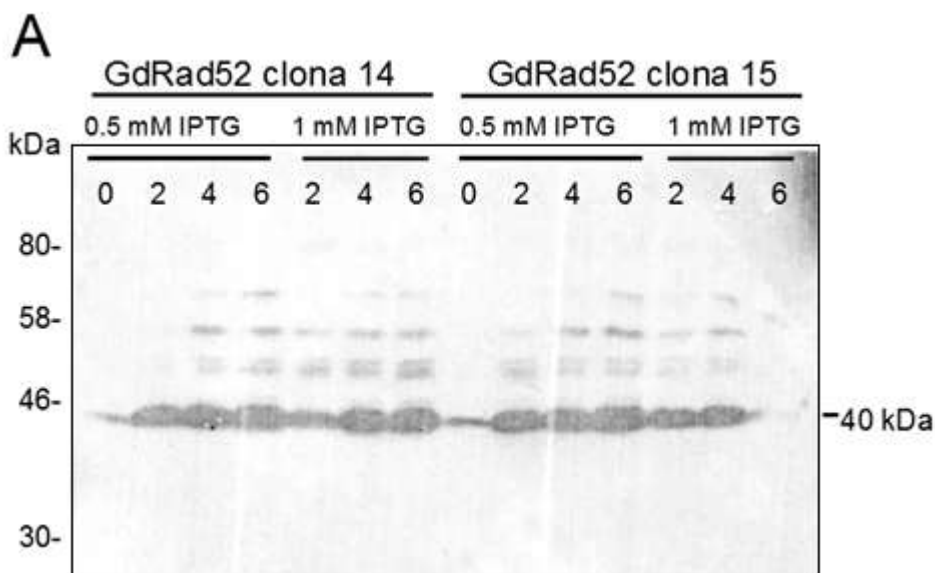


Fig 20. Curva de inducción de la expresión de la proteína recombinante GdRad52 (A) dependiente de tiempo y concentración de IPTG, observándose una banda de tamaño esperado para la proteína.

Solubilidad de la proteína

La prueba de solubilidad de las proteínas recombinantes se realizó con las dos clonas candidatas del gen en el cual resultaron encontrarse en mayor proporción en la fracción soluble de la extracción, como se muestra en la figura 21 obteniéndose una banda de mayor tamaño en dichas fracciones. A partir de este punto se eligió trabajar con la clona 6 para expresar GdRad52.

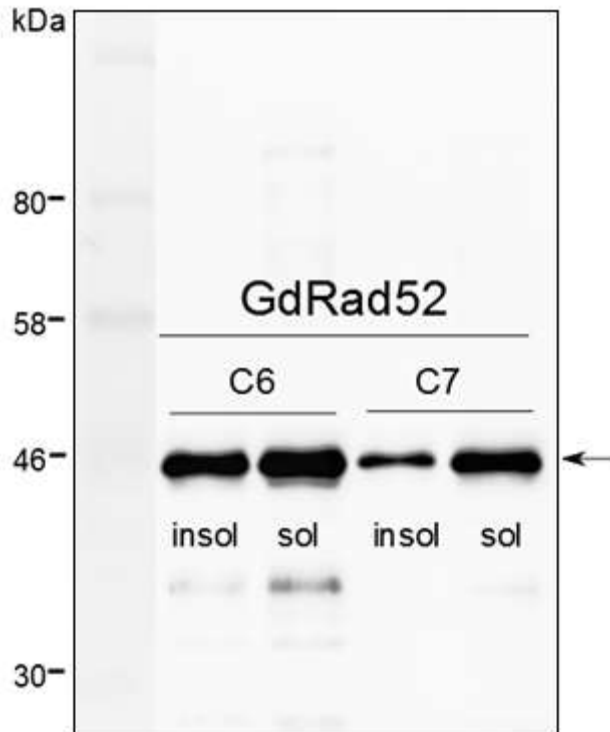


Fig. 21.- Western blot de la prueba de solubilidad de la proteína recombinante observándose una única banda a la altura del marcador correspondiente a 40 kDa, dicha banda se aprecia significativamente mayor en las fracciones solubles de ambas clonas.

Purificación de las proteínas recombinantes

Para los ensayos de actividad bioquímica *in vitro* se decidió utilizar solo GdRad52 y GdRPA1, ya que GdRad51 ya se había o estaba en proceso de caracterización, por lo cual estas proteínas fueron purificadas utilizando diferentes resinas de afinidad, iniciando con las perlas de agarosa-níquel, las cuales tienen unida covalentemente iones de Ni^{2+} , estos iones tienen alta afinidad de unión no covalente a las colas de histidina que tienen integradas las proteínas recombinantes, de esta manera al unirse se inmovilizan y finalmente se eluyen con un aumento de la concentración de imidazole, una molécula competidora por el ion níquel. Las resinas Mono S son partículas esféricas hidrofílicas de intercambio aniónico fuerte debido a su grupo funcional ácido sulfónico. Las perlas de Micro-HAP (hidroxiapatita) tiene grupos funcionales que comprende pares de cristales de iones de calcio cargados positivamente y grupos de 6 átomos de oxígeno cargados negativamente asociados con tripletes de cristales de fosfato así como más grupos fosfato

distribuidos en la superficie, de esta manera los grupos amino de las proteínas son atraídos por los grupos fosfato y los carboxilos por los iones de calcio. Source Q es una matriz PEEK (polyetheretherketone) en forma de perlas hidrofílicas, es un fuerte intercambiador aniónico. Las perlas Source S tienen las mismas características que Source Q excepto que son fuertes intercambiadores catiónicos. Q sefarosa es un intercambiador aniónico fuerte. Todas estas columnas fueron utilizadas, en el orden que se muestra en la figura 22 para la purificación de GdRad52 y figura 23 para la purificación de GdRPA1, para mejorar el rendimiento y pureza de las proteínas. Como se puede apreciar, en el gel de la última purificación respectivamente, se logra obtener una sola banda del tamaño esperado que demuestra la pureza de la proteína en cuestión. Después de la concentración de cada una de las proteínas se cuantificó cada una por densidad en gel utilizando BSA de concentración conocida como referencia.

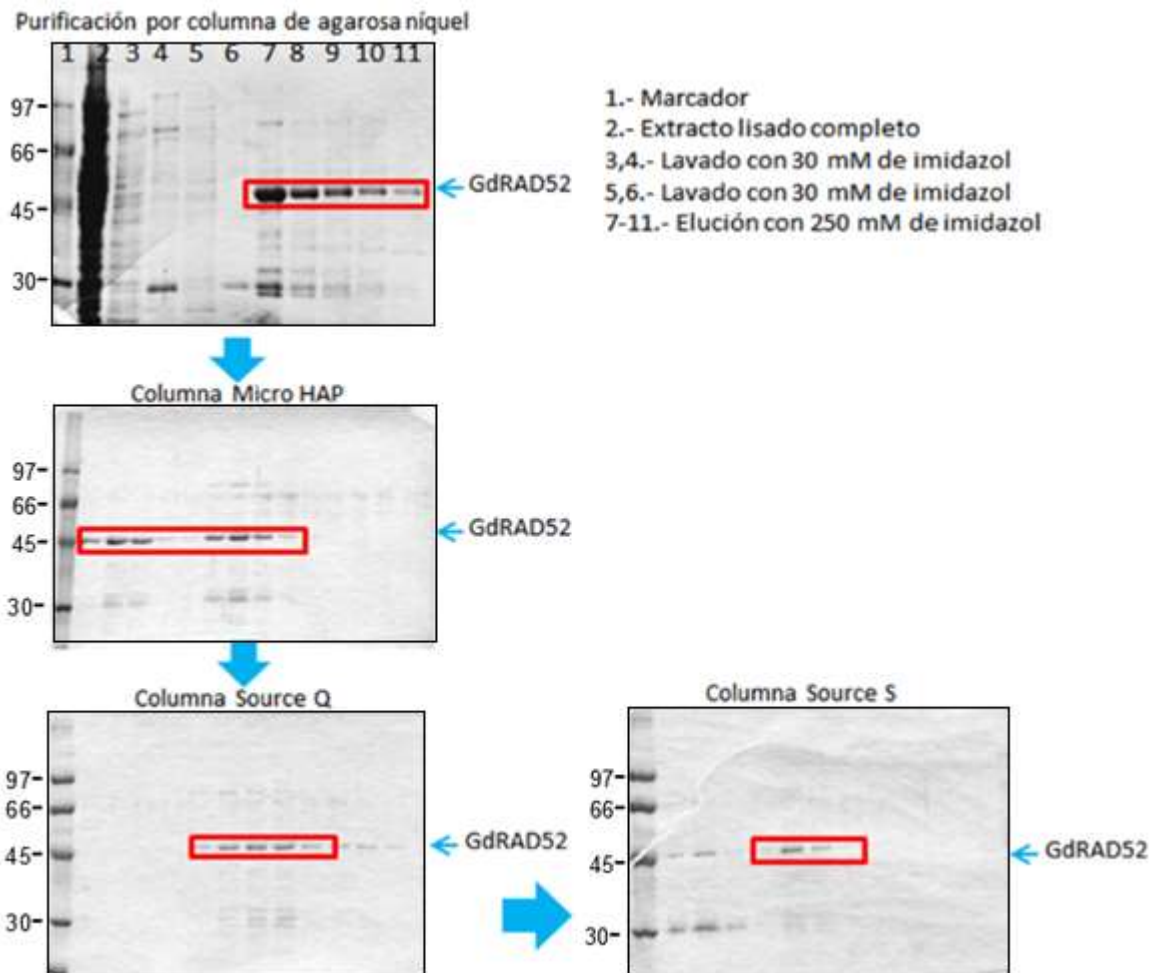


Fig 22.- Proceso de purificación de la proteína GdRad52 utilizando diferentes resinas de afinidad, inicialmente se realizó la purificación haciendo pasar el extracto clarificado por una columna de agarosa-niquel, el eluido se hizo pasar por una columna con resina Micro-HAP, el producto se aplicó a una columna de resina Source Q y el eluido finalmente se hizo pasar por la columna Source S, este eluido final fue concentrado con columnas centricon.

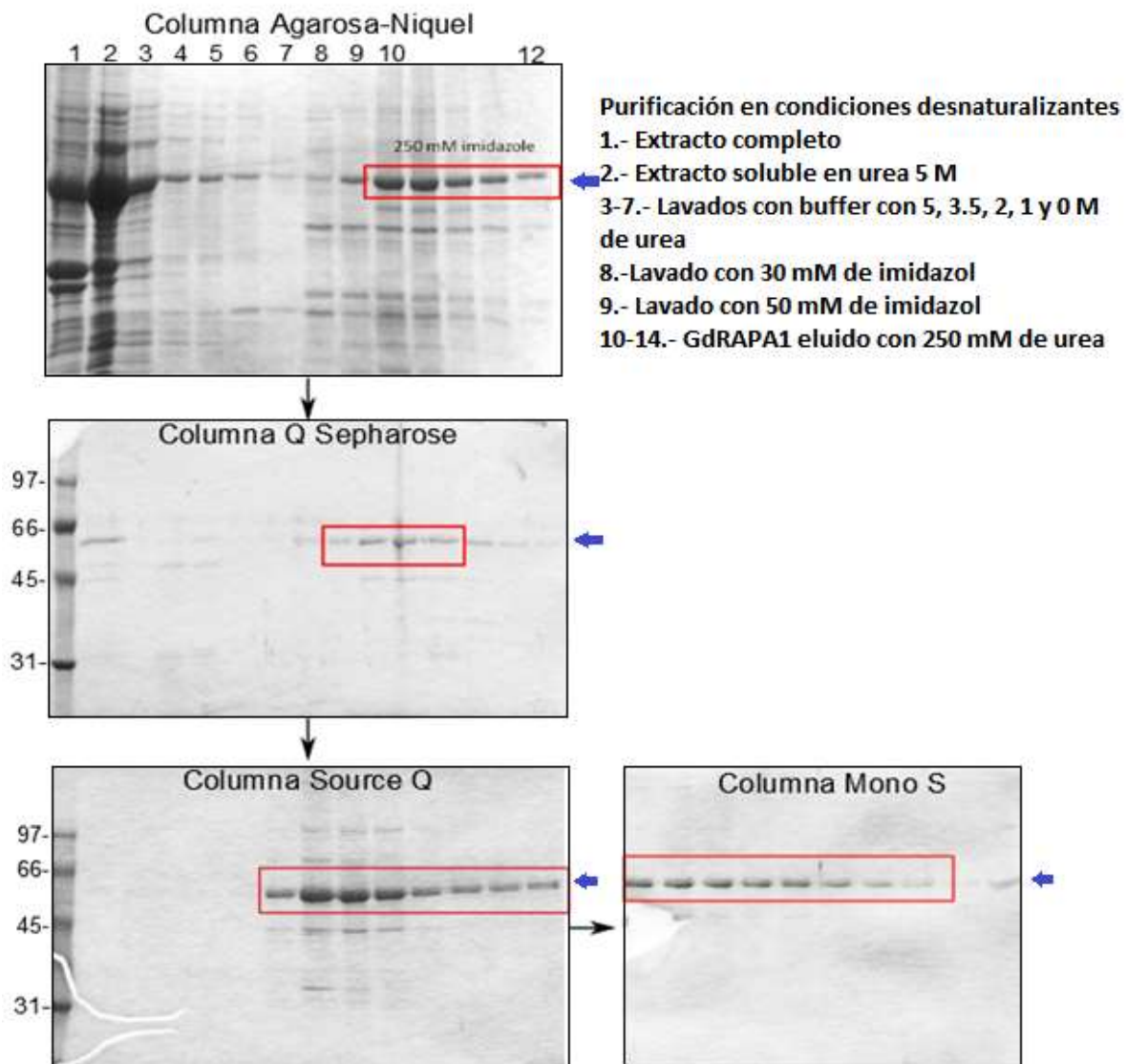


Fig 23.- Proceso de purificación de la proteína GdRPA1, que involucra el uso de 4 columnas de diferentes resinas, en cada uno se muestra en recuadro rojo la proteína de interés.

CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE GdRad52

GdRad52 posee la actividad de unión a DNA

La actividad de unión a DNA se sabe que reside en el extremo N terminal y C terminal de la proteína, sin embargo, como se muestra en la figura de alineamiento con ScRad52, esta secuencia putativa que posee *Giardia* solo tiene uno de estos dominios de unión a DNA, el N terminal. Para evaluar la propiedad de unión a DNA de esta región se realizaron ensayos tipo EMSA. En la figura 24A se muestran los resultados obtenidos de GdRad52 unido a ssDNA, en el cual se usó 10 nM de oligo PSLO2041 de 83 nucleotidos marcado radiactivamente y 0, 6, 12, 24 y 50 nM de proteína, en el último carril se agregó a la reacción final además de 50 mM de proteína, SDS y proteinasa K (PK) como control para asegurar que el retardamiento se deba a la proteína y no a alguna condición del gel. En la figura 24B se realizó el experimento con las mismas concentraciones de proteína y como sustrato de utilizó oligo dsDNA (PSLO2041 marcado radiactivamente apareado con su complementario). Además se realizó un ensayo agregando ambos sustratos para verificar la preferencia de la proteína. Como se aprecia en cada gel, hay un retardamiento del DNA marcado radiactivamente que aumenta de intensidad al aumentar la concentración de proteína, GdRad52 se une a la cadena sencilla a una concentración de alrededor de 10 nM y llega a una saturación a los 50 nM mientras que su afinidad por cadena doble es aproximadamente 5 veces menor, a 50 nM de proteína se une solo al 20 % del sustrato, esto se observa claramente en el ensayo de competencia en 24C, dichos resultados se ven de manera gráfica en la figura 24D.

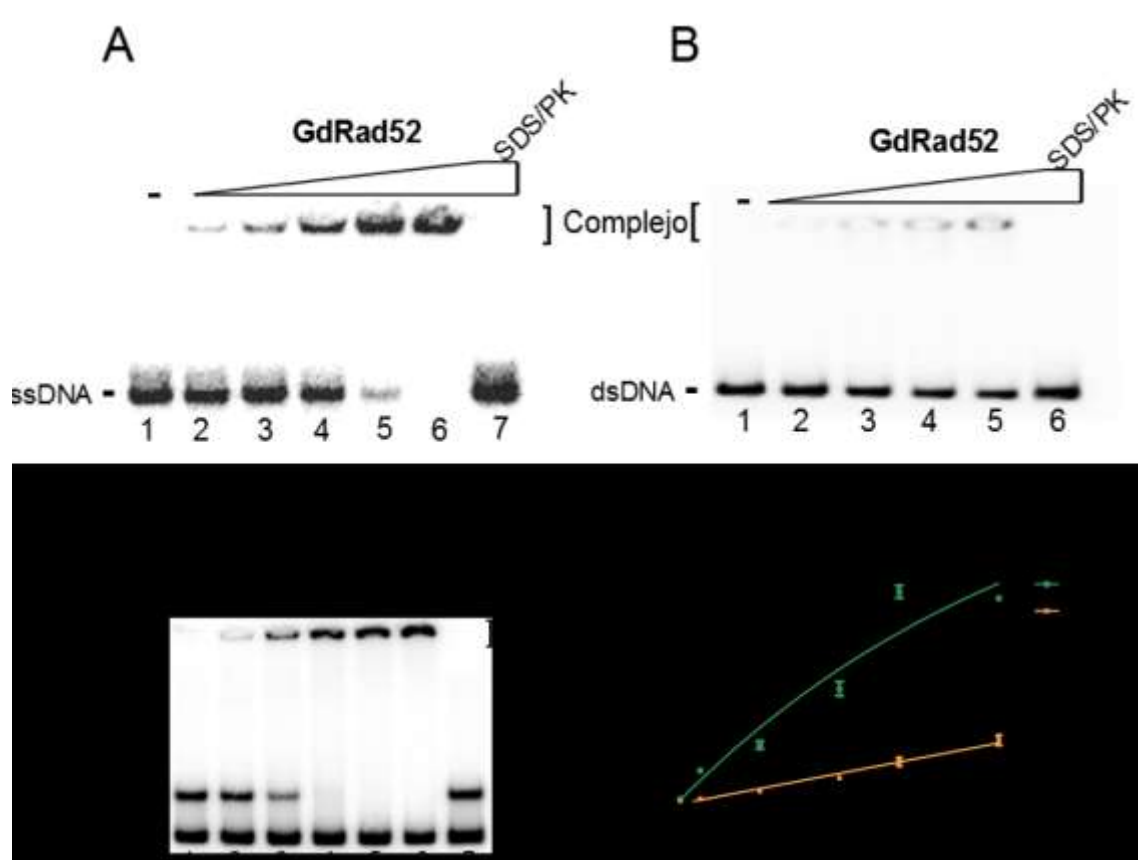


Fig. 24.- Ensayo de retardamiento que muestra en A, la unión de GdRad52 a DNA de cadena sencilla dependiente de la concentración de proteína, en B se muestra el mismo ensayo usando DNA de cadena doble, en C el ensayo de competencia por ambos sustratos de DNA, en D se representan los resultados de C.

GdRPA1 se une a DNA de cadena sencilla

RPA es un complejo heterotrimerico conformado por RPA1, RPA2 y RPA3 cuya función es unirse a DNA de cadena sencilla de manera promiscua. En el genoma de *Giardia duodenalis* se encuentra codificada la secuencia para RPA1, las dos otras subunidades no fueron localizadas a partir de análisis de homología de secuencias realizadas *in silico*. GdRPA1 fue clonada y expresada de manera heterologa previamente (Martinez Reyes, tesis de maestría, 2013). Para este trabajo, GdRPA1 fue purificada y analizada por EMSA, como se observa en la figura 25A, esta proteína tiene alta afinidad a ssDNA, observándose la formación de un complejo DNA proteína desde 3 nM de concentración que fue la concentración más baja utilizada, llegando a una saturación a los 48 nM de RPA1. Interesantemente esta proteína de *Giardia* no tiene afinidad

alguna por DNA de cadena doble como se muestra en la fig 25B, lo mismo se puede apreciar en el ensayo de competencia (25C) donde toda la proteína se une a la cadena sencilla y no a la cadena doble. Estos resultados se aprecian claramente en la gráfica de la figura 25D.

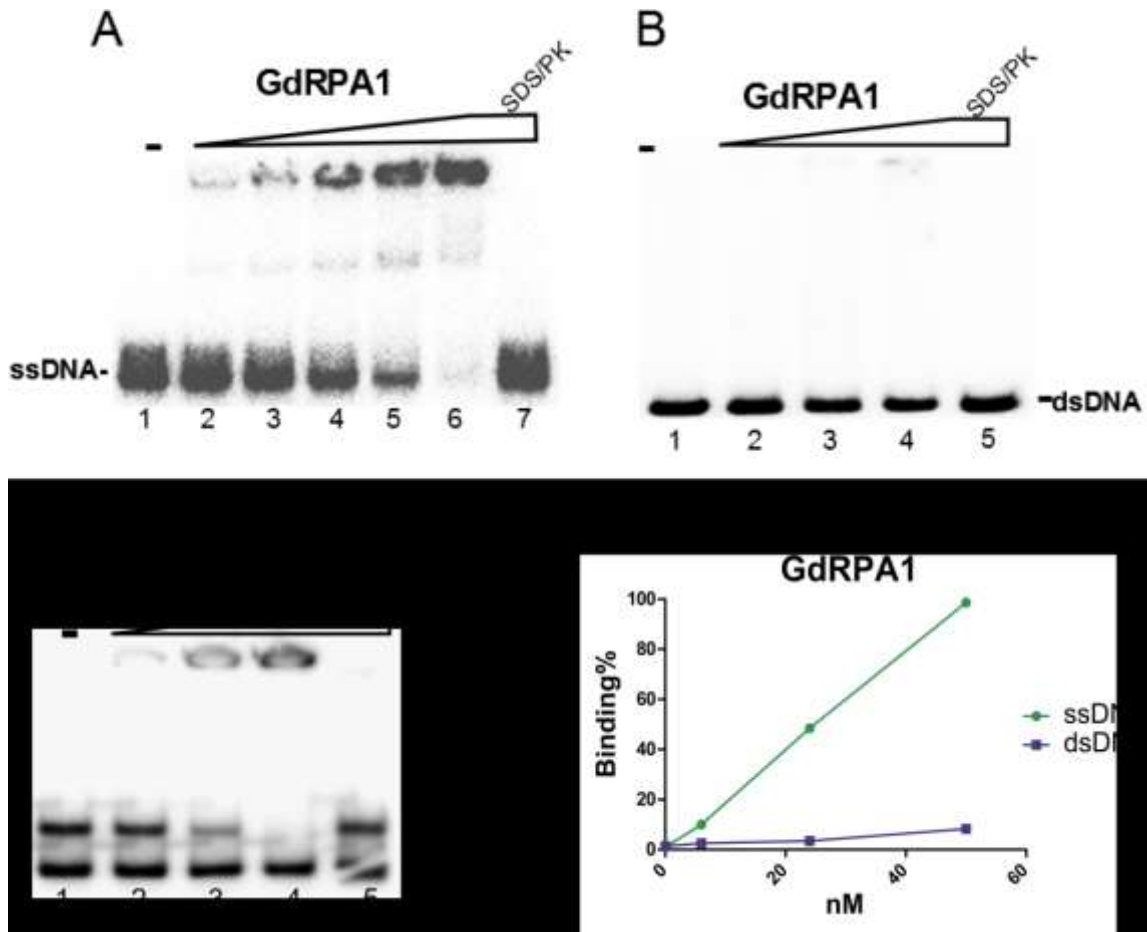


Fig 25.- Ensayo de retardamiento que muestra en A, la unión de GdRPA1 a DNA de cadena sencilla dependiente de la concentración de proteína, en B se muestra el mismo ensayo usando DNA de cadena doble, en C el ensayo de competencia por ambos sustratos de DNA, en D se representan los resultados de A y B.

Rad52 de *Giardia* promueve el alineamiento de DNA complementario.

Se analizó la actividad de alineamiento de DNA complementario usando oligonucleótidos complementarios en ausencia de proteína, el cual muestra un incremento lento de la formación de DNA de doble cadena con respecto al tiempo (Fig 26A). Cuando se incubó GdRad52 con el oligonucleótido marcado radiactivamente y después se agregó el oligonucleótido complementario

se observó una inmediata formación de la doble cadena como se muestra en la figura 26B, esta reacción es altamente eficiente ya que desde 3 nM de concentración de la proteína, esta es capaz de alinear casi todo el sustrato y con 24 nM el 80% del DNA fue alineado en un minuto. De esta manera el alineamiento de DNA complementario fue muy rápido llegando al 100% de alineamiento en 4 min (Fig 26C).

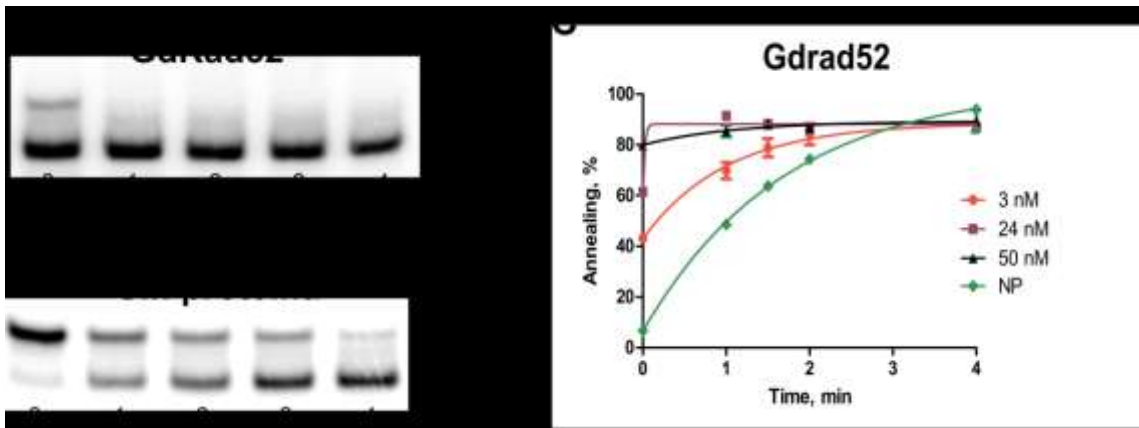


Fig 26.- Alineamiento de DNA complementario; A) ensayo realizado con 24 nM de GdRad52 con respecto al tiempo, la formación de cadena doble se da de manera muy rápida. B) ensayo realizado sin proteína con respecto al tiempo.

