



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

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Regulación de la expresión del rDNA en
Giardia duodenalis”**

T E S I S

Que presenta

Francisco Alejandro Lagunas Rangel

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de la Tesis

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV Zacatenco bajo la dirección de la doctora María del Refugio Bermúdez Cruz. Fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo la beca asignada al número de CVU 660808

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por abrirme sus puertas y darme el apoyo y la oportunidad de llevar a cabo este posgrado.

A la doctora Rosa María Bermúdez Cruz por todas sus enseñanzas, su paciencia, su tiempo y su guía.

A los doctores Patricio Gariglio, Rebeca Manning, José Hernández y Santiago Martínez por sus consejos y asesoría.

A Enrique García Villa por sus consejos y enseñanzas.

A la doctora María Luisa Bazán por todo su cariño y su dedicación.

A Gabriela Mora en la coordinación académica, Guadalupe Aguilar en la unidad de secuenciación y a Rosa María García en la cocina bacteriológica por su disposición, apoyo y amabilidad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades de <i>Giardia</i>	3
1.2. Ciclo de vida	3
1.3. Ensamblajes	3
1.4. Genoma de <i>Giardia</i>	4
1.5. Patogenia	5
1.6. Ciclo celular	5
1.7. DNA ribosomal	9
1.8. Histonas y marcas epigenéticas	11
1.9. Sirtuinas	12
2. ANTECEDENTES	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
8. MATERIALES Y MÉTODOS	18
8.1. Cepas y condiciones de crecimiento	18
8.2. Soluciones	18
8.3. Análisis de hipersensibilidad a la DNasaI de la cromatina	18
8.4. Análisis bioinformático	20
8.5. Elutriación centrífuga en contraflujo	20
8.6. Citometría de flujo	21
8.7. RT-qPCR	21
8.8. Construcción de plásmidos y transfección de parásitos	21
8.9. Inmunofluorescencia	23
8.10. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	23

8.11. Análisis estadístico	24
9. RESULTADOS	25
9.1. El rDNA en <i>Giardia</i> tiene una distribución diferencial de cromatina y marcas epigenéticas en las diferentes subunidades	25
9.2. La nicotinamida (NAM) induce la expresión de rRNA, mientras que la tricostatina A (TSA) y la 3-deazaneplanocina A (DZNep) la reprimen	25
9.3. Durante el ciclo celular de <i>Giardia</i> , se regula la transcripción del rRNA	28
9.4. NAM induce un arresto del ciclo celular en G2 en los trofozoítos de <i>Giardia</i> y promueve cambios en la expresión transcripcional de las sirtuinas	32
9.5. GdSir2.4 produce cambios epigenéticos sobre la secuencia de rRNA	35
10. DISCUSIÓN	39
11. CONCLUSIONES	45
12. PERSPECTIVAS	46
13. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular de trofozoítos de <i>Giardia</i>.	8
Figura 2. Diagrama esquemático de los complejos silenciadores del rRNA de A) levadura y de B) humano.	11
Figura 3. Plásmido construido para sobreexpresar a GdSir2.4 silvestre y a la dominante negativa.	22
Figura 4. Distribución de heterocromatina en rDNA de <i>Giardia</i>.	26
Figura 5. Marcas epigenéticas en el rDNA de <i>Giardia</i>.	27
Figura 6. La expresión del rRNA está regulada por mecanismos epigenéticos.	28
Figura 7. Análisis del ciclo celular de las fracciones de elutriación y los niveles de expresión del rRNA.	31
Figura 8. Expresión de sirtuinas de <i>Giardia</i> en cada fracción de elutriación.	33
Figura 9. NAM arresta a los trofozoítos de <i>Giardia</i> en fase G2 de forma dosis y tiempo dependiente.	34
Figura 10. NAM promueve cambios en la expresión transcripcional de las sirtuinas.	35
Figura 11. GdSir2.4 se encuentra en la región IGS del rDNA dentro del nucleolo.	37
Figura 12. GdSir2.4 participa en la regulación del rRNA.	38
Figura 13. Mecanismos reguladores de la expresión de rRNA de <i>Giardia</i>.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agrupaciones genotípicas en análisis genéticos de <i>Giardia duodenalis</i> y otras especies.	4
Tabla 2. Lista de primers utilizados en este estudio.	19
Tabla 3. Posibles proteínas asociadas a las sirtuinas en el silenciamiento del rRNA.	29

RESUMEN

Giardia duodenalis es un parásito de gran interés médico por la gran cantidad de infecciones que causa en todo el mundo cada año. Aunque la investigación sobre los mecanismos epigenéticos en este protista solo ha comenzado recientemente, ya se ha demostrado que la regulación epigenética tiene funciones importantes en el enquistamiento, la variación antigénica y la resistencia a los antibióticos en *Giardia*. En este trabajo, se determinó el estado de la cromatina en el DNA ribosomal (rDNA) en el genoma de *Giardia*, se determinaron niveles de RNA ribosomal en presencia de inhibidores específicos de sirtuinas y de enzimas HDACs y HMTs, de igual manera se evaluaron los niveles de transcritos de cada sirtuinas y del RNA ribosomal a través del ciclo celular. Ensayos de ChIP en el rDNA, así como inmunofluorescencia indirecta permitieron determinar la localización subcelular de un ortólogo de *Giardia* de Sir2, GdSir2.4, el cual está involucrado en el silenciamiento de la expresión de rRNA. Nuestros resultados demuestran que GdSir2.4 se localiza en el nucleolo, y su unión a la región espaciadora intergénica del rDNA está asociada con la desacetilación de la cromatina en esta región. Dada la importancia de la regulación de la expresión del rRNA para mantener niveles adecuados de ribosomas y estabilidad genómica dentro de las células, GdSir2.4 puede considerarse un objetivo para crear nuevos agentes terapéuticos contra este parásito

Palabras clave. Sirtuinas, desacetilación, ciclo celular, silenciamiento de genes, ChIP

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a parasite of great medical interest due to the large number of infections that it causes worldwide each year. Although research on epigenetic mechanisms in this protist has only started recently, epigenetic regulation has already been shown to have important roles in encystation, antigenic variation, and antibiotic resistance in *Giardia*. In this work, the chromatin status of ribosomal DNA in the *Giardia* genome was determined, levels of ribosomal RNA were determined in the presence of specific inhibitors of sirtuins and HDACs and HMTs enzymes, as well as levels of transcripts of each sirtuins and of ribosomal RNA were evaluated throughout the cell cycle. ChIP assays and indirect immunofluorescence made it possible to determine the subcellular location of a Sir2 *Giardia* ortholog, GdSir2.4, which is involved in the silencing of rRNA expression. Our results demonstrate that GdSir2.4 is localized in the nucleolus, and its binding to the intergenic spacer region of rDNA is associated with deacetylation of chromatin in this region. Given the importance of the regulation of rRNA expression to maintain adequate levels of ribosomes and genomic stability within cells, GdSir2.4 can be considered a target to create new therapeutic agents against this parasite.

