



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Caracterización *in vitro* de MSH2 putativo de la vía de
reparación MMR en *Giardia duodenalis*”**

TESIS

Que presenta

RUBÉN VILLALOBOS RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis: Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez
Cruz

Ciudad de México

julio, 2019

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido para la obtención del grado de Maestría.

Al CINVESTAV.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, mi tutora, por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo y darme la oportunidad de realizarme como maestro, por su gran compromiso en mi desarrollo y por experiencia y calidad humana, por su infinita paciencia hacia mí y toda su atención.

A la Dra. María Luisa Bazán, por el apoyo incondicional que me brindó en el ámbito académico, por su experiencia y paciencia. A mis asesores, Dr. Luis Marat Álvarez, Dr. Javier Hernández Sánchez y Dr. Luis Kameyama Kawabe, por sus aportaciones para el presente proyecto.

A la Sra. Gabriela Mora por toda su paciencia y disposición en el ámbito administrativo.

A Alejandra, por apoyarme en todo, compartir juntos la vida y aprender de ella y por haberme acompañado durante toda esta experiencia.

A mi papá Rubén, a mi mamá Patricia y a mis hermanas Daniela y Sofía.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que me acompañaron y mantuvieron siempre una sonrisa en mi cara: Fabiola, Maritere, Sara, Mariana, Lalo, Francisco, Alejandro, Ulises y Esteban.

Por último, a mi segunda familia, Memo, David (Tachi), Fani y Martín.

Contenido

Contenido.....	1
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
<i>Giardia duodenalis</i>	6
Ciclo de vida.....	9
Genoma de <i>Giardia</i>	12
Ensamblés.....	13
Daños en DNA y vías de reparación.....	14
Vía de reparación de apareamientos erróneos, MMR.....	16
Homólogos eucariontes de MutS.....	21
Antecedentes.....	24
Justificación.....	31
Hipótesis.....	31
Objetivo.....	31
Objetivos particulares.....	31
Estrategia experimental.....	31
Metodología.....	32
Ensayos <i>in silico</i>	32
Oligonucleótidos utilizados.....	32
Cultivo y extracción de DNA genómico de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i>	33
Amplificación y purificación del gen putativo GdmsH2 a partir de DNA genómico de <i>G. duodenalis</i>	34

Defosforilación del producto de PCR pRSET	35
Preparación de bacterias competentes, cepas de preservación de plásmido y de expresión	36
Químico-competentes (Hanahan protocol).....	36
Electro-competente (Alonso-Stepanova protocol).....	37
Clonación de Gdmsh2 en vector de expresión pET100 y transformación	38
Clonación IVA (García-Nafra, J., 2016): Gdmsh2 en pRSET.....	40
Extracción de plásmidos.....	41
EasyPrep.....	41
MiniPrep.....	41
Secuenciación (BigDye Terminator, Applied Biosystem).....	42
Expresión de GDMSH2 recombinante.....	43
Purificación de GdMSH2.....	43
Columna agarosa-níquel (cromatografía de afinidad química).....	43
Método de enriquecimiento.....	44
Cuantificación de proteína (reactivo Bradford).....	45
Inmunodetección en fase sólida (<i>western blot</i>).....	46
Preparación de sondas de DNA (homoduplex) fluoresceinado.....	47
Ensayo de interacción GdMSH2-DNA tipo EMSA.....	47
Resultados.....	48
Identificación y caracterización <i>in silico</i> de Gdmsh2 putativo de <i>G. duodenalis</i>	48
Clonación, expresión y purificación de GdMSH2.....	51
Clonación, expresión y purificación en pET100.....	52
Clonación, expresión y purificación en pRSET.....	61
Evaluación de la interacción entre GdMSH2 y dsDNA mediante ensayos tipo EMSA (Electromobility Shifting Assay).....	69
Discusión.....	72
Conclusiones.....	76

Perspectivas.....	76
Referencias.....	77
Apéndice I: Obtención de vectores de expresión.....	83
Apéndice II: Orígenes del estudio de la vía MisMatch Repair.....	86
Apéndice III: Generalidades de las vías de reparación del DNA.....	90

Resumen

Giardia duodenalis es un protozooario flagelado parasitario considerado como un organismo modelo de divergencia temprana. Posee un genoma minimalista cercano a las 12Mb de longitud repartido en cinco cromosomas en dos núcleos transcripcionalmente activos. Además, es el agente etiológico de una de las infecciones más comunes humanas: la giardiasis, que consiste en la colonización del epitelio intestinal por parte de trofozoitos. Durante su vida cicla entre dos estadios: trofozoito, que representa la fase vegetativa y replicativa del organismo, y quiste, que representa la fase infectiva y de resistencia. Cada estadio se da según el ambiente en el que se encuentre, para lo cual sufre múltiples rondas de replicación del DNA y divisiones nucleares que generan varios cambios de ploidía, pasando desde tetraploide cuando trofozoito, a octoploide cuando enquistante y por último llega a tener dieciséis juegos cromosómicos como quiste. Todo ello le provoca a su genoma una alta susceptibilidad a lesiones que alteran su estabilidad genómica y viabilidad celular, siendo de gran incidencia aquellas originadas por la maquinaria replicativa, como inserciones o deleciones o apareamientos erróneos y que son corregidos por la vía de reparación de apareamientos erróneos o *Mismatch Repair*, por sus siglas en inglés.

En esta vía se detectan distorsiones en el DNA mediante el dímero MutS en procariontes y por homólogos como MutS α o MutS β en eucariontes según el tipo de error específico, siendo MSH2 componente tanto de MutS α como MutS β , afín a DNA y apareamientos erróneos entre bases no complementarias. Una vez que se da el reconocimiento del error en el DNA, se recluta el dímero MutL para generar un corte en la cadena con el error y dirigir la resección de la misma mediante una exonucleasa; por último, se resintetiza la cadena y se ligan los extremos.

Siendo que esta vía no ha sido caracterizada en *Giardia*, el presente trabajo se enfocó en la caracterización *in silico* e *in vitro* del producto del gen Gdmsh2 y su actividad de unión a DNA de doble cadena. Se encontró que MSH2 se encuentra fuertemente conservada entre organismos tanto procariontes como eucariontes, y que además en *G. duodenalis* contiene los dominios putativos de mayor relevancia para su funcionamiento, como el dominio IV de unión al DNA, y el V de ATPasa. Para evaluarla se construyó el plásmido pRSET_GdMSH2 para expresar a GdMSH2 en un sistema bacteriano y posteriormente purificarla, incubarla con sondas de DNA y observar su interacción mediante ensayos EMSA, en los que se observó la afinidad por DNA de GdMSH2 independiente de ATP.

Abstract

Giardia duodenalis is a model organism considered as an early divergent eukaryotic protozoan. It's a flagellated parasite with minimalist genome close to 12Mb distributed on five chromosomes within two transcriptionally active nuclei. Further, *G. duodenalis* is the etiologic agent of one of the most common human infections: giardiasis, which consists in the colonization of the duodenum epithelium. *G. duodenalis* displays two phases during its life cycle: the trophozoite, which represents the vegetative and replicative phase, and the cyst, which represents the infective and resisting phase. Each stage presents in accordance to the surrounding environment, for which the parasite suffers substantial DNA replication rounds and nuclear divisions generating several ploidy changes, going from tetraploid trophozoites to octaploid cysts, reaching sixteen chromosomal sets when reaching the cyst phase. This process promotes a highly susceptible genome, which in turn disturbs *G. duodenalis* stability and cellular viability. The relative highest frequency on the incidence DNA damage arise from the replication machinery producing nucleotide insertions/deletions or mismatches, which are repaired through a specific mismatch repair pathway (MMR).

This mechanism detects DNA distortions by MuTS in prokaryotes, and the MutS α o MutS β homologs in eukaryotes. MSH2 is a component of both MutS α and MutS β and is related to DNA mismatch repair within non-complementary strands. Once the mismatch is recognized, the heterodimer MutL is recruited for a mismatched nick and resected by an exonuclease; finally, the chain is resynthesized and the ends bound.

Since the MMR pathway has not been addressed on *Giardia*, this is the first approach focusing the *in silico* and *in vitro* characterization of the Gdmsh2 gene product and its homoduplex DNA bounding activity. Thus, it was found that MSH2 is strongly conserved between prokaryotes and eukaryotes. Most of the relevant putative domains in *G. duodenalis* are well conserved including the DNA binding IV and the ATPase V domains. To express GdMSH2 and study its biochemical properties, the pRSET_GdMSH2 plasmid was constructed. The bacterial recombinant GdMSH2 protein was purified to evaluate its DNA binding properties by EMSA assays. These results showed that GdMS2 does have affinity for DNA and this was not dependent on ATP.

Introducción

Giardia duodenalis

Giardia duodenalis, homónimo de *Giardia lamblia* y de *Giardia intestinalis*, es un parásito unicelular eucarionte, descrito por primera vez en 1681 por Anton Van Leeuwenhoek, que se hospeda en el intestino de los mamíferos anclándose al epitelio o nadando libremente entre el duodeno e íleon (Lane y Lloyd, 2002). Éste protista pertenece al orden Diplomonadida, grupo de organismos binucleados y flagelados propios de ambientes anaeróbicos o microaerófilos, del supergrupo Excavata (Torres, A., T., 2016). Se le considera un organismo minimalista debido a que su compacto genoma contiene los genes mínimos necesarios para su desarrollo y sobrevivencia, a pesar de que sus secuencias proteínicas suelen presentar inserciones aminoacídicas con mayor frecuencia que otros organismos eucariontes (Morrison, H., G., et al, 2007). Además, se tiene la noción de que *G. duodenalis* ha evolucionado reduciendo su complejidad en comparación a otros eucariontes (quizá debido a la adopción de la vida parasitaria por sus antecesores) pues, aunque presenta organelos membranosos, como sus núcleos, retículo endoplásmico, mitosomas y vacuolas periféricas, no contiene aparato de Golgi, endosomas ni mitocondrias (Cernikova, L., et al, 2018). El minimalismo genómico y reducida complejidad, son aprovechados para utilizarlo como organismo modelo ya que facilitan el estudio de organelos vestigiales, diferenciación celular y mecanismos celulares (Svard, et al, 2003; Lauwaet, et al, 2007). Sin embargo, a pesar del amplio estudio que ha tenido, muchos de sus mecanismos biológicos básicos permanecen sin dilucidación. Este parásito posee una morfología (Figura 1) cambiante que depende de la etapa del ciclo de vida en el que se encuentre. Puede presentarse como trofozoito, su forma parasitaria (12-15 μm de largo y 5-9 μm de ancho), o bien como quiste, su forma infecciosa.

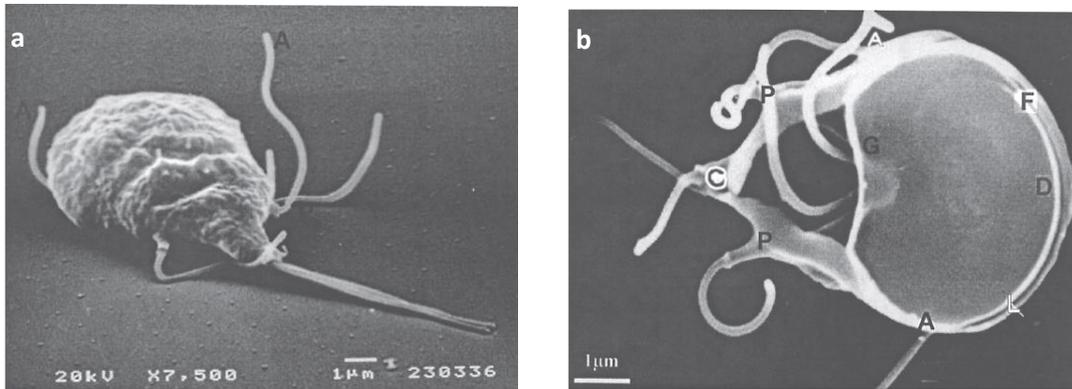


Figura 1. a. *G. duodenalis* vista dorsalmente a 7,500 ampliaciones. b. 10,000 ampliaciones de la vista ventral, donde se aprecian el disco ventral (D), la cresta (L), la brida ventrolateral (F), el surco ventral (G), los dos flagelos anteriolaterales (A), los dos flagelos posteriolateral (P), y los dos flagelos caudales o de cola (C). (Cortesía de Dr. Janine C. Harris y Mr. Michael Turner, tomada de Lane, S., Lloyd, D. 2002).

Como parásito, *G. duodenalis* causa la giardiasis, una de las enfermedades parasitarias más comunes del mundo (alrededor de 280 millones de infecciones en humanos son reportadas por año (Anklarklev, J., et al. 2010). Debido a su gran resistencia a severidades ambientales y a una relativamente baja dosis infecciosa (10 quistes) cerca del 10% de las infecciones (28.2 millones de personas) son causadas por alimentos contaminados (Ryan, U., et al, 2018). Transmitida por el agua o posiblemente por zoonosis, la giardiasis es multifactorial (depende, entre otras cosas, de la situación inmune del individuo y de la cepa ingerida) y se caracteriza por provocar los siguientes síntomas, que aparecen a los seis o hasta diez días después de la infección y son más severos en infantes o en pacientes con hipogamaglobulinemia (Adam, 1991): diarrea, dolor estomacal/abdominal, náuseas, vómito y pérdida de peso, mala absorción de nutrientes. Sin embargo, no existe evidencia de invasión, es decir penetración del epitelio o tejidos adyacentes o acceso al torrente sanguíneo, ni secreción de alguna toxina conocida (Buret, A., G., 2007). De hecho, los trabajos de Troeger *et al* (Troeger, *et al*, 2007) y Müller y Allmen (Müller, Allmen, 2005) sugieren que los síntomas se presentan debido a la respuesta inmune del individuo ante algún producto metabólico de *G. duodenalis* más que a su anclaje al epitelio. La infección comienza cuando se ingieren suficientes quistes, que al contacto con los ácidos gástricos a su paso por el estómago desencadenan el desenquistamiento y liberan a los trofozoitos ya en la luz del intestino, donde colonizan la

pared intestinal. Alrededor de la mitad de las infecciones son asintomáticas y suelen resolverse espontáneamente, generalmente por una respuesta inmune efectiva como péptidos antimicrobianos, óxido nítrico, entre otros (Roxström-Lindquist, K, *et al*, 2006). Se reportado que *G. duodenalis* ha desarrollado estrategias para inhibir la producción epitelial de óxido nítrico y evadir este mecanismo de defensa del huésped (Eckman, L., 2000). El diagnóstico puede realizarse mediante la búsqueda microscópica de quistes y/o trofozoítos en las heces del individuo y, aunque es más probable encontrar quistes que trofozoítos, éstos últimos confirman la infección sintomática. Algunos pacientes pueden presentar falsos negativos mediante el análisis de sus heces, por lo que se puede optar por enteropruebas que consisten en recoger contenido duodenal mediante una cápsula gelatinosa ingerida oralmente y luego se examina al microscopio (Adam, 1991). Otras alternativas son realizar duodenoscopias, la toma de biopsias o la identificación mediante anticuerpos.

Drug	Dose ^b	Median efficacy (%) ^c	Efficacy range (%)
Metronidazole	500–750 mg/day × 5–10 days	88	60–95
	2.0–2.4 g, single dose	48	36–60
	2.0–2.4 g, q.d. × 2 days	71	67–80
	2.0–2.4 g, q.d. × 3 days		93–100
	15–22.5 mg/kg/day × 5–10 days ^d	94	80–100
Tinidazole	300 mg/day × 7 days	87	74–100
	1.0–2.0 g, single dose	92	86–100
	50 mg/kg, single dose ^d	91	80–96
Ornidazole	1.0–2.0 g, single dose		96–100
	40–50 mg/kg, single dose ^d		92–100
Secnidazole	2.0 g, single dose		86–100
	30 mg/kg, 1 or 2 doses ^d		88–100
Quinacrine	300 mg/day × 5–7 days		95–100
	6–8 mg/kg/day × 5–10 days ^d		92–95
Furazolidone	400 mg/day × 7–10 days	92	80–85
	8 mg/kg/day × 7–10 days ^d		81–96
Albendazole	200–800 mg/day × 1–3 days		24–81
	200–400 mg/day × 5–7 days		94–100
Paromomycin	10–50 mg/kg/day or 1,500 mg/day × 5–10 days		55–88
Bacitracin zinc	240,000 U/day × 10 days		95

^a Efficacy is based on studies that may vary in design, entry methodology, or outcome measure. When separate pediatric populations were studied, they are designated. See the text for references.

^b Doses are total daily amounts, which may or may not have been given in divided doses. Actual treatment recommendations are presented in Table 2. q.d., once a day.

^c Median efficacy is given when the results of four or more studies are included.

^d Pediatric population only.

Tabla 1. Eficacia de drogas antiparasitarias en infecciones adultas y pediátricas de *G. duodenalis* (Gardner, T., B., Hill, D., R., 2001).

Debido a la resistencia de los quistes, ha sido difícil controlar la diseminación de *G. duodenalis* en el ambiente. Sin embargo, existen tratamientos que eliminan eficazmente la infección,

como por ejemplo el metronidazol, que aunque no tiene efecto sobre la viabilidad de los quistes, sí afecta una amplia diversidad de organismos pues tiende reducirse a radicales de nitroanión, mediante moléculas ferredoxina, que se presume se unen al DNA y proteínas, imposibilitando su actividad (Moreno, S., N., *et al*, 1983). En la tabla 1 se resumen los tratamientos más comunes contra la giardiasis.

Ciclo de vida

Como parte de las estrategias de supervivencia de *G. duodenalis*, la diferenciación celular es una de las más importantes, pues le brinda resistencia a múltiples ambientes cuando quiste, y su desarrollo colonizante como trofozoito. Dentro de su ciclo de vida, dos transiciones de diferenciación celular pueden ser apreciadas: desde el quiste latente hacia excizoito y luego a trofozoito, proceso conocido como desenquistamiento, y del móvil y replicativo trofozoito de vuelta a al quiste infectivo, proceso conocido como enquistamiento (Ankarklev, J., 2010) (Figura 2).

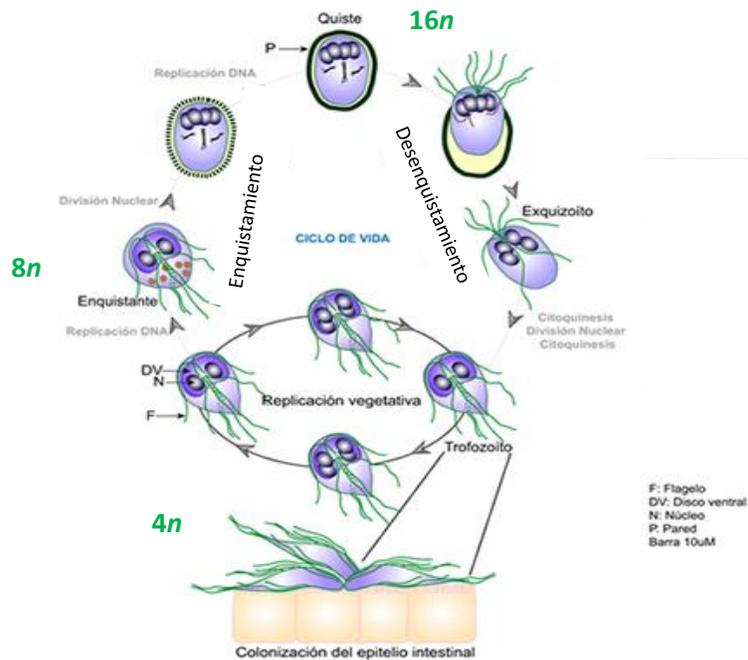


Figura 2. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Modificada de www.unal.edu.co. Cuando un quiste es ingerido, su paso por los ácidos gástricos desencadenan el desenquistamiento, comenzando por diferenciarse a excizoito, un paso antes de ser trofozoito, que se diferencia de éste mediante la ausencia del disco adhesivo, que aún contiene cuatro núcleos tetraploides (16n) y que los flagelos

aparecen en uno de los polos del quiste seguidos del cuerpo del excizoito. Aquí, la pared quística es degradada por vacuolas periféricas parecidas a lisosomas localizados justo debajo de la misma, el metabolismo aumenta drásticamente y se reorganizan el citoesqueleto y la regulación transcripcional. En seguida, el excizoito se divide dos veces sin pasar por la fase S, es decir, sin replicación de DNA (Bernander, R., *et al*, 2001), y da origen a cuatro trofozoitos, cada uno con un par de núcleos no hermanos diploides ($4n$). Éstos, a su vez, si las condiciones son las mínimamente óptimas, comienzan a colonizar el epitelio intestinal anclándose, empleando su disco adhesivo que les sirve como ventosa y se replican a las 6-12 horas, según lo observado *in vitro* (Ankarklev, J., 2010). El proceso de diferenciación inverso, enquistamiento, se da cuando un trofozoito es llevado corriente abajo por el flujo intestinal y entra en contacto con bilis, colesterol y un pH básico. Las estructuras exteriores como el disco ventral y los flagelos se internalizan y se forma la pared del quiste.

En la naturaleza, cuando los quistes son ingeridos por un posible hospedero, sus ácidos gástricos desencadenan la desenquistación obteniéndose un excizoito de cuatro núcleos tetraploides de corta vida que originan cuatro trofozoitos. Éstos, a su vez, colonizarán el intestino delgado anclándose al epitelio mediante su disco adherente. Los trofozoitos comienzan a enquistarse cuando migran corriente abajo con el flujo intestinal. El proceso es inducido por factores del hospedero, tales como alta concentración de bilis, baja concentración de colesterol y un pH básico (Lauwaet, *et al.*, 2007). A partir de aquí, el proceso puede dividirse en dos etapas: enquistamiento temprano y enquistamiento tardío. En la primera, los trofozoitos comienzan a tomar una forma redonda, aparecen las vesículas específicas de enquistamiento o ESVs (Encystation-specific vesicles), que transportan y maduran a las proteínas de la pared quística CWP (Cyst Wall Proteins) y comienzan a internalizarse los flagelos. Además, el disco adherente es desensamblado en cuatro partes que se mantendrán en el citoplasma, mientras que se da una replicación del DNA y un arresto del ciclo celular en la fase G2 para obtener los dos núcleos de forma tetraploide. Comienza entonces la etapa de enquistamiento tardío, durante la cual cada uno de los dos núcleos tetraploides se dividen en dos núcleos diploides, obteniéndose entonces cuatro núcleos diploides en la célula, y luego el DNA se replica una vez más dando lugar a quistes con cuatro núcleos tetraploides, es decir, quistes $16n$. Durante esta etapa se presenta el fenómeno conocido como cariogamia, en el que al menos un par de núcleos se interconecta e incluso

llegan a intercambiar material genético en eventos denominados diplomixis, con los que reduce la heterocigocidad alélica a pesar de ser un organismo asexuado (Carpenter, M., L., *et al.*, 2012). A diferencia de los trofozoítos, los quistes tienen un metabolismo más bajo pero son mucho más resistentes a factores ambientales siendo capaces de sobrevivir por varias semanas fuera de un huésped (Ankarklev, J., 2010). Los quistes suelen ser evacuados con las heces fecales, forma en que se liberan al ambiente y se mantienen a la espera de volver a ser ingeridos. Su resistencia extrema se debe en parte a su pared quística (0.3-0.5 μ m de ancho) que está formada por una red rígida e insoluble de carbohidratos (60%, principalmente β (1-3)-*N*-acetil-D-galactosamina) y proteínas (40%, CWP1, 2 y 3) asociada a una doble membrana interna. Los azúcares de la pared quística se sintetizan de *novo* a partir de glucosa a través de una vía metabólica de cinco enzimas reguladas transcripcional y alostéricamente durante el enquistamiento. Uno de los principales factores de transcripción que efectúan la regulación positiva del enquistamiento es Myb2 (Huang, Y., *et al.*, 2008).

Otra estrategia de sobrevivencia de *G. duodenalis* es la evasión del sistema inmune del hospedero mediante un fenómeno llamado variación antigénica. Se presenta sólo en la etapa de trofozoito e involucra su revestimiento superficial: las proteínas de superficie variante-específico VSPs (Variant-Specific Surface Proteins) que cubren la totalidad del trofozoito salvo durante la diferenciación y su recambio cada 6-13 generaciones. Las VSPs constan de un dominio C-terminal altamente conservado, interiorizado en el citoplasma, un dominio transmembranal seguido de un dominio semiconservado externo a la célula y por último una porción N-terminal variable que funciona de interfase entre la célula y su ambiente. La familia de genes VSPs asciende a alrededor de 200 genes en los ensamblajes A y B, detallados más adelante. Cuando una variante es expresada, las otras son reprimidas y una variante domina poblacionalmente. Sin embargo, en un mismo aislado pueden encontrarse subpoblaciones de trofozoitos expresando diferentes VSPs (Ankarklev, J., 2010). Se entiende entonces que *G. duodenalis* tiene la capacidad de burlar el sistema inmune de su hospedero cambiando su revestimiento proteico.

Genoma de *Giardia*

G. duodenalis compartamentaliza su DNA en dos núcleos, característica del orden de los diplomonádidos. Son del mismo tamaño, transcripcionalmente activos a la vez, inician la duplicación del DNA simultáneamente y cada uno contiene la misma carga de DNA (Ankarklev, J., *et al.* 2010), sin embargo, presenta expresión asimétrica, es decir, los dos núcleos no siempre expresan lo mismo. Su genoma está repartido en cinco cromosomas diferentes (en cada núcleo, con una longitud de ~12 Mb) y de forma diploide, en trofozoitos, por lo que en este estado vegetativo tiene una ploidía 4N, número que se cicla al doble, 8N, durante los inicios de la mitosis y su diferenciación a quiste. En general, por cada gen existe una copia (alelo) en cada núcleo, significa que en total puede contener hasta cuatro alelos de un solo gen, sin embargo se han reportado estudios donde se ha visto que hay 3 alelos por un gen en lugar de 4 (Tumova *et al.*, 2019), por lo que sus posibilidades de regulación son muy amplias y particulares, lo que es comprensible dado su complejo sistema de señalización para diferenciarse a quiste, y viceversa, sin embargo, este hecho fundamental de su biología plantea una de las preguntas más profundas sobre este ser: dado que no se ha descrito ni documentado observación alguna de un ciclo sexual en el microorganismo, se tiene por aceptado que no lo tiene, entonces ¿cómo hace para mantener tantas copias de un mismo gen/cromosoma? (Adam, 1991). A este respecto, se sospecha de un mecanismo similar a la meiosis referido como diplomixis (Poxleitner, M., K., *et al.*, 2008) debido a la presencia de genes específicos de este proceso, además de la baja heterocigocidad alélica (Morrison, H., G., *et al.*, 2007) y del posible intercambio genético horizontal entre otros trofozoitos e inclusive entre otros organismos.

Varios esfuerzos se realizaron en el pasado para conocer el genoma de este parásito; actualmente se cuentan con bases de datos que contienen los datos de secuenciaciones de varios grupos de investigación de manera que se tiene acceso al mapa completo del genoma de *G. duodenalis*, sin embargo, no se han comprobado las funciones de numerosos genes, <http://giardiadb.org/giardiadb/home.do>.

El genoma del ensamble A, cepa WB, clona 6 ha sido secuenciado (Morrison, H., G., 2007) y del estructuralmente compacto genoma de 11.7Mb se predicen 6,470 ORF's con una distancia intergénica de 372 pb, además, evidencia transcripcional provee consistencia con al menos 4,787 de éstos (Ankarklev, J., *et al*, 2010). Así mismo, genes bacterianos y también propios de arqueas han sido encontrados el genoma del parásito, por lo que se cree que su interacción con éstos ha moldeado su genoma. Se dice que es un genoma de baja complejidad o minimalista debido a que contiene pocos intrones, pequeñas secuencias no codificantes, los UTR de los mensajeros son pequeños (comparado con otros eucariontes, tabla 2) y los genes codifican para maquinarias simplificadas de replicación, transcripción, procesamiento de mensajeros y otros RNA y las vías metabólicas básicas de los eucariontes, además sus procesos celulares son rudimentarios: requieren menos subunidades proteínicas y dentro de su repertorio enzimático se encuentran algunas parecidas a las equivalentes bacterianas.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Leishmania major</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Giardia lamblia</i>
Size (MB)	12.5	22.8	26.1	32.8	~24	2.3	~160	11.7
%G+C content	38.3	19.4	46.4	59.7	~25%	47.6	32.7	49.0
Proteins encoded	5770	5268	9068	8272	9938	1997	25,949	6470
Mean CDS (bp)	1424	2283	1592	1901	1170	1077	929	1283
Mean intergenic distance (bp)	515	1694	1279	2045	1245	129	1165	372
Gene density, per kbp	0.48	0.23	0.32	0.25	0.41	0.97	0.34	0.58
Introns	272	7406	1	0	~2500 predicted	2	65	4
tRNAs	275	44	65	83	Subtelomeric arrays	44	479	63

Tabla 2. Comparación del contenido y organización de genomas eucariontes. Tomada directamente de Morrison, G, et al, 2007.

Ensamblajes

En un principio, se distinguía entre especies de *Giardia* según el hospedero de donde se aislará, sin embargo, conforme avanzaron las tecnologías de identificación proteínica y de secuenciación genómica, se descubrió que algunas especies presentes en un huésped específico podía ser aislado de otro tipo de huésped y pudieron diferenciarse entonces dentro de la especie *G. duodenalis* 8 ensamblajes genéticos diferentes, designados A-H. Mediante PCR y determinación de longitud de fragmentos de restricción en sitios con polimorfismos (RFLP, por sus siglas en inglés) se pudieron delimitar éstos ocho ensamblajes (Heyworth, F., 2016). Los

loci utilizados para la genotipificación suelen ser β -giardina (bg), triosa fosfato isomerasa (tpi), la subunidad menor del rRNA (ssu) y glutamato dehidrogenasa (gdh) (Feng, Y., Xiao, L. 2011). Se ha observado que ciertos ensamblajes tienden a parasitar sólo ciertos hospederos, mientras que otros pueden parasitar a una amplia gama de huéspedes diferentes, o bien, que en un mismo huésped se encuentran más de un ensamblaje, además, diferentes loci de un mismo aislado pueden contener secuencias de DNA típicas de diferentes ensamblajes, por lo que determinar a qué ensamblaje pertenece un “aislado” de un huésped puede resultar difícil (Heyworth, F., 2016). En humanos, los ensamblajes A y B son los asociados a giardiasis, conteniendo un 78% de homología en secuencias codificantes entre ellos (Ankarklev, J., 2010).