GdRad52 puede mediar el alineamiento inhibido por GdRPA1.

El alineamiento de DNA complementario llevado a cabo en la célula, usualmente es inhibido por RPA que al unirse a las cadenas sencillas evita el alineamiento espontaneo de manera que para que esto se logre se requiere de Rad52 que estimula este proceso. Al incubar ambas cadenas complementarias de DNA con GdRPA1 (150 nM) y después de mezclarlas no se obtiene formación de doble cadena (Fig. 27A) indicando que GdRPA1 inhibe el alineamiento espontáneo, en contraste, cuando a esta reacción se agregó GdRad52 la formación de la doble cadena se observó a los 15 min de reacción, mostrando que GdRad52 promueve el alineamiento aun cuando el DNA está cubierta de GdRPA1 (Fig 27B). Además, se muestra que la tasa de alineamiento de DNA cubierto por GdRPA1 llevado a cabo por GdRad52 fue significativamente mayor que la tasa de alineamiento espontaneo pero menor que el alineamiento promovido por GdRad52 con DNA libre (Fig 27C).

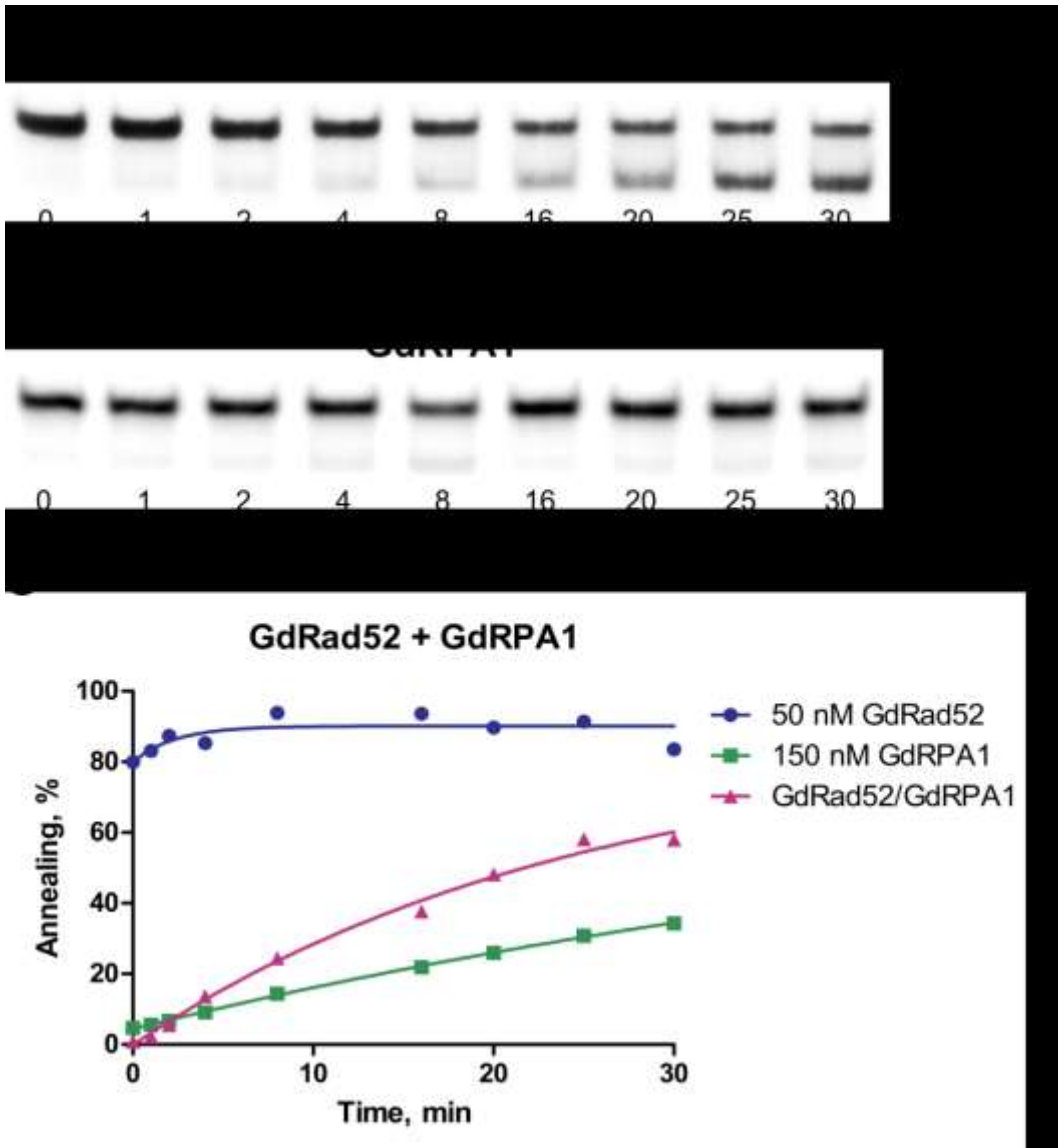


Fig 27.- Ensayo de alineamiento de DNA complementario llevado a cabo por GdRad52 en presencia de la inhibición de GdRPA1 (A), en presencia solo de RPA1 que inhibe el alineamiento espontáneo (B) y en (C) se muestra la gráfica de las figuras A y B.

GdRad52 forma estructuras oligoméricas.

Rad52 es una proteína que en su forma activa forma estructuras oligoméricas en forma de anillo que varían de número de monómeros (se han observado de 7 a 11). Para verificar si GdRad52 también formaba estas estructuras, se obtuvieron micrografías electrónicas de GdRad52 que muestran estructuras oligoméricas en forma de anillo con un diámetro de 101 nM. En la figura 28A

se observan varios anillos en todo el campo, importantemente estas estructuras se forman de manera espontánea y no necesitan la presencia de DNA. Además se observan agregados que parecen ser de varios anillos. Una magnificación de la imagen en el panel inferior, muestra anillos específicos en mayor detalle. En la figura 28 panel superior izquierdo se muestra un modelamiento tridimensional de las secuencias proteicas del dominio de unión a DNA de HsRad52 como referencia (púrpura) y GdRad52 (verde), como se observa además de conservar la secuencia aminoacídica también las estructuras secundarias y terciarias son similares, lo cual predice que se organizan de manera similar para formar homo-oligómeros y de esta manera facilitar la unión del DNA alrededor del anillo (panel inferior izquierdo de la Fig 28).

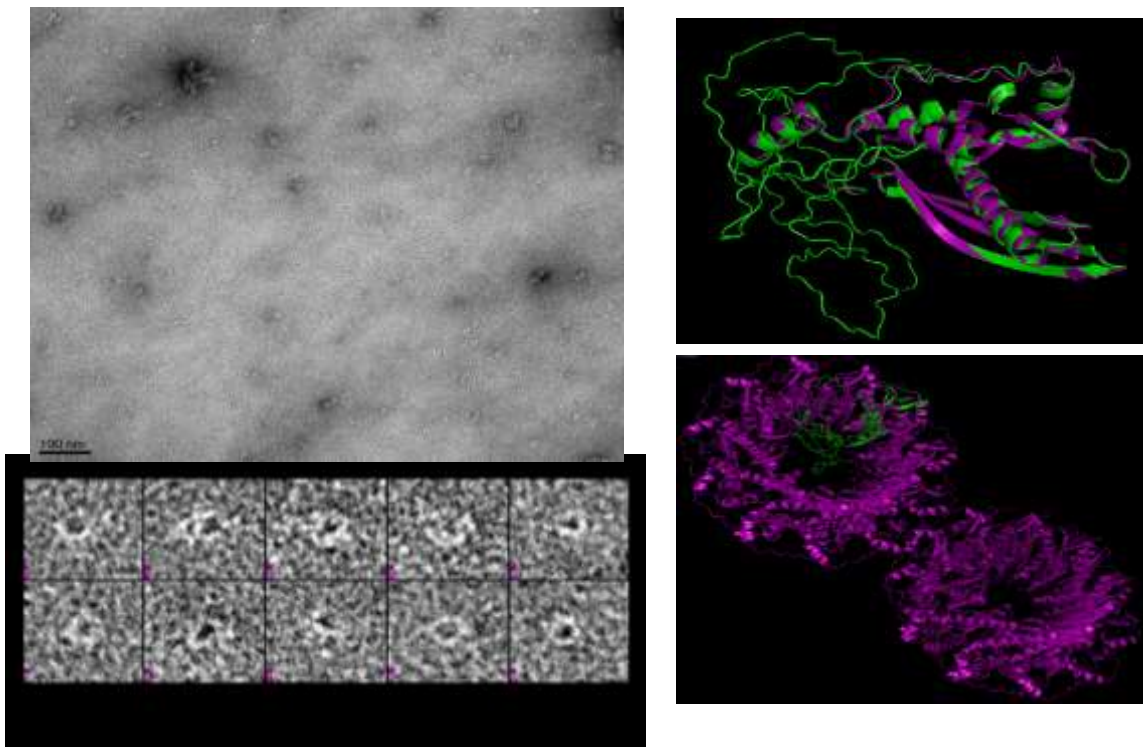


Fig.28.- GdRad52 forma estructuras oligoméricas. En el panel superior izquierdo de la figura se muestran múltiples anillos distribuidos en todo el campo en el panel inferior izquierdo una amplificación de algunos anillos que muestran a mayor detalle la estructura. En el panel derecho se muestra un modelado tridimensional del dominio de unión a DNA de GdRad52 (verde) obtenido a partir de la secuencia de unión a DNA cristalizada de HsRad52 (violeta), en el panel superior una superposición de las estructuras de una subunidad, en el panel inferior se muestra la estructura oligomérica.

Producción de anticuerpo policlonal anti-GdRad52.

Los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con proteína recombinante de origen bacteriano GdRad52 fueron puestos a prueba para verificar su reconocimiento a la proteína tanto recombinante como la del parásito. Para esto ambos extractos fueron resueltos en un gel de poliacrilamida y luego transferidos a membranas de nitrocelulosa, la membrana (figura 29A) fue incubada con el suero preinmune a las diluciones indicadas, en ninguno de los casos se reconoció la proteína de interés, esto demuestra que en el suero no hay ningún anticuerpo que pueda reconocer a dichas proteínas previo a la inoculación. En la figura 29B la membrana se incubó con el suero inmune en diferentes diluciones, en este se observa el reconocimiento solo de la proteína recombinante y no así a la proteína del parásito, además se observa señal de la proteína recombinante hasta dilución 1:1000 del suero inmune.

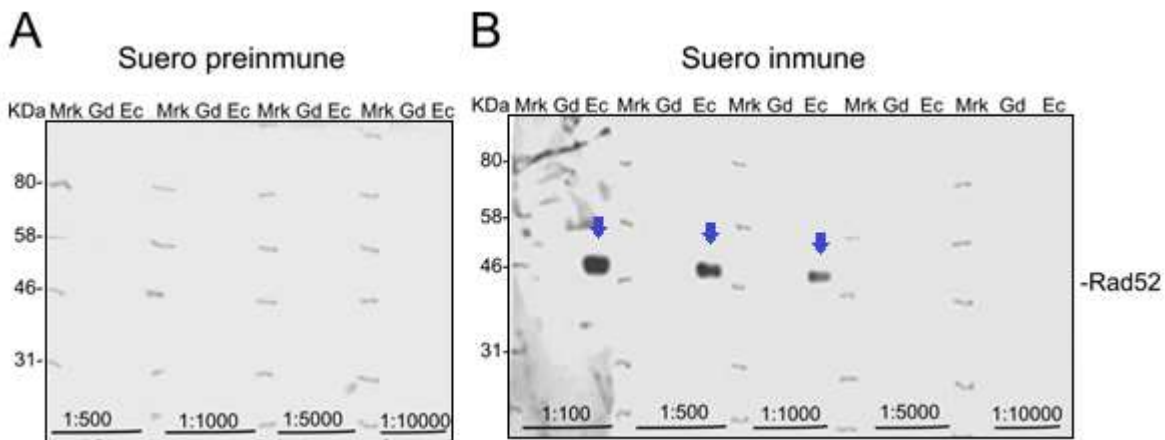


Fig 29.- Ensayo de western blot para reconocer la proteína GdRad52 recombinante y extracto total de *Giardia* incubados con el suero que contiene anti-Rad52 generado en ratón. En A la membrana fue incubada con suero preinmune en diferentes diluciones que van de 1:500 a 1:10000 y en B con suero inmune en diluciones de 1:100 a 1:10000.