Keywords. Sirtuins, deacetylation, cell cycle, gene silencing, ChIP

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de *Giardia*

Giardia duodenalis es un protozooario binucleado flagelado del orden Diplomonadida que pertenece al grupo Metamonada dentro del supergrupo Excavata¹. En particular, *Giardia* es uno de los agentes más comunes que causan enfermedades diarreicas en todo el mundo, con más de 300 millones de casos notificados al año, especialmente en países de bajos ingresos y en desarrollo². *Giardia* se caracteriza por un genoma muy compacto con una simplificación significativa de la mayoría de los procesos celulares, incluso sin algunos de los organelos típicos de las células eucariotas, como un aparato de Golgi clásico, peroxisomas y mitocondrias respiratorias. Por lo tanto, en muchas vías donde se requieren complejos multiproteicos, es notable que *Giardia* tiene menos componentes reconocibles con respecto a otros organismos³⁻⁵.

1.2. Ciclo de vida

Giardia tiene un ciclo de vida simple con dos etapas principales: la forma vegetativa y móvil denominada trofozoíto, y el quiste altamente infeccioso y resistente al medio ambiente⁶. Cuando un huésped ingiere los quistes, estos ingresan al tracto digestivo donde son estimulados por el medio ácido en el estómago y la presencia de bilis y tripsina en el duodeno para convertirse en trofozoítos móviles en el intestino delgado proximal. En el ambiente rico en nutrientes y bajo en oxígeno del tracto intestinal superior, los trofozoítos proliferan y usan su disco adhesivo para adherirse a las vellosidades intestinales para resistir la peristalsis. A medida que aumenta la densidad del parásito y los trofozoítos descienden al tracto intestinal inferior, encuentran disminución del colesterol, aumento del pH y aumento de las concentraciones de bilis y ácido láctico. Estas condiciones inducen a algunos de los trofozoítos a diferenciarse en quistes infecciosos, los cuales se excretan en las heces y se convierten en fuente de nuevas infecciones⁷.

1.3. Ensamblajes

Mediante una combinación de estudios de movilidad electroforética, RFLP, PCR de los genes β -giardina (*bg*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), la subunidad pequeña ribosomal (*ssu*) y

glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y su secuenciación, los organismos morfológicamente idénticos de *Giardia duodenalis* se han subclasificado en ocho conjuntos o ensambles (de A a H). Cada uno de estos ensambles tiene un número diferente de especies que puede infectar, donde se ha demostrado que los ensamblajes C a H son relativamente específicos e infectan a pocas especies, mientras que los ensamblajes A y B tienen un gran número de posibles huéspedes, y donde se incluye al humano^{8,9}. La Tabla 1 muestra el ensamblaje de *Giardia duodenalis* con sus huéspedes correspondientes y el nombre científico propuesto para cada ensamblaje.

Tabla 1. Agrupaciones genotípicas en análisis genéticos de *Giardia duodenalis* y otras especies¹⁰.

Especies/ Ensamble	Nueva nomenclatura propuesta	Susceptibilidad de hospedero
<i>G. duodenalis</i> Ensamble A	<i>G. duodenalis</i>	Humanos y otros primates, perros, gatos, ganado, roedores, y otros mamíferos salvajes.
<i>G. duodenalis</i> Ensamble B	<i>G. entérica</i>	Humanos y otros primates, perros y algunas especies de animales salvajes
<i>G. duodenalis</i> Ensamble C y D	<i>G. canis</i>	Perros y otros canidos
<i>G. duodenalis</i> Ensamble E	<i>G. bovis</i>	Ganado y otros animales domésticos
<i>G. duodenalis</i> Ensamble F	<i>G. felis</i>	Gatos
<i>G. duodenalis</i> Ensamble G	<i>G. simondi</i>	Ratas
<i>G. agilis</i>	<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. muris</i>	<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardea</i>	<i>G. ardea</i>	Aves
<i>G. microti</i>	<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. duodenalis</i> Ensamble H	Sin propuesta	Foca gris, Gaviota.

1.4. Genoma de *Giardia*

Giardia cuenta con cinco cromosomas en cada uno de sus dos núcleos, ambos transcripcionalmente activos y considerados diploides. Sin embargo, al contrario de lo que podría pensarse, las células de *Giardia* son constitutivamente aneuploides: los núcleos no

son idénticos entre sí, contienen diferente número de cromosomas y atraviesan el ciclo celular de manera asíncrona. Incluso se ha demostrado que varios genes del cromosoma 5 se han perdido en uno de los dos núcleos¹¹. *Giardia* cuenta con un genoma de aproximadamente 12.6 Mb que contiene 4963 marcos de lectura abiertos con una longitud media de 635 aminoácidos codificados¹². El genoma es compacto en términos de espacio intragénico y regiones no codificantes, los promotores y las regiones no traducidas son mínimas y una de las características más notables del genoma de *Giardia* es que a la fecha sólo han sido identificados 12 genes que sufren modificaciones postranscripcionales a lo largo de su genoma. Esto contrasta con el genoma humano, el cuál tiene en promedio 8.4 intrones por gen y el tamaño de cada uno es aproximadamente 3000 pb^{13,14}.

1.5. Patogenia

Los principales síntomas de la infección con *Giardia* son variables pero suelen incluir diarrea acuosa, náuseas, dolor epigástrico y pérdida de peso⁶, y estos aparecen entre los 6 y los 15 días después de la infección¹⁵. Se estima que este parásito causa alrededor de 280 millones de infecciones humanas sintomáticas por año; de las cuales el 10% son transmitidas a través de alimentos contaminados con quistes. Además, también es un patógeno zoonótico y la infección a animales de granja puede tener un impacto económico relevante, que resulta en la pérdida de productividad^{15,16}. El tratamiento de la giardiasis se limita a compuestos nitroheterocíclicos (metronidazol, nitazoxanida y furazolidona), benzimidazoles (albendazol y mebendazol), paromomicina y auranofina, donde el fracaso del tratamiento es relativamente común^{17,18}. Aunque se desconoce el mecanismo exacto se ha visto que uno de los más probables es la pérdida de la habilidad del parásito de reducir a las drogas nitro, evitando así su activación. Otro mecanismo para la resistencia a metronidazol y a nitazoxanida implica la alteración de la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés; mientras que en el caso de los benzimidazoles se cree que la resistencia ocurre por mutaciones en la β -tubulina del parásito⁶. Por tanto, se destaca la necesidad de nuevas opciones para tratar esta enfermedad.