En este proyecto se trabajará con el ensamblaje A, con el subgrupo WB porque es la responsable de la giardiasis en humanos, además es representativa de todas las especies de *Giardia* y no contiene endosimbiontes (Lane, S., Lloyd, D. 2002), además de ser la mejor caracterizada (entre otras cosas, su genoma es el completamente secuenciado) y de ser fácil de crecer y reproducir todo su ciclo de vida *in vitro*.

Daños en DNA y vías de reparación

Todo ser vivo puede sufrir daño a su genoma por diversos factores, algunos intrínsecos a su regulación y metabolismo (daños endógenos), y algunos otros debidos al ambiente en el que se desarrolla (daños exógenos), ya sea alterando su química o alterando su estructura. Se estima que, al día, se pueden llegar a acumular hasta alrededor de 1×10^9 mutaciones debido a diversos factores; los sistemas de reparación del DNA aseguran que menos de 1×10^{-6} de estas mutaciones se establezcan. Entre los daños que puede sufrir el DNA se encuentran los rompimientos de cadena sencilla (Single Strand Break, por sus siglas en inglés, SSB), rompimientos de doble cadena (Double Strand Breaks, por sus siglas en inglés, DSB), inter e intra cruzamiento de cadenas, modificaciones a las bases nucleotídicas (oxidación, alquilación, desaminación), formación de aductos entrecruzamiento de nucleótidos adyacentes (como los dímeros de timina), apareamiento erróneo de bases no complementarias y bucles de inserciones/deleciones. En general, además de los cortes de una y de doble cadena en el DNA, los daños a éste pueden ser divididos en dos clases: cambios químicos en una sola base o

errores de replicación, que afectan la secuencia nucleotídica pero no distorsionan la estructura general del DNA, de manera que no afectan la transcripción, y los cambios que provocan distorsiones estructurales en el DNA siendo un impedimento para la transcripción y la replicación, como puede ser la unión covalente de dos bases adyacentes o entre cadenas complementarias, apareamientos erróneos o pequeños bucles de inserciones/deleciones (Krebs, J., E., *et al.*, 2014). Dichos daños pueden provocar mutaciones, inserciones, deleciones, translocaciones, pérdida de cromosomas y de información esencial, en general, inestabilidad genómica, resultando en la inducción de apoptosis o hasta enfermedades fatales (Camarillo, C., L., *et al.*, 2009). La fuente de estos daños es variada, proviene desde las especies reactivas de oxígenos generadas por el mismo metabolismo celular, horquillas de replicación colapsadas, nucleasas, hasta agentes químicos, radiación ionizante y UV, entre otras. En cualquiera de los casos, el daño más grave que puede llegar a sufrir el DNA son los rompimientos de doble cadena, DSB, pues en estos la continuidad de una secuencia dada es interrumpida, impidiendo su correcta decodificación, plegamiento o interacción con otras moléculas. La principal vía de reparación encargada de solucionar éste tipo de daños es la recombinación homóloga (Fleck, O. y Nielsen, O., 2004).

Teniéndose esto en cuenta, se considera que la integridad y estabilidad del genoma es en gran parte lo que determina la viabilidad de los seres vivos, su desarrollo y reproducción, por lo que éstos han desarrollado múltiples estrategias tanto para censar daños/errores en el genoma como para repararlos de forma precisa y fiel. En general, la respuesta celular ante el daño al DNA comienza con el sistema de detección de cada tipo de daño, luego la activación de vías checkpoint, le puede seguir el arresto del ciclo celular, si es necesario, y en seguida el inicio del mecanismo de reparación de DNA (Camarillo, C., L., *et al.*, 2009). Los sistemas de reparación de DNA concertados por los sistemas eucariontes son seis vías fuertemente conservadas: la reparación por recombinación homóloga (Homologous Recombination Repair, por sus siglas en inglés, HRR), la unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End-Joining, por sus siglas en inglés, NHEJ), la reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, por sus siglas en inglés, BER), la reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair, por sus siglas en inglés, NER), la reparación de apareamientos erróneos

(MisMatch Repair, por sus siglas en inglés, MMR) y la reparación mediante metiltransferasas, aunque recientes investigaciones han revelado nuevas vías, como la BER acoplada a la transcripción, la replicación inducida por freno y la inserción de nucleótidos, así como la interconexión de las seis principales vías (Fleck, O. y Nielsen, O., 2004). Todas actúan de forma independiente o acopladas a otros mecanismos celulares, y a veces no con la intención de reparar el genoma sino con la de darle mantenimiento o bien para otros fines, como por ejemplo, la generación de anticuerpos, que requiere de los mecanismos de recombinación homóloga para generar nuevas combinaciones de segmentos proteínicos, o como en otro ejemplo donde el sistema MMR acoplado a la duplicación del DNA durante la fase S, ayuda a la actividad Proof Reading de la DNA polimerasa a mantener la fidelidad de la copia. Estas seis vías de reparación de DNA en eucariontes han sido ampliamente descritas en levadura y humano, sin embargo, poco se sabe de sus equivalentes en otros eucariontes como los protozoarios, aún menos en aquellos parasitarios, quienes se encuentran continuamente expuestos a la acción de fármacos y a la presión del sistema inmune de su hospedero, factores que pudieran perturbar la estabilidad de su genoma (Camarillo, C., L., *et al.*, 2009).

Vía de reparación de apareamientos erróneos, MMR

En general son tres pasos los que dan origen a la alta fidelidad de la replicación de DNA en los organismos: la polimerización 5' → 3' por parte de la DNA polimerasa, que genera 1 error en cada 10⁵ nucleótidos añadidos, su actividad “proof Reading”, que genera 1 error en cada 10² nucleótidos añadidos, y la vía de reparación MMR, que genera 1 error en cada 10³ nucleótidos añadidos; juntos se obtiene una tasa de error de 1 en cada 10¹⁰ nucleótidos añadidos durante la replicación, lo que implica una probabilidad muy baja de que un error se mantenga en el DNA cuando es replicado (Alberts, B., *et al.*, 2015). Éstos errores se manifiestan cuando se enfrentan interacciones no complementarias (A:G, C:T) entre bases de una cadena de DNA, así como pequeños segmentos deletados/insertados que no se aparean con la cadena complementaria (Insertion Deletion loops, IDL), situación de mayor frecuencia en regiones microsatélite, ya sea porque el error escapó de la actividad “proof reading” de la DNA polimerasa o porque ésta agregó nucleótidos azarosamente. Aunque es pequeña, la probabilidad de añadir nucleótidos erróneos, durante la replicación se manifiesta y genera

apareamientos erróneos, a diferencia de los IDL's que sí generan una distorsión en una sólo cadena, que además de ser un error en la secuencia nucleotídica, provocan distorsiones en la estructura general del DNA. Dicha distorsión es detectada y reparada por la vía MMR, sin embargo, la distorsión por sí sola, al presentarse en ambas cadenas de una misma hebra de DNA, no facilita la detección del nucleótido erróneo, el sistema sólo reconoce dos bases mal apareadas. Aún así, sólo la cadena que contiene el error es procesada. Surge entonces la pregunta: ¿cómo se distingue entre la cadena con la secuencia original y la cadena que contiene el error que provoca la distorsión detectada por la vía MMR para que ésta la repare?. En procariontes, la respuesta yace en el sistema de metilación: Al tiempo inmediato a la replicación del DNA, sólo la cadena parental/templado lleva grupos metilo, principalmente en las adeninas de la secuencia consenso GATC, momento conocido como estado hemimetilado, por lo que el sistema MMR puede entonces distinguir entre la cadena que contiene el error y la cadena original (metilada). Los apareamientos erróneos son entonces fielmente corregidos, con respecto a la secuencia original mediante el reconocimiento de la hemimetilación en la secuencia GATC, y preferencialmente podrá reparar errores a 1 kb de distancia de dicha secuencia (Krebs, J., E., *et al.*, 2014). Mientras tanto, en eucariontes, la respuesta no ha sido elucidada, sin embargo, evidencias apuntan a varias razones: detrás de la horquilla de replicación, la cadena *lagging* contiene nicks que surgieron de la eliminación de los fragmentos de Okazaki, y sirven como señal de reconocimiento de la cadena recién sintetizada, sin embargo, este modelo deja un problema: la cadena *leading* debería contener también nicks para que el sistema MMR distinga entre la cadena templado y la recién sintetizada, sin embargo, esto no es así, en la cadena *leading* no hay nicks y aún así la vía MMR logra repararla cuando es necesario (Alberts, B., *et al.*, 2015). Por otro lado, en la vía MMR eucarionte, que más se diversificó y más específica puede llegar a ser, se desarrollaron proteínas Mut T, M y Y se encarga de reparar apareamientos erróneos causados por estrés oxidativo, siendo el principal de estos daños el cambio de G a 8-oxo-G. Aquí, la distinción entre cadenas no tiene importancia porque lo que al ser censado como daño es suficiente para que sea tratada (Krebs, J., E., *et al.*, 2014).

El mecanismo general de acción de esta vía es relativamente sencillo. Comienza con la detección de daño específico en el DNA, que como se ha mencionado ya antes puede darse por errores durante la replicación, principalmente; el daño es detectado mediante el dímero MUTS en procariontes y MUTS α / β /otros en eucariontes, que se une a la región del DNA donde se detectó el daño y recluta al complejo MUTL en procariontes y MUTL α / β /otros en eucariontes, y cuya función es crear un nick, que es una incisión en el esqueleto de la cadena de DNA, y desnaturalizar ligeramente las dos hebras para permitir el paso a nucleasas varias que degradarán la región adyacente al daño, junto con éste, para que al final una DNA polimerasa resintetice la región y por último, una ligasa selle los extremos (Figura 3). A diferencia del sistema procarionte, donde el homodímero MUTS actúa en cualquier tipo de daño que active la vía MMR, en eucariontes, en general, para cada tipo de daño que la vía MMR pueda reparar, existe un dímero especializado para su reconocimiento, como bien pueden ser bucles de pequeñas inserciones/deleciones, detectadas principalmente por el heterodímero MUTS β (MSH2-MSH3), o daños originados fuera del proceso de replicación, como los que podrían darse durante reparaciones mediadas por recombinación homóloga, donde antes de que se de dicho proceso, MSH4 o MSH5 actúan anclándose al daño y lo liberan hasta que esté reparado, o en aquéllos originados por estrés oxidativo, como se ejemplificó anteriormente.

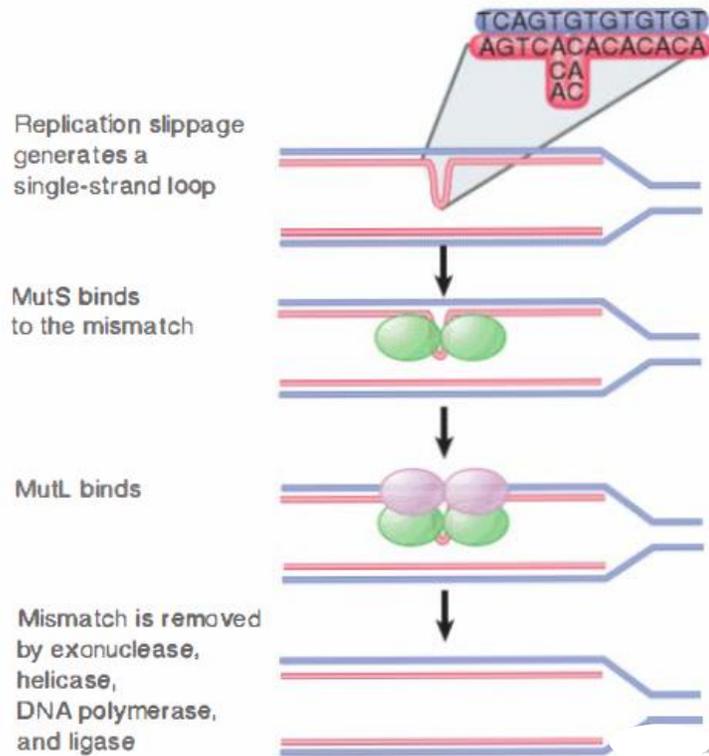


Figura 3. Mecanismo de acción de la vía MMR acoplado a replicación (Krebs, J., E., *et al.*, 2014), durante el cual se censura una pequeña inserción/delección que genera un rizo de cadena sencilla detectado por MutS, que a su vez provoca el reclutamiento de MutL, encargado de generar el corte de cadena sencilla que dirige y dé lugar a la reparación mediante resección, resíntesis y ligación.

Dentro de la vía MMR en procariontes pueden distinguirse dos mecanismos diferentes basados en la especificidad del daño o error detectado y el tamaño de éste, ambos descritos en *Escherichia coli*: el de parche largo y el de parche corto. El primero, *Long-patch mismatch correction*, por como se conoce en inglés, ha sido descrito en procariontes, en *E. coli*, y en eucariontes existen evidencias del mismo mecanismo, en cultivos celulares de mamíferos y *Drosophila melanogaster* y *Sacharomyces cerevisiae*; en este mecanismo, la especificidad por la cadena a reparar está dirigida por señales secundarias que pueden estar localizadas lejanamente del sitio erróneo. La característica principal de este mecanismo se presenta en el paso de resección de la cadena dañada, en el que a la cadena procesada se le retira alrededor de una kilobase. Dicha señal secundaria que gobierna la discriminación entre la cadena dañada y la original en *E. coli* es la presencia de grupos metilo en las adeninas de la secuencia consenso GATC (figura 3), que cuando recién se da la replicación del DNA, sólo se encuentra en la cadena

que fungió como templado, permitiendo a la maquinaria MMR distinguir entre la cadena nueva y la original, y así dirigir la resección en la nueva, que es en la que se encuentra el daño (mal apareamiento causado por error durante la replicación) (Modrich, P., 1991). El paralelismo de este mecanismo específico entre procariontes y eucariontes se sugiere reside en la DNA polimerasa requerida en el último paso de la vía, la resíntesis de la cadena escindida, que en eucariontes es la misma que realiza la replicación, DNApol. III, mientras que en eucariontes existe evidencia que sugiere que la resíntesis es realizada por la DNApol α (Holmes, J., *et al.*, 1990). Por otra parte, el mecanismo de parche corto, *Short-patch mismatch repair* por su nombre en inglés, ha sido identificado en células de mamíferos y en bacteria y, en contraste con el *Long-patch*, la longitud resectada de DNA adyacente al daño detectado es de alrededor de 10 nucleótidos o menos y la señal de discriminación entre la cadena dañada y la original puede provenir de la naturaleza del *mismatch* o del ambiente secuencial inmediato (Modrich, P., 1991).

Debido a que los IDL's tienen mayor frecuencia de aparición en regiones con secuencias repetitivas, como las regiones microsatélite, gracias al fenómeno conocido como *Slipage* por parte de la DNApol, donde fácilmente puede deslizarse sobre el templado y añadir en la cadena nueva pequeñas repeticiones de forma desfasada, es que una falla en el sistema MMR, especialmente en el heterodímero MutS β (MSH2-Msh3), especializado en el reconocimiento de IDL's, puede provocar enfermedades relacionadas a cambios en el número de repeticiones de una secuencia, por ello, mutaciones en la vía MMR son biomarcadores de propensión a dichas enfermedades.

En *G. duodenalis*, la síntesis de nuevas cadenas de DNA se da en gran medida en puntos clave de su ciclo de vida, pues a cada etapa corresponde un cambio en su ploidía. Cuando este cambio es aditivo, cada cromosoma debe ser replicado hasta dos veces en un tiempo relativamente corto, por lo que los sistemas de detección de errores deben mantenerse en constante actividad, siendo la vía MMR de suma importancia pues va acoplada a la horquilla de replicación y es la segunda línea de defensa contra errores (tomando la actividad Proof Reading de la DNA polimerasa como la primera), además de intervenir en los procesos de recombinación que se dan durante varias etapas del ciclo de vida de *G. duodenalis*, impidiendo

la recombinación de cadenas heterólogas hasta que las homogenice, por ende, su actividad en *G. duodenalis*, como en todos los organismos con dicha vía, es imprescindible (Hingorani, M., M., 2016).

La vía de reparación MMR funciona sobre el DNA más allá de su forma canónica reparando errores propios de la replicación. En algunos casos coopera con la fidelidad de la recombinación homóloga evitando el intercambio de cadenas heteroduplex o en la hipermutación somática para la diversidad de anticuerpos, promoviendo estabilidad genómica, y en otros casos procesando el daño oxidativo en el DNA. Por ejemplo, MutS β , que originalmente se une a pequeñas inserciones/deleciones post-replicación o durante recombinación, también se une a DNA con extremos cohesivos para iniciar la remoción de los sobresalientes 3' no homólogos durante la reparación de rompimientos de doble cadena (Hingorani, M., M., 2016). A manera de recopilación, Spampinato y su equipo de trabajo reseñan una serie de experimentos en los que se asocia fuertemente la correcta funcionalidad de los componentes básicos de la vía MRR (como MSH2, MLH1, PMS1/2, entre otro) con la frecuencia y fidelidad de la recombinación homóloga. Los autores concluyen además, que las proteínas de la vía MMR se han visto involucradas en prevenir niveles altos de recombinación ilegítima y más bien promoviendo la recombinación homóloga (Spampinato, C., P., *et al*, 2009). Por otro lado, la vía MMR se ha visto también partícipe de la recombinación meiótica (*crossing over*) cooperando en la reparación de rupturas de doble cadena durante la resolución de las uniones Holliday (Manhart, C., M. y Alani, E., 2015).

Homólogos eucariontes de MutS

En un principio, los genes involucrados en el control de fidelidad de replicación y reparación de DNA se identificaban mediante la generación de mutaciones específicas que se observara que provocara un fenotipo mutante (aumento en la frecuencia de aparición de mutaciones), por lo que a los genes identificados mediante esta técnica se les conoce por *Mut*. Muchos genes así identificados han resultado formar parte de la vía de reparación MMR (Krebs, J., E., *et al.*, 2014). Cuando se extrapoló el estudio de dicha vía en eucariontes, las proteínas homólogas del mecanismo fueron nombradas como “homólogos de “MutS/L” o “MS/LH”, por

sus siglas en inglés. Dependiendo del tipo de error en el DNA, existen diferentes heterodímeros MutS en eucariontes; cada complejo MutS, generalmente formado por MSH2 como base estructural y alguna otra “MSH”, como puede observarse en la tabla 3, es afín a un tipo de error de apareamiento entre bases en el DNA.

Componente	Sustrato o acoplado a:
MutS α (MSH2/MSH6)	$\pm 1b$, mismatches; replicación
MutS β (MSH2/MSH3)	2-4b, mismatches; replicación
MSH4 y MSH5	Recombinación homóloga
Mut T, -M y -Y	Estrés oxidativo

Tabla 3. Ejemplos de heterodímeros eucariontes componentes de la vía MMR (Pochart, P., *et al*, 1997; Spampinato, C., P., *et al*, 2009; Edelbrock, M., A., *et al*, 2013).

Es el caso de las proteínas que conforman el complejo central de la vía en eucariontes: MutS α , heterodímero compuesto de MSH2 y MSH6. Dicho heterodímero inicia la vía de reparación MMR y funge como sensor de apareamientos erróneos en el DNA de manera inmediata a la replicación. Cuando éste detecta un mal apareamiento de bases en el DNA, principalmente aquéllas originadas durante la replicación, como son los cambios de dC por dT, generándose un apareamiento erróneo G-T, así como pequeños IDL’s de no más de cinco nucleótidos, cambia ligeramente de conformación de manera que puede hidrolizar ATP y reclutar a MutL-Pms1. Mecanísticamente, el reconocimiento se da gracias al fenómeno de apilamiento de bases y aminoácidos aromáticos (mediante la fuertemente conservada fenilalanina 337 en Msh6 de *S. cerevisiae*, por ejemplo (Spampinato, C., P., *et al*, 2009)) y la interacción cercana con el esqueleto de fosfatos-azúcares y los dominios de unión al DNA en cada subunidad; MutS α se desliza sobre el DNA hasta que un mal apareamiento le permite formar dicho apilamiento y con ello, mediante su cambio de conformación, provocar una torsión de 60° en el DNA, aquí se afianza la interacción con la región y el MutS α no se desliza más, por cierto tiempo.

Las proteínas de la superfamilia MutS eucarionte se caracterizan por conservar la estructura secundaria mostrada en la figura 4, en la que se contienen estos cinco dominios, en orden N-terminal a C-terminal: el dominio I complementa la interacción del dominio IV con el DNA; el dominio II funge estructuralmente como conexión entre los dominios I y III; el dominio III, que se divide en dos partes, embebiendo al dominio IV, funciona como palanca entre los demás dominios y el V; el dominio IV es la base estructural de la abrazadera que interactúa directamente y de forma no específica con el DNA; y el dominio V actúa como a la vez como módulo de dimerización con otras proteínas MutS y como sitio de unión e hidrólisis de ATP (Edelbrock, M., A., et al, 2013).



Figura 4. Estructura secundaria típica de la superfamilia MutS. (<http://pfam.xfam.org/protein/P43246>)

En la MSH2 humana, el dominio I se encuentra entre los aminoácidos 1 y 124, cuya estructura secundaria es una mezcla de α hélices y β plegadas. En eucariontes, este dominio difiere del de procariontes en la cantidad de contactos que realizan al interactuar con DNA; mientras que el de procariontes forma múltiples contactos, el de eucariontes forma sólo un contacto con el DNA. El dominio II de hMSH2 abarca los aminoácidos 125 a 297 y también es una mezcla de α hélices y β plegadas. El hecho de encontrarse tridimensionalmente estrecha a los dominios III y V sugiere que está involucrado en señalamiento, además, gracias a la presencia de tres rizos superficiales no conservados en procariontes, se sospecha de su interacción con otras proteínas. El dominio III de hMSH2 se compone desde el aminoácido 300 hasta el 456 y del 554 al 619, y está conformado principalmente por largas α hélices, como la que separa el dominio IV del V, que está fuertemente conservado, y que parece servir de transductor de señales entre la actividad ATPasa, del dominio V, y la interacción con DNA, de los dominios I y IV. De forma contraria, el dominio IV de hMSH2 es principalmente β plegadas, además, se forma a partir del aminoácido 457 y termina en el 553, y realiza múltiples contactos no específicos con el DNA. Por último, el dominio V de hMSH2, comprendido entre los aminoácidos 620 y 855, contiene el dominio ABC-ATPasa que es la región más conservada

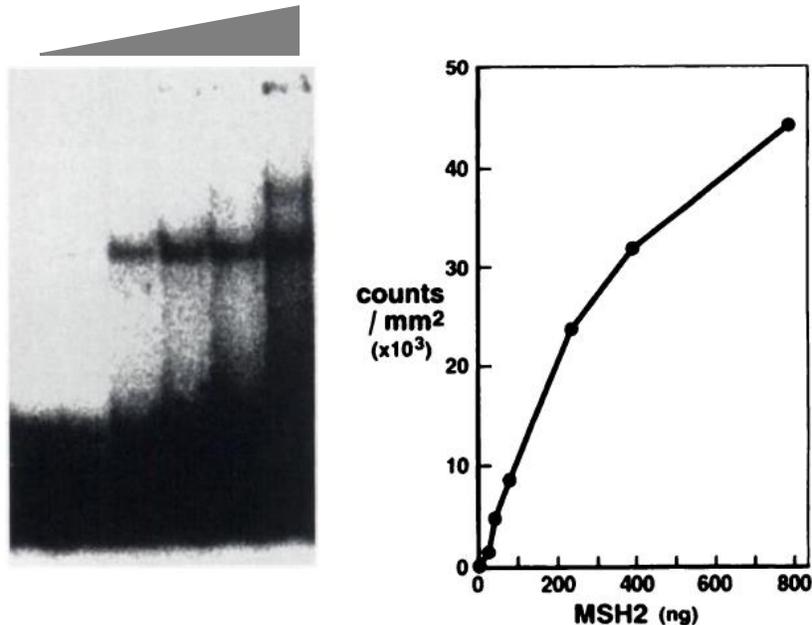
entre los homólogos MutS, además de un motivo hélice-vuelta-hélice que interacciona con el dominio V de otra MutS para dimerizarse (Warren, J., J., et al, 2007).

Antecedentes

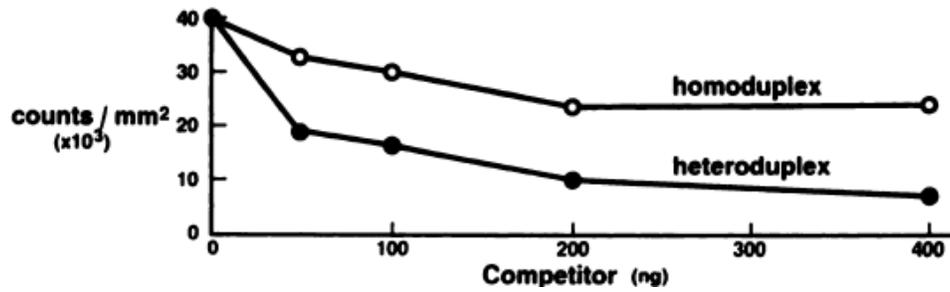
Richard Fishel y colaboradores demostraron *in vitro* que MSH2 humana es capaz de unirse por sí sola a mmDNA mediante ensayos tipo EMSA (Electro Mobility Shifting Assay), figura 6. Incubaron dicha proteína purificada con oligos de 39-pb marcados radiactivamente con ^{32}P y luego, mediante electroforesis, observaron el retardamiento creciente de la señal radiactiva al aumentar gradualmente la cantidad de proteína MSH2 presente.

En la figura 6 se muestran algunos experimentos en los que se observa la interacción de MSH2 por sí sola con DNA. La gráfica del panel A es la cuantificación de la señal radiactiva de la sonda retenida en complejo con MSH2 con la que calcularon que la unión del complejo aparenta ser cooperativa y que alcanza un 80% de saturación cuando la relación proteína:DNA es de 4:1. (Fishel, R., *et al*, 1994).

A)



B)



C)

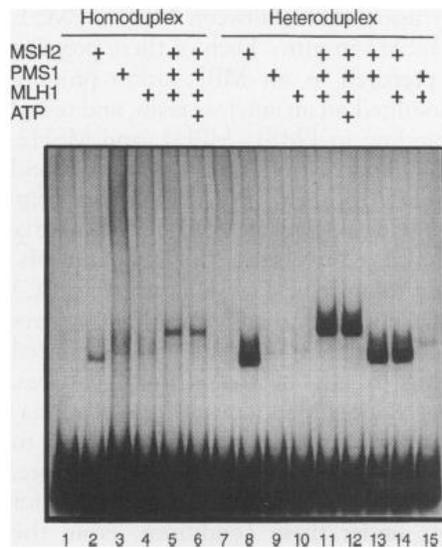


Figura 6. Experimentos antecedentes que muestran conclusiones paralelas entre sí sobre la afinidad de MSH2 por mmDNA y por DNA homoduplex. A) Ensayo de interacción MSH2 humana vs. mmDNA. Izq. Gel de cambio de retardamiento de sonda radiactiva con respecto al aumento de concentración de MSH2. Der. Cuantificación de la señal radiactiva retenida en complejo MSH2-mmDNA. B) Ensayo de competencia de sustrato en el que enfrentan al complejo proteína-DNA contra una sonda sin señal medible que provoca el decremento en la intensidad del complejo inicial: la curva heteroduplex cae más drásticamente que la homoduplex, indicando que hMSH2 tiene mayor afinidad por el mmDNA (Fishel, R., et al, 1994). C) ensayo tipo EMSA en el que en los carriles donde se enfrenta la sonda sólo contra ScMSH2 (carriles 2 y 8) se tiene una banda de mayor intensidad cuando la sonda contiene un mismatch (heteroduplex) (Prolla, T., A., et al, 1994).

De manera análoga, Niels de Wind y su equipo de trabajo encontraron que MSH2 de ratón tiene una mayor afinidad, por sí sola, a mmDNA con el apareamiento erróneo G.T, y a mmDNA

con una inserción dinucleotídica GT (extrahelical), que a otros tipos de *mismatch* y que a DNA homodúplex. En este experimento, incubaron extractos de líneas celulares *wild type* y *MSH2*^{-/-}, como control negativo, con sondas dsDNA de 38 pb marcadas radiactivamente y observaron mediante electroforesis la actividad de unión MSH2-mmDNA (Figura 7). Como control positivo del retardamiento de la sonda debido a la formación de un complejo con una proteína, incluyeron las incubaciones de los extractos de ambas líneas celulares con sonda marcada radiactivamente y que contenía la secuencia de unión de E2F. (de Wind, N., *et. al*, 1995).