Interacción de GdRad52 con GdRPA1 y con GdDMC1B

Para que se realice el intercambio de cadena homóloga en el proceso de reparación del DNA por recombinación homóloga, es necesario que Rad52 interaccione directamente con varias proteínas, especialmente con RPA y Rad51, para probar si GdRad52 también puede hacer lo mismo, se

realizó un ensayo de “far western”. En el que se observa que en condiciones de PAGE nativo GdRad52 interactúa con GdRPA1 (Fig.30) y también con GdDMC1B (Fig. 31)

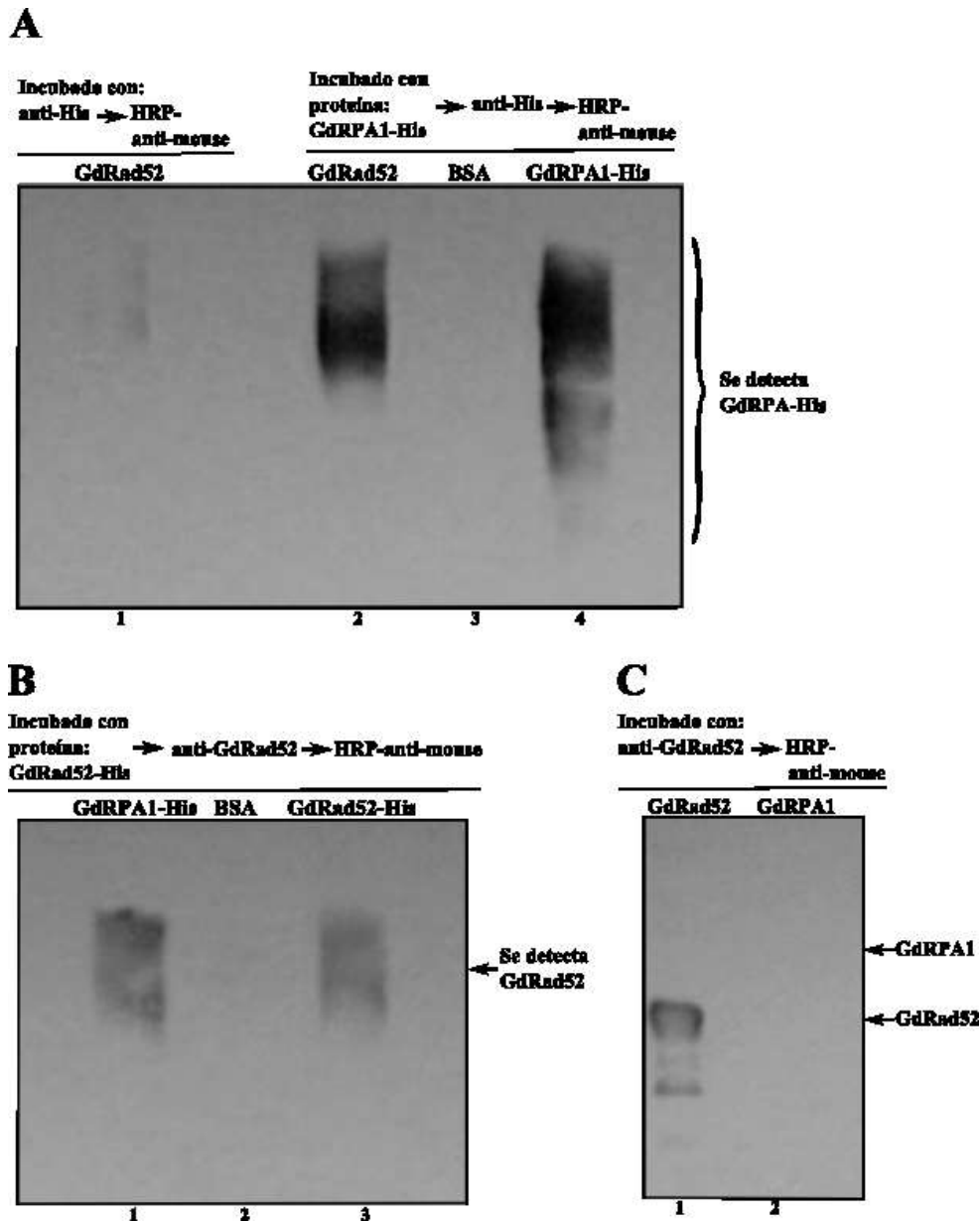


Fig. 30.- Ensayo de Far western. A) línea 1 control de anticuerpo anti-His; membrana transferida con proteína GdRad52 (etiqueta de histidina eliminada) incubada con anticuerpo primario anti-His (el anticuerpo no detecta a la proteína). La membrana transferida con GdRad52 (etiqueta de histidina eliminada línea 2), BSA como control negativo (línea 3) y GdRPA1-His como control positivo (línea 4) fue incubada con proteína GdRPA-His purificada, luego con anticuerpo primario anti-His y después con anticuerpo secundario. B) la membrana transferida con GdRPA1-His (línea

1) BSA como control negativo (línea 2) y GdRad52-His como control positivo (línea 3) fue incubada con proteína GdRad52-His purificada, luego con anticuerpo primario anti-GdRad52 y finalmente con anticuerpo secundario. C) control del anticuerpo anti-GdRad52; la membrana que contiene GdRad52-His (línea 1) y GdRPA1-His (línea 2) fue incubada con anticuerpo anti-GdRad52 y después de la incubación con anticuerpo secundario, solo se ve la señal de GdRad52, es decir el anticuerpo primario no detecta GdRPA1.

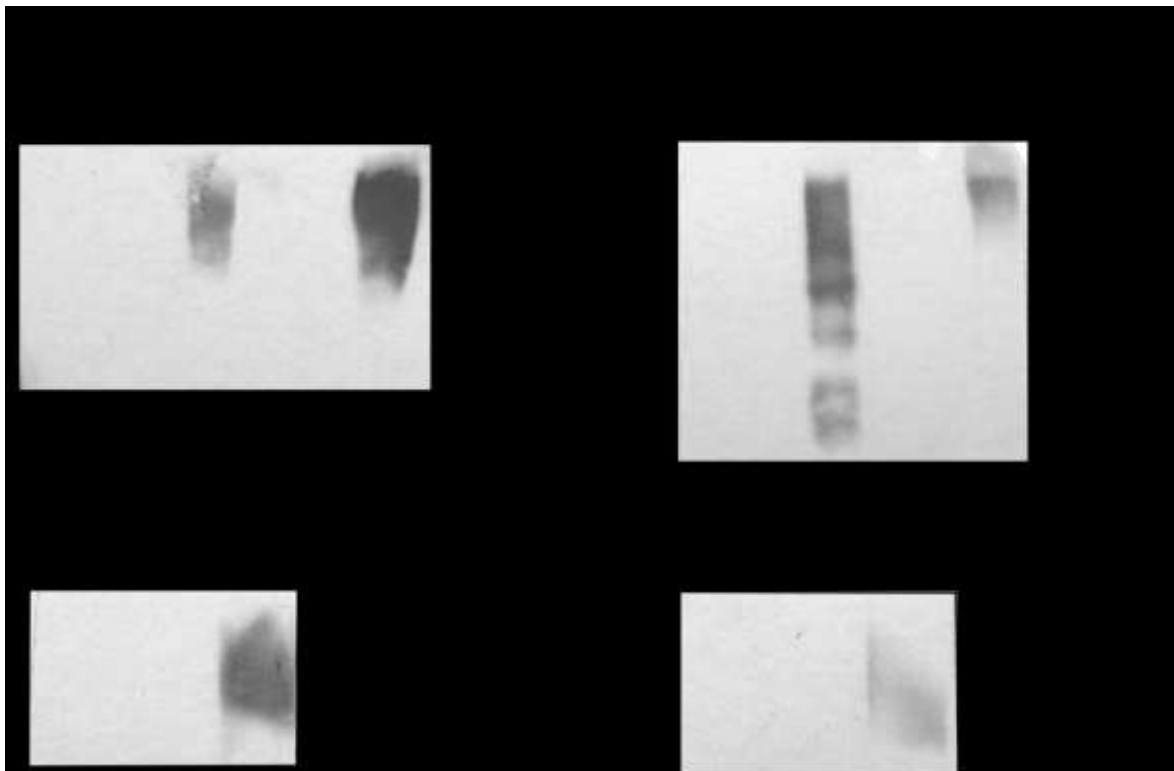


Fig. 31.- Ensayo de Far western. A) membranas transferidas con proteínas purificadas, BSA como control negativo, GdDMC1B-HA y GdRad52-His, fueron incubadas con proteína GdRad52 purificada, posteriormente lavada e incubada con anticuerpo anti His para detectar Rad52. B) membranas transferidas con proteínas purificadas, BSA como control negativo, GdDMC1B-His y GdRad52-His, fueron incubadas con proteína GdDMC1B-His purificada, posteriormente lavada e incubada con anticuerpo anti-GdDMC1B para detectar la proteína. C) control de anticuerpo anti-His que solo detecta proteínas etiquetadas con Histidinas. D) control de anticuerpo anti-GdDMC1B que solo detecta a GdDMC1B.

CARACTERIZACIÓN *in vivo* DE GdRad52

Etiquetado del gen endógeno rad52 de *Giardia duodenalis*

Debido a que no se obtuvo reconocimiento de la proteína GdRad52 endógena de *Giardia* con el anticuerpo policlonal generado en ratón se decidió llevar a cabo un procedimiento que tiene como finalidad etiquetar a la proteína endógena con tres secuencias de hemaglutinina y de esta manera identificarla con un anticuerpo anti-HA, para esto se diseñaron oligonucleótidos que amplifican una secuencia de aproximadamente 800-pb (Fig 32) este fragmento fue clonado en un vector de tránsito, y de la transformación se obtuvieron clonas candidatas que fueron caracterizadas por PCR (Fig 33A) en el que se observa únicamente la clona 15 como candidata positiva, esta clona fue verificada por restricción parcial (Fig 33B) usando combinación de varias enzimas como se muestra en la figura se obtuvieron fragmentos de tamaño esperado.

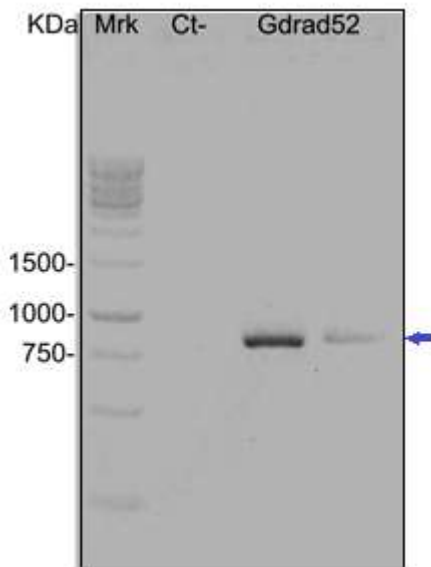


Fig 32.- PCR de un fragmento de GdRad52 para la posterior etiquetación.

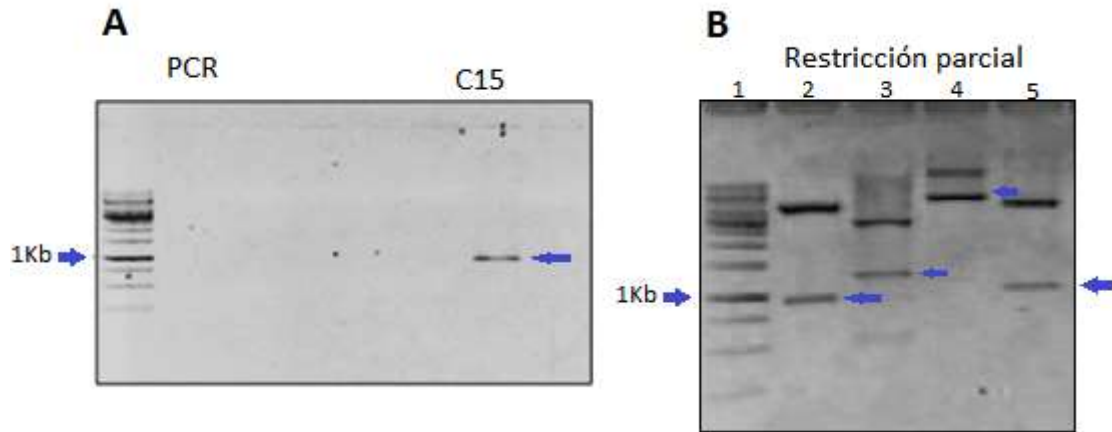


Fig 33.- Caracterización parcial de la clonación en el vector de transición del gen Gdrad52, en A se muestra un resultado de PCR de clonas candidatas en el cual se observa una amplificación del tamaño esperado en la clona 15, esta clona fue sujeta a restricción con diferentes enzimas. En B línea 1 el marcador de peso molecular, línea 2; restricción EcoRI que libera un fragmento de tamaño esperado (marcado con flecha), línea 3; restricción con EcoRI y PstI libera el fragmento anterior más un fragmento de mayor tamaño, línea 4; restricción con enzima XhoI lineariza el plásmido; línea 5; se usaron enzimas XhoI y XmaI, con estas se libera el fragmento deseado.