1.6. Ciclo celular

El ciclo celular consiste en una secuencia de eventos ordenada y altamente regulada que permite que una célula produzca dos células hijas. Este ciclo consta de dos fases principales: interfase y mitosis. La interfase se subdivide en las fases G1, S y G2. La fase G1 (gap 1) es donde una célula crece de tamaño y sintetiza todos los componentes necesarios para la síntesis de DNA. A esto le sigue la fase S, donde la célula replica su ADN. En la fase G2 (gap 2), la célula reproduce sus orgánulos y continúa creciendo en tamaño. Al final de G2, la célula pasa a la mitosis, que también se subdivide en diferentes fases. En la profase, la primera etapa de la mitosis, se produce el ensamblaje del huso mitótico, así como su unión al ADN condensado y replicado (cromátidas hermanas). En la metafase, los cromosomas se alinean a medio camino entre los polos del huso. Durante la anafase, las cromátidas se separan sincrónicamente y cada una es empujada hacia el polo del huso al que se enfrenta. Durante la telofase, los dos conjuntos de cromosomas hijos llegan a los polos del huso y se descondensan, y finalmente, durante la citocinesis, el citoplasma se divide en dos para crear dos células hijas¹⁹.

En contraste con varias células de mamíferos donde G1 es la fase más larga del ciclo celular, los trofozoítos de *Giardia* pasan la mayor parte del ciclo celular en la fase G2²⁰. Durante la interfase, la cromatina de *Giardia* se descondensa y los cuerpos basales se localizan en la región inmediatamente por encima de ambos núcleos. En la profase, se observa condensación de cromatina en cromosomas²¹ a pesar de la ausencia de la histona enlazadora H1^{22,23}. Los cromosomas de *Giardia* son muy pequeños ($\sim 0,8 - 2,4 \mu\text{m}$)²⁴, y cada uno tiene un único locus centromérico^{25,26}. Además, los cuerpos basales flagelares se duplican y la nucleación de los cuatro polos del huso comienza entre los dos núcleos en la profase^{26,27}. Cerca del final de la profase, se observa un reposicionamiento de ambos núcleos en la línea media de los trofozoítos, colocándose uno sobre otro a lo largo del eje dorsal-ventral. Mientras tanto, los microtúbulos del huso y los cuerpos basales flagelares se colocan gradualmente alrededor de cada núcleo, y los microtúbulos se organizan en los husos polares, alargándose hasta rodear cada núcleo. En metafase, la formación de husos bipolares y la presencia de cromátidas hermanas se observa en *Giardia* como en otros organismos. Sin embargo, no se observa una alineación de centrómeros a lo largo del eje. Durante la anafase, los microtúbulos se adhieren al centrómero de cada cromosoma, seguido de un alargamiento del huso a lo largo del eje de izquierda a derecha. La envoltura nuclear permanece intacta durante la mitosis en *Giardia*.

En la prometafase, los husos mitóticos permanecen extranucleares, pero los microtúbulos que se originan en estas estructuras penetran en el núcleo a través de aberturas en la membrana nuclear²⁶. Estas observaciones sugieren que *Giardia* tiene una mitosis semiabierta que también ocurre en *Drosophila melanogaster*, *Asterina miniata*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis* y *Caenorhabditis elegans*²⁸. La cariocinesis por *Giardia* ocurre en lados opuestos del eje izquierdo-derecho de la célula, ocurriendo primero en un núcleo en relación con el otro. La asincronía de los dos núcleos ocurre en la profase y anafase tempranas donde la condensación del DNA y el estiramiento lateral de las cromátidas ocurren más rápidamente en un núcleo^{29,30}. *Giardia* presenta una división ecuacional de sus núcleos, siempre transfiriendo una copia de cada núcleo parental a cada célula hija. Durante la telofase, se observan algunas cromátidas rezagadas entre los nuevos núcleos, lo que sugiere una separación cromática prematura³¹. Un haz de microtúbulos reemplaza las matrices del huso bipolar y los cuerpos basales vuelven a su ubicación habitual durante la interfase, los núcleos se colocan adyacentes entre sí y la cromatina se descondensa²⁶. La citocinesis comienza con un pequeño surco en el extremo anterior de la célula que crea una célula característica en forma de corazón con cuatro núcleos. El surco avanza gradualmente perpendicular al eje de segregación cromosómica y hacia atrás donde se produce el estiramiento de la membrana plasmática. Debido a la falta de miosina, no existe un anillo contráctil en *Giardia*. Por lo tanto, el surco de división es impulsado por flexiones de flagelos caudales y golpes de poder de flagelos anteriores que culminan en citocinesis^{26,27}. En *Giardia*, los cuerpos basales flagelares no se reabsorben, y estos juegan un papel importante en la organización del huso durante todo el ciclo celular al ayudar a establecer la polaridad celular^{26,32}. Los flagelos se heredan de forma semiconservadora de las células progenitoras a las hijas de manera similar a otros protistas y algas³³. Cuando los flagelos anterolaterales parentales se transforman en los flagelos caudal derecho en ambas células hijas, ambos flagelos posterolaterales parentales se vuelven anterolaterales en una célula hija mientras que ambos flagelos ventrales hacen lo mismo en la otra. Ambos flagelos caudales mantienen su tipo y siempre se colocan en el lado izquierdo debido a que representan los cuerpos basales más maduros en las células hijas, forman el núcleo de los nuevos microtúbulos de disco adhesivo y, por lo tanto, determinan la asimetría izquierda-derecha de la célula. Por el contrario, los flagelos de los pares ventral y posterolateral siempre se ensamblan de novo durante cada división. En particular, la

reorientación, migración y transformación funcional de los cuerpos basales de los padres y los flagelos ocurren en paralelo con el movimiento de los núcleos y la mitosis³² (Nohýnková et al., 2006).