Con el objetivo de determinar a mayor profundidad las propiedades de unión de los principales componentes de la vía MMR en eucariontes, MSH2-MSH6, MLH1-PMS1, a DNA, Drotschmann y colaboradores realizaron mutaciones puntuales en los genes *Msh2* y *Msh6* de *S. cerevisiae* para luego evaluar los pasos río abajo de la vía MMR, basándose en la estructura cristalina del homólogo bacteriano MUTS de *Thermus aquaticus*. Mediante la medición de la frecuencia de mutación empleando el gen *Lys2* (que es el inicio de la biosíntesis de lisina) con un apareamiento erróneo, los autores determinaron qué aminoácidos de MSH2 y MSH6

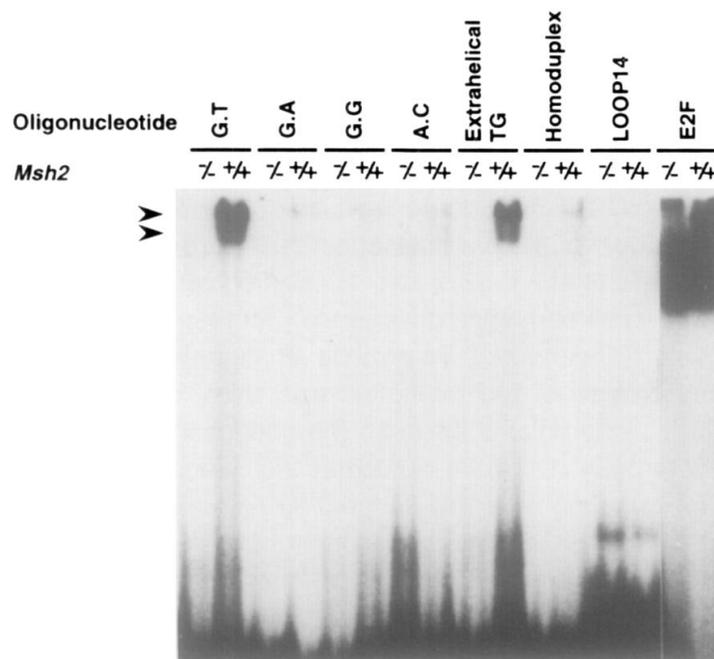


Figura 7. Afinidad de MSH2 por mmDNA específicos. En este ensayo de actividad de unión a mmDNA, al fondo se observa la sonda radiactiva sin interacción y, a la altura señalada por las flechas, el complejo MSH2-mmDNA. (de Wind, N., *et. al*, 1995).

representan mayor importancia en el sistema de reparación MMR. Corroborando tal información mediante ensayos tipo EMSA donde enfrentan MSH2-MSH6 contra DNA con y sin apareamiento erróneo y los respectivos complejos con MSH6 con mutaciones puntuales. Sus resultados sugirieron que varios aminoácidos interfieren en la interacción con el esqueleto de DNA (fosfatos y azúcares) cerca del apareamiento erróneo son críticos para la actividad de reconocimiento y posterior reparación. Dichos contactos aminoácido-DNA inducen el apilamiento base-fenilalanina (MSH6)-base (Figura 8) que permite la interacción principal de reconocimiento de apareamiento erróneo, además de puentes de hidrógeno entre MSH6 y la base mal apareada, estabilizando así la conformación torcida del DNA (~60°; Figura 8, arriba) que permite los siguientes pasos de reparación. Tal fenilalanina se encuentra en la posición 39 en MUTS de *T. aquaticus* mientras que su posición en MSH6 de *S. cerevisiae* es 337. Determinaron también que el complejo MLH1-PMS1 se une al DNA independientemente de apareamientos erróneos. En resumen, el modelo de reconocimiento de apareamientos erróneos por parte de MSH2-MSH6 y su homólogo bacteriano MUTS como inicio de la vía MMR que Drotschmann y colaboradores proponen es que el dímero avanza sobre el DNA buscando apareamientos erróneos probando cada sitio posible a que se tuerza; la facilidad de torsión mediada por el dímero indicará entonces que se ha encontrado un apareamiento erróneo (Drotschmann, K., *et al.*, 2002).

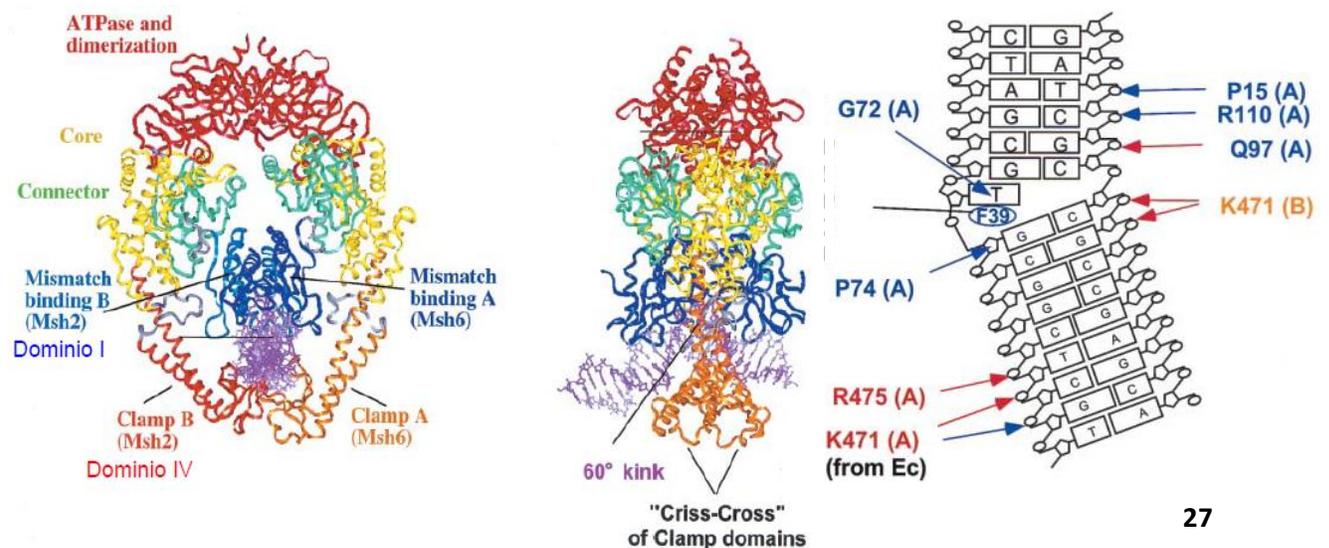


Figura 8. Estructura cristalizada de MUTS de *T. aquaticus* en complejo con DNA con un apareamiento erróneo y sus interacciones proteína-mmDNA (mismatched DNA). En colores los aminoácidos que hacen contacto de MUTS. Las flechas rojas indican interacciones Van der Waals, mientras que las azules son puentes de hidrógeno (Modificada de Drotchshman, K., *et al.*, 2002).

En la búsqueda por la vía MMR en eucariontes y sus similitudes con el equivalente en procariontes, Spampinato y colaboradores presentan alineamientos de las proteínas MSH2, MSH6 y MSH3 de *S. cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, y la MUTS de *E. coli* para encontrar los dominios conservados a través de la evolución. Según sus resultados *in silico* (Figura 9), se conservan fuertemente los cinco dominios principales de MUTS, especialmente el I y el V, quienes se encargan de unirse al apareamiento erróneo y a ATP, respectivamente. Además, la fenilalanina 39 de MUTS que se encarga de permitir la torsión de reconocimiento de la base no apareada, se encuentra en posiciones equivalentes de las proteínas homólogas analizadas (Spampinato, C., P., *et al.*, 2009).

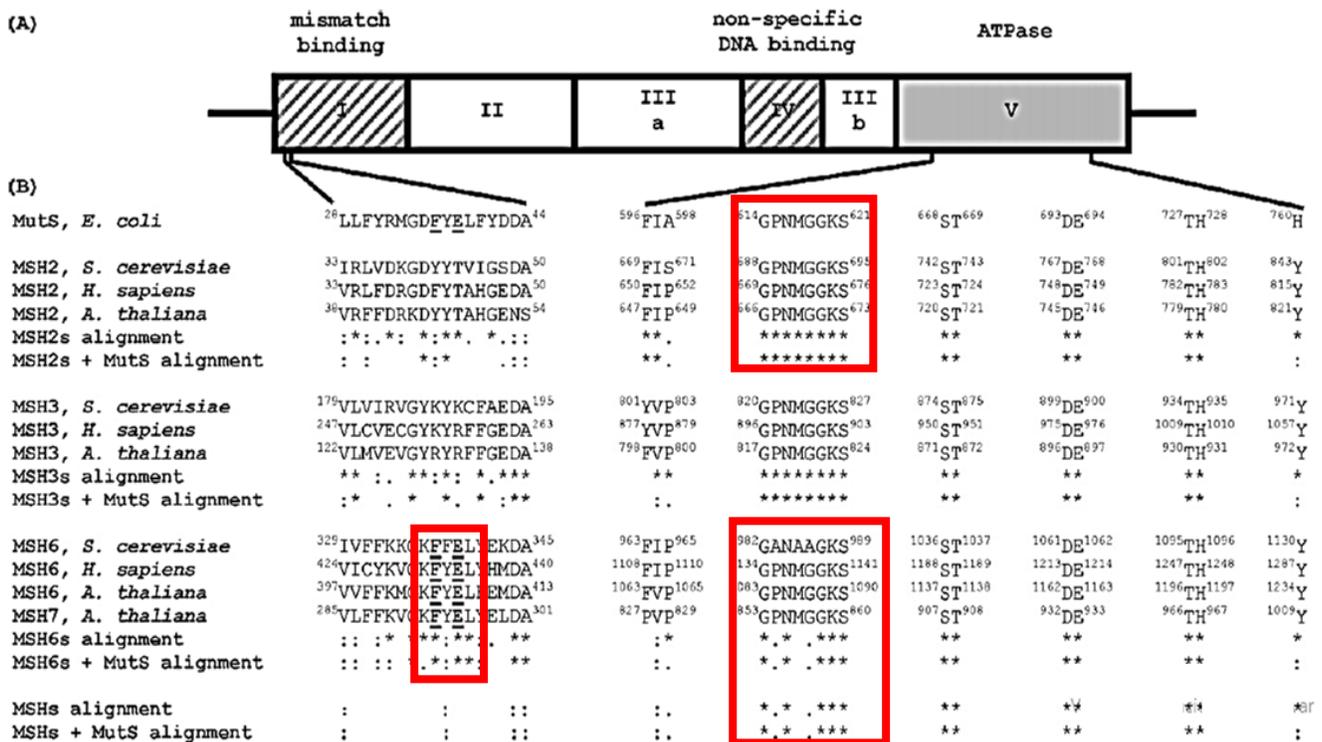


Figura 9. Dominios conservados entre la proteína MUTS de *E. coli* y las homólogas MSH2, MSH3 y MSH6 (Spampinato, C., P., *et al.*, 2009). En los recuadros rojos las regiones de gran similitud dentro de los dominios de relevancia.

Por otro lado, Ramesh y colaboradores, buscaron en el genoma de *G. duodenalis* genes específicos de la meiosis, y encontraron, entre otros, los genes putativos de la vía de reparación MMR, entre los cuales están MSH2 y MSH6 (MUTS α). Tal hecho tiene consistencia con el punto de acción de la vía MMR, que no se limita a reparar errores de replicación, sino que también frena la recombinación homóloga entre cadenas heterodúplex durante la meiosis hasta que las convierta en homodúplex; además del hecho de que *G. duodenalis* presenta una ploidía variante durante su ciclo de vida y varias recombinaciones “meióticas”, por lo que debe tener la maquinaria suficiente para dar fidelidad a dichos procesos. Ahora bien, gracias a sus ensayos *in silico* (alineamientos y creación de árboles filogenéticos), Marilee Ramesh en 2005, encontró que las proteínas MSH2 y MSH6 (MUTS α) de *S. cerevisiae* y de *G. duodenalis* se encuentran cercanamente relacionadas con otros organismos modelo, como el humano, donde la vía de reparación de apareamientos erróneos (MMR) esté caracterizada (figura 10).

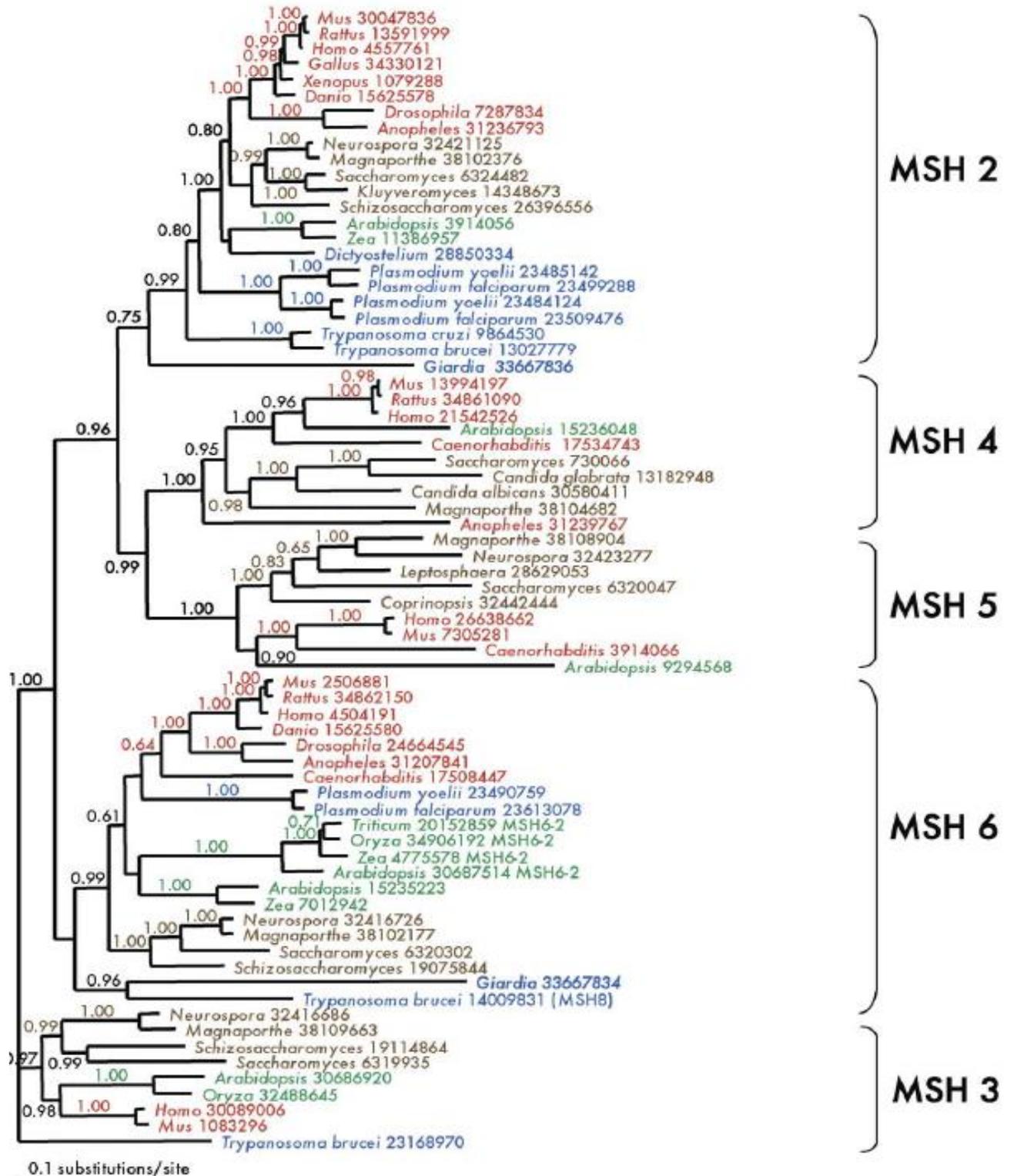


Figura 10. Relaciones filogenéticas entre homólogos de MutS entre eucariontes (Ramesh, M. A., *et al.*, 2005).

Justificación

La vía de reparación MMR ha sido ampliamente descrita, aunque aún se desconoce el papel de la actividad de unión/hidrólisis de ATP por parte del complejo MutS α . No obstante, la vía de reparación MMR no ha sido descrita en *G. duodenalis*. Investigar dicha vía en este organismo podría esclarecer las bases moleculares del sistema MMR eucariote, además de identificar posibles blancos terapéuticos para tratamiento de la giardiasis. Por otra parte, dada la ploidía variante de *G. duodenalis* durante su ciclo de vida, la vía MMR debe ser crucial para mantener la estabilidad genómica y viabilidad celular. Por lo tanto, es importante investigar la vía MMR este organismo.

Hipótesis

La proteína MSH2 es capaz de reconocer y unirse *in vitro* a DNA de manera semejante a sus homólogos bacterianos (MutS de *E. coli*) y homólogos eucariotes (MSH2 de *H. sapiens* y de *S. cereviceae*) de manera dependiente de ATP.

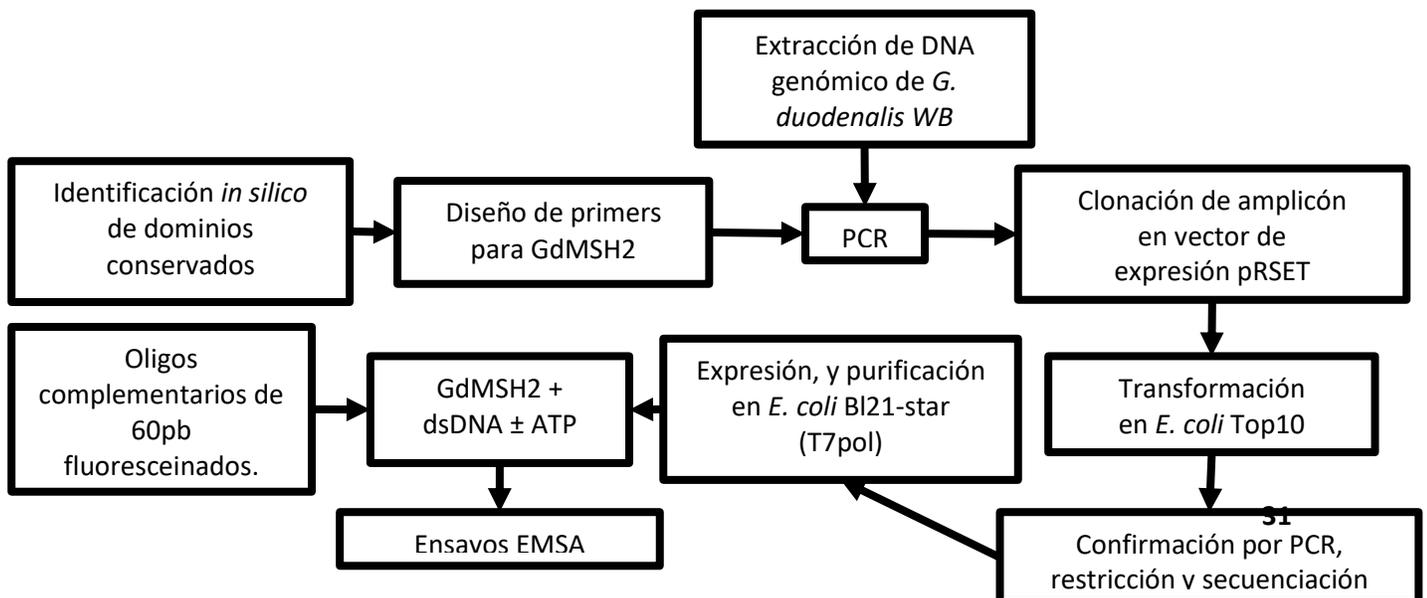
Objetivo

Caracterizar *in vitro* la proteína putativa MSH2 de *G. duodenalis*

Objetivos particulares

1. Identificación *in silico* de MSH2 putativa de *G. duodenalis*.
2. Clonación, expresión y purificación de GdMSH2.
3. Determinación de unión de GdMSH2 recombinante a dsDNA, con y sin ATP.

Estrategia Experimental



Metodología

Ensayos *in silico*

Se identificaron dominios conservados entre MSH2 de *G. duodenalis* y las proteínas homólogas en *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, donde la vía MMR ya haya sido caracterizada. Para ello se utilizaron las herramientas de búsqueda e identificación: BLAST de NCBI y base de datos del genoma de *Giardia* <https://giardiadb.org/giardiadb/>; y de alineamiento Clustal <https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/> y Esript3 <http://esript.ibcp.fr/ESript/ESript/>. La proteína GdMSH2 se modeló a través de I-TASSER <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/> para su comparación por solapamiento con las respectivas proteínas de *H. sapiens* y *E. coli* en Pymol.

Oligonucleótidos utilizados

El diseño de las construcciones plasmídicas fueron realizada mediante Vector NTI, de Thermo Fischer Scientific. Todas las reacciones PCR y los cebadores para éstas fueron diseñadas con Oligo 7, de Molecular Biology Insights, Inc. Los siguientes son los oligonucleótidos diseñados y utilizados para amplificar el gen GdMsh2 completo y otorgarle una región complementaria al vector pET100 para su clonación: gMsh2F, 5'TCATCATCATCATGGTATGGCTGGTACCATGGAGCAGCAGTGGG-3'; gMsh2R, 5'AGCAGCCGGATCGTTGAGCTTAAGTCAGGTTGCTTCACCAGCG 3'; y para verificar la ligación: M2pet-F2, 5'TAATACGACTCACT ATAGGG3'; M2pet-R2, 5' AGAAGGCGTAAAGATTCCCC 3'. Para el extremo 3' del gen, 5'ACCCTTGACAGCAGCCGAA3'; 5'TAGTTATTGCTCAGCGGTGG3'.

Para la clonación IVA, detallada más adelante, los oligonucleótidos diseñados y utilizados fueron los siguientes: Para el inserto GdMSH2: F2IVA, 5' GTGGATCCATGGAGCAGCAGTGGGCA 3'; R2IVA 5' CAAGCTTTCAGGTTGCTTCACCAGCG 3'; F2pRIVA, 5' CAACCTGAAAGCTTGATCCGGCTG 3'; R2pRIVA 5' GCTCCATGGATCCACCCTGGAAG 3'.

El oligonucleótido para secuenciar alrededor del nucleótido 1890 es: 5' GCCCTGGGTACAGCGAAGAA 3'.

Cultivo y Extracción de DNA genómico de trofozoitos *G. duodenalis*

Se inocularon axénicamente 90 µL de *G. duodenalis* en 15 mL de medio TYI-S-33 completo (+ 10% suero de ternera + 1 % antibiótico/antimicótico, HyClone® (modificación de Keister, D., B., 1983) para dejar crecer durante 1 día. Al observarse pastilla al fondo se incubó en hielo durante 30 minutos para despegar las células de la pared interna del tubo. Luego se centrifugó a 8,000 x g a 4°C durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el pellet celular tres veces resuspendiendo en 2 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH = 7.4). Se incubó la pastilla obtenida en 350 µL de buffer de lisis alcalina para *Giardia* (tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.4 %, proteinasa K 20 mg/mL, pH = 7.4) durante 16 horas a 65°C. En seguida se hirvió durante 10 minutos a baño María, se añadieron 2.5 µL de RNasaA (10 µg/mL) y se incubó a 65° C durante 1 hora. Añadido 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcla en vórtex hasta obtener una emulsión de consistencia lechosa. Luego se centrifugó a 14 krpm durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa. Para precipitar el material genómico se precipitó con 10 % de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, grado biología molecular, y se reposó durante ~12 horas a -20° C. Se centrifugó a 10 kG por 20 minutos a 4°C y se realizaron tres lavados con etanol 70%. La pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se resuspendió en 100 µL de agua libre de sales y nucleasas (MilliQ). El DNA obtenido se almacenó a -20° C.

Como control de integridad del material genómico obtenido, se llevó a cabo una electroforesis del mismo en un gel de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X (0.0445 M Tris, 0.0445 M ácido bórico y 0.001 M EDTA). Además, para comprobar que el DNA genómico fuera de calidad suficiente para amplificar secuencias, se llevó a cabo una PCR dirigida al gen PDI-1 con los siguientes cebadores: PDI-F 5' ACTCCTCTGCTCCTTGTG 3'; PDI-R 5' CTCCTTCGCTGCTTTCAC 3'. El tamaño esperado del amplicón es de 423 pb y las condiciones de la PCR son las siguientes:

Desnaturalización inicial	94° C, 5'	} 30 ciclos
Desnaturalización	94° C, 30''	
Alineamiento	55° C, 30''	
Extensión	72° C, 30''	
Extensión final	72° C, 7'	

Incubación

4° C, ∞

Amplificación y clonación del gen putativo Gdmsh2 a partir de DNA genómico de *G. duodenalis*

A partir de las secuencias depositadas en GDB (<http://giardiadb.org/giardiadb/home.do>), se diseñaron los cebadores dirigidos al gen ortólogo putativo Gdmsh2 para su amplificación por PCR PHUSION High-Fidelity PCR Master Mix (NEB®, #M0531). La secuencia del gen mencionado se obtuvo a partir de la búsqueda BLASTp en dicha base de datos utilizando la secuencia de *H. sapiens* y *S. cereviceae* por separado.

Condiciones de la amplificación de Gdmsh2 con complementariedad a pET100:

Reactivos	volumen
2X Phusion® Master Mix	75 µL
gMsh2F, 10 µM	7.5 µL
gMsh2R, 10 µM	7.5 µL
DNA genómico, 100ng	3 µL
Agua MilliQ	hasta 150 µL

Desnaturalización inicial	98° C, 30''	} 5 ciclos
Desnaturalización I	98° C, 10''	
Alineamiento I	58° C, 30''	
Extensión I	72° C, 1.5'	
Desnaturalización II	94°C, 30''	} 30 ciclos
Alineamiento y extensión II	70° C, 2'	
Extensión final	72° C, 10'	
Incubación	4° C, ∞	

Posteriormente, para su clonación en pET100, el amplicón se purificó mediante electrodiálisis a partir de la banda correspondiente a 2.9 kb cortada del gel de electroforesis preparativo (agarosa 1%) en TBE 0.5X. Al tampón con el amplicón eluído se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 5 % de glicerol, para dejar reposar durante ~12 horas a -20° C. Luego se centrifugó a 10 kG durante 15 minutos a 4° C y se desechó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados agregando etanol 70 % y centrifugando a 10 kG durante 5 minutos. Al retirarse el sobrenadante restante, se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió en 30 µL de agua desionizada y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Para la preparación del amplicón utilizado en la clonación IVA en pRSET, bastó con emplear directamente el producto fresco de PCR (empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion, de NEB®, #M0530S), cuyas condiciones fueron:

Reactivos	volumen	
Buffer 5X	50 µL	
dNTP's mix	5 µL	
F2IVA, 10 µM	12.5 µL	
R2IVA, 10 µM	12.5 µL	
Polimerasa Phusion®	2.5 µL	
DNA genómico	5 µL	
Agua MilliQ	hasta 250 µL	
Desnaturalización inicial	98° C, 30''	
Desnaturalización	98° C, 10''	} 35 ciclos
Alineamiento	58.9° C, 30''	
Extensión	72° C, 1.75'	
Extensión final	72° C, 7'	
Incubación	4° C, ∞	

La concentración del amplicón de 2.9 kb se midió a través de espectrofotometría con un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

En el caso de los amplicones obtenidos para IVA clonig no hubo necesidad de purificación pues según la misma técnica de ligación, los productos de PCR se usan frescos.

Defosforilación del producto de PCR pRSET

Para dar lugar a la ligación inserto-vector en el IVA clonig, se sometió a defosforilación al producto fresco de PCR del vector pRSET inmediatamente anterior descrito. Para ello, se suspendió el amplicón en buffer 1X (a razón de 0.5 µg/5µL) para después agregar 0.5 unidades de CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal, M0290S, NEB®) por cada µg de DNA. En seguida, la reacción se incubó a 37° C durante 1 hora y finalmente se precipitó el DNA resultante: se agregó 5 % de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100 % grado biología molecular y se incubó a -20° C durante 2 horas, luego se centrifugó a 14.5 krpm durante 30 minutos para después lavar la pastilla de DNA con 20 µL de etanol al 70 %, dos veces, centrifugando a 13 krpm durante 7 minutos. Al final, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en

10 µL de agua desionizada. Se estimó la cantidad de vector defosforilado resultante mediante espectrofotometría como se indica a continuación:

Amplicón	ng/µL	260/280	260/230
Gdmsh2	617.05	1.41	0.59
pRSET	642.5	1.44	0.62
*pRSET	18.7	1.36	0.42

Tabla 4. Cantidad estimada de DNA (para construir pRSET_Gdmsh2) producto de PCR e índices de calidad (presencia de interferentes proteínicos, azúcares, componentes aromáticos, etc.) obtenidos en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). *pRSET es el producto defosforilado.

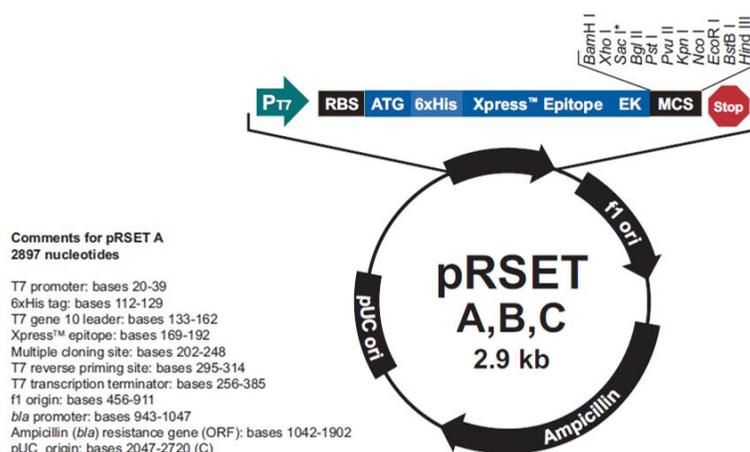


Figura 12. Mapa general del vector pRSET (Invitrogen) en su forma comercial (Invitrogen, Life Technologies. 2010. User Manual).

Preparación de bacterias competentes, cepas de preservación de plásmido y de expresión

Químico-competentes (Hanahan protocol, Sambrook, J., Russel, D., W., 2006)

Se estrió una pequeña alícuota de células *E. coli* XL1-BLUE (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*) y otra de TOP 10 (*F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk λ– rpsL(StrR) endA1 nupG*) de forma paralela, en medio LB sólido y se incubó a 37° C durante toda la noche. Con una asada de este cultivo se inoculó medio LB (3 mL) líquido para generar el cultivo semilla que se dejó crecer durante toda la noche a 37° C. Después se inocularon 100 mL de medio LB líquido con 1 mL del cultivo semilla ya crecido y se dejó crecer a 37° C hasta alcanzar una

densidad óptica a 600 nM (OD₆₀₀) entre 0.5 y 0.7, que es cuando se encuentran en fase de crecimiento exponencial. Se reposó en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 3.5 krpm durante 10 minutos a 4° C. El pellet bacteriano se resuspendió en 33.3 mL de buffer TFB I (C₂H₃O₂K 30 M, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, 15 % glicerol, pH = 5.8. Se esterilizó mediante filtrado) y se centrifugó con las mismas condiciones. El pellet fue después resuspendido en 1 mL TFB II (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM, 15% glicerol, pH = 6.5. Se esterilizó mediante filtrado) y se reposó durante 15 minutos. Por último, se repartió todo el cultivo en alícuotas de 50 µL sobre hielo seco (<-70° C) y se almacenaron en ultracongelador (-80° C).