Una vez caracterizada la clona candidata, se realizó una restricción de 2 µg de plásmido TOPO-GdRad52 usando las enzimas XmaI y XhoI para liberar el fragmento de interés. El fragmento liberado fue ligado al plásmido pNEO-3HA previamente restringido con las mismas enzimas XmaI y XhoI, la reacción de ligación fue transformado el células *E. coli* DH5α, de las cuales se obtuvieron candidatas que fueron caracterizadas por PCR (Fig. 34B). en este gel, se observa que se obtuvieron las clonas 3, 6, 8 y 10 como positivas, estas 4 clonas fueron sujetas a restricción con enzimas XmaI y EcoRI (Fig. 34C) los cuales liberan un fragmento de aproximadamente 1 Kb esperado, usando la enzima PstI el cual libera un fragmento también de aproximadamente 1 Kb esperado (Fig. 34D), cabe mencionar que se liberan los fragmentos en C y D solo si la clonación fue obtenida en el sentido correcto, esto se puede apreciar mediante el esquema en A.

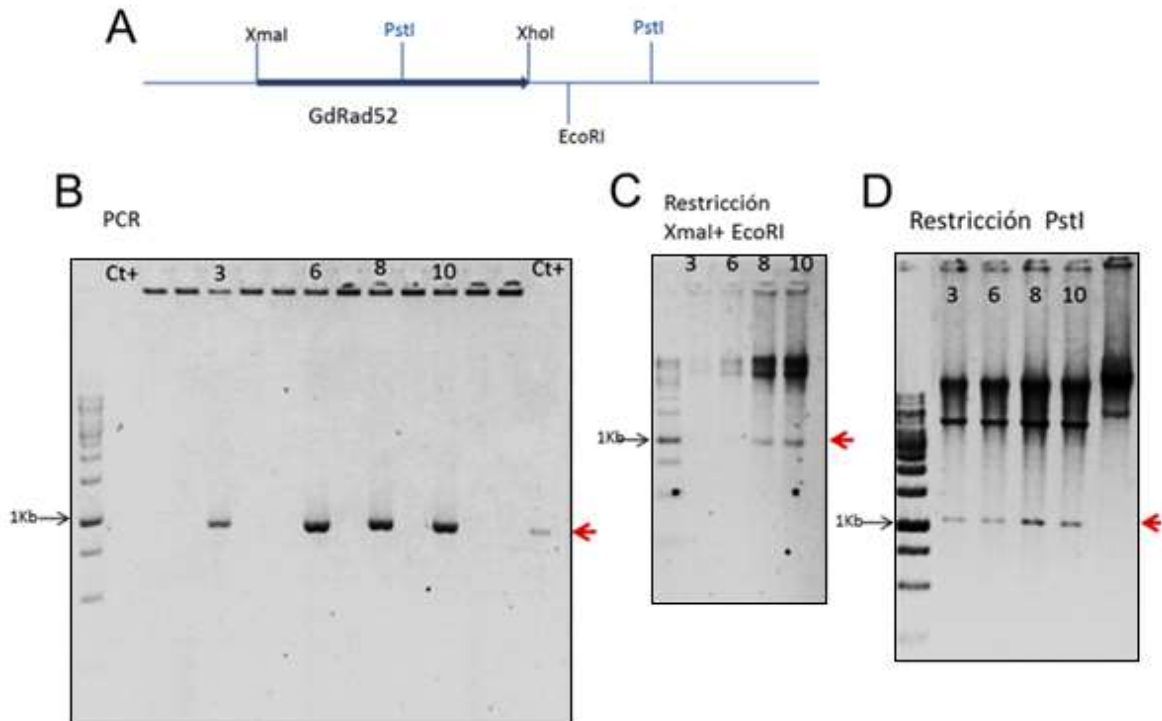


Fig 34.- Caracterización parcial de clonas candidatas Neo-Gdrad52-3HA. A) esquema de inserción del rad52 en el plásmido pNEO-3HA, donde se marcan los sitios de restricción; B) PCR de clonas candidatas amplificando en clonas 3, 6, 8 y 10; C) restricción con XmaI y EcoRI libera el fragmento esperado; D) Restricción con PstI libera fragmento de tamaño esperado.

Secuenciación de la clona candidata

Una vez caracterizadas por PCR y restricción, se realizó una secuenciación en dos de las clonas positivas para verificar la ligación correcta del inserto de PCR con la secuencia que codifica para 3HA, la secuenciación confirmó que el gen rad52 fue ligado en fase con la secuencia de 3HA que se encuentra en el plásmido, por tal razón se decidió utilizar la clona del plásmido 6 para linearizar y transfectar en trofozoítos de *Giardia*.

Transfección del plásmido pcRAD52-3HA-NEO en trofozoítos de *Giardia*

Previo a la transfección se realizó una reacción de restricción del plásmido pcRAD52-3HA-NEO para linearizarlo, una vez verificada la linearización por electroforesis (Fig. 35), en el cual se observó una sola banda con diferente migración respecto al plásmido no linearizado. Se llevó a

cabo la transfección y recuperación de las células y posterior selección con el antibiótico geneticina, una vez agregado el antibiótico, aquellas células que no recibieron el plásmido transfectedo murieron paulatinamente, aproximadamente a los 7 días después todas las células del control negativo murieron. En ese momento se realizó la selección de clonas individuales de manera que se obtuvo una dilución de una célula por cada 200 ul, que se colocaron en una placa de Elisa, se incubó nuevamente por 5 días, de esta placa se obtuvieron solamente 3 pozos con crecimiento celular, estos tres se cultivaron en tubos de 4.5 ml y posteriormente en tubos de 15 ml.

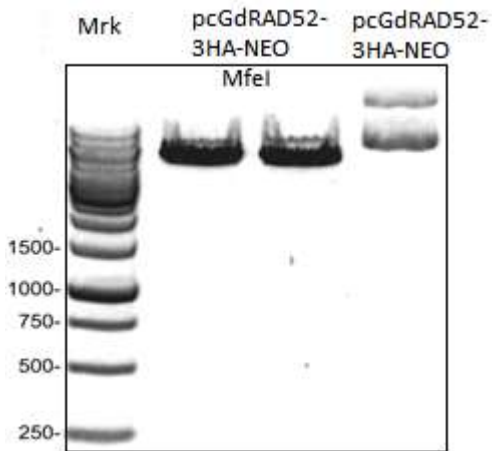


Fig.- 35. Restricción del plásmido pcRAD52-3HA-NEO que tiene clonado el extremo 3' de rad52, se muestra en el segundo y tercer carril el plásmido restringido se observa como una sola banda que migra diferente con respecto al plásmido sin restringir (carril cuarto).

Caracterización de las clonas candidatas transgénicas GdRad52-3HA por PCR

Se partió de un cultivo confluyente de 15 ml de trofozoítos obtenidos de la selección clonal, se extrajo DNA genómico y se usó como templado para un ensayo de PCR usando oligos que solo amplifican si el inserto fue integrado de manera correcta, como se observa en la figura 20, las tres clonas fueron positivas para la PCR.

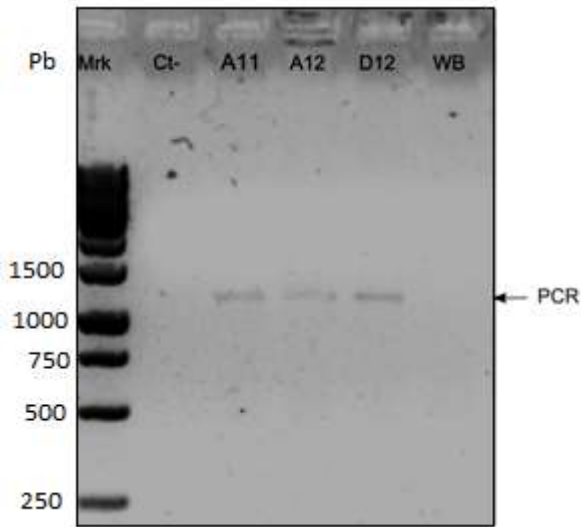


Fig 36.- prueba de PCR de tres clonas obtenidas de la selección clonal, se observa un amplificado del tamaño esperado en las tres clonas misma banda que no se observa en la cepa sin transfectar.

Secuenciación de las clonas candidatas

A partir del producto de PCR de las clonas candidatas se realizó una secuenciación usando el oligo Rv-Neo-seq, como resultado se obtuvo una secuencia predicha *in silico* dónde el extremo 3' del gen Rad52 está en marco con la secuencia de tres fragmentos de hemaglutinina. Con esta información se decidió secuenciar completamente el gen Rad52 en la clona A12 el cual se muestra en la figura 38 como un esquema de la secuenciación completa, confirmando esta y sin ningún cambio.

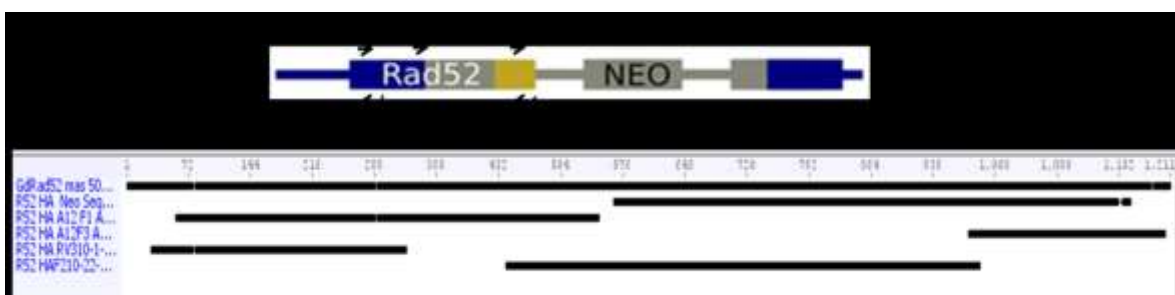


Fig 37.- Esquema desarrollado a partir de la secuenciación completa de Gdrad52 etiquetada en el genoma de *Giardia*, en A se muestra el gen etiquetado y en flechas enumeradas los diferentes

oligonucleótidos utilizados para la secuenciación, en B se muestra el gen de referencia y enumerado las secuenciaciones obtenidas con los 5 oligonucleótidos.

Análisis de la expresión del transcrito del gen rad52 inducida por daño con radiación gamma

Adicionalmente se realizaron ensayos de PCR semicuantitativo para analizar la expresión del mRNA de Gdrad52, en trofozoítos expuestos a daño por radiación gamma, se utilizaron 5 condiciones; trofozoito no irradiados (NI), 30 min, 1 hr, 2 hrs y 3 hrs pos-irradiación. Se extrajo RNA total (Fig. 38A), se trató con DNAsa para eliminar cualquier DNA genómico, se realizó una PCR (Fig. 38B) con RNA sin tratamiento con DNAsa y RNA con tratamiento de DNAsa, (este control permitió eliminar la posibilidad de contaminación con DNA genómico que pudiera resultar en un falso positivo) y posteriormente se realizó retrotranscripción para obtener cDNA, este sirvió de templado para realizar la PCR Tiempo Real. En la figura 40 se observa la gráfica que muestra un aumento significativo en la expresión del gen Rad52 a una hr post irradiación de los trofozoítos comparada con la muestra no irradiada.

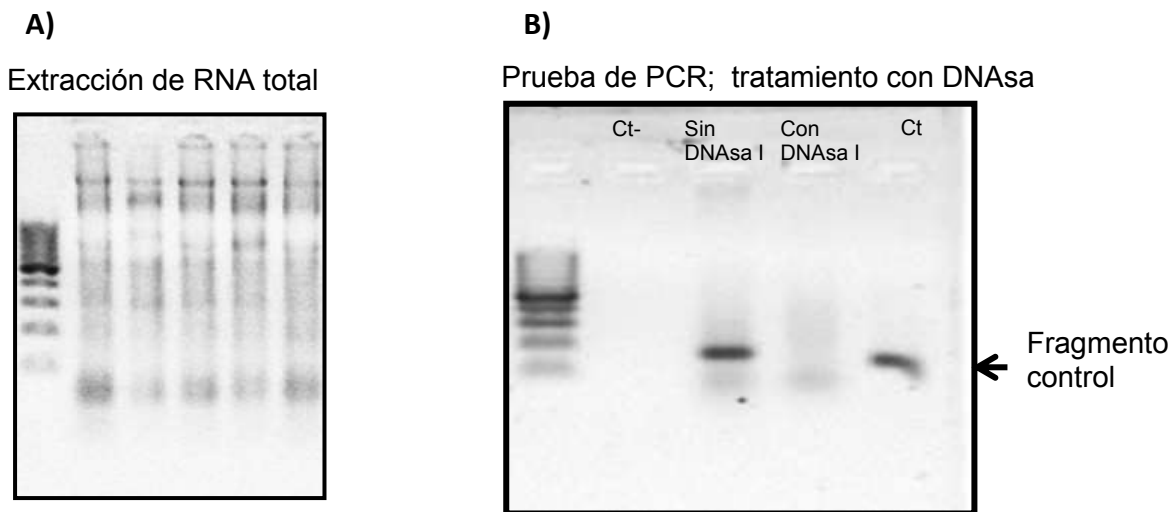


Fig. 38.- A) Extracción de RNA de trofozoítos irradiados, B) PCR de RNA con y sin tratamiento con DNAsa.