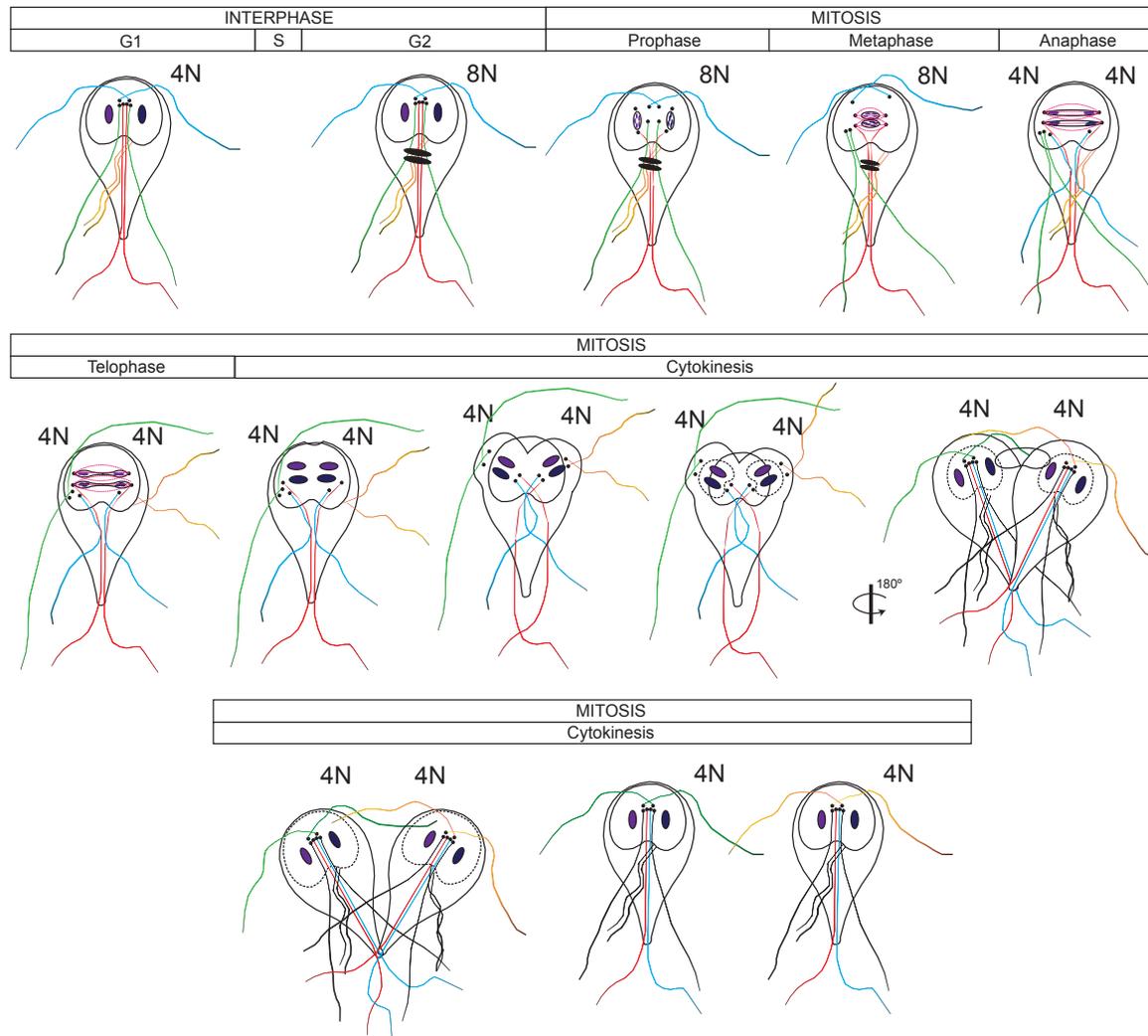


Figura 1. Ciclo celular de trofozoítos de *Giardia*. La división celular de *Giardia* es un proceso muy complejo que requiere una alta organización en cada uno de los pasos que atraviesa la célula. La profase, metafase, anafase y telofase comprenden los pasos de la mitosis donde los núcleos se duplican y posteriormente se produce la citocinesis. En esta figura nos centramos en los cambios que se producen en los núcleos, los flagelos y el disco adhesivo durante el ciclo celular. Los flagelos anteriores parentales aparecen en azul, los flagelos caudales en rojo, los posteriores en verde y los ventrales en amarillo. Los cuerpos basales son puntos negros y el disco adhesivo parental tiene una línea continua, mientras que los discos secundarios son discontinuos (Lagunas-Rangel, FA et al. (2021, en revisión)).

Los nuevos discos adhesivos se ensamblan de novo en las células hijas durante la mitosis y su nucleación comienza en el lado anterior dorsal de la célula parental después de la reorientación de los flagelos anterolaterales. Estos aparecen como pequeños discos compuestos por cintas cortas de microtúbulos del citoesqueleto. Estos nuevos discos giran en el sentido de las agujas del reloj y se mueven gradualmente en direcciones opuestas. El disco parental permanece hasta la mitosis tardía, donde el reborde ventrolateral persiste hasta la última fase de la división. Por lo tanto, el desmontaje del disco parental implica primero desmontar el citoesqueleto de los cuerpos basales y luego cortar y eliminar gradualmente las microfibras y los puentes cruzados para que el disco se vuelva gradualmente más pequeño³⁰. Los trofozoítos de *Giardia* alternan entre una fase adherida y una de natación, y esta transición, así como la motilidad flagelar, es importante durante la división. La fase de natación es necesaria para el inicio de la citocinesis que conduce a la separación de las dos células hijas. Al inicio de la citocinesis, el montaje del disco adhesivo en cada célula hija se completa con un agrandamiento de las microcintas dorsales con un desarrollo final de la cresta lateral y el reborde ventrolateral. Finalmente, se requiere la fase dependiente de la adhesión para completar la citocinesis de las células hijas conectadas de cola a cola. Durante este proceso, las células hijas mueven sus discos adhesivos en direcciones opuestas hasta que las células se separan³⁰. Un diagrama que resume los cambios de *Giardia* a través del ciclo celular se presenta en la figura 1.

Durante el enquistamiento, el cual ocurre cuando los trofozoítos se encuentran en la fase G2, las células en la fase de prequiste dividen sus núcleos sin replicación del DNA y sin duplicación de polos centroméricos, por lo que el quiste comienza con una ploidía de 2N. Después de una ronda de replicación del DNA sin división celular, el quiste maduro se convertirá en 16N que consta de cuatro núcleos 4N²⁰. Mientras tanto, las tétradas del cuerpo basal se separan y migran a los polos del huso sin duplicación previa. Además, el disco adhesivo junto con su citoesqueleto asociado se fragmentan³⁴.

1.7. DNA ribosomal

El DNA ribosomal (rDNA) es la secuencia de DNA que codifica el RNA ribosomal (rRNA) y, en la mayoría de los eucariotas, consiste en un segmento altamente repetitivo compuesto

por un espaciador transcrito externo (ETS), las subunidades 18S, 5.8S y 28S que están separadas por espaciadores transcritos internos (ITS) y un espaciador no transcrito (NTS) también conocido como espaciador intergénico (IGS) entre cada repetición. Esta unidad de rDNA se transcribe como un RNA precursor largo (45S pre-ARNr) que se procesa y modifica para generar las subunidades ribosomales maduras³⁵. La síntesis del RNA ribosomal oscila durante el ciclo celular. La transcripción de genes del DNA ribosomal esta fuertemente asociada al ciclo celular y esta es máxima durante la fase S y G2. Al entrar en la mitosis, los nucléolos sufren cambios morfológicos extensos y la transcripción del DNA ribosomal cesa casi por completo. La vía p53-pRb normalmente controla el punto de control G1/S, y en este punto también se censan los niveles de pre-rRNA, que de no ser adecuados, impiden el paso de una fase a la siguiente³⁶.