**Electro-competentes (Alonso-Stepanova protocol,
alonsostepanova.wordpress.ncsu.edu)**

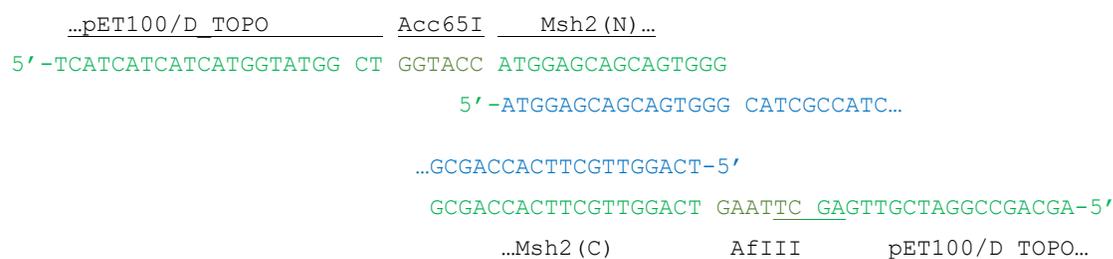
Se comenzó creciendo un cultivo de las cepas de interés: TOP 10, BL21 STAR y BL21-43 a partir de la inoculación de una asada de las mismas en 3 mL de medio LB, incubándose a 37° C durante alrededor de 16 horas. 1 mL de este cultivo semilla obtenido fue inoculado en 100 mL de LB e incubado a 37° C hasta alcanzar OD₆₀₀=0.8. Se enfriaron después los tubos en hielo para luego centrifugarse a 5 krpm durante 10 minutos a 4° C. El pellet bacteriano obtenido al decantar el sobrenadante fue lavado mediante su resuspensión en 100 mL de agua MilliQ estéril fría y centrifugación a 5 krpm durante 10 minutos a 4° C. Un segundo lavado similar se llevó a cabo pero ahora con 50 mL de agua MilliQ estéril fría y su posterior centrifugación a 5 krpm durante 15 minutos a 4° C. El pellet resultante se resuspendió en 20 mL/1 L de cultivo de glicerol al 10 % frío y se centrifugó a 10 krpm durante 15 minutos a 4° C. Por último, este nuevo pellet fue resuspendido en 4 mL/1L de cultivo de glicerol al 10% frío y se alicuotó de a 40 µL para su almacenamiento a -80° C.

Una alícuota de cada cepa fue transformada con pUC18 para calcular la eficiencia de transformación mediante la ecuación:

$$\epsilon(\text{CFU}/\mu\text{gDNA}) = \left(\frac{\text{CFU}}{\text{pgDNA}} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{V_{\text{medio}} + V_{\text{bacterias}}}{V_{\text{inóculo}}} \right)$$

Clonación de Gdmsh2 en vector de expresión pET100 y transformación

Para insertar GdMsh2 en el vector pET100 se realizó la ligación isotérmica o de Gibson (Gibson, *et al*, 2009), por ser una alternativa a la ligación dirigida mediante restricciones, pues entre el gen Gdmh2 y el vector pET100, en su forma disponible en el laboratorio, no existen sitios de restricción compatibles que la permitan. Consiste en una reacción a 50° C para unir moléculas de DNA que contienen regiones de alrededor de 20 pb de homología a través de la acción de una exonucleasa 5'-3', una DNA polimerasa y, por último, una DNA ligasa (Figura 13). Las regiones de complementariedad y los sitios de restricción elegidos se integraron mediante los oligos con los que se amplificó el gen, como puede observarse en el siguiente esquema:



Para llevar a cabo la ligación se empleó una proporción 3:1 de inserto:vector. Los componentes y cantidades de la reacción son: 7 µL de los fragmentos a ligar y 15 µL del buffer de reacción de Gibson (80 µL 5X de buffer contienen: Exonucleasa T5 10 U/µL (Epicenter®, #T5E4111K), polimerasa Phusion®2 U/µL (NEB®, #M0530S) y Taq DNA ligase 40 U/µL (NEB®, M0208L)). Se incubó esta mezcla durante 1 hora a 50 ° C. De los 22 µL de reacción, uno es utilizado para la PCR de verificación de ligación, descrita más adelante. El resto fue empleado para transformar una alícuota de *E. coli* XL1-BLUE químicamente competente agregándolo a una alícuota de las células competentes de 50 µL. Se incubó en hielo durante 30 minutos, luego se incubó a 42° C durante 1 minuto y se regresó a hielo durante 2 minutos más para completar el shock térmico. En área estéril (al mechero), se agregaron alrededor de 4 volúmenes de cepa (250 µL) de medio LB y se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora como método de recuperación de las células y de expresión del caset de resistencia a antibiótico selector (ampicilina). Al término de esta incubación, se inocularon 150 y 200 µL, en

esterilidad, de cultivo transformante en cajas Petri con medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 mg/mL) y se le permitió crecer incubando a 37° C durante ~16 horas.

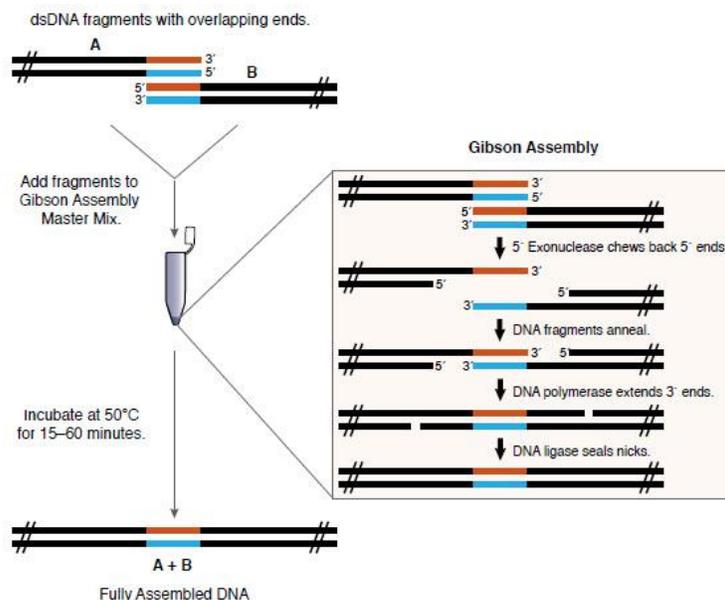


Figura 13. Esquematación de la ligación isotérmica o de Gibson.

Para comprobar que la ligación tuvo lugar y se dio correctamente y asegurar su posterior transformación, se realizaron PCR dirigidas a los extremos 5' y 3' del gen empalmado una región del vector adyacente a éstas que generara amplicones de alrededor de 500 pb, empleando la DNA polimerasa estándar (EP0402, NEB).

Reactivos	volumen
Buffer 10X	2.5 µL
MgCl ₂ , 25 mM	1.8 µL
dNTP's mix	0.5 µL
2.5F/R, 10 µM	1.25 µL
2.3R/R, 10 µM	1.25 µL
Taq. Pol.	0.125 µL
DNA (reacción Gibson)	10 µL
Agua MilliQ	hasta 25 µL

Desnaturalización inicial	94° C, 5'	} 28 ciclos
Desnaturalización	94° C, 30''	
Alineamiento	56.5° C, 30''	
Extensión	72° C, 35''	
Extensión final	72° C, 5'	

Incubación 4° C, ∞

Clonación IVA (García-Nafría, J., 2016): Gdmsh2 en pRSET

Esta técnica se vale de la propia maquinaria de recombinación de las bacterias: se les proveen fragmentos de DNA con regiones complementarias en los extremos para que dichas maquinarias las ligen y se obtenga la construcción deseada. En la figura 14 se describe esquemáticamente el procedimiento de esta ligación.

A diferencia de García-Nafría, en este caso, los fragmentos a ligar (vector y gen) fueron amplificados por separado, como se describió anteriormente, y luego de ser defosforilado el vector, se agregaron ambos insertos en una proporción 1:15 vector:inserto a una alícuota de 50 µL de *E. coli* TOP10 competentes para transformar por shock térmico. Se agregaron 350 µL de LB al vial y se mantuvo en agitación a 37° C durante 1 hora. En seguida, con una alícuota de 200 µL se sembró una caja Petri con LB con ampicilina para dejar crecer durante toda la noche a 37° C. Por último, se crecieron cultivos de algunas de las colonias obtenidas en LB con 100 µg/ml de ampicilina para buscar y analizar la presencia de la construcción deseada mediante PCR y digestiones enzimáticas.

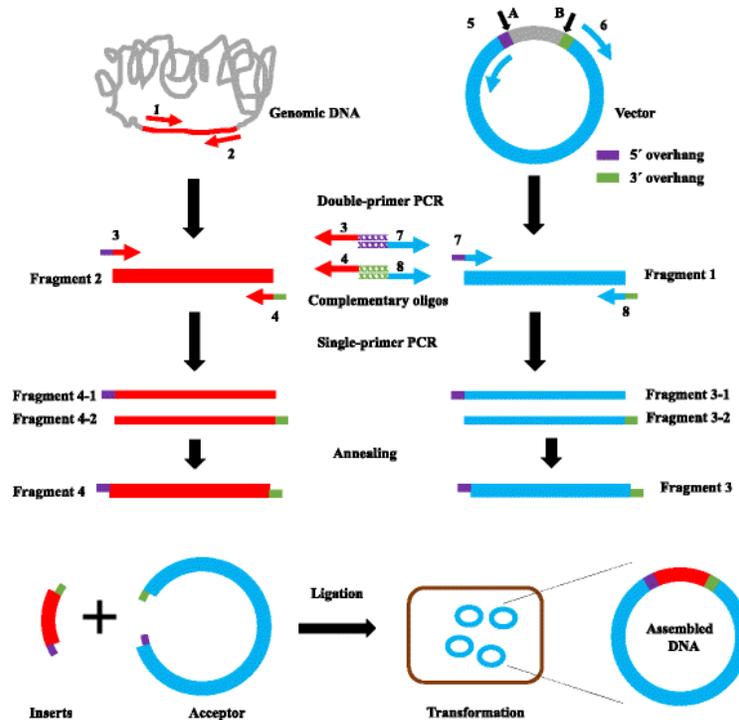


Figura 14. Estrategia general del ensamblaje en vivo (Zeng, F., et al, 2017).

Extracción de plásmidos

Según el tiempo disponible y la calidad necesaria de las preparaciones de plásmido extraído para los diferentes experimentos, se realizaron dos tipos de extracciones:

EasyPrep (Berghammer, H., Auer, B., 1993)

Con una asada de las colonias transformantes seleccionadas se inocularon 3 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 mg/mL) y se incubó a 37° C con agitación durante alrededor de 16 horas. En seguida, se centrifugó el medio crecido a 14.5 krpm durante 1 minuto para obtener el pellet bacteriano que fue luego resuspendido en buffer de lisis y reposado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego fue hervido durante 1 hora a baño maría para ser incubado después en hielo durante otro minuto. Por último, se centrifugó a 14.5 krpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante que fue almacenado a -20° C (Sambrook, J., 1989). En seguida, para mejorar el producto obtenido de este procedimiento, se precipitó doblemente el DNA mediante fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), en la que luego de emulsificar la muestra con un volumen de este, se centrifugó a 13 krpm durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa que fue tratada con 10 % de glucógeno 10 % y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado biología molecular) para dejar precipitando el DNA a -20° C durante aproximadamente 2 horas. En seguida se centrifugó a 14.5 krpm durante 30 minutos y se lavó tres veces la pastilla con 350 µL de etanol al 70 % centrifugando a 13 krpm durante 5 minutos. Por último, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua MilliQ.

MiniPreparación de plásmido

En base a la técnica descrita por Sambrook y colaboradores en 1989, comenzado con la inoculación de 3 mL medio LB adicionado con ampicilina (100 mg/mL) con una asada de las colonias transformantes seleccionadas. Se centrifugó a 13 krpm durante 45 segundos y se decantó el sobrenadante. Al pellet bacteriano se le resuspendió en 300 µL de buffer STET (8 % sacarosa, 5 % tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH = 8). Fue nuevamente centrifugado bajo las mismas condiciones y la pastilla obtenida fue resuspendida en 300 µL de STET, a lo que se añadieron 25 µL de lisozima (10 µg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego fue hervido durante 2 minutos y se colocó inmediatamente en hielo durante 1 minuto. Después se centrifugó a 13 krpm durante 10 minutos y se recuperó el

sobrenadante al que se le agregó 4 μL de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 65° C durante 25 minutos. Posteriormente se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta obtener una emulsión de apariencia lechosa. Se centrifugó a 13 krpm durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa que fue tratada con 10 % de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado biología molecular) para dejar precipitando el DNA a -20° C durante aproximadamente 2 horas. En seguida se centrifugó a 14.5 krpm durante 30 minutos y se lavó tres veces la pastilla con 350 μL de etanol al 70 % centrifugando a 13 krpm durante 5 minutos. Por último, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua MilliQ. Cada preparación fue cuantificada y caracterizada mediante los índices de control de calidad arrojados por Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). (Sambrook, J., 1989).

Secuenciación (Big Dye Terminador, Applied Biosystem)

Se mezcló 1 μL del cebador correspondiente (10 μM) con al menos 500 ng de DNA purificado y desalado en una matriz de agua MilliQ que afore a 12 μL . En seguida, se incubó la mezcla durante 5 minutos a 72° C y luego a 22° C durante otros 5 minutos. Luego se agregaron 4 μL de buffer y 4 μL de Mix Big Dye; se sometió a vórtex unos segundos y se centrifugó ligeramente para reunir todo el volumen en la parte inferior del tubo. A continuación se llevó a cabo una PCR con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	96° C, 5'	} 25 ciclos
Desnaturalización	96° C, 10''	
Alineamiento	58° C, 5'	
Extensión	60° C, 4'	
Extensión final	72° C, 7'	
Incubación	4° C, ∞	

Al producto de esta reacción se le añadieron 5 μL de EDTA 125 μM , pH=8, y 60 μL de etanol 100 % grado biología molecular. Se sometió a vórtex unos segundos y se centrifugó ligeramente para reunir todo el volumen en la parte inferior del tubo. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para luego centrifugarla a 24 krpm durante 20 minutos a 4° C. el sobrenadante fue desechado empleando una micropipeta para evitar perder el DNA. Este fue lavado tres veces con 250 μL de etanol al 70 % y centrifugado 13.5 krpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de DNA se dejó secar en el tubo a

temperatura ambiente. Así, este producto fue entregado en el secuenciador (AB310 de Applied Biosystems) para ser leído. Los resultados de estas lecturas pueden observarse en la sección de resultados.

Expresión de GdMSH2 recombinante

Los extractos de las transformantes que resultaron positivas en todas las pruebas anteriores fueron utilizados para transformar *E. coli* BL21-star, SOLU-BL21 o BL21-43 como se mencionó anteriormente. Una vez crecidas las transformantes en medio Lb sólido adicionado con ampicilina (100 mg/mL) se tomó una asada de una de ellas y se inoculó 3 mL (o al menos el 10 % del volumen de cultivo a inducir) de medio LB líquido adicionado con ampicilina (100 mg/mL) como cultivo semilla que se dejó crecer a 37° C con agitación durante alrededor de 16 horas. En seguida se inoculan 10 mL de medio LB líquido + Amp con 1 mL de cultivo semilla crecido, y se incubó a 37° C con agitación hasta alcanzar $0.5 < OD_{600} < 0.8$. Alcanzada la densidad óptica óptima, el cultivo fue dividido en 2 partes: una de 2 mL en el que no se indujo la expresión, y otra de 8 mL al que se le agregaron las diferentes concentraciones de inductor (IPTG) a probar. En ese momento fue tomada la primera muestra (1 mL) de ambas partes del cultivo, siendo este el tiempo 0 horas. Después de 1, 2, 4 y 6 horas post-inducción, fueron tomadas muestras de 1 mL sólo del cultivo inducido a la expresión. Al final, todas las muestras fueron centrifugadas a 14.5 krpm durante 45 segundos y se desechó el sobrenadante. Los pellets bacterianos obtenidos fueron resuspendidos en 200 µL de buffer Laemmli 2X (que es la dilución en 12.5 % de β-mercaptoetanol y 1.38 volúmenes de agua MilliQ, del 5X: 250 mM Tris-HCl pH = 6.8, 10 % SDS, 20 % glicerol) y almacenados en congelador -20° C.

Purificación de GdMSH2

Columna agarosa-níquel (cromatografía de afinidad química)

Determinado el tiempo óptimo de expresión y la concentración óptima de IPTG, se repite el cultivo pero ahora en 500 mL de LB con ampicilina (100 mg/mL) que después de la incubación, es centrifugado para recolectar las bacterias. Estas se resuspendieron en 6.25 mL de buffer A1 (1X Buffer de lisis (300 mM Tris, pH = 7.5, 2 M NaCl, 20 mM MgCl₂), 30 mM imidazol, 800 µM PMSF, 3.4 mM β-Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2mM benzamidina, pastilla COMPLETE

(coctel de inhibidores de proteasas)) para sonicar 10 veces a 100 % de potencia durante 5 segundos entre descansos de 35 segundos. En seguida se centrifugó el lisado crudo a 18 kG durante 40 minutos a 4° C para colectar el sobrenadante que después fue filtrado con una membrana con tamaño de poro de 0.22 μ M. Lo obtenido, extracto total (ET) fue añadida a una columna con perlas de agarosa-níquel equilibrada con buffer A1 a 4° C. La fracción no unida (NU) fue almacenada para su posterior visualización por western blot, como se muestra en resultados. Las perlas fueron entonces lavadas con 7 mL de buffer A1 y la elución recolectada también fue almacenada y etiquetada como primer lavado (L1). Un segundo lavado se llevó a cabo agregando a las perlas 7 mL de buffer A2 (1X buffer de lisis, 50 mM imidazol, 800 μ M PMSF, 3.4 mM β -Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM benzamidina, pastilla COMPLETE (coctel de inhibidores de proteasas)); esta elución se almacenó y etiquetó como segundo lavado (L2). Por último, la proteína se eluyó de la columna haciendo fluir 10 mL de buffer B (1x buffer de lisis, 300 mM imidazol, 800 μ M PMSF, 3.4mM β -Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM benzamidina, pastilla COMPLETE (coctel de inhibidores de proteasas)). Del flujo eluído se recuperaron 10 muestras de 1 mL cada una. Todas las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80° C hasta necesitarlas para su visualización por western blot.

Método de enriquecimiento

De forma similar al procedimiento anterior, comenzando con la producción y extracción de la proteína GdMSH2, a partir de un cultivo de BL21 STAR de 500mL al que se le indujo la expresión de GdMSH2 durante 6 horas y con 1 mM de IPTG, se obtuvo un pellet bacteriano que fue resuspendido en 6.25 mL de buffer de lisis 1X (300 mM Tris, pH = 7.5, 2 M NaCl, 20 mM $MgCl_2$), 30 mM imidazol, 800 μ M PMSF, 3.4 mM β -Mercaptoetanol, 300 mM NaCl, 2 mM benzamidina, pastilla COMPLETE (coctel de inhibidores de proteasas)) para luego ser lisado a 100 % de potencia 10 veces durante 5 minutos con descansos de 35 minutos. Se centrifugó entonces a 15 krpm durante 40 minutos a 4° C y luego el sobrenadante se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 μ M. Lo obtenido hasta aquí se le etiquetó como extracto total (ET) y una alícuota del mismo se reservó para el western blot de verificación de purificación.

El extracto total fue concentrado mediante membranas de tamaño de poro de 50 kDa empleando viales Microcon® (MILLIPORE) en los que se centrifugó a 7.5 kg durante 20 minutos a 4° C. En seguida se lavó la membrana tres veces con buffer de lisis 1X para finalmente resuspender el pellet obtenido en 500 µL del mismo buffer.

El extracto concentrado fue cargado a un gel PAGE 10 % después de agregársele 100 µL de Laemmli 2X y someterlo a baño maría durante 5 minutos. Se llevó a cabo la electroforesis de la muestra aplicando un campo de 130 V durante 1.5 horas. A continuación, se cortó longitudinalmente la porción del gel entre 100 y 130 kDa, donde GdMSH2 debió haber migrado, y se introdujo en membranas Spectrum® (60 kDa) en las que también se añadieron 400 µL de buffer de electroforesis. Las membranas con buffer y el trozo de gel fueron sometidas a electroforesis bajo un campo de 130 V durante 1 hora, orientando el trozo de gel lo más cercano al ánodo de la cámara. Terminado este procedimiento, se recuperaron alrededor de 1250 µL del buffer de las membranas.

El buffer de electroforesis enriquecido con GdMSH2 fue nuevamente concentrado en los viales Microcon® (MILLIPORE) de tamaño de poro de 50 kDa centrifugándolo a 7.5 kG durante 20 minutos a 4° C. Después, para desalar la muestra, se lavó la membrana tres veces con buffer de T150 (Tris-HCl 20 mM, pH = 7.5, EDTA 0.4 nM, KCl 0.15 M) para finalmente resuspender el pellet obtenido en 250 µL del mismo buffer. Se alicuotó el resultante en unidades de 50 µL que se almacenaron a -80° C.

Paralelamente, un cultivo sin transformar de la misma cepa, fue sometido al mismo tratamiento para utilizarlo como blanco en los ensayos siguientes.

Cuantificación de proteína (reactivo Bradford)

Una curva patrón, por duplicado, se preparó de la siguiente manera:

Puntos de la curva	Agua (µL)	BSA 1µg/µL (µL)	R. Bradford (1:5) (µL)
0	30	0	180
1	29	1	180
2	28	2	180

3	27	3	180
4	26	4	180
5	25	5	180
6	24	6	180

Las muestras tanto del cultivo sin transformar como del inducido fueron preparadas, por duplicado, de la siguiente manera: a 5 μL de muestra se le añadieron 25 μL de agua y 180 del reactivo de Bradford (1:5 en agua).

Tanto las curvas patrón como las muestras fueron leídas en un lector de ELISA Original Multiskan Ex® de Thermo Scientific. Así, se obtuvo que para la curva patrón se describe con la expresión:

$$ABS = 0.359 + (0.127) \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \text{ de GdMSH2} \right)$$

Con un índice de confianza $R^2 = 0.951$. De esta manera, se determinó que la muestra del cultivo sin transformar contuvo 0.165 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, mientras que la muestra inducida 1.453 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para conocer la cantidad neta de GdMSH2 en la muestra del cultivo inducido y purificado, se le restó el valor blanco de la muestra sin transformar, con lo que se obtuvieron 1.288 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de GdMSH2 purificada.

Inmunodetección en fase sólida (*western blot*)

Los perfiles de expresión fueron apreciados mediante tinción Coomassie e inmunodetección en fase sólida empleando la técnica de electroforesis SDS-PAGE (al 7 %) cargando 40 μL de muestra. Para la tinción, el gel fue sumergido y con agitación en solución Coomassie durante 30 minutos. Luego se incubó en solución desteñidora (25 % metanol, 12.5 % ácido acético) durante 30 minutos 3 veces. Por último, se almacenó en agua bidestilada. Para la inmunodetección se comenzó transfiriendo las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. La membrana fue incubada en leche al 5 % en TBS-T durante 1 hora con agitación como bloqueo de inespecificidades. En seguida, se lavó tres veces por inmersión en TBS-T con agitación durante 5 minutos. Se incubó después la membrana en 2 mL de una solución 1:7000 de anticuerpo específico de la etiqueta

de seis histidinas, añadido por los vectores pET100 o pRSET a GdMSH2 en el extremo amino terminal, durante una hora y se realizaron los tres respectivos lavados de cinco minutos en TBS-T. La membrana fue ahora enfrentada a alrededor de 15 mL de solución 1:30000 de anticuerpo anti-ratón durante 1 hora con agitación; fue lavada de la misma forma. Se dejó secar y se revelaron placas fotográficas de la membrana a través de su reacción con luminol.

Preparación de sondas de DNA (homoduplex) fluoresceinado

Los oligos empleados son complementarios entre sí:

EMSA60.R Marcado con 6-FAM (6 carboxi fluoresceína) en 5':

*5' TAATACAAAATAAGTAAATGAATAAACAGAGAAAATAAAGTAAAGGATATAAAAAATGAA 3'

EMSA60.F Complementario:

5' TTCATTTTTTATATCCTTTACTTTATTTTCTCTGTTTATTCATTTACTTATTTTGTATTA 3'

Se hibridaron agregando cantidades equimolares de cada uno e incubando a 90°C durante 5 minutos y luego dejándose enfriar a temperatura ambiente. Se almacenan en -20°C.

Ensayo de interacción GdMSH2-DNA tipo EMSA

Para cada reacción de 20 µL se añadieron los siguientes reactivos, comenzando con el mix de reacción, luego el agua y al final la proteína:

Mix:	Tris/DDT, 10X	2 µL	Agua MilliQ (µL)	GdMSH2 (µL)	GdMSH2 (mM)
	MgCl ₂ , 100 mM	1 µL	13.9	0.0	0.0
	ATP, 20 mM	1 µL	12.74	1.16	0.6
	BSA, 2 mg/mL	1 µL	12.15	1.75	1
	Glicerol, 100 %	1 µL	11.51	2.33	1.3
	dsDNA, 2X10 ⁻⁶	1 µL	9.24	4.66	2.6

Una vez preparadas las reacciones, se incubaron a 37° C durante 1 hora. En seguida, fueron cargadas a un gel de poliacrilamida (38:1) nativo al 4 % que se sometió a un campo de 140 V durante 20 minutos. Terminada esta electroforesis, los geles fueron fotodocumentados mediante el programa Image Studio (Li-cor®) a través de un lector de fluorescencias Odyssey FC (Li-cor®) ajustando la lectura a 600 nm.

Resultados

Identificación y caracterización *in silico* de Gdmsh2 putativo de *G. duodenalis*.

Para resolver el primer objetivo particular, se comenzó por obtener la secuencia del gen putativo GdMsh2 de *G. duodenalis* reportado por Marilee Ramesh en el 2005 (GenBank AY295098.1) y las realización de una rutina BLASTp en la base de datos *Giardia* Database ingresando las secuencias de MSH2 de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*, obteniéndose el gen “GL50803_113252” en *Giardia* Database con una longitud de 2.892kb y ubicándolo en el cromosoma 5 entre las bases 4,043,600 y 4,046,491. Codifica en la cadena complementaria y no contiene intrones (Figura 15). Mediante estas mismas bases de datos se verificó la presencia de los dominios conservados que la acreditan como una MSH2 putativa, siendo de relevancia la presencia del dominio IV de unión a DNA, y el dominio V de ATPasa. Dichos dominios y su conservación entre especies fueron verificados mediante el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las respectivas proteínas de *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y *E. coli* (Figura 16).

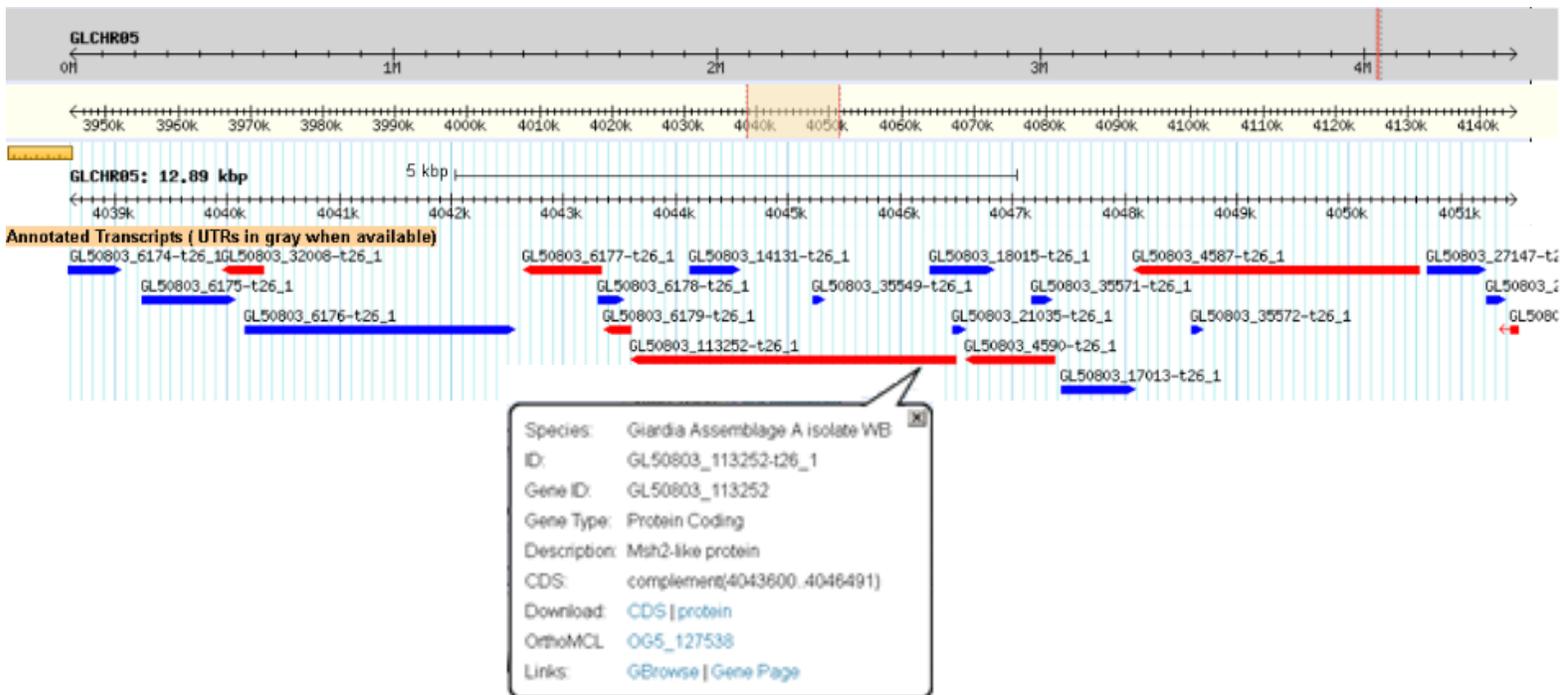
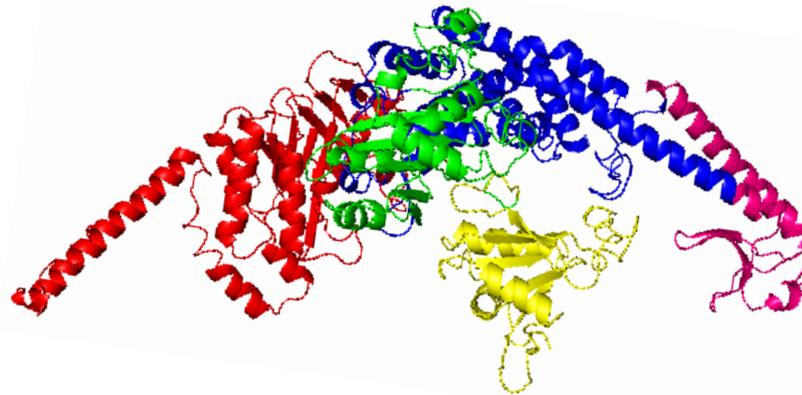
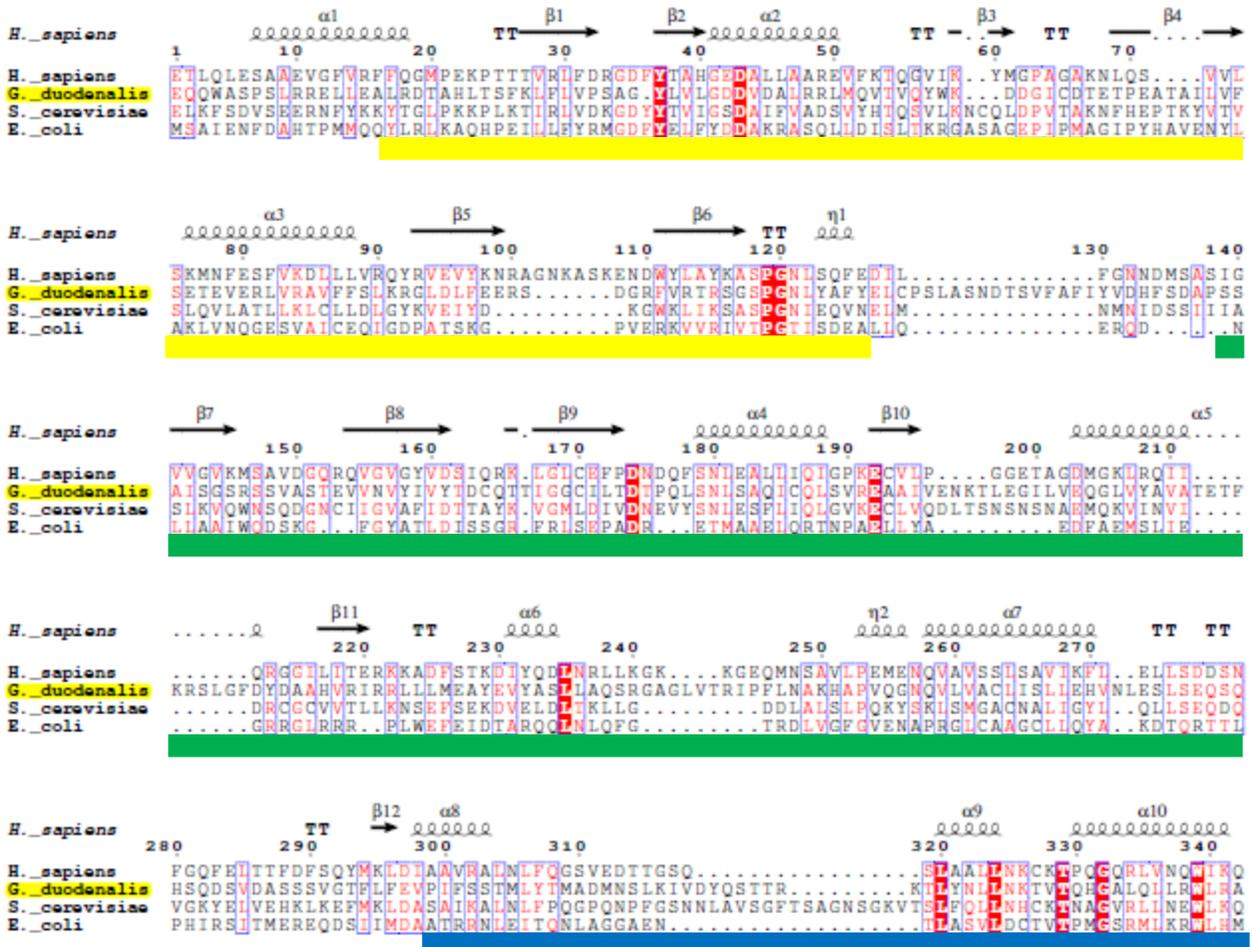


Figura 15. Localización del gen Gdmsh2 en el genoma de *G. duodenalis*, WB, ensamble A (giardiadb.org).