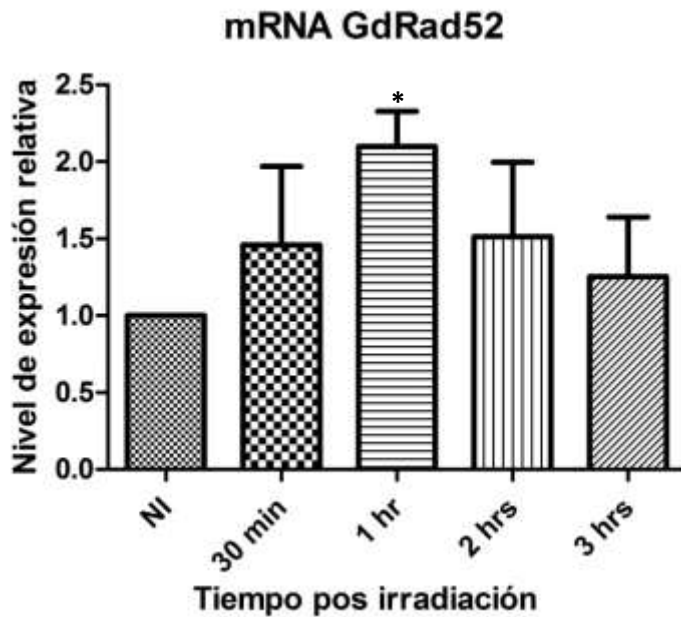


Fig. 39.- Niveles de expresión del RNA mensajero de rad52, a los 30 min, 1, 2 y 3 hrs posteriores a la exposición de trofozoítos a radiación gamma. La diferencia significativa se observa a una hr pos irradiación el cual aumenta el doble de cantidad de mRNA.

Análisis por western blot de la proteína GdRad52-3HA

Se realizó un ensayo de western blot de las clonas candidatas para identificar la expresión de la proteína en condiciones óptimas de crecimiento celular, para esto se obtuvo una pastilla celular de un tubo de cultivo confluyente de trofozoítos de las tres clonas candidatas, las pastillas se lisaron y se cuantificó la concentración de proteína total en cada caso, obteniéndose entre 4 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para SDS-PAGE y posterior western blot se usó 50 μg de proteína total para cada clona y un control positivo (extracto total de DMC1B-3HA 50 μg), no se obtuvo señal alguno para los extractos de las clonas GdRad52HA pero si para el control positivo, por este motivo se realizó nuevamente el ensayo de western blot usando diferentes concentraciones de proteína total de la clona A12 (50, 80, 100, 120 y 140 μg) usando un control positivo. Con estas cantidades de proteína total no fue posible identificar por western blot ninguna señal de la presencia de la proteína.

Debido a que se sabe que Rad52 participa en la reparación del daño al DNA por recombinación homóloga, y que la presencia de la proteína aumenta en los sitios de daño se

analizó por western blot extracto completo de trofozoítos expuestos a Radiación ionizante a los 30 min y una hr post-irradiación, con este tratamiento se observó una ligera señal del tamaño esperado a una hr después de la inducción de daño, cabe señalar que se utilizó 100 ug de proteína total en cada caso (Fig. 40).

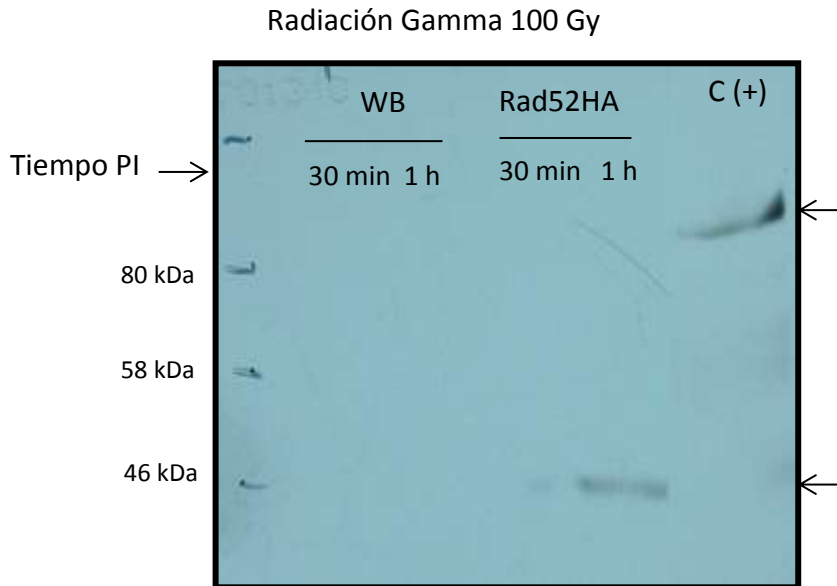


Fig. 40.- Inmuno detección de GdRad52-3HA en trofozoítos irradiados con 100 Gy de radiación Gamma, como control negativo se muestran trofozoítos silvestres y como control positivo se usó un extracto celular de trofozoítos con MRE11 etiquetado con HA, se marcan con flechas las bandas detectadas en cada caso.

DISCUSION

Giardia duodenalis en un organismo sumamente interesante que ha sido sujeto de estudio en diversas ramas de la ciencia debido a su naturaleza, entre los más importantes evidentemente se encuentra el área clínica, en el cual se han analizado los mecanismos de patogenicidad, interacción huésped- parasito, evasión de la respuesta inmune, mecanismo de acción de fármacos, mejoramiento de efectividad de fármacos, entre otros (Einarsson et al., 2016), todo esto con el objeto de entender mejor el fenómeno y de esta manera mejorar el tratamiento contra la giardiasis y mejorar la eficiencia de la prevención de la infección.

Ha surgido también un área de investigación enfocada al entendimiento de la evolución del parásito como un organismo eucarionte de divergencia temprana (Hedges, 2002), en este campo surge el interés de descubrir y delinear los elementos que lleven a entender de qué manera evolucionaron los diferentes organismos sobre la tierra además de descubrir mecanismos que podrían beneficiar la salud humana y animales de granja e incluso favorecer algún avance biotecnológico. El genoma minimalista de *Giardia*, lleva a considerar si otros organismos con mayor complejidad como mamíferos podrían funcionar con los elementos básicos, o delimitar cuales son los elementos básico necesarios para la conservación de las funciones vitales de una célula (Morrison et al., 2007), así mismo, el estudio de algunos elementos celulares pueden ser de gran utilidad para tratar enfermedades humanas o para el desarrollo biotecnológico.

En este sentido, nos hemos interesado en estudiar el sistema de reparación del DNA en *Giardia duodenalis*, que se lleva a cabo por la vía de recombinación homóloga, con el objeto de entender mejor los mecanismos de sobrevivencia y resistencia del parasito, así como identificar los elementos que lo hacen más eficiente comparado con otros organismos.

El daño al DNA es un fenómeno inevitable que surge por diversas fuentes y que puede comprometer la viabilidad celular, es por ello que la evolución ha desarrollado diferentes mecanismos que reparan los diferentes tipos de daño generado (Friedberg, 2008; Maher et al., 2011), se sabe que para reparar los daños más severos se requieren mecanismos de reparación altamente efectivos, el mecanismo que existe para este fin es la reparación de rompimiento de la doble cadena del DNA por recombinación homóloga, esta vía es tan importante que se encuentra conservada desde arqueobacterias hasta mamíferos, adicionalmente se cree que este mecanismo dio lugar a la meiosis que permitió la variabilidad genética entre los organismos vivos (Maher et al., 2011).

En el caso de *Giardia duodenalis*, diversos estudios indican que se reproduce de manera asexual y sin embargo su baja heterocigocidad indica que realiza recombinación genética (Morrison et al., 2007). Con respecto a esto, se sabe que varias proteínas que participan en meiosis participan también en reparación por recombinación homóloga. Estudios *in silico* en el genoma de *Giardia* muestran secuencias putativas de proteínas que participan en ambas vías (Ramesh et al., 2005). Hasta el momento se han estudiado las siguientes proteínas de la vía de reparación por

recombinación; el complejo MR (Sandoval-Cabrera et al., 2015), ATM, RPA1 y DMC1B (Torres-Huerta et al., 2016), los estudios han demostrado que estas proteínas son funcionales y que responden ante daño a la doble cadena de DNA, además de que estas funciones son semejantes a las conocidas en levadura para cada una de estas proteínas (Lisby and Rothstein, 2009), lo cual indica que participan de manera importante en la reparación del DNA dañado para mantener la integridad del genoma del parásito.

Otra proteína que participa activamente en la integridad genómica a través de su función en reparación del DNA es Rad52, es importante decir que esta proteína participa también en meiosis y además en otros procesos de reparación por recombinación no conservativa independiente de Rad51, por este motivo Rad52 fue un buen candidato para ser caracterizado en *Giardia* para este trabajo, se caracterizaron sus funciones bioquímicas y su respuesta ante daño al DNA.

Inicialmente se identificó una secuencia anotada en la base de datos de *Giardia duodenalis* como Rad52, se hicieron análisis de alineamientos buscando regiones conservadas que compartieran con Rad52 de otras especies. Se observó que esta proteína putativa conserva la región amino terminal correspondiente a unión a DNA, es interesante notar que a pesar de que comúnmente estas proteínas tienen otra región de unión a DNA en el carboxilo terminal, esta región no se encuentra en GdRad52, sin embargo se sabe que el amino terminal es suficiente para llevar a cabo la unión a DNA, alineamiento de DNA complementario y homo-oligomerización (Singleton et al., 2002), el dominio carboxilo terminal es el sitio donde Rad52 interacciona con proteínas de la vía para llevar a cabo sus funciones, especialmente RPA (Park et al., 1996) y Rad51 (Shen et al., 1996).

Para poder estudiar las funciones bioquímicas de la proteína putativa Rad52 de *Giardia* se generó proteína recombinante, para ello se clonó la secuencia peptídica de GdRad52 en un vector de expresión bacteriano. El vector tiene una ventaja que evita fugas transcripcionales en células DH5 α que se usa para clonar el gen de interés, esto es importante debido a que algunas proteínas pueden ser tóxicas para la célula y por lo tanto su clonación puede llegar a ser imposible. El sistema consiste en que la expresión de la proteína de interés está controlado bajo el promotor del bacteriófago T7 y la RNA polimerasa que reconoce dicho promotor solo se expresa en células BL21 pero que además su expresión está regulado por el operón lac (Studier et al., 1990).

El gen rad52 de *Giardia* fue clonado exitosamente con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal para poder identificarla con anticuerpos. Se verificó la solubilidad de la proteína recombinante, encontrándose tanto en la fracción soluble como en la insoluble, se decidió trabajar con la fracción soluble debido a que esto asegura la obtención de proteína plegada de manera nativa lo cual es indispensable para la realización de los ensayos de actividad (Graslund et al., 2008). El método de purificación de proteínas insolubles involucra condiciones desnaturizantes que afectan el plegamiento de las proteínas, lo cual requiere un método adicional de renaturalización, sin embargo esta técnica no es completamente eficaz ya que una cantidad de proteína permanece desnaturizada, además de que el plegamiento puede no ser la nativa

(O'Callaghan et al., 1998). Se utiliza este método solo en casos muy especiales, es decir, cuando toda la proteína producida se encuentra en cuerpos de inclusión.

Para realizar el ensayo bioquímico que demostrara la actividad de unión a DNA de GdRad52 se realizaron ensayos tipo EMSA, que consiste en interaccionar DNA y proteína y al ser resuelto en un gel nativo permite observar la formación del complejo DNA-proteína que migrara de manera diferente al DNA no acomplexado, para esto se usaron oligonucleótidos de 83 pares de bases de cadena sencilla y de cadena doble marcados radiactivamente con fosforo 32, se usa esta técnica debido a su alta sensibilidad lo que permite usar pequeñas cantidades de sustrato (oligo) y de proteína, se probaron concentraciones de proteína GdRad52 desde 3 nM llegando a un retardamiento del 100% de la sonda marcada (10 nM) con 50 nM de proteína. Interesantemente estas concentraciones son bajas comparadas con las utilizadas usualmente en ensayos con Rad52 de levadura donde se observa el mismo porcentaje de retardamiento usando de 400 a 800 nM de proteína (Seong et al., 2008) y también en Rad52 de humano donde requiere de una concentración de 1 a 2 μ M de proteína (Kagawa et al., 2008). Esto sugiere que GdRad52 es más eficiente que sus homólogos. Con respecto a la unión a cadena doble, GdRad52 se une también pero con muy baja afinidad comparado con cadena sencilla, este es un comportamiento típico que se observa en proteínas Rad52 caracterizadas.