El locus de rDNA de levadura se encuentra en el brazo largo del cromosoma XII. Hay dos vías que actúan en paralelo para regular la expresión del rRNA, una dependiente de Sir2 y la otra independiente. En el silenciamiento del rDNA dependiente de Sir2, Fob1 se une al sitio RFB del espaciador no transcrito 1 (NTS1) y recluta a Net1, lo que conduce al reclutamiento de Sir2 y Cdc14 al complejo RENT. Varias otras proteínas influyen en la regulación de la expresión del rRNA. Rpd3 está asociado con la regulación negativa del silenciamiento del rDNA. Set1 o Dot1 reclutan positivamente a Net1 y Sir2, mientras que Set2 tiene el efecto contrario. Rad6 o Ubp10 regulan positivamente el silenciamiento del rDNA regulando la asociación de Sir2 en los loci del rDNA, mientras que Ubp8 tiene un efecto negativo. En el silenciamiento del rDNA independiente de Sir2, Fob1 unido al sitio RFB media la unión de Tof2, Csm1/Lrs4 y condensina al NTS1, lo que lleva a la asociación de rDNA con la periferia nuclear con la ayuda de proteínas CLIP como Heh1 y Nur1 durante la mitosis. En esta etapa específica del ciclo celular, Jhd2 regula preferencialmente el silenciamiento del rDNA manteniendo la asociación de Csm1/Lrs4 y condensina³⁷ (Figura 2A).

En mamíferos la expresión del rDNA está regulada por varios complejos enzimáticos, el factor de transcripción TTF-I reconoce y se une a T0, lo que facilita el reclutamiento del complejo de remodelación nucleolar (NoRC, por sus siglas en inglés) o del complejo de remodelación y desacetilación de nucleosomas (NuRD) al promotor del rDNA. Un RNA corto no codificante denominado pRNA, homólogo al promotor del rDNA, es producido por RNAPI y se une a TIP5 a través de una estructura en horquilla, lo que facilita y estabiliza el

reclutamiento del NoRC a la cromatina, promoviendo así el silenciamiento del rDNA. Las DNMTs median la hipermetilación del rDNA con la asociación del NoRC y pRNA. El complejo de silenciamiento nucleolar dependiente de energía (eNoSC) regula el silenciamiento del rDNA en respuesta a los niveles de energía intracelular o la restricción calórica. El complejo NuRD establece el estado de equilibrio para el rDNA en células diferenciadas y de detención del crecimiento. La interacción del complejo NuRD con CSB y TTF-I facilita el reclutamiento de NuRD al promotor del rDNA³⁷ (Figura 2B).

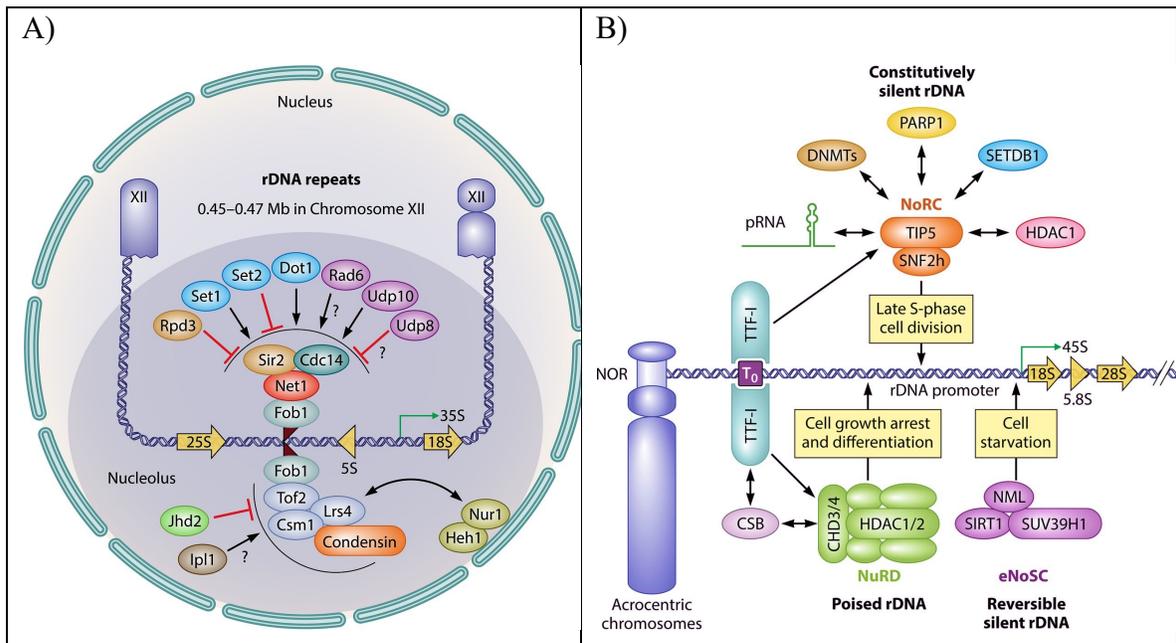


Figura 2. Diagrama esquemático de los complejos silenciadores del rRNA de A) levadura y de B) humano.

1.8. Histonas y marcas epigenéticas

Las histonas son proteínas críticas en el empaquetamiento del DNA en la célula en forma de cromatina y cromosomas. Son proteínas de masa molecular baja, aproximadamente 11-12 KDa y exhiben un alto contenido, cerca de 20%, de lisina y arginina (aminoácidos básicos). Con las cargas positivas de las cadenas laterales de estos restos, las histonas (que son extremadamente básicas) se unen a los grupos fosfato del ADN (cargados negativamente). Hay cinco tipos principales: la histona H1 y las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Estas últimas se denominan también histonas nucleosomales o canónicas y forman un octámero con dos histonas de cada tipo, en el cual se enrolla aproximadamente dos veces la doble cadena de DNA. Este complejo ADN-histona recibe el nombre de nucleosoma y constituye el

componente primario del cromosoma. La histona H1 se coloca como pieza de cierre en cada nucleosoma y al mismo tiempo toma contacto con las agrupaciones vecinas³⁸. A menudo, las histonas son modificadas, modificando el nivel de compactación de la cromatina y permitiendo cambios en la expresión genica. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas permiten que las células respondan rápida y específicamente a estímulos endógenos o exógenos para evitar la síntesis de proteínas de novo, un proceso que lleva tiempo y consume energía³⁹. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, citrulinación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, desamidación, formilación, O-GlcNAcilación, propionilación, butirilación, crotonilación e isomerización de la prolina⁴⁰. En particular, las modificaciones postraduccionales en las histonas están relacionadas principalmente con la regulación de la expresión génica y, por lo tanto, tienen funciones importantes en procesos clave. Varias enzimas evolucionaron para provocar modificaciones específicas de aminoácidos en las histonas, agregando grupos funcionales (*writers*), eliminando estas marcas (*erasers*), y estas marcas de cromatina pueden ser identificadas por un grupo de proteínas (*readers*). Por tanto, estas modificaciones de histonas permiten que las células modifiquen rápidamente la expresión génica en respuesta a estímulos ambientales⁴¹. El análisis del genoma de *Giardia* identificó la presencia de enzimas que podrían modificar las histonas, incluidos los escritores de cromatina como acetiltransferasas (HAT)⁴², metiltransferasas (HMTs)⁴³, proteínas cinasas específicas⁴⁴ y ubiquitin ligasas⁴⁵; así como enzimas borradoras como desacetilasas (HDAC)⁴² y deubiquitinasas, entre otros factores putativos de modificación de histonas, donde la estructura del dominio de estas enzimas parece ser menos compleja⁴⁶. Esto sugiere que existen mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica en este parásito, abriendo un área de investigación prometedora⁴⁷, aunque al mismo tiempo no se ha demostrado la metilación del DNA en este organismo⁴⁸.