A)



B)



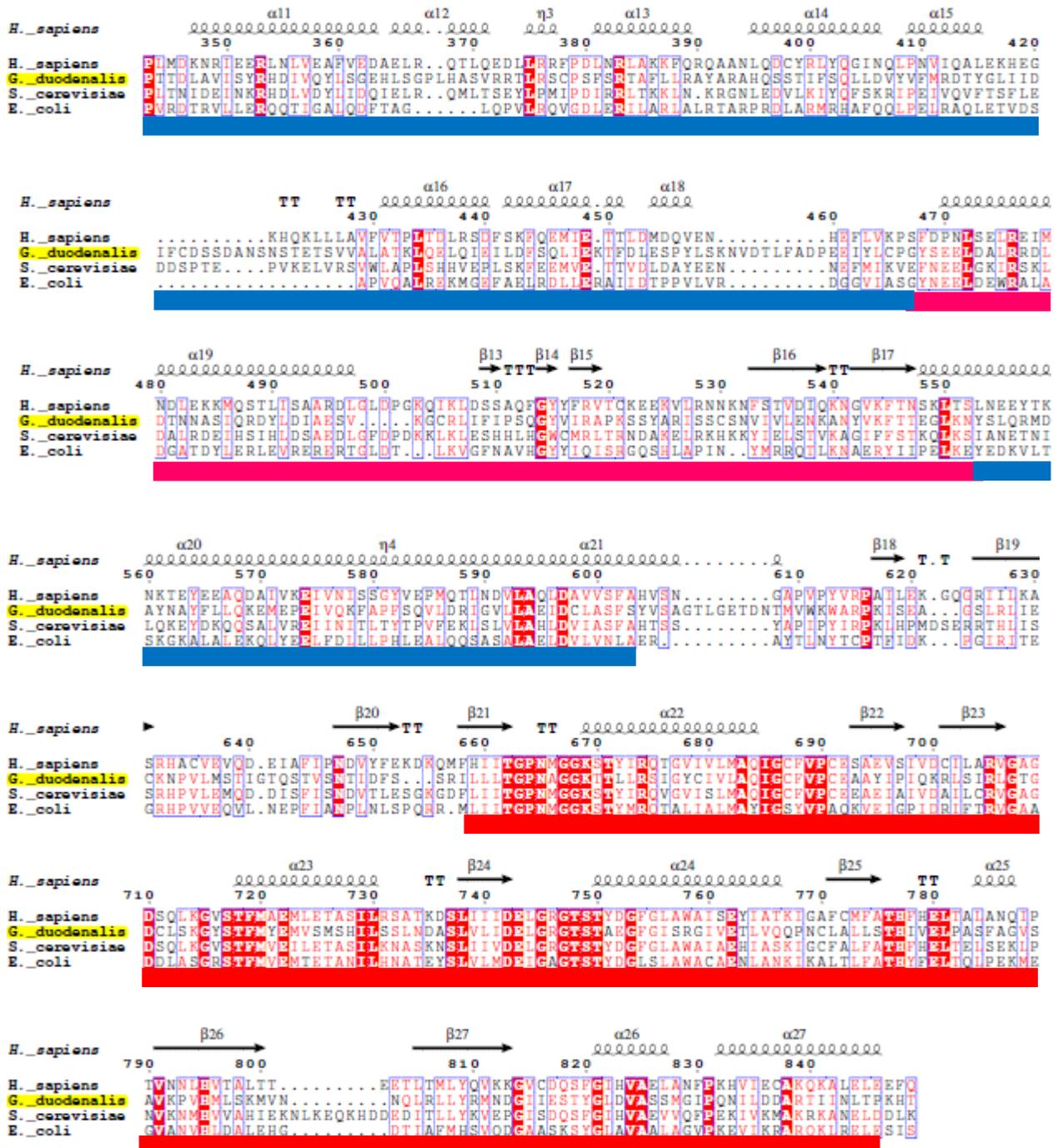


Figura 16. Alineamiento y predicción de las estructuras A) terciaria y B) secundaria, con respecto a la humana, de las secuencias de las proteínas MSH2 de *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *E. coli* y *G. duodenalis*. Amarillo: dominio I; verde: dominio II; azul: dominio III; rosa: dominio IV; Rojo: Dominio V. Para la estructura terciaria, los dominios fueron identificados a partir de las secuencias correspondientes a la MSH2 humana. Alineamiento y predicción de estructura secundaria, con respecto a la MSH2 humana

reportada en PDB (www.rcsb.org). En blanco sobre rojo los aminoácidos conservados y en rojo los que sólo conservan la similitud química.

Para evidenciar visualmente la conservación estructural, GdMSH2 fue modelada mediante I-TASSER, The Yang Zhang Lab, University of Michigan (zhanglab.ccmb.med.umich.edu), y superpuesta con una homóloga eucarionte (*H. sapiens*) y una procarionte (*E. coli*), como puede observarse en la figura 17, mediante el programa Pymol.

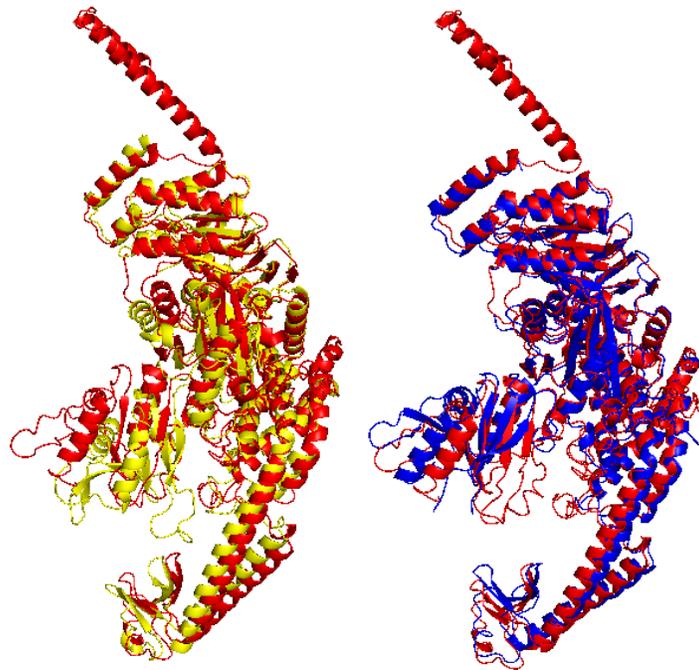


Figura 17. En rojo MSH2 de *G. duodenalis*, en azul MSH2 de *H. sapiens* y en amarillo MUTS subunidad A de *E. coli*.

Clonación, expresión y purificación de GdMSH2.

A partir de un cultivo de trofozoitos de *G. duodenalis* cepa WB, del ensamble A, se obtuvo material genómico mediante la técnica de extracción con fenol:cloroformo y empleándolo como molde se amplificó el gen GdMsh2 identificado.

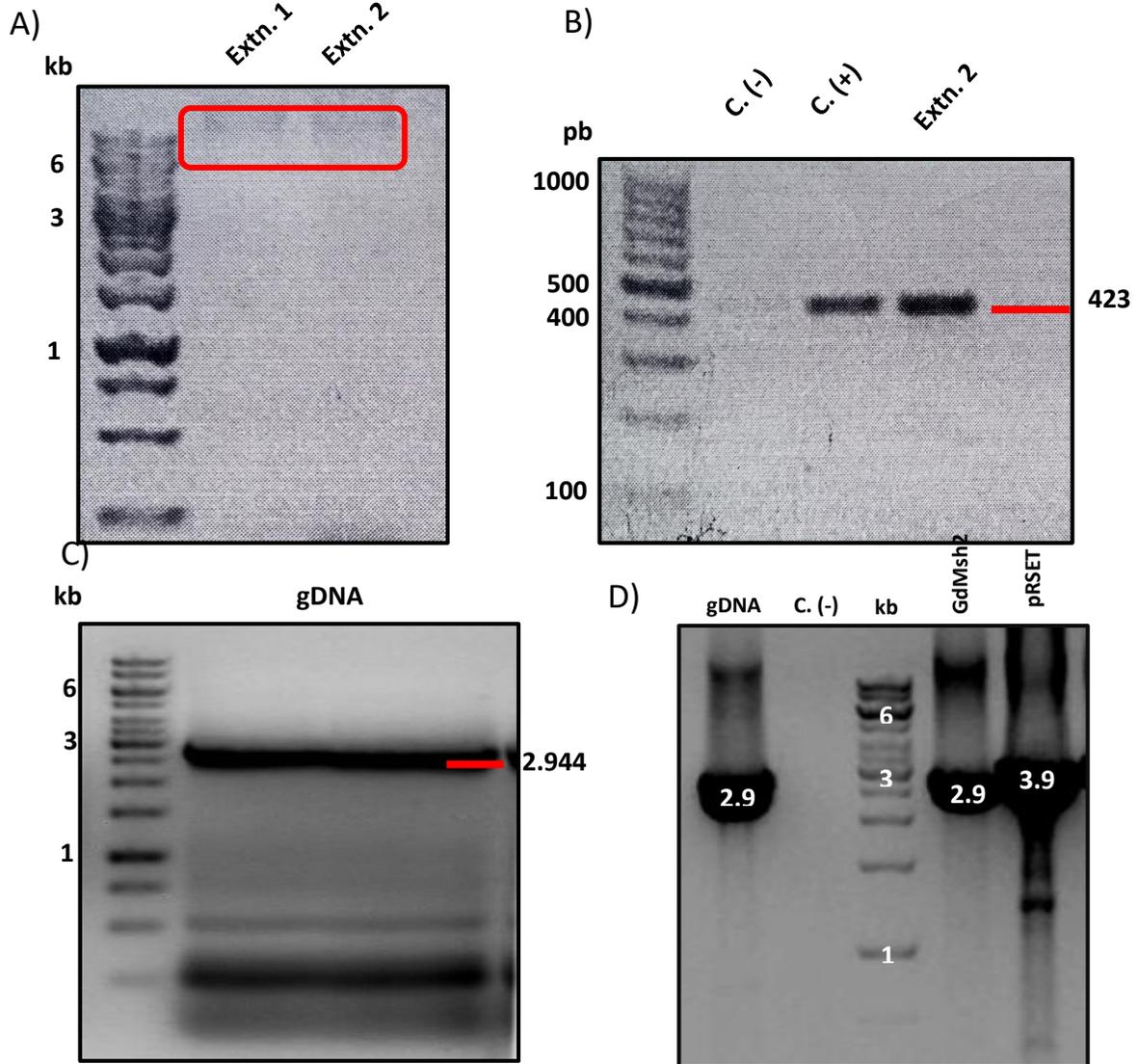


Figura 18. A) integridad del material genómico extraído. B) amplificación del gen control disulfuro isomerasa (PDI) de 423pb con el material genómico como molde. C) amplificación PCR de alta fidelidad de GdMsh2 (2.944kb) complementario a pET100 usando el material genómico como templado; se estimaron 617.8 ng/ μ L, con índices 260/280: 1.4, y 260/230: 0.59. D) amplificación PCR de GdMsh2 (2.9 kb) complementario a pRSET, y de pRSET (3.9 kb) complementario a GdMsh2. Todas estas electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1 %.

Clonación, expresión y purificación en pET100

El vector pET100 disponible en el laboratorio se encontraba ligado y de forma circular al gen de *G. duodenalis* Rad51. Para utilizarlo, fue digerido enzimáticamente de forma secuencial (que aunque resultó de baja eficiencia, notable visiblemente en la figura 19 donde la banda de 5.6Kb correspondiente a pET100 es tenue comparada contra el resto del plásmido remanente, fue una mejora comparado con la digestión empleando ambas enzimas a la vez) para que se liberara de Rad51 y se separó de éste mediante electroforesis. Ver figura 19.

Después de purificar ambos fragmentos, GdMsh2 y pET100, se unieron mediante ligación isotérmica para obtener el plásmido de expresión pET100_MSH2 como se observa en la figura 20.

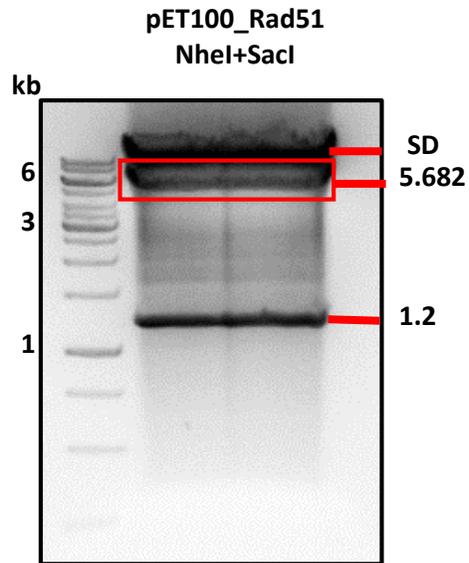


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para separar al vector pET100 (5.682 kb) del gen Rad51 (1.2 kb). SD: plásmido remanente sin digerir.

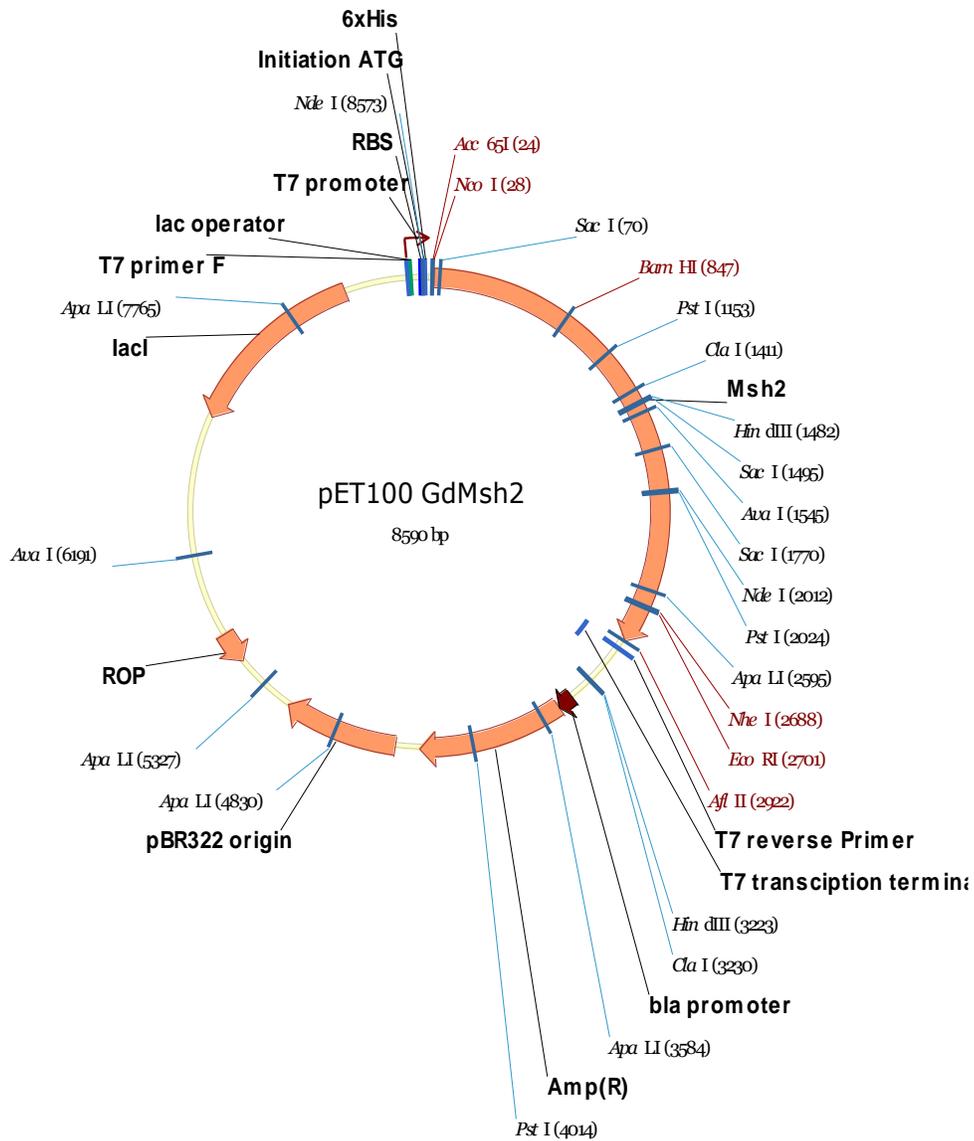


Figura 20. Diseño plásmido pET100_MSH2.

Antes de transformar bacterias *E. coli*, XL1 BLUE, con esta construcción, se verificó la correcta unión de los fragmentos mediante PCR utilizando los cebadores que flanquean los extremos 5' y 3' del gel y empalman las respectivas regiones adyacentes en el vector para obtener amplicones de alrededor de 500 pb. En la figura 21 se muestra la electroforesis del producto de la reacción mencionada y, en seguida la verificación de la presencia de la construcción en extracciones EasyPrep de las cinco colonias transformantes positivas, de 48 transformantes analizadas con esta PCR.

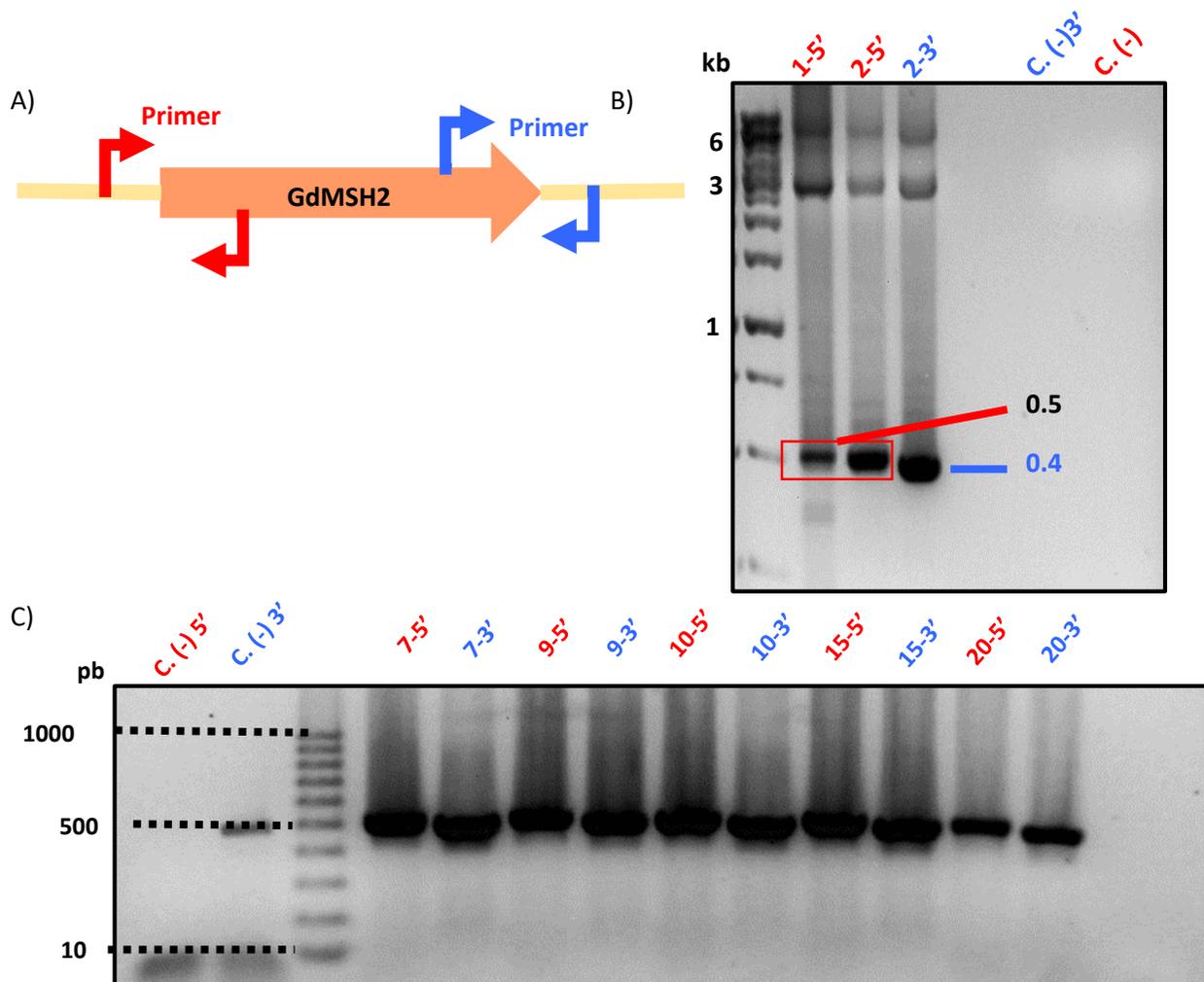


Figura 21. A) Esquemización de los oligos para comprobar ligación. B) Producto de PCR de comprobación de ligación. C) La misma PCR de verificación en extracciones EasyPrep de las colonias transformantes positivas obtenidas. Electroforesis en gel agarosa al 1 %. Se realizaron dos ligaciones con diferentes preparaciones de inserto, uno almacenado durante alrededor de medio año (1) y otro recién obtenido (2). Fue la ligación 2 la elegida para transformar una alícuota de bacterias XL1-Blue químicamente competentes con una eficiencia de transformación de 1.515×10^8 .

Para corroborar la identidad del plásmido pET100_Msh2 en los extractos EasyPrep de las transformantes positivas se llevaron a cabo digestiones enzimáticas como se muestra en la figura 22, donde se aprecian cuatro clonas positivas que presentan el patrón de bandas esperado.

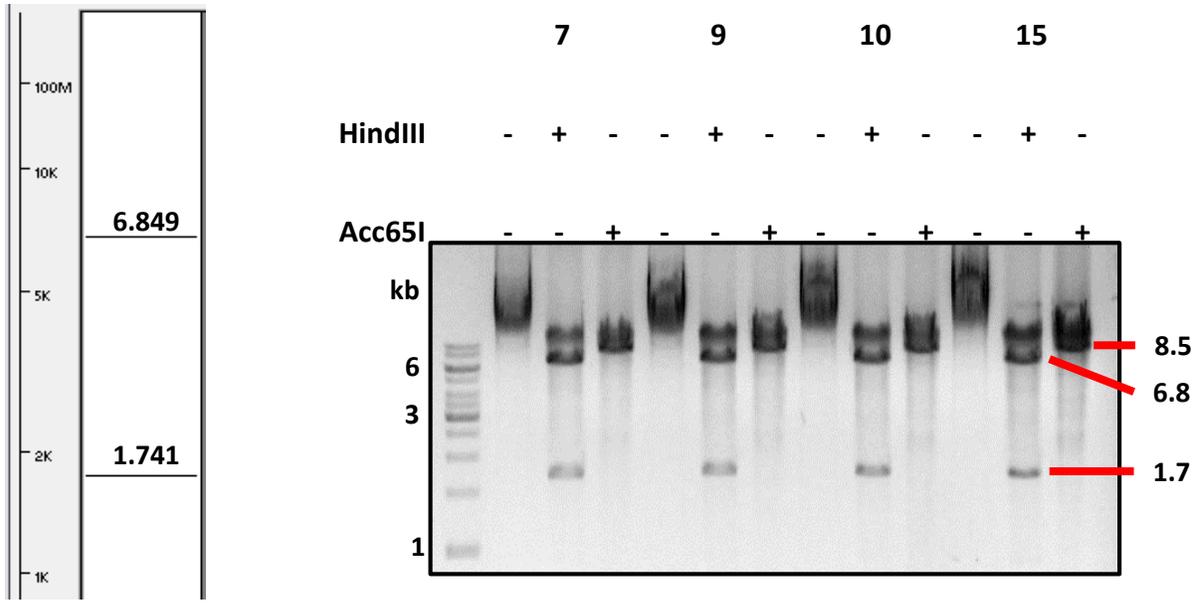


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, extracciones MiniPrep de las transformantes 7, 9, 10 y 15 restringidas (+) o no (-) con HindIII o con Acc65I. Del lado izquierdo la predicción de los productos de restricción de pET100_MSH2 bajo la acción de HindIII. No se presenta el patrón esperado de la restricción Acc65I debido a que en el plásmido existe un solo sitio de corte para esta enzima, por lo que el producto es el plásmido entero linealizado (8.59 kb).

Continuando con la caracterización de la construcción obtenida, se secuenciaron los extremos 5' y 3' del gen GdMSH2 en pET100 a partir de la extracción MiniPrep de las transformantes para comprobar la integridad de la secuencia y de su posición. En la figura 23 se puede observar la secuencia, en las regiones 5', 3' y alrededor del nucleótido 1890, del gen Gdmsh2 en pRSET extraída de la clona 15, que resultó óptima: se encuentra íntegra y dentro del marco de lectura.

Fue transformada con pET100_MSH2, proveniente de extracción MiniPrep de la transformante positiva 15, una alícuota (aproximadamente 50 µL) de cultivo químicamente competente de *E. coli* BL21-43 para expresar la proteína y observarla mediante western blot. Empleándose una concentración final de 1 mM de IPTG se indujo la expresión de GdMSH2 en 10 mL cultivo de la noche anterior en fase de crecimiento ($OD_{600} = 0.624$). Con el fin de determinar el tiempo de inducción óptimo, se tomaron muestras a una fracción del cultivo sin inducir (S.I.) y a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas post inducción y se les hizo migrar en un gel de electroforesis SDS-PAGE 7 %. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana

de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo magnético a 0.3 A para luego ser tratada con los anticuerpos anti-his y anti-ratón para obtener la placa de la figura 24, en la que puede observarse que no se obtienen bandas del tamaño esperado de aproximadamente 100 kDa sino a 70 kDa, lo que sugiere degradación, mas se obtiene la mayor cantidad de señal (presencia de proteína) a las seis horas; presumiblemente, la cantidad tiende a aumentar conforme el tiempo transcurre, sin embargo, para conocer el límite máximo habría de determinarse el punto de senilidad del cultivo. Además, a pesar del sistema de expresión del fago T7, el carril “Sin Inducción” del panel B) de la figura 24, aunque tenue, indica una ligera fuga transcripcional pues su señal es extrañamente de mayor intensidad que la observada en el carril de 0 horas. Fue mediante el biosoftware en línea web.expasy.org/compute_pi que se predijo el tamaño de GdMSH: 108.4 kDa. Los perfiles de expresión en las pruebas de inducción realizadas en las transformantes positivas, arrojan en los ensayos western blot una banda a la altura de 70 kDa, figura 24, lo que sugiere una alteración a nivel de secuencia en el plásmido, o bien, a nivel de transcripción o mayor probablemente, de expresión, pues la especificidad de los anticuerpos utilizados niega la posibilidad de que la banda observada sea una inespecificidad. A pesar de esto último, mediante la tinción Coomassie de un gel SDS-PAGE 7 % presentado en la figura 24, puede observarse una tenue banda a la altura de 100 kDa en todas las muestras de 6 horas post-inducción de todas las transformantes positivas. Por otro lado, la banda mejor representada, con respecto a cualquier otra visible, se encuentra a la misma altura que la observada en las placas de western blot (70 kDa). Una evidencia más observada en el resultado de western blot de la imagen 20 es el aumento progresivo (visualmente) de la cantidad de proteína detectada, que bien puede deberse a la acumulación de la proteína durante el tiempo transcurrido después de la inducción, o bien por el propio crecimiento del cultivo durante el mismo tiempo. Así, se eligió 6 horas como el tiempo óptimo de inducción de expresión para pET100_GdMSH2.