Alineamiento de DNA complementario es otra actividad de Rad52, el cual es indispensable para alineamiento de la segunda hebra en el proceso de recombinación homóloga y de esta actividad también depende su función en reparación por replicación inducida por rompimiento (BIR) y en alineamiento de cadena sencilla (SSA) (Mortensen et al., 1996). El ensayo usando oligonucleótidos complementarios muestra que el alineamiento se lleva a cabo de manera espontánea pero a una menor velocidad comparada con la que tiene proteína GdRad52, lo cual demuestra la actividad de la proteína y que además a concentraciones muy bajas (3 nM) se lleva a cabo la actividad, se estableció también una concentración máxima (50 nM) para actividad óptima, ya que a concentraciones mayores como 100 y 200 nM de proteína el alineamiento se inhibe, posiblemente por impedimento estérico. Esta actividad de GdRad52 es muy semejante a ScRad52, donde también se observa un alineamiento óptimo a 20 nM casi al minuto de reacción comparado con el alineamiento espontáneo (Sugiyama et al., 1998).

En el proceso de recombinación homóloga específicamente en el alineamiento de la segunda hebra dañada, las hebras de cadena sencilla se cubren por RPA, esto para evitar la formación de estructuras secundarias, es decir la cadena sencilla nunca está descubierta, por lo tanto no puede realizar alineamiento espontáneo, ni tampoco RPA puede realizar esta función, de manera que RPA juega aquí un papel regulador inhibiendo el alineamiento espontáneo. Entonces la actividad de Rad52 es necesaria para que esta hebra pueda aparearse a su complementario y así permitir el progreso de la reparación, específicamente Rad52 primero interactúa directamente con RPA y con el DNA, desplaza a RPA y alinea el DNA a su homóloga (Sugiyama et al., 1998). Este proceso es independiente de Rad51.

Estudios previos (Martínez Reyes, tesis de maestría, 2013) mostraron que *Giardia duodenalis* posee una secuencia altamente similar a ScRPA1, no se localizó ninguna otra secuencia que pudiera ser RPA2 y/o RPA3, lo cual nos lleva a considerar en primera instancia que GdRPA1 realiza la función total que realiza por ejemplo ScRPA (subunidades 1, 2 y 3), el minimalismo que presenta *Giardia* lleva a considerar fuertemente esta opción o que las subunidades 2 y 3 son altamente divergentes en *Giardia*, como consecuencia de inserciones de aminoácidos que son bastante comunes en este parásito (Morrison et al., 2007), de cualquier manera, se requieren estudios que prueben cualquier hipótesis. GdRPA1 demostró ser capaz de unirse de manera muy eficiente a DNA de cadena sencilla y prácticamente no se une a DNA de doble cadena, este fenómeno es muy característico de las RPA caracterizadas (Fanning et al., 2006). También se observó que GdRPA1 al unirse fuertemente al oligonucleótido de cadena sencilla inhibe el alineamiento con su complementario, pero GdRad52 a través de su interacción con GdRPA1 (se discutirá más adelante) y de su actividad de alineamiento supera esta inhibición y forma cadenas dobles, esta secuencia de eventos es importante debido a que en un sistema in vivo, primero se une RPA y luego Rad52 desplaza a esta para alinear las cadenas complementarias, este fenómeno también se demostró en levadura observándose de igual manera una inhibición del alineamiento por RPA y una superación de esta inhibición por Rad52 (Sugiyama et al., 1998).

Como ya se mencionó, Rad52 tiene una cualidad que la caracteriza, de la cual parece depender sus actividades bioquímicas, es su propiedad de asociarse en forma de anillo, auto-oligomerizándose, estas estructuras han sido ampliamente estudiadas en ScRad52 y HsRad52, en los cuales se han demostrado por estudios de microscopía electrónica, mutación de dominios, cristalización y modelados tridimensionales que la formación de estas estructuras está determinada por un dominio de interacción entre monómeros de la misma proteína, dicho dominio se encuentra en el extremo amino terminal junto al dominio de unión a DNA, lo cual se observó que conteniendo solo estas dos regiones se forman anillos que son capaces de unirse al DNA. También se determinó que se pueden formar anillos de diferentes números de monómeros, usualmente se observan entre 7 y 11 (Kagawa et al., 2002). GdRad52 también forma estructuras en forma de anillo observadas en un modelado predicho utilizando el dominio amino terminal, estas estructuras fueron empalmadas en la estructura de anillo publicado para HsRad52 (PDB ID: 1H2I), la estructura a lo cual resultó en un empalme casi perfecto, análisis por microscopía electrónica confirmaron la formación de estas estructuras que se forman de manera espontánea. Consistentemente, el dominio amino terminal de la proteína Rad52 de humano fue analizada por cristalografía y se observó que forma de manera espontánea en ausencia de DNA una estructura de anillo, análisis más detallados mostraron que estos anillos variaban de tamaño, es decir, de número de monómeros, que dependían del tamaño de cada monómero, al parecer, si los monómeros solo eran de la región amino terminal, los anillos eran de 11 unidades, pero si los monómeros eran de la proteína completa, los monómeros eran de 7 unidades (Kagawa et al., 2002). Aunque no realizamos un análisis del número de monómeros de GdRad52, considerando la proteína completa podemos predecir que este se podría formar también de 7.

Para que la reparación del DNA dañado se lleve a cabo de manera exitosa y eficiente, es indispensable la interacción entre las proteínas involucradas ya que esto permitirá el reclutamiento sincronizado de los diferentes componentes, así al reclutarse RPA al DNA, este recluta a Rad52 a través de su interacción y a su vez, Rad52 recluta a Rad51, DMC1 en el caso de *Giardia*, de manera que al menos estas 3 proteínas interactúan entre ellas facilitando su función en el proceso, ya que la función de una afectará a las otras o de la actividad de una dependerán las otras.

Debido a que GdRPA1 y GdRad52 están marcadas con la misma etiqueta, se decidió obtener anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante GdRad52 etiquetada con histidinas, esto se realizó inyectando proteína purificada resuelta en un gel de poliacrilamida, cortada y homogenizada a ratones. El suero resultante fue probado contra la proteína GdRad52 recombinante, se obtuvo un reconocimiento exitoso con lo que se decidió probar el anticuerpo contra extracto completo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* sin y con inducción de daño al DNA con radiación gamma. Sin embargo el anticuerpo fue incapaz de reconocer a alguna proteína del parásito y que además al probarla contra la proteína GdRPA1, esta también fue reconocida, para poder utilizar el anticuerpo en ensayos de interacción de proteína se realizó un procedimiento de pre-clareado del anticuerpo, el cual consistió en incubar proteína purificada GdRPA1 transferida a una membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo diluido en PBS por un largo periodo de tiempo, el anticuerpo resultante fue retado nuevamente contra GdRPA1 y después de varios procesos de pre-clareado se logró obtener anticuerpo que seguía reconociendo a GdRad52 pero no a GdRPA1, esto se utilizó para ensayos de “Far western” donde se tuvo proteína GdRPA1 resuelto en un gel de poliacrilamida nativo (Golub et al., 1998; Wu et al., 2007). Esto se realizó para asegurar la conservación de la estructura nativa de la proteína, fue después transferida a una membrana de nitrocelulosa, esta fue incubada primero con proteína purificada GdRad52 para permitir la interacción entre la proteína inmovilizada y la proteína en la solución de incubación, posteriormente se incubó con anticuerpo anti-GdRad52, de manera que si las proteínas interactúan se detectaría la señal de reconocimiento del anticuerpo a GdRad52 sobre la membrana. El resultado obtenido fue exitoso, así mismo el ensayo inverso en el que GdRad52 fue inmovilizada e incubada primero con GdRPA1 purificada y después con anti-His, cabe mencionar que la etiqueta de Histidinas de GdRad52 fue removido con enzima enterocinasa para evitar el reconocimiento del anticuerpo anti-His y así evitar un resultado falso positivo. Interesantemente se observó que la interacción entre estas dos proteínas parece ser bastante fuerte ya que usando condiciones estándares de lavado de las membranas y diluciones altas de los anticuerpos se pudo observar una fuerte señal en cada caso, contrastando con lo que se ha reportado para ScRad52, el cual se encontró que interactúa preferentemente con la subunidad 2 de RPA y muy débilmente con la subunidad 1 (Plate et al., 2008). Es importante mencionar que en este trabajo se demuestran dos puntos importantes; 1) que GdRPA1 interactúa eficientemente con GdRad52 y 2) que GdRad52 pudo realizar alineamiento de DNA en presencia de GdRPA1, todo esto utilizando solo una subunidad de RPA, al parecer estas dos características son indispensables para esta importante función de Rad52, como demostró en levadura que, para que se lleve a cabo el alineamiento por Rad52 es indispensable su interacción con RPA (Sugiyama and Kantake, 2009).

Para probar la interacción entre GdRad52 y GdDMC1B se realizó el mismo ensayo solo que esta vez se utilizó proteína DMC1B etiquetada con 3HA que fue purificada de trofozoítos de *Giardia*, esta proteína se utilizó para inmovilizar, de igual manera se incubó con proteína GdRad52 y después con anticuerpo anti-His, el ensayo contrario donde se inmovilizó GdRad52 e incubado con GdDMC1B etiquetado con histidinas y después con anti-GdDMC1B, se obtuvo también un resultado positivo para la interacción entre las proteínas, cabe mencionar que los geles mostrados en los resultados con respecto a estos dos ensayos se observan barridos de proteína resuelta debido a diferentes conformaciones nativas de cada proteína, sin embargo se presentan controles de cada anticuerpo utilizado que demuestra que el reconocimiento es específico. Adicionalmente es importante decir que inicialmente el ensayo se probó resolviendo las proteínas en SDS-PAGE, sin embargo no se observó ninguna interacción entre las proteínas, lo que indica que la interacción específica de las proteínas depende de la forma nativa de cada una, es decir, al parecer es más importante la estructura que la secuencia (Wu et al., 2007).

Una primera aproximación al estudio *in vivo* de GdRad52 fue el que se realizó al analizar por PCR semi-cuantitativo la expresión del RNA mensajero, para esto se utilizaron trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos a daño genotóxico con radiación gamma, esta técnica fue establecida en el grupo de trabajo (Torres-Huerta et al., 2016) en el cual se determinó que 100 Gy de radiación es capaz de generar daño a la doble cadena del DNA por lo cual se utilizaron estas condiciones para el análisis. Las células se cosecharon después de diferentes tiempos post-irradiación, se les extrajo RNA el cual fue tratado primero DNAsa para eliminar cualquier contaminación con DNA genómico y después se usaron para sintetizar cDNA del cual se hicieron PCR convencional y PCR tiempo real o semicuantitativo, en la que observamos que a una hora post-irradiación hay un aumento de casi el doble de copias de RNA mensajero de GdRad52, indicando que el daño causado indujo la expresión del mensajero, por lo que podemos decir que es un gen activo en el parásito y que además su expresión se activa al detectar daño a la doble cadena del DNA. Comparando los resultados que se han observado para Rad52 en línea celular linfoblastoide TK6 de humano, donde se ve un aumento de aproximadamente 1.5 veces comparado con el basal (Riches et al., 2010), lo cual es consistente con nuestros resultados donde GdRad52 se comporta de manera muy similar en respuesta a radiación gamma.

Se realizó también PCR convencional a cDNA obtenido de trofozoítos no expuestos a daño genotóxico, interesantemente observamos amplificación, indicando que el gen se transcribe en condiciones basales y por lo tanto se esperaría la expresión de la proteína y sin embargo no fue posible detectarla. De las cuatro copias del gen que *Giardia* posee, al menos una copia fue etiquetada (Sandoval-Cabrera et al., 2015; Torres-Huerta et al., 2016), podemos decir que la cantidad de proteína GdRad52 total presente en la célula en condiciones basales es muy baja y que de esa cantidad solo una cuarta parte está etiquetada lo cual dificultaría su detección, explicando así la nula detección en condiciones basales. Sin embargo este dato indica que la GdRad52 es de baja concentración porque otras proteínas etiquetadas aún solo el 25% en el peor caso, si las detectamos.

Debido a que el anticuerpo policlonal generado en ratón no reconoció a ninguna proteína del parásito, se decidió etiquetar el gen endógeno rad52 con una etiqueta de hemaglutinina para poder identificar la proteína endógena con un anticuerpo (Gourguechon and Cande, 2011). Para este procedimiento se clonó la secuencia de Gdrad52 en un vector de integración al genoma que contiene tanto la etiqueta deseada como un gen que le confiere al parásito una resistencia a un antibiótico para poder seleccionar una clona que contenga la construcción deseada. Se obtuvo la clona que fue caracterizada por secuenciación, en el que se observó que al menos una copia de las 4 que posee *Giardia* fue etiquetada exitosamente. Se realizaron ensayos de western blot con estos trofozoítos transgénicos y a pesar de diferentes condiciones y tratamientos no se observó ninguna proteína en condiciones basales de crecimiento óptimo de las células, con la idea de inducir la expresión de las proteínas, los trofozoítos fueron expuestos a daño genotóxico, se realizó nuevamente el ensayo de western blot a los 30 min y una hr después de la generación de daño, en esta ocasión se logró identificar una banda de tamaño esperado y de reconocimiento específico a una hora post irradiación, indicando que el daño causado fue capaz de inducir la expresión de GdRad52, es decir Rad52 de *Giardia* al parecer tiene una participación en la reparación del daño a la doble cadena del DNA. Este fenómeno es semejante al observado en estudios con Rad52 de humano donde han mostrado que la proteína aumenta su expresión y se relocaliza en focos o centros de reparación junto con proteínas de reparación como el complejo MRN en respuesta a daño por radiación y también en la fase s del ciclo celular (Liu et al., 1999) indicando que participa tanto en reparación como en meiosis. De igual manera, Rad52 de levadura se relocaliza en focos de reparación solo en la fase S del ciclo celular en respuesta a daño por radiación (Lisby et al., 2001),

Al caracterizar las funciones bioquímicas de la proteína GdRad52 y comprobar que funciona como las proteínas Rad52 de otras especies ya caracterizadas, podemos decir que esta es una proteína funcional y que además es altamente eficiente en sus funciones bioquímicas. Así mismo los resultados observados con respecto al modesto aumento en la transcripción del mRNA y en la proteína, nos lleva a pensar que se debe precisamente a su alta eficiencia, es decir, la célula solo requiere de una pequeña cantidad de proteína que será suficiente para su participación en la reparación del daño al DNA, lo cual es consistente con el modesto cambio de expresión en levadura donde su importancia en actividad depende de su relocalización en focos de reparación (Lisby et al., 2001).