1.9. Sirtuinas

La acetilación de histonas es un ejemplo de marca de histonas. En general, la acetilación de histonas se asocia con cromatina activa y transcripción de genes, mientras que la desacetilación de histonas se asocia con cromatina inactiva y represión de la transcripción. El equilibrio entre los dos estados está controlado por la actividad de las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC)⁴⁹. Las sirtuinas se clasifican

dentro de la familia de enzimas HDAC de clase III que, a diferencia de las HDAC de clases I y II, requieren el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) como sustrato⁵⁰. Las sirtuinas son altamente conservadas desde procariotas hasta eucariotas y la proteína Sir2 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el miembro fundador de esta familia⁵¹. Los mamíferos tienen siete sirtuinas, SIRT1–7, que comparten un dominio central catalítico conservado dependiente de NAD⁺, se localizan en diferentes compartimentos subcelulares, se dirigen a diferentes sustratos y gobiernan diversos procesos biológicos importantes que incluyen el metabolismo energético, la resistencia al estrés y el mantenimiento de la estabilidad genómica, envejecimiento y tumorigénesis. Los estudios biológicos celulares han demostrado diferentes compartimentos subcelulares para cada miembro de la familia, siendo SIRT6 y SIRT7 proteínas nucleares, SIRT3, SIRT4 y SIRT5 son proteínas mitocondriales, y SIRT1 y SIRT2 que se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma⁵². Las sirtuinas realizan principalmente desacetilación en residuos de lisina modificados a través de un mecanismo enzimático único que consume NAD⁺ estequiométricamente, y la nicotinamida es un producto obligatorio con cada ciclo de reacción. Por lo tanto, la actividad de la sirtuina está íntimamente ligada al estado metabólico de la célula⁵³. Además, se sabe que las sirtuinas, más allá que la desacetilación, pueden llevar a cabo otro tipo de reacciones que incluyen ADP-ribosilación, desuccinilación, desmalonilación y desacilación, entre otras⁵⁴. Por ejemplo, se ha encontrado que SIRT4 tiene baja actividad desacetilasa, pero alta actividad de ADP ribosiltransferasa. Mientras tanto, SIRT5 prefiere sustratos de succinilo, malonilo y glutaril lisina en lugar de acetil lisina. Se ha informado que SIRT2, cuya actividad principal es la desacetilación, posee actividad de desmiristoilación junto con SIRT6⁵⁵.

Uno de los blancos de las sirtuinas son las histonas, siendo responsables de la cromatina represiva y el silenciamiento de genes (Morigi et al., 2018). Las sirtuinas tienen funciones en el control del ciclo celular, la reparación del ADN y las funciones asociadas a las mitocondrias⁵⁶. Se han identificado sirtuinas putativas en parásitos como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Sarcomastigophora*, *Neospora*, *Babesia*, *Theileria* y *Eimeria*⁵⁷, donde estas juegan un papel importante en procesos clave y, por lo tanto, se consideran como posibles dianas terapéuticas antiparasitarias⁵⁸.

2. ANTECEDENTES

Giardia tiene 86 copias de la unidad de rRNA que consta de 28S, 5.8S y 18S en la región subtelomérica de sus cromosomas¹². El rRNA de 5S se transcribe por separado de un locus génico diferente⁵⁹. Hay 10 copias de la subunidad 5S y se encuentran en regiones internas (no teloméricas) de los cromosomas¹². Cada trofozoito de *Giardia* contiene dos núcleos y el rRNA se expresa en ambos núcleos⁶⁰. En particular, este parásito exhibe subunidades de RNA ribosomal más pequeñas que muchos eucariotas, e incluso de procariotas, y con una secuencia que contiene un alto contenido de GC (75.1%)⁶¹. En este parásito, las repeticiones de rRNA comienzan después de una región subtelomérica llamada unidad génica del telómero (TGU, por sus siglas en inglés) (compuesta de un gen de una proteína rica en cisteína (VSP, por sus siglas en inglés), una proteína quinasa (gPK) y un gen de anquirina (ANK))⁶². El rDNA de *Giardia* comienza con una forma truncada de la subunidad 28S (con un punto de ruptura muy conservado) que posteriormente continúa con la primera subunidad funcional 18S y un número variable de repeticiones. Al final, hay una forma truncada de la subunidad 18S que es interrumpida abruptamente por la secuencia de telómeros⁶³. La transcripción de rRNA por la RNA polimerasa I genera un precursor de pre-47S rRNA que luego puede procesarse para producir el rRNA maduro. Para satisfacer la demanda, la biogénesis de los ribosomas representa un tremendo compromiso de energía celular y está estrictamente regulada por las células en respuesta a diversos estreses y estímulos ambientales³⁷. Los genes que codifican el rDNA son altamente susceptibles a la pérdida de copias debido a su repetitividad y transcripción activa a lo largo del ciclo celular, lo que representa uno de los aspectos más críticos del mantenimiento del genoma⁶⁴. Estas cuestiones deben ser gestionadas por las células a través de algunos mecanismos reguladores. En la mayoría de los casos, la regulación a corto plazo se produce mediante la modificación reversible de los factores de transcripción de la RNA Pol I que afectan la eficacia del inicio de la transcripción y/o la tasa de transcripción de genes de rRNA activos. Sin embargo, la regulación a largo plazo implica mecanismos epigenéticos que alteran la proporción de copias activas y silenciosas de genes de rRNA³⁵. En los sitios de heterocromatina del rDNA, los estados epigenéticos contribuyen al silenciamiento génico y la estabilidad del genoma, que son necesarios para una segregación cromosómica adecuada y una vida útil normal³⁷. En