A) 5'

```
80      90      100     110     120     130     140
GAAGGAGATATACATATC CGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGGTACCATGGAGCAGCAGTGGG
GAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTGGTACCATGGAGCAGCAGTGGG

150     160     170     180     190     200     210
CATCGCCATCTCTGCGCAGAGAGCTCTTGGAGGCTCTCCGAGATACAGCACATTTAACTTCGTTCAAGCT
CATCGCCATCTCTGCGCAGAGAGCTCTTGGAGGCTCTCCGAGATACAGCACATTTAACTTCGTTCAAGCT

220     230     240     250     260     270     280
CTTTCTAGTGCCTTCAGCTGGATACTTAGTACTTGGAGATGATGTCGATGCATTGAGGAGACTCATGCAG
CTTTCTAGTGCCTTCAGCTGGATACTTAGTACTTGGAGATGATGTCGATGCATTGAGGAGACTCATGCAG

290     300     310     320     330     340     350     360
GTGACAGTACAGTACTGGAAGGACGACGGTATTTGTGATACTGAGACACCAGAGGCTACTGCCATCTTAGTATTTAG
GTGACAGTACAGTACTGGAAGGACGACGGTATTTGTGATACTGAGACACCAGAGGCTACTGCCATCTTAGTATTTAG

370     380     390     400     410     420     430
TGAGACAGAGCTACAAAAGGCTTGTGAGGGCAGTGTTTTTCTCGCTGAAAGCGAGGGCTTGACCTCTTTGAGGAA
TGAGACAGAGCTACAAAAGGCTTGTGAGGGCAGTGTTTTTCTCGCTGAAAGCGAGGGCTTGACCTCTTTGAGGAA

440     450     460     470     480     490     500     510
AGGAGCGACGGGCGCTTTGTACGAACACGCTCAGGATCTCCGGGGAATCTTTACGCCTTCTATGAACTATGCC
AGGAGCGACGGGCGCTTTGTACGAACACGCTCAGGATCTCCGGGGAATCTTTACGCCTTCTATGAACTATGCC

520     530     540     550     560     570     580
TTCTTTGGCATCTAATGACACCTCTGTCTTCGCATTCATTTATGTTGATCACTTCAGTGATGCTCCCAGCAGTGCC
TTCTTTGGCATCTAATGACACCTCTGTCTTCGCATTCATTTATGTTGATCACTTCAGTGATGCTCCCAGCAGTGCC

590     600     610
ATAAGCGGCTCACGGTCGAGTGTG
ATAAGCGGCTCACGGTCGAGTGTG
```

B) 1890

```
1670     1680     1690     1700     1710     1720     1730
TGCATCTATACAAAAGAGACTACCTAGATATTGCAGAGAGCGTTAAGGGGTGTAGGTTGATTTTCATTCCGTCTC
TGCATCTATACAAAAGAGACTACCTAGATATTGCAGAGAGCGTTAAGGGGTGTAGGTTGATTTTCATTCCGTCTC

1740     1750     1760     1770     1780     1790     1800     1810
AAGGATACGTTATTAGGGCACCAAAGAGCTCGTATGCGCGCATCTCAAAGTTGTTCCAACGTCATAGTGCTAGAGAA
AAGGATACGTTATTAGGGCACCAAAGAGCTCGTATGCGCGCATCTCAAAGTTGTTCCAACGTCATAGTGCTAGAGAA

1820     1830     1840     1850     1860     1870     1880
CAAGGCTAACTATGTTAAGTTTACTACAGAGGGGCTCAAGAACTACTCTCTCCAAAAGAAATGGATGCATATAATG
CAAGGCTAACTATGTTAAGTTTACTACAGAGGGGCTCAAGAACTACTCTCTCTCCAAAAGAAATGGATGCATATAATG

1890     1900     1910     1920     1930     1940     1950     1960
CATACTTCTTGCTACAGAAGGAGATGGAACCGGAAATTGTCCAAAAGTTTCGCTCCATTTAGTCAAAGTGTTAGATAGA
CATACTTCTTGCTACAGAAGGAGATGGAACCGGAAATTGTCCAAAAGTTTCGCTCCATTTAGTCAAAGTGTTAGATAGA

1970     1980     1990     2000     2010     2020     2030
ATTGGAGTGTTGTTGGCTGAAATAGATTGCCTAGCATCTTTTTTCATATGTTTCTGCAGGTACTCTTGGAGAGA
ATTGGAGTGTTGTTGGCTGAAATAGATTGCCTAGCATCTTTTTTCATATGTTTCTGCAGGTACTCTTGGAGAGA

2040     2050     2060     2070     2080     2090     2100     2110
CAGATAATACAATGGTGTGGAAGTGGGCTCGACCAAAGATATCTGAGGCTGGCTCGTTGGCGCTTAATTGAATGCAAAA
CAGATAATACAATGGTGTGGAAGTGGGCTCGACCAAAGATATCTGAGGCTGGCTCGTTGGCGCTTAATTGAATGCAAAA

2120     2130     2140     2150     2160     2170     2180
ACCCTGTCTTGATGAGCACAAATTGGAACACAGTCCACGGTGAGTAACACCATTGACTTCAGCTCACGGAATAC
ACCCTGTCTTGATGAGCACAAATTGGAACACAGTCCACGGTGAGTAACACCATTGACTTCAGCTCACGGAATAC
```

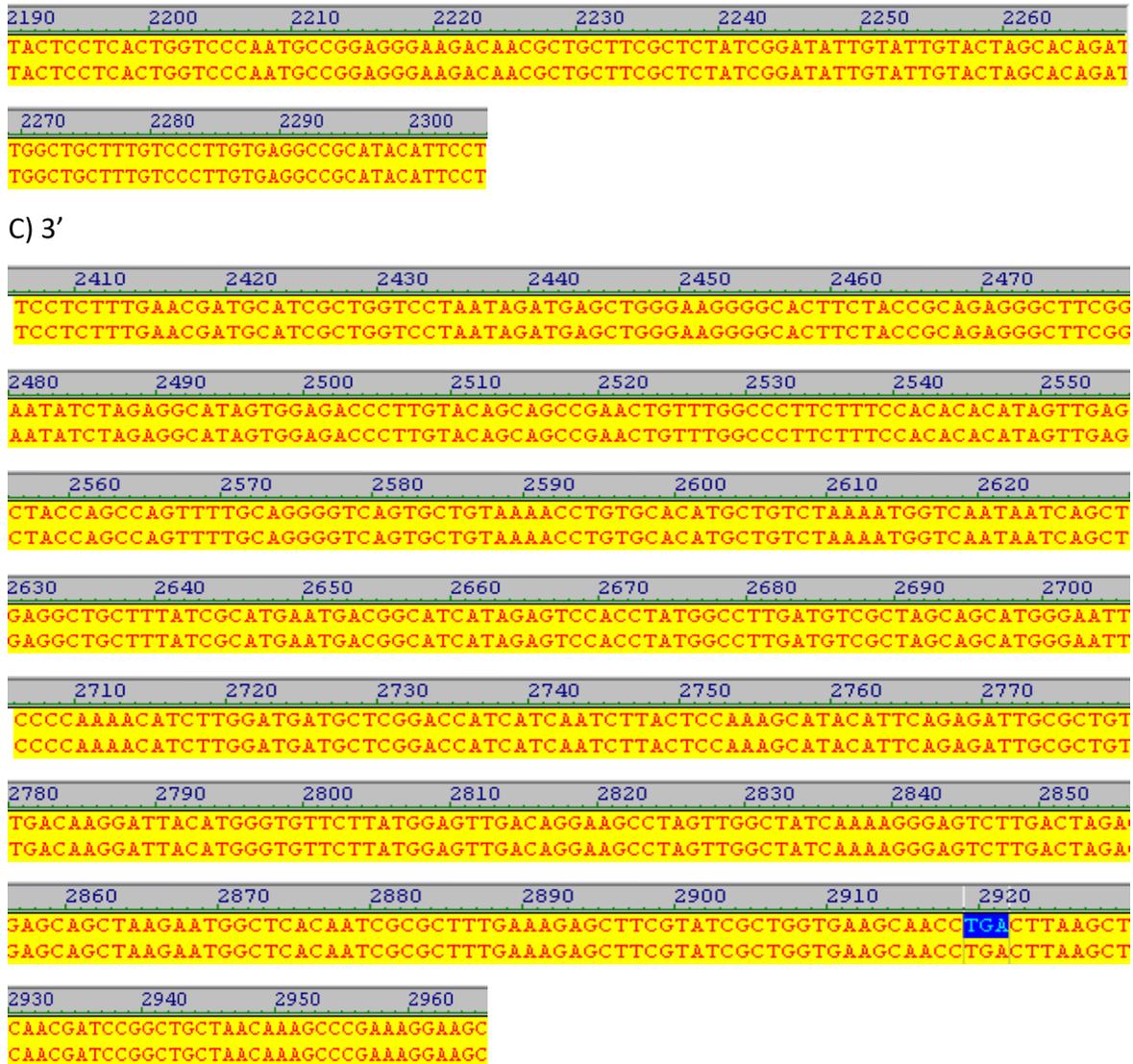


Figura 23. Comparación entre la secuencia obtenida de la clona 15 (línea inferior) y la secuencia original del plásmido (línea superior). A) Región 5' del gen GdmsH2; B) Región alrededor del nucleótido 1890; C) Región 3' del gen GdmsH2. Resaltadas en rojo con fondo amarillo las bases que coinciden con la secuencia original. En azul el codón ATG de inicio de la transcripción del vector y el codón TGA de paro de GdmsH2. Encerrado en rojo una mutación puntual que cambia el codón 82 de GTA, que codifica para valina, a ATA, que codifica para isoleucina, manteniéndose la química hidrofóbica del sitio. Alineamiento realizado en el programa Vector NTI de Invitrogen.

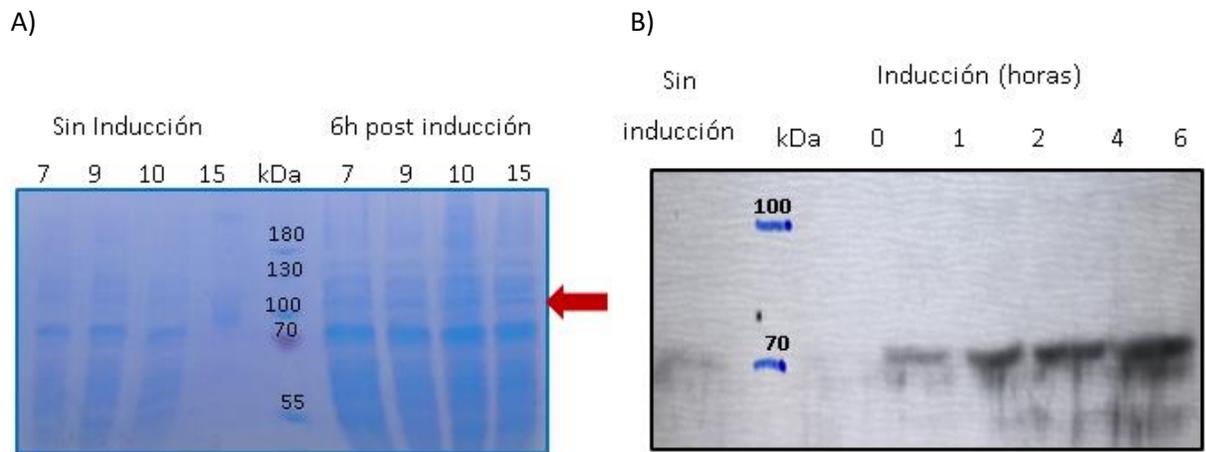


Figura 24. A) tinción Coomassie de las muestras 6 horas post-inducción de los extractos totales de las transformantes positivas. A cada carril se cargaron 20 μ L. B) Inmunodetección en fase sólida (western blot) de inducción piloto de la expresión de GdMSH2 (108.41 kDa) de la clona 15.

Por último, con este mismo plásmido, se indujo la expresión de GdMSH2 mediante el empleo de IPTG, 1 mM como concentración final, en un cultivo fresco de 400 mL de *E. coli* BL21-43. A las seis horas de incubación se lisó el cultivo y se purificó mediante una columna de agarosa-níquel, como se detalla en metodología, obteniéndose hasta 10 fracciones de elución de 1 mL cada una. Éstas fueron cargadas a un gel de electroforesis SDS-PAGE 10 % y se les hizo migrar mediante la aplicación de un campo eléctrico con una diferencia de potencial de 120 V durante 1.5 horas. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo magnético a 0.3 A para luego ser tratada con los anticuerpos anti-his y anti-ratón para obtener la placa de la figura 25, en la que puede observarse que es en la fracción 3 donde mayor cantidad de señal se obtuvo, seguido de las fracciones 2, 4 y 6; sin embargo, en todas las eluciones analizadas en este western blot, incluyendo el extracto total, la fracción no unida a la columna de agarosa-níquel y los dos lavados, presentan una mayor señal a la altura de 70 kDa, o menor, lo que sugiere que la proteína recombinante GdMSH2 se está degradando.

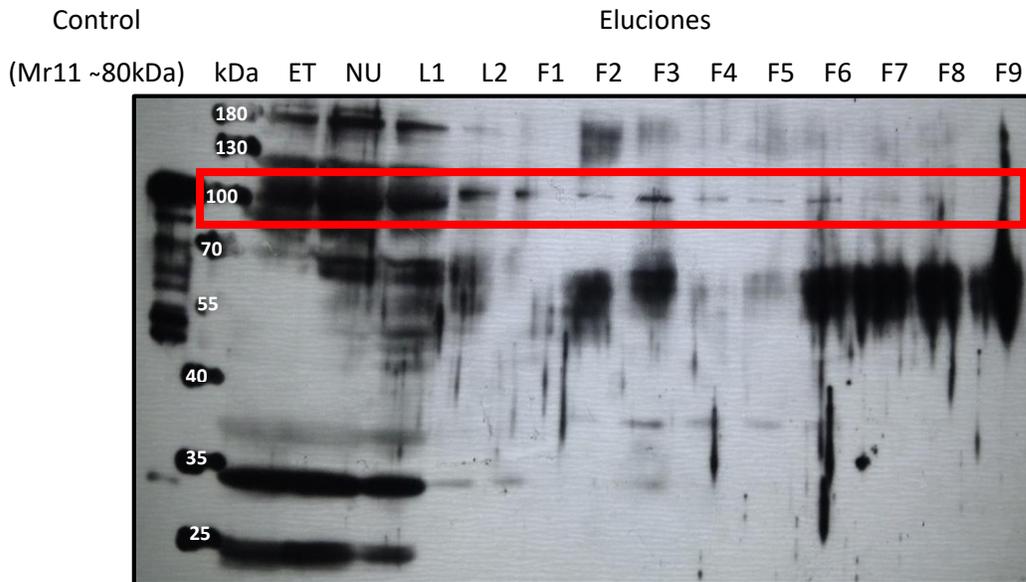


Figura 25. Inmunodetección en fase sólida (Western-Blot) dirigida a GdMSH2. Fracciones de elución durante la purificación en columna de agarosa-níquel. La proteína Mre11 recombinante también presenta la etiqueta de seis histidinas; se asocia su degradación debido a su largo periodo de almacenamiento. A cada carril se cargaron 30 μ L de la fracción respectiva. PAGE 10 %, bloqueo en leche 1 hora, Anti-His (1:7000) 1 hora y Anti-ratón (1:30000) 1 hora, temperatura ambiente. 2 minutos de exposición.

Clonación, expresión y purificación en pRSET

Buscando evitar los problemas presentados con la construcción anterior, pET100_Gdmsh2, se optó por la siguiente estrategia. Para asegurar la calidad de los amplicones para construir pRSET_GdMSH2 mediante la técnica IVA clonación, se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad (como se menciona en la metodología) y sus productos fueron observados en un gel de agarosa 1 %, figura 26, y posteriormente transformados en *E. coli* TOP 10.

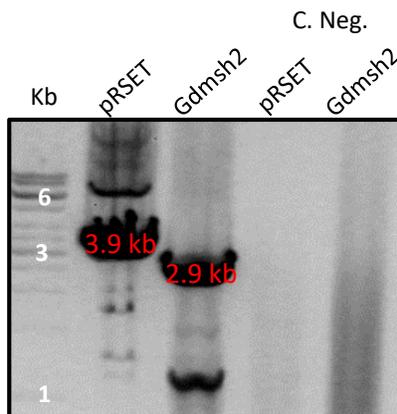


Figura 26. Amplificación de alta fidelidad de los componentes de pRSET_GdmsH2. 15 µL cargados en cada pozo. Agarosa 1 %, 130 V durante 30 minutos.

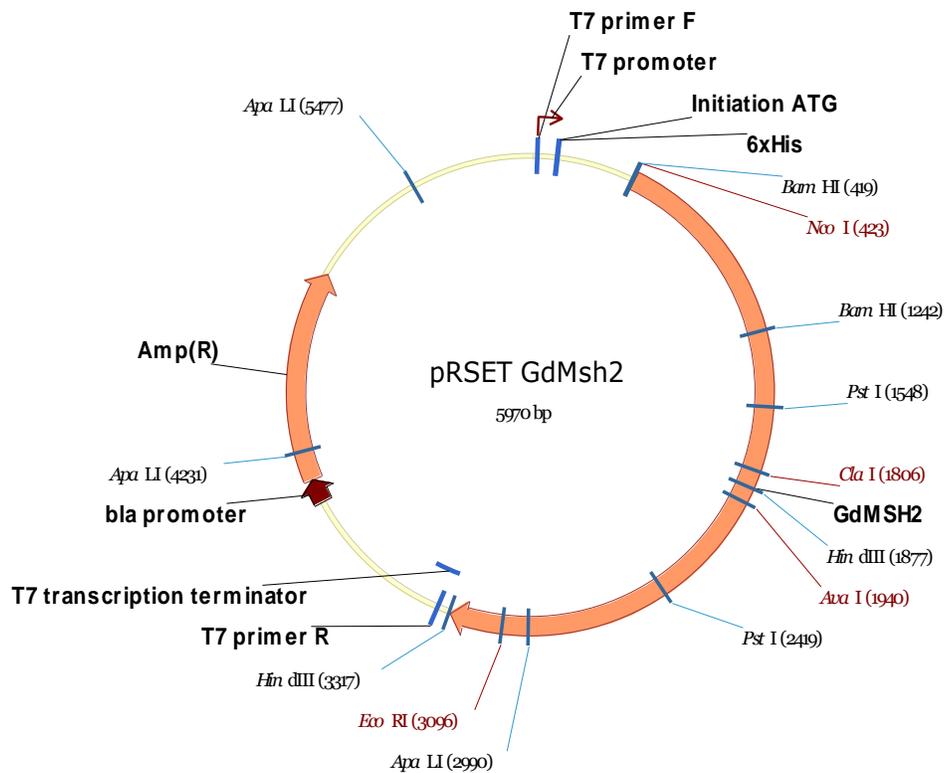


Figura 27. Diseño del plásmido pRSET_GdMsh2.

La PCR de alta fidelidad empleada para obtener los componentes de la construcción pRSET_GdMsh2, vector e inserto, (figura 26) mediante la técnica IVA cloning, descrita en la metodología, dio como resultado amplicones inespecíficos para ambos componentes (principalmente en la amplificación de pRSET, donde aparecen 6 bandas inespecíficas, mientras que dos para la amplificación de GdMsh2), a diferencia de lo observado en la PCR piloto de la figura 18. Sin embargo, estos productos fueron empleados para la ligación IVA cloning por la abundancia de la banda esperada en cada caso. En total fueron 24 las colonias transformantes analizadas de entre las obtenidas de la transformación. Sólo una, la clona 7, resultó positiva para este análisis que consistió en una PCR dirigida al gen GdmsH2 (figura 28), y la obtención de patrones de bandeo a partir de digestiones enzimáticas (figura 29).

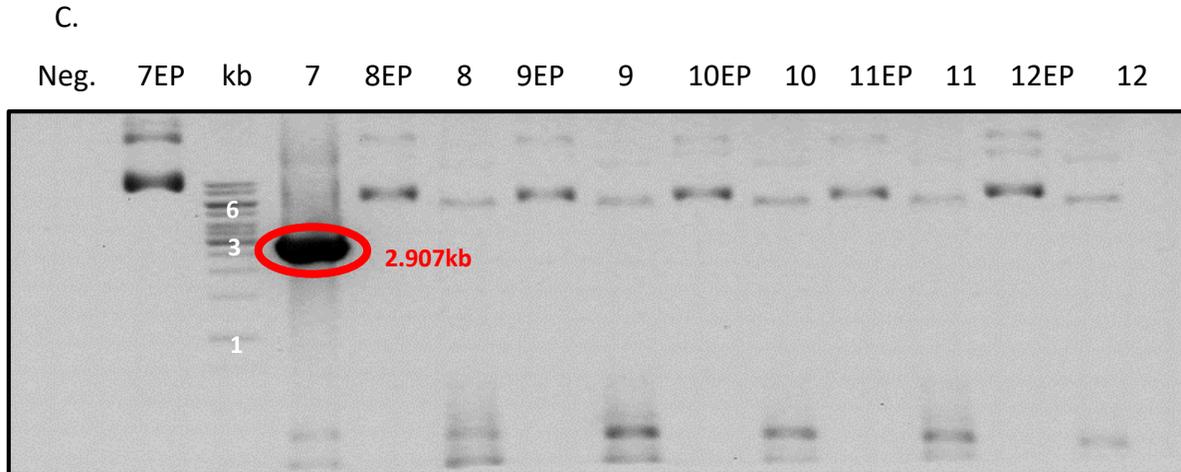


Figura 28. PCR búsqueda de transformantes que contengan Gdmsh2. EP: extracción Easy Prep. El total de la reacción de PCR (25 μ L) fue cargada, mientras que de EP 5 μ L. Agarosa 1 %, 130 V durante 30 minutos.

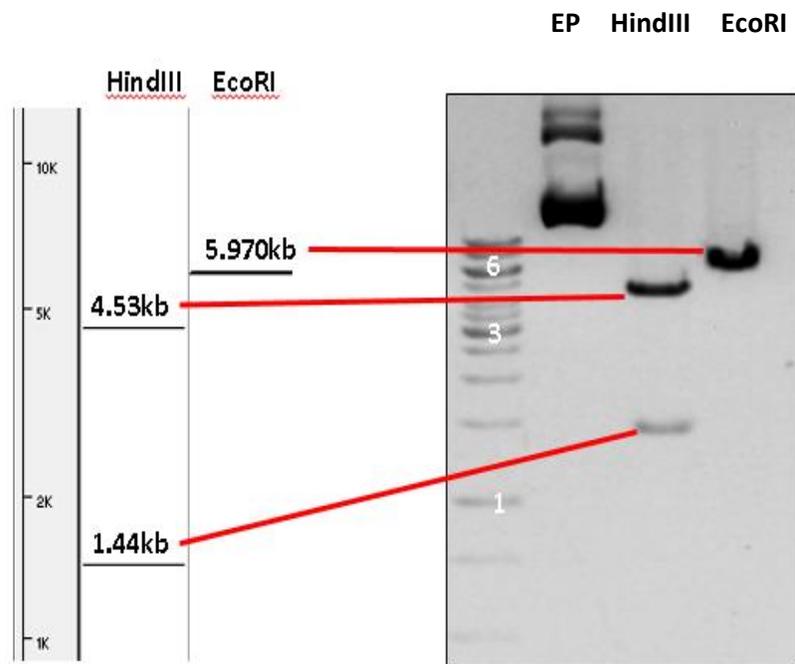


Figura 29. Digestión enzimática de pRSET_Gdmsh2 (durante 17h) extraído de la clona 7. A) la predicción del patrón de bandeo realizado en Vector NTI. EP: extracto EasyPrep (7 μ L cargados). B) El total de la reacción de digestión (25 μ L) fue cargada. Agarosa 1 %, 130 V durante 30 minutos.

Con el fin de asegurar la integridad de la secuencia de Gdmsh2 en pRSET presente en la clona 7, se secuenciaron las mismas regiones que para la construcción con pET100: 5', 3' y alrededor

de la posición 1890. En la figura 30 se muestra el alineamiento entre la secuencia original y la obtenida a partir de la secuenciación, donde se aprecia su integridad.

A) 5'

120	130	140	150	160	170	180	
CCACCACAGCGGCGCTTTTGAATTTAAGCTGCCGGACATTGGCGAAGGCATCCACGAAGGTGAAATTGTCAAATGG							
CCACCACAGCGGCGCTTTTGAATTTAAGCTGCCGGACATTGGCGAAGGCATCCACGAAGGTGAAATTGTCAAATGG							
190	200	210	220	230	240	250	260
TTTGTGAAAACCGGGCGATGAAGTGAACGAAGACGATGTATTGTGCGAAGTGCAAAAATGACAAGGCGGTTGTGCAAA							
TTTGTGAAAACCGGGCGATGAAGTGAACGAAGACGATGTATTGTGCGAAGTGCAAAAATGACAAGGCGGTTGTGCAAA							
270	280	290	300	310	320	330	
ATTCCCTCCCCGGTCAAAGGGGAAAGTGCTTGAAATCCTCGTCCCGGAGGGAAACAGTGGCAACGGTCGGGCAAACG							
ATTCCCTCCCCGGTCAAAGGGGAAAGTGCTTGAAATCCTCGTCCCGGAGGGAAACAGTGGCAACGGTCGGGCAAACG							
340	350	360	370	380	390	400	410
CTCATCACGCTCGATGCGCCGGGTTATGAAAACATGACGACCGGCAGCGACACCGGGCGAAAACCTGTACTTCCAGG							
CTCATCACGCTCGATGCGCCGGGTTATGAAAACATGACGACCGGCAGCGACACCGGGCGAAAACCTGTACTTCCAGG							
420	430	440	450	460	470	480	
GTGGATCCATCGGAGCAGTGGGCATCGCCATCTCTGCGCAGAGAGCTCTTGGAGGCTCTCCGAGATACAGCA							
GTGGATCCATCGGAGCAGCAGTGGGCATCGCCATCTCTGCGCAGAGAGCTCTTGGAGGCTCTCCGAGATACAGCA							
490	500	510	520	530	540	550	560
CATTTAACTTCGTTCAAGCTCTTTCTAGTGCCTTCAGCTGGATACTTAGTACTTGGAGATGATGTCGATGCATTGAG							
CATTTAACTTCGTTCAAGCTCTTTCTAGTGCCTTCAGCTGGATACTTAGTACTTGGAGATGATGTCGATGCATTGAG							
570	580	590	600	610	620	630	
GAGACTCATGCAGGTGACAGTACAGTACTGGAAGGACGACGGTATTGTGATACTGAGACACCAGAGGCTACT							
GAGACTCATGCAGGTGACAGTACAGTACTGGAAGGACGACGGTATTGTGATACTGAGACACCAGAGGCTACT							
640	650	660					
GCCATCTTAGTATTTAGTGAGACAGAG							
GCCATCTTAGTATTTAGTGAGACAGAG							

B) 1890

2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	
GAGACTACCTAGATATTGCAGAGAGCGTTAAGGGGTGTAGGTTGATTTTCATTCCGTCTCAAGGATACGTTATTA							
GAGACTACCTAGATATTGCAGAGAGCGTTAAGGGGTGTAGGTTGATTTTCATTCCGTCTCAAGGATACGTTATTA							
2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220
GGGCACCAAAGAGCTCGTATGCGCGCATCTCAAAGTTGTTCCAACGTCATAGTCTAGAGAAACAAGGCTAACTATGT							
GGGCACCAAAGAGCTCGTATGCGCGCATCTCAAAGTTGTTCCAACGTCATAGTCTAGAGAAACAAGGCTAACTATGT							
2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	
TAAGTTTACTACAGAGGGGCTCAAGAACTACTCTCTCCAAAGAATGGATGCATATAATGCATACTTCTTGCTAC							
TAAGTTTACTACAGAGGGGCTCAAGAACTACTCTCTCCAAAGAATGGATGCATATAATGCATACTTCTTGCTAC							
2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370
AGAAGGAGATGGAACCGGAAATTGTCCAAAAGTTGCTCCATTTAGTCAAAGTGTAGATAGAATTGGAGTGTGTTG							
AGAAGGAGATGGAACCGGAAATTGTCCAAAAGTTGCTCCATTTAGTCAAAGTGTAGATAGAATTGGAGTGTGTTG							
2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	
GCTGAAATAGATTGCCTAGCATCTTTTCATATGTTTCTGCAGGTACTCTTGGAGAGACAGATAATACAATGG							
GCTGAAATAGATTGCCTAGCATCTTTTCATATGTTTCTGCAGGTACTCTTGGAGAGACAGATAATACAATGG							

2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
TGTGGAAGTGGGCTCGACCAAAAGATATCTGAGGCTGGCTCGTTGGCGCTTAATTGAATGCAAAAAACCCTGTCTTGATGA							
TGTGGAAGTGGGCTCGACCAAAAGATATCTGAGGCTGGCTCGTTGGCGCTTAATTGAATGCAAAAAACCCTGTCTTGATGA							

2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
GCACAATTGGAACACAGTCCACGGTGAGTAAACACCATTGACTTCAGCTCACGAATACTACTCCTCACTGGTCCCA							
GCACAATTGGAACACAGTCCACGGTGAGTAAACACCATTGACTTCAGCTCACGAATACTACTCCTCACTGGTCCCA							

C) 3'

3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160
FATGTCGCTAGCAGCATGGGAATTCCTCCAAAACATCTTGGATGATGCTCGGACCATCATCAATCTTACTCCAAAAGCATACA							
FATGTCGCTAGCAGCATGGGAATTCCTCCAAAACATCTTGGATGATGCTCGGACCATCATCAATCTTACTCCAAAAGCATACA							

3170	3180	3190	3200	3210
TTCAGAGATTGCGCTGTTGACAAGGATTACATGGGTGTTCTTATGGAGT				
TTCAGAGATTGCGCTGTTGACAAGGATTACATGGGTGTTCTTATGGAGT				

Figura 30. Comparación entre la secuencia de Gdmsh2 en pRSET diseñada (línea inferior) y la obtenida de la clona 7 (línea superior). A) Región 5' del gen Gdmsh2; B) Región alrededor del nucleótido 1890; C) Región 3' del gen Gdmsh2. Resaltadas en rojo con fondo amarillo las bases que coinciden con la secuencia original. En azul el codón ATG de inicio de Gdmsh2. Encerrado en rojo una mutación puntual silenciosa que cambia el codón 734 (en el nucleótido 2202) de GTG, que codifica para valina, a GTC, que codifica también para valina, manteniéndose sin alteraciones la secuencia aminoacídica. Alineamiento realizado en el programa Vector NTI.