CONCLUSIONES

Se logró clonar, expresar y purificar la proteína Rad52 de *Giardia duodenalis*.

Los ensayos bioquímicos con GdRad52 demostraron que:

- 1.- Tiene la capacidad de unirse a DNA.
- 2.- Se une con mayor afinidad a cadena sencilla y menor afinidad a cadena doble.
- 3.- Puede llevar a cabo eficientemente el alineamiento de DNA complementario.
- 4.- Estimula el alineamiento de DNA complementario inhibido por RPA.
- 5.- Es capaz de formar estructuras oligoméricas en forma de anillo.
- 6.- Interacciona con la proteína GdRPA1 y con la recombinasa GdDMC1B.

Ensayos en trofozoítos de *Giardia duodenalis* mostraron que:

- 7.- La expresión de mRNA de Gdrad52 aumenta al doble a una hora post- irradiación en respuesta a daño genotóxico.
- 8.- La expresión de la proteína GdRad52 aumenta a las dos hrs post- irradiación.

PERSPECTIVAS

- 1.- Analizar si GdRa52 realiza intercambio de cadena como la recombinase GdDMC1B.
- 2.- Analizar el papel de mediadora de recombinación de GdRad52.
- 3.- Estudiar el comportamiento de GdRad52 en el ciclo celular.
- 4.- Estudiar las posibles modificaciones postraduccionales de GdRad52 y su importancia en la función o vida media de la proteína.
- 5.- Deletar GdRad52 en *G. duodenalis* y verificar su fenotipo ante daño al DNA.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svard, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8, 413-422.
- Bartelt, L.A., Sartor, R.B., 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime reports* 7, 62.
- Berkman, D.S., Lescano, A.G., Gilman, R.H., Lopez, S.L., Black, M.M., 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* 359, 564-571.
- Bernander, R., Palm, J.E., Svard, S.G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol* 3, 55-62.
- Best, A.A., Morrison, H.G., McArthur, A.G., Sogin, M.L., Olsen, G.J., 2004. Evolution of eukaryotic transcription: insights from the genome of *Giardia lamblia*. *Genome Res* 14, 1537-1547.
- Buret, A.G., 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15, 261-265.
- Caccio, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E., 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol*.
- Caccio, S.M., Sprong, H., 2009. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*.
- Caccio, S.M., Sprong, H., 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 124, 107-112.
- Carlson, D.W., Finger, D.R., 2004. Beaver fever arthritis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 10, 86-88.
- Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* 57, 953-994.
- Cervello, A., Alfaro, A., Chumillas, M.J., 1993. Hypokalemic myopathy induced by *Giardia lamblia*. *The New England journal of medicine* 329, 210-211.
- Cooper, M.A., Adam, R.D., Worobey, M., Sterling, C.R., 2007. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol* 17, 1984-1988.
- Cotton, J.A., Beatty, J.K., Buret, A.G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International journal for parasitology* 41, 925-933.
- Dizdar, V., Gilja, O.H., Hausken, T., 2007. Increased visceral sensitivity in *Giardia*-induced postinfectious irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. Effect of the 5HT3-antagonist ondansetron. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19, 977-982.
- Dudas, A., Chovanec, M., 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 566, 131-167.
- Eckmann, L., 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 25, 259-270.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., Svard, S.G., 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current opinion in microbiology* 34, 47-52.
- Fanning, E., Klimovich, V., Nager, A.R., 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic acids research* 34, 4126-4137.
- Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews* 24, 110-140.
- Fradet-Turcotte, A., Sitz, J., Grapton, D., Orthwein, A., 2016. BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization. *Endocrine-related cancer* 23, T1-T17.
- Friedberg, E.C., 2008. A brief history of the DNA repair field. *Cell research* 18, 3-7.
- Gallego, E., Alvarado, M., Wasserman, M., 2007. Identification and expression of the protein ubiquitination system in *Giardia intestinalis*. *Parasitology research* 101, 1-7.

- Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S., Radding, C.M., 1998. Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic acids research* 26, 5388-5393.
- Gourguechon, S., Cande, W.Z., 2011. Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* 10, 142-145.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H.W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T.C., Kim, C.Y., Hung, L.W., Waldo, G.S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J.L., Stevens, R.C., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M.I., Eschenfeldt, W.H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S.K., Emtage, J.S., Sauder, J.M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S.C., Bonanno, J.B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F.W., Chance, M.R., Sali, A., Acton, T.B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L.C., Hunt, J.F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C.K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G.T., Stuart, D.I., Owens, R.J., Daenke, S., Schutz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Bussow, K., Gunsalus, K.C., 2008. Protein production and purification. *Nature methods* 5, 135-146.
- Hakem, R., 2008. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 27, 589-605.
- Halliez, M.C., Buret, A.G., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World journal of gastroenterology* 19, 8974-8985.
- Hanamshet, K., Mazina, O.M., Mazin, A.V., 2016. Reappearance from Obscurity: Mammalian Rad52 in Homologous Recombination. *Genes* 7.
- Hedges, S.B., 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nature reviews. Genetics* 3, 838-849.
- Heyer, W.D., 2007. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. *Top Curr Genet* 17, 95-133.
- Huertas, P., 2010. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17, 11-16.
- Kagawa, W., Kagawa, A., Saito, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., 2008. Identification of a second DNA binding site in the human Rad52 protein. *The Journal of biological chemistry* 283, 24264-24273.
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., Yokoyama, S., 2002. Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol Cell* 10, 359-371.
- Kobayashi, J., Iwabuchi, K., Miyagawa, K., Sonoda, E., Suzuki, K., Takata, M., Tauchi, H., 2008. Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res (Tokyo)* 49, 93-103.
- Kraus, E., Leung, W.Y., Haber, J.E., 2001. Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8255-8262.
- Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U.H., Sung, P., 2002. Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *The Journal of biological chemistry* 277, 40132-40141.
- Krogh, B.O., Symington, L.S., 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38, 233-271.
- Kurita, A., Maguchi, H., Takahashi, K., Katanuma, A., Osanai, M., Kin, T., Yane, K., Hashigo, S., Ohtsubo, M., 2010. Small pancreatic cancer with giardiasis: a case report. *Pancreas* 39, 943-945.
- Lane, S., Lloyd, D., 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28, 123-147.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M., Sogin, M.L., 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International journal for parasitology* 40, 1063-1074.

- Li, X., Heyer, W.D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18, 99-113.
- Lisby, M., Rothstein, R., 2009. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA repair* 8, 1068-1076.
- Lisby, M., Rothstein, R., Mortensen, U.H., 2001. Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8276-8282.
- Liu, Y., Li, M., Lee, E.Y., Maizels, N., 1999. Localization and dynamic relocalization of mammalian Rad52 during the cell cycle and in response to DNA damage. *Current biology* : CB 9, 975-978.
- Llorente, B., Smith, C.E., Symington, L.S., 2008. Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle* 7, 859-864.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., Alt, F.W., 2005. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120, 497-512.
- Lopez-Romero, G., Quintero, J., Astiazaran-Garcia, H., Velazquez, C., 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite immunology* 37, 394-406.
- Maher, R.L., Branagan, A.M., Morrical, S.W., 2011. Coordination of DNA replication and recombination activities in the maintenance of genome stability. *Journal of cellular biochemistry* 112, 2672-2682.
- Melo, S.P., Gomez, V., Castellanos, I.C., Alvarado, M.E., Hernandez, P.C., Gallego, A., Wasserman, M., 2008. Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 347-350.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E., Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G., Sogin, M.L., 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921-1926.
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., 1996. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10729-10734.
- Mortensen, U.H., Lisby, M., Rothstein, R., 2009. Rad52. *Current biology* : CB 19, R676-677.
- Naess, H., Nyland, M., Hausken, T., Follestad, I., Nyland, H.I., 2012. Chronic fatigue syndrome after *Giardia* enteritis: clinical characteristics, disability and long-term sickness absence. *BMC gastroenterology* 12, 13.
- O'Callaghan, C.A., Tormo, J., Willcox, B.E., Blundell, C.D., Jakobsen, B.K., Stuart, D.I., McMichael, A.J., Bell, J.I., Jones, E.Y., 1998. Production, crystallization, and preliminary X-ray analysis of the human MHC class Ib molecule HLA-E. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 1264-1266.
- Paques, F., Haber, J.E., 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 63, 349-404.
- Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., Lee, S.H., 1996. Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 18996-19000.
- Plate, I., Hallwyl, S.C., Shi, I., Krejci, L., Muller, C., Albertsen, L., Sung, P., Mortensen, U.H., 2008. Interaction with RPA is necessary for Rad52 repair center formation and for its mediator activity. *The Journal of biological chemistry* 283, 29077-29085.
- Poxleitner, M.K., Carpenter, M.L., Mancuso, J.J., Wang, C.J., Dawson, S.C., Cande, W.Z., 2008. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science* 319, 1530-1533.
- Prucca, C.G., Lujan, H.D., 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 11, 1706-1715.

- Ramesh, M.A., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., 2005. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current biology* : CB 15, 185-191.
- Riches, L.C., Lynch, A.M., Gooderham, N.J., 2010. A molecular beacon approach to detecting RAD52 expression in response to DNA damage in human cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24, 652-660.
- Ringqvist, E., Palm, J.E., Skarin, H., Hehl, A.B., Weiland, M., Davids, B.J., Reiner, D.S., Griffiths, W.J., Eckmann, L., Gillin, F.D., Svard, S.G., 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular and biochemical parasitology* 159, 85-91.
- Rivero, F.D., Saura, A., Prucca, C.G., Carranza, P.G., Torri, A., Lujan, H.D., 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nature medicine* 16, 551-557, 551p following 557.
- Rodriguez-Fuentes, G.B., Cedillo-Rivera, R., Fonseca-Linan, R., Arguello-Garcia, R., Munoz, O., Ortega-Pierres, G., Yeppez-Mulia, L., 2006. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101, 693-696.
- Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svard, S.G., 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends in parasitology* 22, 26-31.
- Sandoval-Cabrera, A., Zarzosa-Alvarez, A.L., Martinez-Miguel, R.M., Bermudez-Cruz, R.M., 2015. MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie* 111, 45-57.
- Scharer, O.D., 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 2946-2974.
- Seong, C., Sehorn, M.G., Plate, I., Shi, I., Song, B., Chi, P., Mortensen, U., Sung, P., Krejci, L., 2008. Molecular anatomy of the recombination mediator function of *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The Journal of biological chemistry* 283, 12166-12174.
- Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., Park, M.S., 1996. Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *The Journal of biological chemistry* 271, 148-152.
- Singer, S.M., Yee, J., Nash, T.E., 1998. Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 92, 59-69.
- Singleton, M.R., Wentzell, L.M., Liu, Y., West, S.C., Wigley, D.B., 2002. Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13492-13497.
- Solaymani-Mohammadi, S., Singer, S.M., 2010. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Experimental parasitology* 126, 292-297.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* 185, 60-89.
- Sugiyama, T., Kantake, N., 2009. Dynamic regulatory interactions of rad51, rad52, and replication protein-a in recombination intermediates. *Journal of molecular biology* 390, 45-55.
- Sugiyama, T., New, J.H., Kowalczykowski, S.C., 1998. DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6049-6054.
- Svard, S.G., Hagblom, P., Palm, J.E., 2003. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS microbiology letters* 218, 3-7.
- Symington, L.S., 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630-670, table of contents.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S.F., Darde, M.L., Ayala, F.J., 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5129-5133.

- Torres-Huerta, A.L., Martinez-Miguel, R.M., Bazan-Tejeda, M.L., Bermudez-Cruz, R.M., 2016. Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie* 127, 173-186.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., Lucocq, J.M., 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176.
- Troeger, H., Epple, H.J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 56, 328-335.
- Weiner, A., Zauberman, N., Minsky, A., 2009. Recombinational DNA repair in a cellular context: a search for the homology search. *Nat Rev Microbiol* 7, 748-755.
- West, S.C., 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-445.
- Wu, Y., Li, Q., Chen, X.Z., 2007. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nature protocols* 2, 3278-3284.