Giardia se ha reportado la presencia de cromosomas secundarios o accesorios de longitud variable que contienen conjuntos de repeticiones del rDNA⁶², lo que podría indicar la presencia de círculos extracromosómicos producto de inestabilidad genómica⁶⁴. Las histonas canónicas (dos copias para los genes H2a, H2b y H3, y tres copias del gen H4, con excepción de la histona enlazadora H1)^{22,23} se han identificado en *Giardia*, las cuales mantienen sitios conservados evolutivamente para modificaciones postraduccionales. En *Giardia*, los mecanismos epigenéticos estudiados hasta ahora están involucrados en la regulación del enquistamiento^{42,65,66}, la variación antigénica^{66,67} y la resistencia a los antibióticos⁶⁸⁻⁷⁰. Además, las marcas epigenéticas en las histonas están asociadas con efectos sobre la expresión génica en *Giardia*^{66,71}. *Giardia* tiene cinco sirtuinas (GdSir2.1 [GL50803_10708], GdSir2.2 [GL50803_10707], GdSir2.3 [GL50803_16569], GdSir2.4 [GL50803_11676] y GdSir2.5 [GL50803_6942]). Aunque dos de esas sirtuinas (GdSir2.1 y GdSir2.2) se han caracterizado bioquímicamente^{72,73}, no se sabe que función específica tienen dentro del parásito.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que básicamente todos los organismos presentan mecanismos para regular la expresión del rDNA con el fin de mantener un número adecuado de ribosomas y al mismo tiempo evitar la inestabilidad de su genoma, es de interés estudiar estos mecanismos en *Giardia duodenalis*, un parásito de amplio interés médico y con altas tasas de resistencia a los fármacos actuales, con el objeto de explotar estos conocimientos y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

4. HIPÓTESIS

Giardia duodenalis posee mecanismos epigenéticos responsables de regular la expresión del rDNA.

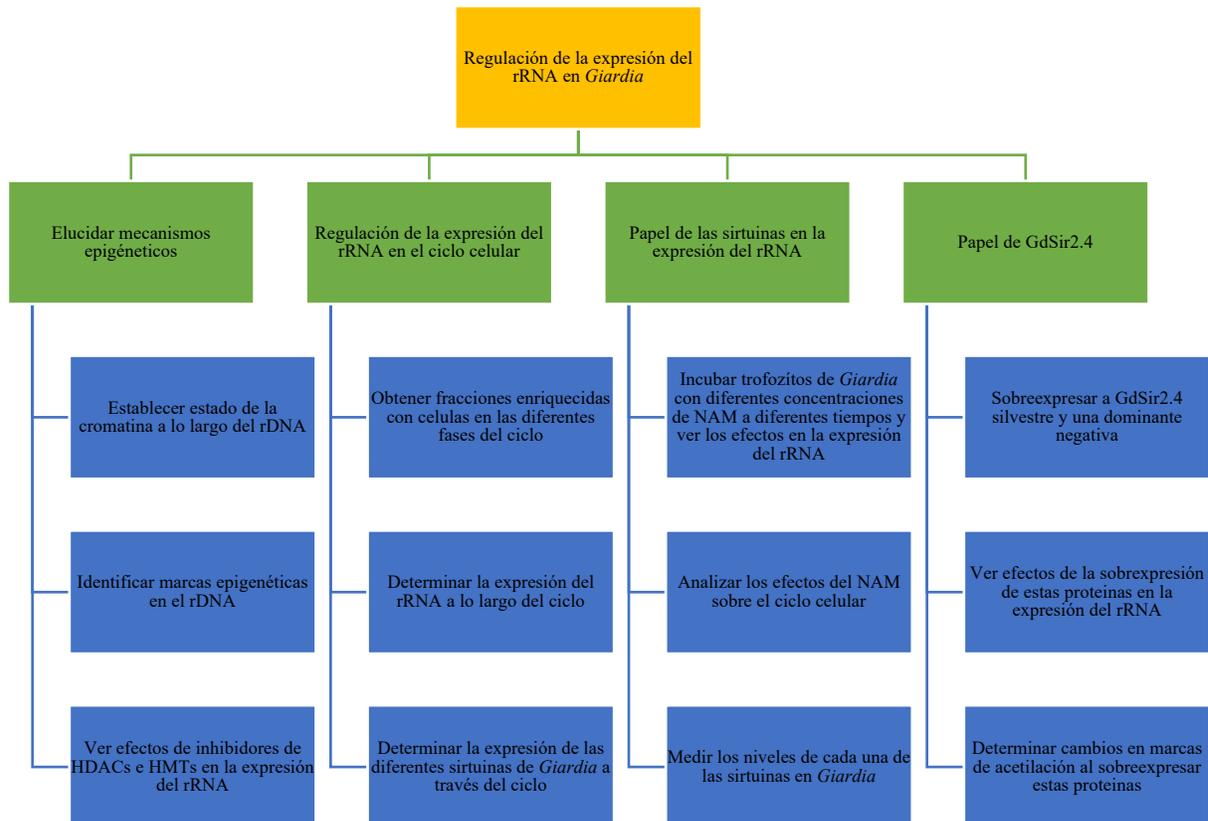
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar algunos de los mecanismos epigenéticos que posee *Giardia duodenalis* para regular la expresión del rDNA.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elucidar posibles mecanismos epigenéticos que permitan regular la expresión del rRNA en *Giardia*.
2. Determinar el estado de eucromatina y heterocromatina en el DNA ribosomal
3. Determinar como se regula la expresión del rRNA a través del ciclo celular de *Giardia*.
4. Establecer el papel de sirtuinas en la expresión del rRNA.
5. Caracterizar la participación de sirtuina GdSir2.4

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Los trofozoítos de *Giardia duodenalis*, cepa WB (ATCC 30957), se cultivaron en medio TYI-S-33 modificado complementado con suero bovino fetal al 10% y solución antibiótica/antifúngica (100 U de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0.25 µg/mL de anfotericina) en tubos de plástico con tapón de rosca de 15 mL a 37 ° C.

8.2. Soluciones

Soluciones madre de TSA 1 µM (Sigma-Aldrich, T8552), NAM 1 M (Sigma-Aldrich, 72340), DZNep 1 µM (Sigma-Aldrich, SML0305), CHX 1 M (Sigma-Aldrich, 01810) y DOX 5 mg/mL (Sigma Aldrich, D9891) se prepararon en PBS o DMSO, dependiendo de su solubilidad, y se esterilizaron por filtración. Las soluciones madre se diluyeron en el medio para su uso a las concentraciones descritas.