Teniendo certeza de la construcción pRSET_Gdmsh2, se procedió a extraer el plásmido de la clona 7 para su posterior transformación en la cepa de expresión *E. coli* BL21 STAR. Con un cultivo fresco ($DO_{600} = 0.59$) de estas transformantes (10 mL) se indujo la expresión de GdMH2 (alcanzando 118.5 kDa con este vector) mediante la aplicación de 1 mM de IPTG y se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas de incubación con el fin de determinar el tiempo óptimo para obtener la mayor cantidad de proteína posible. En la figura 31 se observa que a las seis horas de inducción de expresión se obtiene la mayor señal, además de la aparente tendencia de poder seguir aumentando conforme avanza el tiempo, como también ocurrió con la expresión con pET100. Sin embargo, aunque en menor medida, aparecen bandas inespecíficas alrededor de 130 y 70 kDa.

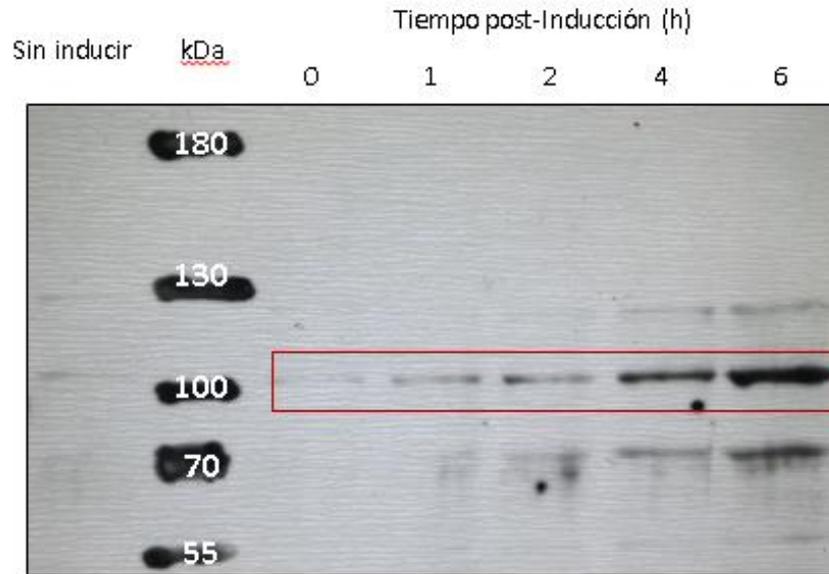


Figura 31. Inmunodetección en fase sólida (Western blot) dirigido a GdMSH2 (118.46 kDa, encerrada en rojo) en su expresión piloto. Cultivo de *E. coli* BL21 STAR en 10 mL de LB; 1 mM IPTG. PAGE 10 %. Anti-His (1:7000) 1 hora y Anti-ratón (1:30000) 1 hora, temperatura ambiente. 2 minutos de exposición.

Para asegurar que el aumento de señal en el western blot de la figura 31 se debe a la producción de GdMSH2 y no simplemente al crecimiento bacteriano, el volumen de las muestras cargadas en este fueron normalizadas con respecto a la OD_{600} del cultivo al inicio (cero horas) de la incubación como se muestra en la tabla 6.

Horas post inducción	OD_{600}	*Volumen utilizado (μ L)
0	0.58	20
1	0.943	12.30
2	1.554	7.46
4	2.38	4.87
6	2.652	4.37

Tabla 6. Cantidad de muestra de cultivo cargada para la prueba de expresión piloto de GdMSH2 en pRSET a diferentes tiempos de inducción. *Resulta del producto del volumen empleado inicialmente (20 μ L) por el cociente entre la OD_{600} inicial y la de la muestra. La densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm del cultivo en cada uno de los tiempos de muestreo fue medida en espectrofotómetro.

En seguida, a manera similar a la prueba piloto, para obtener a GdMSH2 en cantidad suficiente, se partió de un cultivo de 800 mL al que se le añadió IPTG, 1 mM como concentración final, y se le incubó a 37 °C durante seis horas. Al cabo de este tiempo, el cultivo fue lisado y se purificó GdMSH2 a través de su etiqueta de histidinas empleando una columna de agarosa-níquel, como se explica en la metodología. Las eluciones obtenidas a partir de este proceso fueron cargadas a un gel de poliacrilamida para luego someterse a una inmunodetección en fase sólida (Western blot) dirigida a GdMSH2; con todo lo anterior se obtuvo la imagen de la figura 32, donde puede observarse que la señal esperada de alrededor de 100 kDa (GdMSH2 = 118.5 kDa) aparece tenuemente en las fracciones 3, 4, 5 y 6, siendo principalmente representada en la 4, sin embargo, en todas las eluciones aparecen bandas debajo a diferentes alturas (de 55 kDa hacia abajo), y en mayor intensidad, que sugieren la degradación/procesamiento de la proteína a pesar de la presencia de los inhibidores de proteasas empleados durante la purificación, aunque la banda de 70 kDa ya no aparece aquí (posible indicativo del funcionamiento de las modificaciones en el vector pRSET).

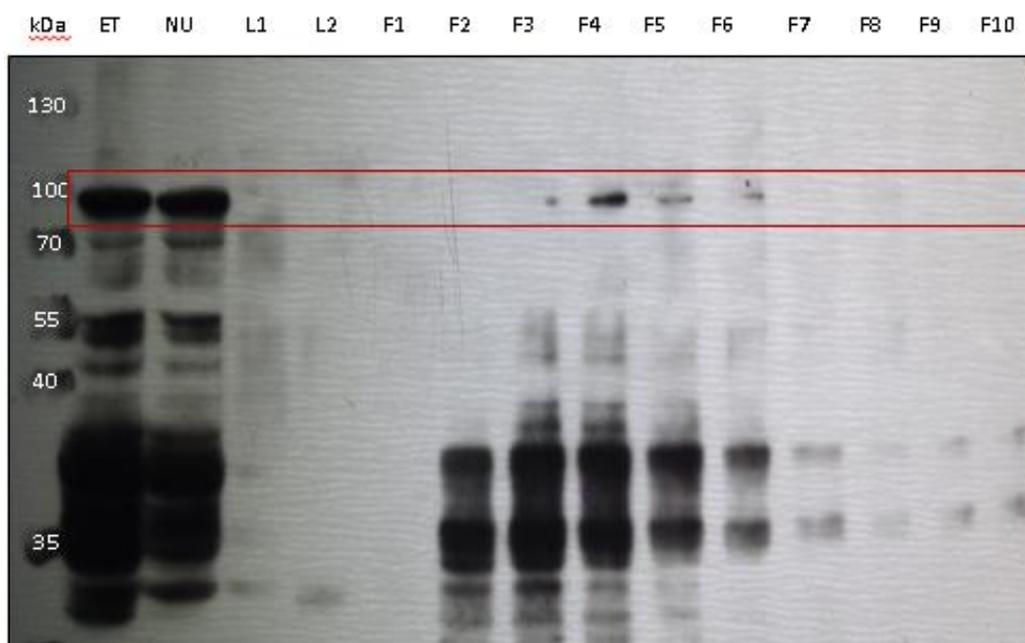


Figura 32. Inmunodetección en fase sólida (western blot) de la purificación de GdMSH2. A cada carril se cargaron 30 μ L de la fracción respectiva. PAGE 10 %, bloqueo en leche 1 hora, Anti-His (1:7000) 1 hora y Anti-ratón (1:30000) 1 hora, temperatura ambiente. 2 minutos de exposición. Encerrado en rojo la altura de 100 kDa.

Debido a la aparente baja eficiencia de purificación obtenida, se procedió a aplicar un método de purificación y enriquecimiento diferentes, como se detalla en la sección de metodología. Para visualizar la eficacia de este método, una muestra del extracto obtenido fue sometido a inmunodetección en fase sólida (western blot) dirigida a GdMSH2, con lo que se obtuvo la figura 33.

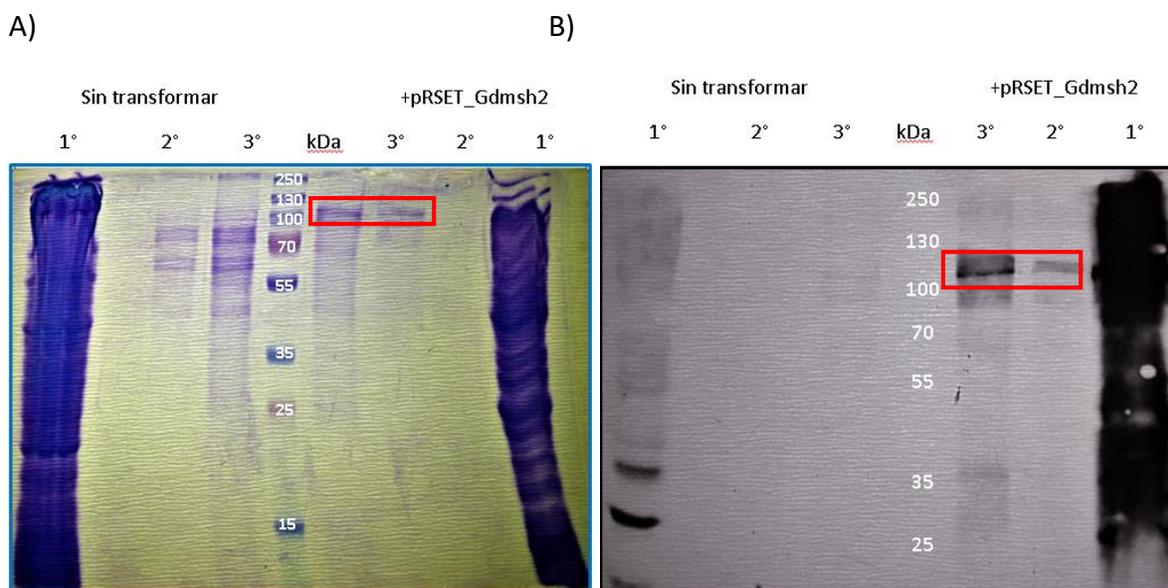


Figura 33. Purificación y enriquecimiento de GdMSH2 por etapas (detallado en metodología). A) tinción Coomassie. B) Inmunodetección en fase sólida dirigida a GdMSH2. ~30 µg cargados en cada carril. PAGE 10 %, bloqueo en leche 1 hora, Anti-His (1:7000) 1 hora y Anti-ratón (1:30000) 1 hora, temperatura ambiente. 2 minutos de exposición. Encerrado en rojo la altura de 100 kDa.

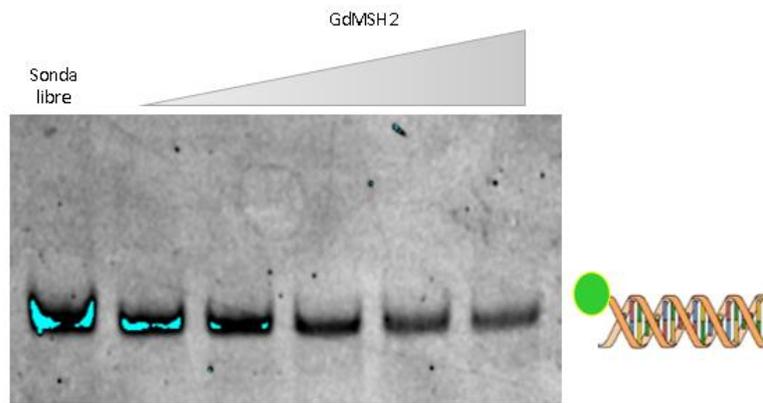
Gracias a este proceso se logró eliminar todo interferente de la muestra, obtener la proteína de forma pura y en cantidad suficiente. En la figura 33 se muestran una tinción Coomassie y un western blot equivalente. En estas imágenes se comparan, del lado izquierdo de cada una, la muestra igualmente tratada de un cultivo sin transformar, que funge como control de fondo, mientras que del lado derecho, la muestra de cultivo inducido a expresar GdMSH2. Como puede observarse en los carriles 3° de la sección “+pRSET_GdMSH2”, donde se presenta la muestra al final del proceso, aparece una banda definida a sobre los 100 kDa correspondiente a GdMSH2; puede notarse además que la intensidad de esta banda es incluso mayor que la que aparece a la misma altura en el carril 2°, señalando la correcta concentración final a la que fue sometida la muestra. A pesar de que en la tinción Coomassie, carril 3° de la

muestra inducida, sólo aparece un sutil barrido, señales muy tenues aparecen entre 70 y 35 kDa también el carril 3°, pero sólo del western blot, indicando que la degradación de la proteína prevalece, aunque en menor medida en este caso, teniendo en cuenta también que la banda de 70 kDa que levantaba la sospecha de procesamiento por parte de la bacteria, fue eliminada por completo. Ahora bien, en el carril 3° del cultivo sin transformar, en el western blot también, aparece una pálida señal a la misma altura que la correspondiente a GdMSH2, sin embargo, por su baja intensidad podría sólo ser un interferente. En cualquier caso, al cuantificar la proteína presente en la muestra enriquecida, para obtener un valor neto de la misma, se cuantificó también la muestra del cultivo sin transformar para emplearlo de blanco y restársela (ver metodología). Debe tenerse en cuenta que la cuantificación de Bradford contiene un error intrínseco al tomar en cuenta sólo los grupos aromáticos entre los residuos que conforman a una proteína, pues el reactivo de Bradford reacciona con estos, provocando el cambio de color que es finalmente cuantificado; en el presente trabajó se despreció dicho error. De la misma forma se utilizó la muestra del cultivo sin transformar para los ensayos de interacción.

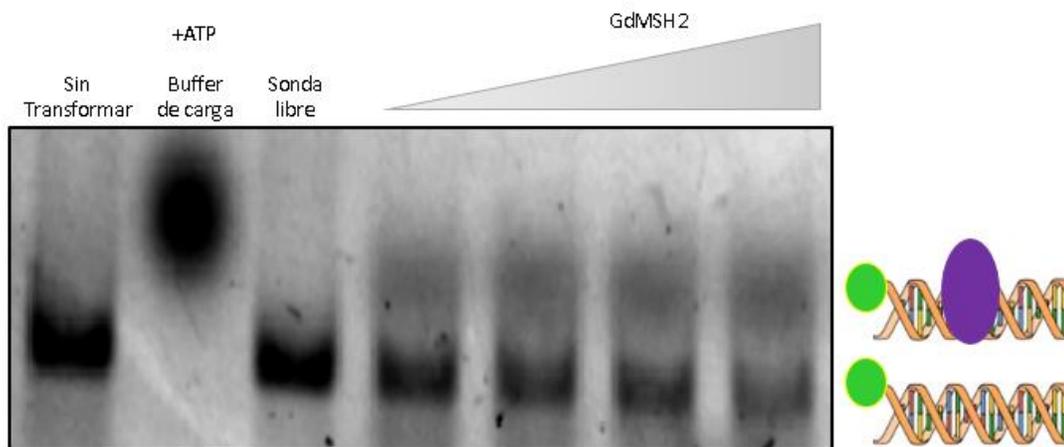
Evaluación de la interacción entre GdMSH2 y dsDNA mediante ensayos tipo EMSA (Electromobility Shifting Assay)

Después de la purificación de GdMSH2, y para poder realizar los ensayos de interacción proteína-DNA, ésta se cuantificó mediante colorimetría con el reactivo de Bradford obteniéndose una estimación de 1.288 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. Esta, en diferentes cantidades, como puede observarse en la figura 34, fue incubada junto a una sonda de dsDNA fluoresceinada en el extremo 5' para posteriormente observar su interacción a través de su retardamiento en un gel de poliacrilamida nativo.

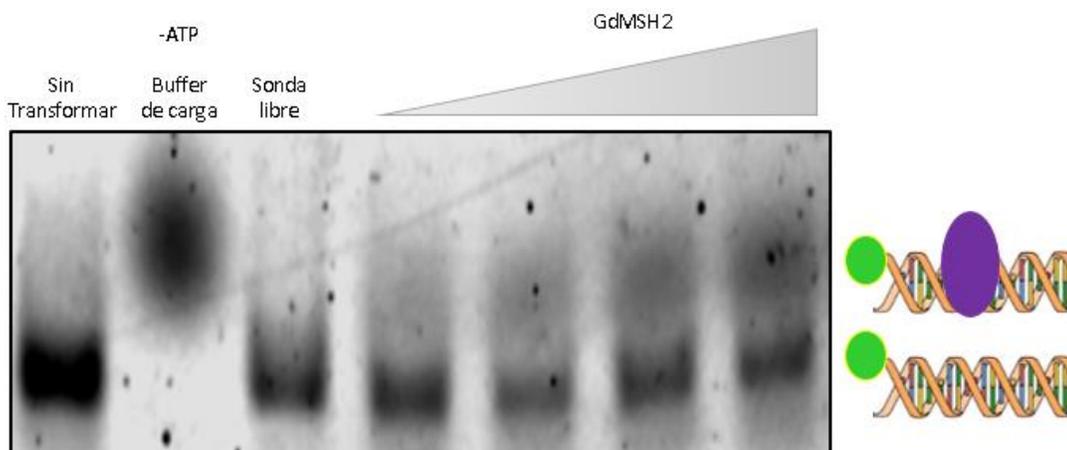
A)



B)



C)



D)

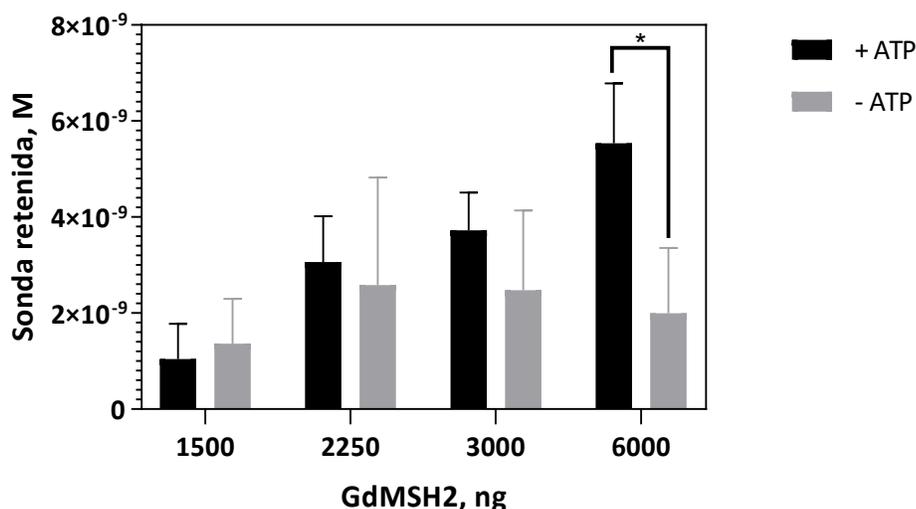


Figura 34. Ensayos tipo EMSA en gel PAGE nativo para observar la interacción entre GdMSH2 y dsDNA. A) Gel de poliacrilamida (29:1) al 10 % en el que se cargaron las reacciones de interacción GdMSH2-DNA-homodúplex. Sólo aparecen las bandas correspondientes a la sonda libre. La tonalidades azules son un efecto en el programa Image Studio (Li-cor®) y aparecen por la saturación de la señal. B) En presencia o C) ausencia de ATP. El carril “Sin transformar” indica la incubación de la sonda de dsDNA con un extracto obtenido de un cultivo de *E. coli* BL21 STAR libre de la construcción pRSET_GdMSH2, utilizado como fondo. D) cuantificación (de tres experimentos independientes) de la sonda retenida en complejo con GdMSH2 (banda superior en los geles) realizada en el programa Image Studio (Li-cor®) y graficada en Graph Prism (GraphPad®). Barras negras: +ATP; barras grises: -ATP. *Diferencia significativa (P value > 0.05).

Hablando particularmente de los geles presentados en este trabajo de la figura 34, cabe resaltar que aunque las bandas correspondientes a la formación del complejo aparecen con una cercanía inesperada a la banda correspondiente a la de la sonda libre, así es la forma en que el complejo se manifiesta pues el experimento es completamente reproducible. Además, la banda correspondiente al complejo, todos los casos, es muy difusa, lo que era esperado al emplear 4 % de poliacrilamida, en proporción 38:1 de acrilamida:bisacrilamida, para el gel. La razón por la cual se utilizó esta concentración y esta proporción de poliacrilamida es porque concentraciones mayores impedían que el complejo penetrara el gel y apareciera en la imagen del mismo, como puede observarse en panel A) de la figura 34, donde el gel es mucho más

concentrado y a proporción 29:1 de acrilamida:bisacrilamida, como se usa normalmente, sólo existen las bandas correspondientes a la onda libre e inclusive se puede notar cómo su intensidad disminuye conforme la cantidad de proteína aumenta.

Discusión

La vía de reparación de apareamientos erróneos (MisMatch Repair, por sus siglas en inglés) es un proceso de suma importancia y fuertemente conservado entre procariontes y eucariontes (Pochart, P., *et al*, 1997). Aunque su estudio en *Giardia* resulta interesante debido a las características minimalistas, así como el hecho de ser un organismo de divergencia temprana, dicha vía no ha sido estudiada experimentalmente en *Giardia*. Estudiarla podría señalar las diferencias que existen entre organismos para esta vía de reparación con respecto a la de *Giardia* para así determinar los detalles cruciales que le permiten llevarse a cabo.

Abordar el cebador paso de la vía MMR, el reconocimiento del error en el DNA, es una reacción importante para caracterizar dicho mecanismo en *Giardia*. Para ello, se procedió a identificar *in silico* a la proteína GdMSH2 mediante alineamientos, contra las homólogas de otras especies, de la secuencia aminoacídica predicha a partir de su gen putativo reportado por Marilee Ramesh y su equipo de trabajo (Ramesh, M., *et al*, 2005), y con su estructura tridimensional, como puede observarse en las figuras 16 y 17.

De los ensayos *in silico* se obtuvo que el gen AY295098.1 (GL50803_113252, en Giardia Data Base) contiene codificados los cinco dominios que lo acreditan como mhs2 putativa, enfatizando para cada dominio los siguientes aspectos: Conserva la estructura general de la superfamilia MutS; El dominio I se encuentra en una región similar a la de hMSH2 (1-24): 17-123, aunque débilmente conservado (figura 16, subrayado amarillo); De manera similar, el dominio II tiene bajo nivel de conservación pero se encuentra en una región parecida a la de hMSH2(125-297): 150-316 (figura 16, subrayado verde); La fuerte conservación en el dominio III de la región α hélice palanca transductora de la actividad ATPasa (D. V) y de interacción con el DNA (D. IV), comprendida entre los aminoácidos 613 a 661 (mientras que en hMSH2 está en 554-619). Además, la región N terminal de este dominio, que abarca las posiciones 344-529 (300-456 en hMSH2), es consistente con la generalidad del bajo nivel de conservación

de este dominio, como se puede observar en el alineamiento de la figura 16 subrayado azul; Los dominios IV y V constituyen la base esencial de MSH2, pues en ellos se tienen las funciones principales: interacción proteína-DNA, dimerización e hidrólisis de ATP; y se encuentran fuertemente conservados en GdMSH2 entre las posiciones 530-612 y 679-905, respectivamente, (figura 16, subrayados rosa y rojo, respectivamente). Su conservación estructural puede observarse en la comparación de la estructura predicha y las de referencia en las figuras 16 y 17, al notarse la abrazadera del D.IV en la parte inferior, o el motivo hélice-vuelta-hélice del D. V en la parte superior. (Warren, J., J., et al, 2007; Kunkel, T., A. y Erie, D., A., 2005); El hecho de que esta secuencia contenga putativamente todas estas características, a nivel proteína, es una fuerte sugerencia de que se comporte como sus homólogas ya caracterizadas durante la experimentación *in vitro*, y apoya fuertemente la existencia de la vía MMR en *G. duodenalis*.

En la figura 16, panel A), se aprecia la representación de estos dominios mediante colores sobre el modelo predicho de la proteína GdMSH2. En dicha representación no se toman en cuenta las diferencias, como inserciones aminoacídicas, que son propias de *G. duodenalis* para identificar con mayor facilidad a cada uno. Además, para la identificación de los dominios I y II, como se menciona en el pie de figura 16, se utilizaron las secuencias de los mismos equivalentes en la MSh2 humana de acuerdo PFAM y a los equipos de trabajo de Michael A. Edelbrock (Edelbrock, M., A., et al, 2013) y Joshua J. Warren (Warren, J., J., et al, 2007). Esta identificación se complementó observando la conservación de dichos dominios en el panel B) de la figura 16, con lo que puede presumirse de precisa, teniendo en cuenta que las bases de datos no reportan estos dominios, I y II, en GdMSH2, como frecuentemente sucede con sus secuencias por ser un organismo de divergencia temprana y con inserciones aminoacídicas atípicas entre eucariontes (Morrison, H., G., et al, 2007). Resultan evidentes estas diferencias al observar las brechas que se crean entre las posiciones 190 y 250, por ejemplo, del alineamiento en el panel B de la figura 16, donde la secuencia de *G. duodenalis* se mantiene continua mientras las de los otros organismos no.

Sin reparar en los problemas observados hasta ahora durante la expresión piloto de GdMH2, se probó purificarla en mayor cantidad y calidad mediante columnas de agarosa-níquel

(cromatografía de afinidad química) y se obtuvo la imagen 21, donde se aprecia que la señal de GdMSH2 aparece tenuemente comparada contra la de 70 kDa. Por un lado, este experimento señala que la posibilidad de que en las anteriores pruebas piloto, la cantidad de cultivo no haya sido suficiente para lograr observar señal a 100 kDa; por otro lado, se puede sospechar de la secuencia del gen en el plásmido: que haya sido mutada de alguna forma por la bacteria, bien porque le es tóxica, o bien por simplemente serle ajena (Duong-Ly, K., C., Gabelli, S., B., 2014). Para verificar si el problema estaba en la secuencia, se diseñó un cebador cuya diana fuera la región nucleotídica equivalente a si la proteína fuera de 70 kDa conservando el extremo amino terminal (pues la señal de los anticuerpos en las inmunodetecciones así lo indican), como sugiere Paul T. Wingfield para dirigir los esfuerzos a encontrar el posible problema (Wingfield, P., T., 2015). Se determinó que esta región era la que rodea el nucleótido 1890. Así, con este oligo, se secuenciaron los plásmidos obtenidos de las clonas positivas y en todos se encontró que ninguna modificación habían sufrido, como se muestra en la figura 23 B). Por lo tanto, la degradación o procesamiento de la proteína GdMSH2 debe tener lugar en los eventos río abajo de la transcripción, o bien, durante el proceso de purificación. En un análisis más acertado sobre la señal a 70 kDa apunta a que la proteína es procesada de cierta manera específica por la maquinaria de la bacteria, lo que explicaría la ausencia de barridos o señales “escalera” en los carriles donde aparece la banda de 70 kDa.

Para resolver la hipótesis planteada en este proyecto: GdMSH2 es capaz de reconocer y unirse *in vitro* a dsDNA homoduplex, se llevaron a cabo experimentos en los que se enfrentaron a GdMSH2 contra una sonda de DNA homoduplex fluoresceinada en el extremo 5' de una de las dos cadenas, de 60pb. Para visualizar la interacción de estos enfrentamientos se cargaron los 20 µL de reacción a geles nativos de poliacrilamida, como se muestra en la figura 34, en los que puede observarse que conforme aumenta la cantidad de proteína GdMSH2, mayor es la cantidad de DNA homoduplex unido en complejo proteína-DNA, a juzgar por la intensidad creciente de la banda superior en los carriles. Estos resultados son consistentes con las conclusiones experimentales presentadas por los equipos de trabajo de Richard Fishel (Fishel, R., et al, 1994) y Tomas A. Prolla (Prolla, T., A., et al, 1994), donde demuestran que MSH2,

humana y de *Saccharomyces cereviceae*, respectivamente, es afín a cadenas dobles de DNA, tanto a homoduplex como al heteroduplex (que contiene un apareamiento erróneo). A simple vista, si se comparan los geles +ATP y –ATP de la figura 34, no parece haber diferencia alguna en cuanto a la intensidad de la señal del complejo formado por lo que GdMSH2 se une a DNA de manera independiente del ATP, consistente con lo observado por Tomas A. Prolla (Prolla, T., A., et al, 1994).

Aún con 4 % de poliacrilamida 29:1 en el gel la banda correspondiente al complejo proteína-DNA jamás apareció a pesar de que la disminución de intensidad de la sonda libre indicaba fuertemente que la reacción de interacción sí se estaba llevado a cabo. La solución a este problema (emulando los geles completamente hidratados de anchas paredes de poro y poros “macro” obtenidos por crio-polimerización por el equipo de Qian Zhao (Zhao, Q., *et al.*, 2010)), gracias a la sugerencia de Pablo Franco Urquijo, estudiante de doctorado y compañero en el departamento, recayó en el principio mismo del retardamiento provocado por la matriz gel, es decir, la red de poros que se crea en el gel. Para permitir que el complejo logre atravesarlo, una red de poros más grandes permite que se disminuyan los efectos estéricos que impiden el paso del complejo, por lo que utilizar una proporción mayor de acrilamida sobre bisacrilamida fue clave para lograr obtener en el gel la imagen de ambas señales: la sonda libre y la sonda en complejo con GdMSH2. Sin embargo, mayor concentración de esta poliacrilamida revertió el efecto y se obtuvieron resultados similares a cuando se utilizaba a 29:1, por lo cual todos los geles donde pudo observarse el cambio de retardamiento que evidenció la interacción proteína-DNA fueron a 4 %.

Los datos obtenidos de tres experimentos independientes para cada caso se graficaron en la figura 34 en la que puede apreciarse con mejor detalle que, a pesar de que los experimentos de interacción en presencia de ATP parecen dotar de mayor afinidad a la GdMSH2 por el DNA homoduplex, no existe diferencia significativa dentro de las concentraciones de proteína utilizada, sin embargo, en ausencia de ATP, el complejo parece alcanzar un límite de saturación antes que en el caso donde sí existe ATP. La consistencia de estos resultados queda en duda pues los estudios realizados por el mencionado equipo de trabajo de Tomas A. Prolla (Prolla, T., A., et al, 1994) en el que muestran que la interacción ScMSH2-mmDNA u

homoduplex se da independientemente de ATP, difieren con los presentados por Fisher, también ya mencionado (Fishel, R., et al, 1994), donde aseguran que el ATP estimula la unión, permitiendo que la reacción alcance su límite de saturación a menor concentración de hMSH2. La discrepancia entre los estudios puede deberse principalmente a que cada estudio analiza proteínas homólogas de diferentes organismos, y a que en el de Prolla, la interacción con o sin ATP se evalúa no sólo formando el complejo ScMSH2-DNA, sino que se unen también PMS1 y MLH1, lo que podría sustituir la estabilidad dada por el ATP que Fisher sí observa en sus propios experimentos. Es importante también señalar que en los experimentos mostrados en el presente trabajo fueron realizados sólo con DNA homoduplex, por lo que la dependencia de ATP pudiera no ser notoria.

Conclusiones

- MSH2 se encuentra fuertemente conservada entre organismos tanto procariontes como eucariontes.
- MSH2 de *Giardia duodenalis* contiene los dominios putativos de mayor relevancia para su funcionamiento: el dominio IV de unión al DNA y el dominio V de ATPasa.
- Hay mejor expresión de GdMSH2 con pRSET que con pET100.
- EL método de enriquecimiento para purificar a GdMSH2 permite obtenerla sin interferentes.
- GdMSH2 es afín al dsDNA de manera independiente a ATP, en el rango de concentración de proteína analizado.

Perspectivas

- Determinar la afinidad de GdMSH2 sobre DNA con apareamientos erróneos y su posible dependencia de ATP.
- Continuar caracterizando otros componentes de la vía MMR y los pasos río debajo del reconocimiento inicial del error en el DNA.

Referencias

1. Acharya, S., Foster, P., L., Brooks, P. and Fishel, R. 2003. The Coordinated Functions of the *E. coli* MutS and MutL Proteins in Mismatch Repair. *Molecular Cell*. 12:233-246.
2. Adam, R., D. 1991. The Biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews*. 55: 706-732.
3. Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J., J. and Lahue, R., S. 1997. Genetic and Biochemical Analysis of Msh2p-Msh6p: Role of ATP Hydrolysis and Msh2p-Msh6p Subunit Interactions In Mismatch Base Pair Recognition. *Molecular And Cellular Biology*. 17, no. 5:2436-2447.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. y Walter, O. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6° edición. Garland Science. Estados Unidos. Pp. 244, 250.
5. Alonso-Stepanova Laboratory.
<https://alonsostepanova.wordpress.ncsu.edu/welcome/tools/labprotocols/electrocompetent-e-coli/>. Visitada el 5 de junio de 2018.
6. Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanism of *Giardia* species. *Nature Reviews. Microbiology*. 8: 413-422.
7. Banerjee, S. y Flores-Rosas, H. 2005. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. *Nucleic Acids Research*. 33(4):1410-1419.
8. Berghammer, H., Auer, B. 1993. "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *BioTechniques* 14:524-528
9. Bernander, R., Palm., J., E. y Svärd, S., G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiology*. 3:55-62.
10. Bishop, D., K., kolodner, R., D. 1986. Repair of heteroduplex plasmid DNA after transformation into *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 6:3401-3409.
11. Buret, A. G. 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*. 56: 316–317.
12. Camarillo, C., L., Casamichana, M., V., Weber, C., Guillen, N., Orozco, E., Marchat, L., A. 2009. DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolitica* and related protozoan parasites. *Infection, Genetics and Evolution*. 9:1051-1056.

13. Carpenter, M., L., Assaf, Z., J., Gourguechon, S. y Cande Z. 2012. Nuclear inheritance and genetic Exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. Journal of Cell Science. 125:2523-2532.
14. Cernikova, L., Faso, C., Hehl, A., B. 2018. Five facts about *Giardia lamblia*. PLoS Pathoh 14 (9).
15. De Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radmn, M. y Riele, H. 1995. Inactivation of the Mouse *Msh2* Gene Results in Mismatch Repair Deficiency, Methylation Tolerance, Hyperrecombination, and Predisposition to Cancer. Cell. 82:321-330.
16. Drotshmann, K., Hall, M., C., Shchbakova, P., V., Wang, H., Erie, D., A., Brownwell, F., R., Kool, E., T., Kunkel, T., A. 2002. DNA Binding Properties of the Yeast Msh2-Msh6 y Mlh1-PMS1 Heterodimers. Biol. Chem. 383:969-975.
17. Duong-Ly, K., Gabelli, S., B. 2014. Explanatory Chapter: Troubleshooting Recombinant Protein Expression: General. Methods in Enzymology. 541(17):209-229.
18. Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T., D., Hetsko, M., L., Smith, J., R., Kagnoff, M., F., Gillin, F., D. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. The Journal of Immunology. 164: 1478- 1487.
19. Edelbrock, M., A., Kaliyaperumal, S. y Williams, K., J., 2013. Structural, molecular and celular functions of MSH2 and MSH6 during signaling and other noncanonical activities. National Institute of Health. 0: 53-66.
20. ExpASY – Compute pI/Mw tool. web.expasy.org/compute_pi. Visitada el 5 de mayo de 2017.
21. Feng, Y., Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clinical Microbiology Reviews. 24:110–140.
22. Fishel, R., Ewel, A. y Lescoe, K. 1994. Purified Human MSH2 Protein Binds to DNA Containing Mismatched Nucleotides. CANCER RESEARCH. 54: 5539-5542.
23. Fleck, O., Nielsen, O., 2004. DNA repair. Journal of Cell Science. 117:515–517.
24. García-Nafría, J., Watson, J., F., Greger, I. H. 2016. IVA cloning: A single-tube universalcloning system exploiting bacterial *in vivo* Assembly. Scientific Reports. 6: 27459.

25. Gardner, T., B., Hill, D., R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:114-128.
26. Gibson, D., G., Youn, L., Chuang, R., Y., Venter, J. C., Hutchison, C., A. y Smith, H., O. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*. 6(5):343-345.
27. Grilley, M., Holmes, J., Yashar, B. y Modrich, P. 1990. Mechanisms of DNA-mismatch correction. *Mutation Research*. 236:253-267
28. Heyworth, F. 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *PARASITE*. 23, 13
29. Hingorani, M., M., 2016. Mismatch binding, ADP-ATP Exchange and intramolecular signaling during mismatch Repair. *DNA Repair*. 38: 24-31
30. Holiday, R. 1964. A mechanism for gene conversión in fungi. *Genet. Res. Camb*. 5:282-304
31. Holmes, J., J., Clark, S., Modrich, P. 1990. Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*87:5837-41
32. Huang, Y., Su, L., Lee, G., A., Chiu, P., Cho, C., Wu, J., Sun, C. 2008. Regulation of Cyst Wall Protein Promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(45): 31021-31029
33. Invitrogen, Life Technologies. 2010. User Manual: Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits. Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into vectors for high-level, inducible expresssion in *E. coli*. Manual part no. 25-0400. MAN0000214.
34. Invitrogen, Life Technologies. 2010. User Manual: pRSET A, B and C For high-level expression of recombinant proteins in *E. coli*. Manual part no. 25-0213. MAN00000061.
35. I-TASSER Protein structure and Function Prediction. <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Visitada el 1 de mayo de 2017.
36. Keister, D., B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(4):487-488.

37. Kramer, W., B., Kramer, M., S., Williamson y Fogel. 1989. Cloning and nucleotide sequence of DNA mismatch repair gene *PMS1* from *Saccharomyces cerevisiae*; homology of *PMS1* to procariotic *MutL* and *HexB*. *Journal of Bacteriology*. 171:5339-5346.
38. Krebs, J., E., Goldstein, E., S., Kilpatrick, S., T. 2014. *Lewin's Genes*. 11° edición. Jones & Bartlett Learning. Estados Unidos. Pp. 428.
39. Kunkel, T., A. y Erie, D., A. 2005. DNA Mismatch Repair. *Annual Reviews Biochem*. 74:681-710.
40. Kunkel, T., A. y Erie, D., A. 2015. Eukariotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annual Reviews Genet*. 49:291-313.
41. Lane, S., Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the Waterborne Parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*. 28:2, 123-147.
42. Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S. & Gillin, F. D. 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol*. 10: 554–559.
43. Manhart, C., M., Alani, E., 2015. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair*.
44. Moreno, S. N. J., Mason, R. P., Muniz, R. P. A., Cruz, F. S., Docampo, R. 1983. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*. *J. Biol. Chem*. 258:4051-4054.
45. Morrison, G., H., 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., Holders, M., E., Huse, S., M., Kim, U., U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J., E., J., Palm, D., Passamaneck, N., D., 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.
46. Müller N, von Allmen N. 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*. 35:1339–47.
47. Pfam <http://pfam.xfam.org/protein/P43246>. Visitada el 2 de junio de 2019.

48. Pochart, P., Woltering, D. y Hollingsworth, M. 1997. Conserved Properties between Functionally Distinct MutS Homologs in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(4):30345-30349
49. Poxleitner, M., K., Carpenter, M., L., Mancuso, J., J., Wang, C., R., 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.
50. Prolla, T., A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R., D. y Liskay, R., M. 1994. MLH1, PMS1, and MSH2 Interactions During the Initiation of DNA Mismatch Repair in Yeast. *SCIENCE*. 265:1091-1093.
51. Ramesh, M., A., Malik, S., B., Logsdon, J., M. 2005. A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in *Giardia* and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. *Current Biology*. 15:185-191.
52. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/structure/2O8B>, visitada el 23 de julio de 2018 a las 16:54 horas.
53. Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svärd, S., G. 2006. *Giardia* immunity – an update. *TRENDS in Parasitology*. 22:26-31.
54. Ryan, U., Hijjawi, N., Feng, Y., Xiao, L. 2018. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology*. 49(1):1-11.
55. Sambrook, J., Fritsch, E., F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª edición. Cold Spring harbor laboratory press.
56. Sambrook J., Russell, D., W. 2006. The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: High-efficiency Transformation. *Cold Spring Harb. Protoc*.
57. Spampinato, C., P., Gomez, R., L., Galles, C., Lario, Luciana, L., D. 2009. From bacteria to plants: A compendium of mismatch repair assays. *Mutation Research*.
58. Svärd, S. G., Hagblom, P. & Palm, J. E. 2003. *Giardia lamblia*– a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol. Lett*. 218: 3–7.

59. Torres, H. A., Martínez, M. R., Bazán, T. M., Bermúdez, C. R., 2016. Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie*. 127: 173-186.
60. Troeger, H., Epple, H-J, Schneider, T. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*. 56:328–35.
61. Tůmová, P., Dluhošová, J., Weisz, F., Nohýnková. 2019. Unequal distribution of genes and chromosomes refers to nuclear diversification in the binucleated *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*. 49: 463-470.
62. Universidad de Colombia. <http://www.unal.edu.co/ins-libbiqUN/eng/model1.html>, visitada el 19 de junio de 2017 a las 12:02.
63. Wagner, R., Meselson, M. 1976. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, no. 11:4135-4139.
64. Warren, J., J., Pohlhaus, T., J., Changela, A., Iyer, R., R., Modrich, P. y Beese, L., S. 2007. Structure of the Human MutS α DNA Lesion Recognition Complex. *Molecular Cell*. 26: 579-592.
65. Wildenber, J., Meselson, M. 1975. Mismatch Repair in Heteroduplex DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, no. 6:2202-2206.
66. Williamson, M., S., Game, J., C., y Fogel, S. 1985. Meiotic gene conversión mutants in *Saccharomyces cerevisiae*, I. Isolation and characterization of *pms-1* and *pms-2*. *Genetics*. 110:609-646.
67. Wingfield, P., T. 2015. Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 80:6.1.1-6.1.35.
68. Zeng, F., Hao, Z., Li, P., Meng, Y., Dong, J. y Lin, Y. 2017. A restriction-free method for free reconstitution using two single-primer PCRs in parallel to generate compatible cohesive ends. *BioMed Central Biotechnology*. 17:32

Apéndice I:

Obtención de vectores de expresión

Vector pET100

En el laboratorio, el vector de expresión pET100 se encontraba inicialmente con la secuencia para Rad51 como inserto. Para liberarlo, se realizó una digestión secuencial con las enzimas de restricción NheI y SacI cuyos sitios de corte flanquean al inserto. En seguida se le realizó una electroforesis en agarosa 1 % en TBE 0.5X y se cortó la banda de 5.682 kb para ser eluída del gel mediante electrodiálisis. Al buffer con el amplicón eluído se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, grado biología molecular, para dejar reposar durante ~12 horas a -20°C. Luego se centrifugó a 10 kG durante 15 minutos a 4°C. y se desechó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados agregando etanol 70 % y centrifugando a 10 kG durante 5 minutos. Al retirarse el sobrenadante restante, se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió en 30 µL de agua MilliQ. Se almacenó a -20° C hasta su posterior uso.

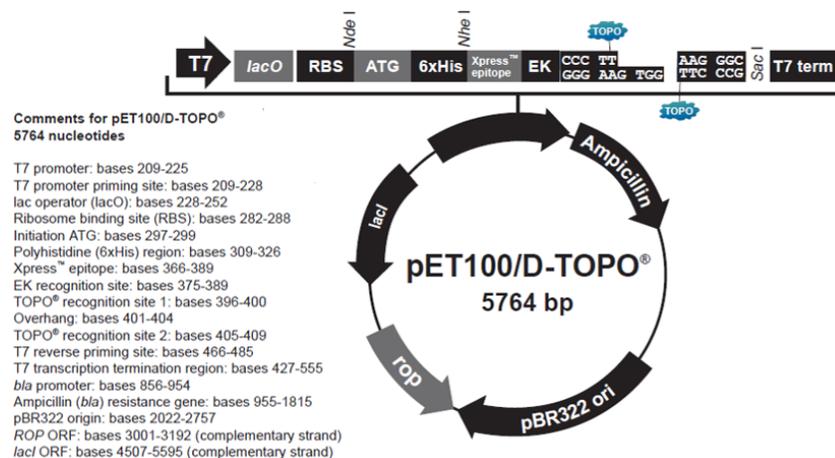


Figura 11. Mapa general del vector pET100 (Invitrogen) en su forma comercial (Invitrogen, Life Technologies. 2010. User Manual).

Vector pRSET

El vector de expresión pRSET fue proporcionado por el Dr. (Edgar Morales, Depto. de Bioquímica), quien realizó las siguientes modificaciones en el mismo:

- Eliminación de las 9 pb “espaciadoras” entre el codón de inicio ATG de la traducción y la etiqueta de histidinas (CAC X 6) para optimizar la expresión de la proteína recombinante.
- Optimización del uso de codones CAT por CAC en la etiqueta de histidinas.
- Eliminación del gen 10 del fago T7.

El sitio de clonación múltiple quedó reducido a dos sitios de restricción: BamHI y HindIII gracias a la inserción del gen ScODC (Ornitin-decarboxilasa).

Para disponer correctamente de este vector y poder ligarlo a la secuencia de interés (el gen Gdmsh2), se realizó una PCR (empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion, de NEB®, #M0530S) con los oligos: F2pRIVA, 5' CAACCTGAAAGCTTGATCCGGCTG 3'; R2pRIVA, 5' GCTCCATGGATCCACCCTGGAAG 3', que dotan al producto con una región de complementariedad con el inserto, con estas condiciones:

Reactivos	volumen
Buffer 5X	50 µL
dNTP's mix	5 µL
F2IVA, 10 µM	12.5 µL
R2IVA, 10 µM	12.5 µL
Polimerasa Phusion®	2.5 µL
DNA genómico	5 µL
Agua MilliQ	hasta 250 µL

Desnaturalización inicial	98° C, 30''	} 35 ciclos
Desnaturalización	98° C, 10''	
Alineamiento	58.9° C, 30''	
Extensión	72° C, 1.75'	
Extensión final	72° C, 7'	
Incubación	4° C, ∞	

de manera que el producto obtenido fuera el vector sin la secuencia ScODC y con 20 pares de bases complementarias al producto de PCR de Gdmsh2 anteriormente descrito. Se midió la cantidad de producto obtenido a través de espectrofotometría con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), y se estimaron 0.62 µg/µL para Gdmsh2 y 0.64 µg/µL para pRSET, con los índices de calidad indicados en la tabla 4. En seguida, este último amplicón fue defosforilado

mediante la fosfatasa alcalina de ternera (NEB[®], M0290S) con el fin de dar lugar a la ligación con el producto Gdmsh2, y se precipitó empleando acetato de sodio y etanol, obteniéndose 18.7 ng/ μ L. Por último, para transformarlos en *E. coli* TOP 10 se consideró una proporción inserto:vector de 15:1.

Apéndice II:

Orígenes del estudio de la vía MisMatch Repair

A mediados de la década de los 60's, el grupo de investigación de Robin Holliday que trabajaban en estudios sobre la recombinación en hongos, detectó que en algunos sistemas la recombinación podía llegar a darse con cierta frecuencia significativa aún entre hebras de DNA que no eran 100% homólogas, sino que diferían en al menos una base, por lo que sugirieron la idea de un sistema de corrección que, previo al proceso de recombinación, homogenizaba la complementariedad de ambas cadenas para que la recombinación se diera eficazmente, proceso al que nombraron conversión de genes (Holliday, R., 1964). Alrededor de una década después, la dilucidación de dicho mecanismo comenzó a darse gracias a múltiples trabajos, como los de Judith Wildenberg y Matthew Meselson en 1975, donde transfecando bacterias (en condiciones mínimas de recombinación) con DNA del fago λ con apareamientos erróneos determinados observaron que en la progenie de fagos los apareamientos erróneos habían sido reparados, el DNA en ellos contenía una cadena parental y otra que había sido reparada (Wildenber y Meselson, 1975).

Un año después, 1976, Robert Wagner y Mathew Meselson realizan experimentos similares con mayor detalle y logran obtener conclusiones que caracterizan a la vía MMR bacteriana: la reparación se da preferentemente en una de las hebras del DNA, la degradación de la región dañada inicia en donde se encuentra el apareamiento erróneo y se da preferencialmente en la dirección $5' \rightarrow 3'$. Además, sugieren que la vía MMR podría actuar no sólo en la mediación de la recombinación, sino corrigiendo errores originados durante la replicación, incluso sugieren que la vía podría actuar con alta eficiencia en cadenas recién sintetizadas quizá debido a su estado no metilado (Wagner, R., Meselson, M., 1976).

Durante los siguientes años, y a la fecha, los mecanismos de la vía MMR se siguen dilucidando, y una gran parte de éstos ya han sido descritos. En 1991, Paul Modrich realiza una revisión de lo conocido hasta el momento sobre dicha vía de reparación. En esta revisión, el autor reúne evidencias tales que permiten proponer los siguientes modelos de acción de la vía MMR procarionte:

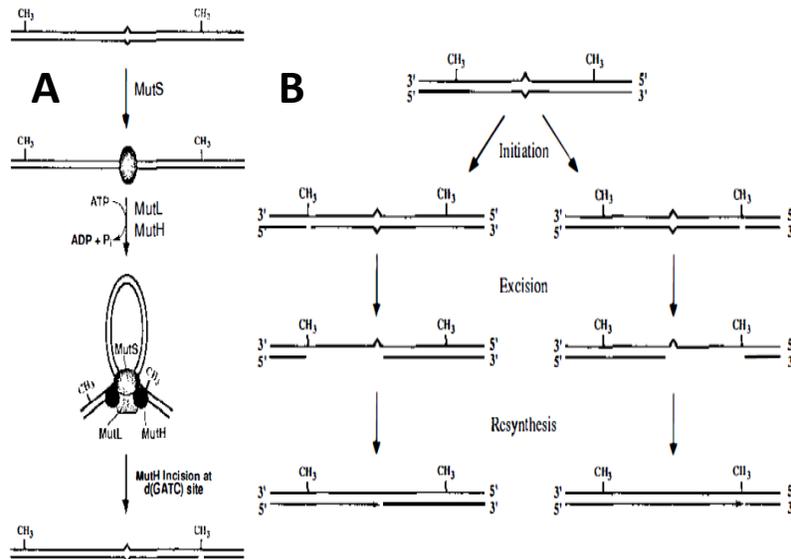


Figura 5. Modelo de la vía MMR procarionte. A) Primeros pasos de la vía, desde el reconocimiento del apareamiento erróneo hasta la generación del Nick en la cadena a degradar. B) Vía MMR general; puede degradar la hebra dañada en cualquier dirección según la nucleasa: exonucleasa VII o RecJ exo para 5'→3', Exo I para 3'→5' (modificada de Modrich, P., 1991).

La figura 5. A se generó a partir de las observaciones de las proteínas cristalizadas formando complejos con DNA con apareamientos erróneos y las evidencias que indican que la metilación en los sitios GATC dirigen la distinción entre la cadena templado y la cadena errónea. Además, en la figura 5. B se ilustra la propuesta de secuencia de pasos y acciones de cada complejo (Modrich, P., 1991).

En la segunda mitad de la década de los 80's se retoma el trabajo de Robin Holliday y se pretende extrapolar lo observado de la vía MMR en procariontes a sistemas eucariontes. Los hongos fueron analizados mediante técnicas de conversión de genes mediante transfección con DNA a recombinar con apareamientos erróneos (Grilley, M., *et al.*, 1990). Además, la generación de cepas mutantes de *S. cerevisiae* en los genes PMS han demostrado la presencia

de la vía MMR en eucariontes gracias al fenotipo mutante que resulta de dichas mutaciones, y a la baja viabilidad de sus esporas (Williamson, *et al.*, 1985; Kramer, *et al.*, 1989). Otros experimentos realizados *In vitro* han permitido determinar que es suficiente una ruptura de cadena sencilla (Nick) para dirigir el mecanismo MMR en células eucariontes. Empleando DNA heteroduplex (con apareamientos erróneos) con Nick en posiciones determinadas, Holmes demostró que la reparación MMR se realiza mediante el reconocimiento de rompimientos de cadena sencilla tanto en células de *Drosophila melanogaster* como en líneas celulares humanas (Holmes, J., 1990). De manera análoga, con múltiples experimentos se ha reportado que es necesaria la presencia de ATP, y similitudes con el sistema bacteriano en cuanto a la discriminación entre cadenas se refiere. Por otro lado, se ha reunido evidencia directa sobre el reconocimiento y procesamiento de apareamientos erróneos en *S. cerevisiae*: Kolodner y colaboradores observaron que células mitóticas de *S. cerevisiae* son capaces de reparar sustituciones de una sola base, cambios de marco de lectura por un solo nucleótido extra y pequeñas inserciones/delecciones (Bishop y Kolodner, 1986).

Adicionalmente, el uso de ATP por parte de los primeros pasos en la vía MMR ha sido ampliamente estudiado. Samir Acharya y colaboradores han propuesto un modelo en el que MUTS de *Thermus aquaticus* expresado en *E. coli*, utiliza el ATP de manera secuencial aprovechándose de sus dos sitios ATPasa. Los autores llaman al modelo switch molecular regulado por ATP. Mediante la diferencia entre ATP inicial y ATP final, midieron la cantidad de ATP hidrolizado por MUTS y observaron que, cuando lo enfrentan a mmDNA (*mismatched* DNA, con apareamiento erróneo), su interacción es mucho más estable que con el DNA homoduplex. Además, mediante TIR (Total Internal Reflectance), una variante de la resonancia de plasmones, evaluaron la formación de cada complejo y su dependencia a ATP, con lo que obtuvieron lo siguiente: MUTS puede unirse inespecíficamente al DNA de forma reversible; esta interacción es más estable cuando en el DNA existe un apareamiento erróneo que, de haberlo, MUTS requerirá de la hidrólisis de ATP para mantener dicha interacción ahora sí específica; el reclutamiento de MUTL afianza la unión al apareamiento erróneo en el DNA siempre que se mantenga un suplemento de ATP (Acharya, S., 2003).

Más adelante, en 1997 Eric Alani y colaboradores caracterizaron las proteínas MSH2 y MSH6 (MUTS α) con respecto a la hidrólisis de ATP e interacciones o reconocimiento de cada una con el DNA *mismatched* mediante aproximaciones genéticas y bioquímicas introduciendo mutaciones puntuales en el gen Msh2 en sus sitios ATPasa y el putativo hélice-vuelta-hélice. Los efectos de dichas mutaciones fueron analizados genéticamente midiendo la frecuencia de mutación, y bioquímicamente midiendo la estabilidad del dímero, de su unión al DNA apareado erróneamente y su actividad ATPasa. Los autores encontraron así que el cambio en el sitio ATPasa no afecta la unión del heterodímero al DNA apareado erróneamente pero sí a los siguientes pasos de la vía. Además, las mutaciones en el motivo hélice-vuelta-hélice en el dominio V de MSH2 revelaron que éste es necesario para su interacción con MSH6. Con ello, sugieren que este motivo hélice-vuelta-hélice de MSH2 dirige la interacción con MSH6 mediante la hidrólisis de ATP, obteniéndose como resultado neto de estos cambios de interacción la modulación del reconocimiento de apareamientos erróneos en el DNA (Alani, E., *et al.*, 1997).

Apéndice III:

Generalidades de las vías de reparación del DNA

La más fiel de las vías de reparación es la recombinación homóloga, HRR, pues usa un templado de DNA homólogo a la cadena a reparar (he aquí una de las razones por las que es ventajoso tener más de un alelo de cada gen). Esta vía es activada cuando se detectan DSB's (al igual que la vía NHEJ, principalmente activa en la fase del ciclo celular G1 y no en la S ni G2, como la HRR) mediante el complejo MRE11-RAD50-NBS1, en humanos, que comienza a degradar el extremo 5' para obtener ssDNA 3' al que se le unirán RPA's (proteína de replicación A) que promueven la interacción de RAD51 con el ssDNA. Al formarse este nuevo complejo, RAD54 estimula la invasión de una molécula de DNA homóloga que será usada como templado para resintetizar la porción dañada, lo que provoca que se formen dos uniones tipo Holliday y ocurra migración de "ramas". Al final, las uniones Holiday son resueltas por helicasas y topoisomerasas (Fleck, O. y Nielsen, O., 2004).

EL dímero KU70-KU80 se une a DSB's, dando inicio a la vía NHEJ. En seguida se recluta la subunidad catalítica de la proteína quinasa de unión a DNA (DNA-PK_{CS}) y, si los extremos no son "ligables, se procesan por nucleasas y posteriormente por polimerasas. Al final, los extremos de DNA son unidos por la ligasa IV XRCC4-DNA (Fleck, O. y Nielsen, O., 2004). Debido a que la NHEJ no utiliza una cadena homóloga como templado, se asocia dicha vía de reparación con la pérdida de nucleótidos y, por ende, de información.

Cuando se presentan lesiones que generan la formación de aductos de DNA, como la dimerización de timinas o los entre- e intra- cruzamientos de cadenas, y fotoproductos inducidos por la radiación UV, la vía de reparación activada para solucionarlos es la escisión de nucleótidos, NER, que contiene dos subvías: la reparación global del genoma (Global Genome Repair, por sus siglas en inglés, GGR), encargada de remover el daño en cualquier región del genoma, y la reparación acoplada a la transcripción (Transcription-Coupled Repair, por sus siglas en inglés, TCR) que repara el daño específicamente en la hebra transcrita de genes activos. UV-DDB, complejo compuesto por DDB1, DDB2 y XPC-hHR23B, reconoce el daño en la vía GGR y recluta al complejo NEF4, RAD7 y RAD16, quien mediante RAD7 une al

complejo NF2, RAD4 y RAD23, que estabiliza la unión al DNA específicamente en el sitio donde es detectado el daño. Así, en la TCR, se comienza con el arresto de la RNA polimerasa y la participación de las proteínas CSA, CSB, RAD26 y RAD28. Los siguientes pasos son idénticos en ambas subvías. Se reclutan los complejos NEF1 y NEF3 y el factor de transcripción TFIIH, cuyas subunidades XPB y XPD, siendo helicasas de polaridad opuesta entre sí, desenrollan el DNA alrededor de la lesión. En seguida se unen XPG, y XPA-RPA, siendo éstos últimos los encargados de verificar el correcto ensamblaje de todo el complejo en el sitio del daño en el DNA y asegura que, cuando se una XPF-ERCC1, XPG y XPF-ERCC1 corten la cadena dañada del lado 3' y 5', respectivamente, eliminando de 24 hasta 32 nucleótidos entre los cuales se encuentra el dañado. Por último, se resintetiza el segmento cortado y se ligan los extremos (Fleck, O., Nielsen, O., 2004).

Cuando el daño en el DNA se da directamente en la base nitrificada de un nucleótido (alquilación, oxidación, desaminación), es decir, el daño no provoca la formación de aductos, la vía activada es la reparación por escisión de bases, BER. Las glicosilasas detectan las bases con lesiones, cuando éstas se detectan, dichas enzimas cortan el enlace N-glicosílico que une la base dañada con el azúcar, creándose un sitio apirimidínico/apurínico (sitio AP, que por sí solo es ya considerado un daño), en seguida, una endonucleasa afín a sitios AP (APN1 o APN2) retira el esqueleto de fosfato-azúcar de la cadena y el gap de un solo nucleótido es rellenado por la DNA polimerasa β y luego es ligada la cadena. La actividad deoxiribofosfodiesterasa de la pol β puede remover el enlace 5' de lo que resta del nucleótido AP, sin embargo, cuando dicha actividad no logra eliminar tal enlace, se lleva a cabo el proceso *long-patch BER* (parche largo de la reparación por escisión de bases), en el que se retiran de 2 a 8 nucleótidos entre los que va el dañado. Al final, una porción de la cadena en la que se encontraba el daño queda sobrelapando a la recién sintetizada; FEN1 se encarga de eliminarla (Fleck, O., Nielsen, O., 2004).

Una vía de reparación menos estudiada como tal es la reparación mediada por metiltransferasas, cuya función consiste en eliminar alquilaciones extras en el DNA. Las enzimas que actúan en esta vía, metiltransferasas, transfieren de forma irreversible los metilos en el DNA a sus residuos de cisteína.