8.3 Análisis de hipersensibilidad a la DNasaI de la cromatina

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 1×10^6 trofozoítos de *Giardia* que se resuspendieron en 1.2 ml de buffer de DNasaI (HEPES, pH 8,0, 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 3 mM, NP40 0,1%, Glicerol 8%, DTT 1 mM) y luego se rompió usando un homogeneizador Dounce (~ 10 golpes). Los núcleos aislados se incubaron con 40 U/mL de DNasaI a 25 °C durante 30 segundos y luego se agregaron 300 µL de buffer de paro de la DNasaI (EDTA 20 mM, SDS 1%) para terminar la reacción. Después del tratamiento con RNasa A y proteinasa K, el ADN se precipitó con acetato de sodio y etanol y se cuantificó. Aproximadamente 2 ng de ADN digerido se analizaron mediante ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, K0221) en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems). Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado, los primers utilizados se enlistan en la Tabla 2 y las condiciones se optimizaron para producir un solo amplicón del tamaño correspondiente con DMSO al 5%, desnaturalización de 95 ° C durante 30 s, alineación de 60 °C durante 6 s, y extensión de 72 °C durante 30 s. Los datos se analizaron usando el método del ciclo umbral ($2^{-\Delta\Delta CT}$) con el gen relacionado con la actina sirviendo como normalizador y los resultados se muestran como enriquecimiento. Se eligió

la primera parte de la región IGS como calibrador para este análisis ya que era la fracción con los valores más bajos.

Tabla 2. Lista de primers utilizados en este estudio. Los sitios de restricción EcoRV y XhoI están subrayados y el sitio de mutagénesis se muestra en negrita.

Metodología	Primer	Secuencia (5' a 3')
Clonación	GdSir2.4 F	<u>GATATCAT</u> GCAGATAGAAGAGGACAGAC
	GdSir2.4 R	<u>AAGCCT</u> CGAGGAGGTAACGCGGCTGACTGGCTGAGA
	HA tag	GAATTCGATTCAGGATCCAGCGTAATCTG
	Mut2.4 F	ACTAAGAGAT CCGCCT ACCTGCTTGACATCTACAACCTCG
	Mut2.4 R	CGAGGTTGTAGATGTCAAGCAGGTAG GCGG ATCTCTTAGT
ChIP	18S F	CGCACATCCAAGGACGGCAGC
	18S R	GCCAACTACGGGCGTTTCAACTGC
	28S F	CGTGCATGAATGGACCAACG
	28S R	CGTCAGGGTGTCTCAGGGG
	INT1 F	GCAACGACCGGGAGACAC
	INT1 R	GCAGGAGAGACCGGAGTGTT
	INT2 F	GATGCACAGTCAGCCTCCAA
	INT2 R	GCGAGATAAAGCACCTTG
	INT3 F	CGGCCTCCGTCACGC
INT3 R	CCCTATAGTGCCGGGCG	
qRT-PCR	GdSirt2.1 F	CTCGGAACAAGCCTTACCGT
	GdSirt2.1 R	CGACCTACAAGATCGAGGGC
	GdSirt2.2 F	CCTGCAACGGACTTCGCATC
	GdSirt2.2 R	AGCCCAGGTCAGCGAGAATC
	GdSirt2.3 F	CAGCCACGACTTCTACCGTT
	GdSirt2.3 R	TGCCGTTTGATACGAAGCCT
	GdSirt2.4 F	TCAGGCCTTCGCTTACACAC
	GdSirt2.4 R	GAGGACAACCTCTGGAAGGC
	GdSirt2.5 F	GGAACCATCCAGCCCAATCA
	GdSirt2.5 R	GAAGAGGCAGGTGTTTCCGA
	Actin F	GTCCGTCATACCATCTGTTC
	Actin R	GTTTCCTCCATACCACACG

8.4. Análisis bioinformático

Las secuencias de los miembros principales que componen los complejos silenciadores del rRNA en levadura y en humanos se obtuvieron de bases de datos públicas y las búsquedas de candidatos en *Giardia* se realizaron por alineamientos con la herramienta BLAST en el servidor de *Giardia* database (McArthur, 2000). Los números de identificación de las proteínas que se usaron como base para buscar ortólogos en *Giardia* son: Fob1 (QHB07573.1), Net1 (KZV10197.1), Cdc14 (AAA34477.1), Sir2 (CAA96447.1), Tof2 (CAA82080.1), Csm1 (QHB07213.1), Lrs4 (QHB07901.1), SNF2h (NP_003592.3), TIP5 (NP_038477.2), NML (XP_011518257.1), SUV39H1 (CAG46546.1), SIRT1 (AAH12499.1), HDAC1 (CAG46518.1), HDAC2 (NP_001518.3), RbAp46 (AAC50231.1), MTA1 (NP_004680.2), MTA2 (NP_004730.2), MTA3 (NP_001269684.1), MBD2 (AAC68871.1), MBD3 (AAH09372.1), GATAD2a (AAH12902.2), CHD3 (AAB87383.1) and CHD4 (AAH38596.1)

8.5. Elutriación centrífuga en contraflujo

Todos los experimentos de elutriación se llevaron a cabo como describen Horlock-Roberts et al. (2017)⁷⁴. Se realizaron utilizando una centrífuga de la serie Avanti J 26 XPI (Beckman Coulter, Inc) y un rotor de la serie JE 5.0 con la cámara de elutriación estándar de 4 ml. El flujo de fluido en el sistema se suministró a través de un tubo de silicona (Masterflex RK-96420-14) de 1.6 mm de diámetro interno y se controló mediante una bomba peristáltica (accionamiento de bomba Masterflex 7523-60 con cabezal de bomba de flujo de precisión [77200-60]). El rotor de la centrífuga se mantuvo a una velocidad de 2,400 rpm (550 g) y a una temperatura de 21 ° C. Las células se inyectaron en el sistema de elutriación a un caudal de bombeo de 1 mL/min. Los flujos utilizados en la elutriación fueron 5 (F1), 8 (F2), 11 (F3), 14 (F4), 17 (F5), 20 (F6), 25 (F7), 30 (F8), 35 (F9), 40 (F10), 50 (F11) y 60 (F12) mL/min, así como un flujo final (BO) a 60 mL/min con la velocidad de centrifugado ajustada a 0 rpm. Se recogió un total de 50 mL para cada fracción, ya que esto correspondía aproximadamente al volumen muerto del sistema. Las células de cada fracción se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 1 mL de PBS y luego se dividieron en alícuotas para el conteo de células, citometría de flujo y RT-qPCR.

8.6. Citometría de flujo

Los trofozoítos de *Giardia* se trataron como describió previamente Bernander et al. (2001)²⁰, usando un fijador de ácido cítrico (ácido cítrico monohidrato 40 mM, fosfato de sodio dibásico 20 mM, sacarosa 200 mM y Triton X-100 al 1%) y luego se diluyó en PBS que contenía MgCl₂ 125 mM. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su análisis y el día de la citometría de flujo se trataron con 100 µg/mL de RNasa A (Sigma-Aldrich, R6513) y se tiñeron con SYTOX 1 µM (Thermo Fisher Scientific, S7020). Las células se analizaron con un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Inc., Indianápolis, EE. UU.) y los datos de citometría de flujo se analizaron con el software de análisis FlowJo v.8.5.1.

8.7. RT-qPCR

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, 15596026). El ARN se transformó en ADNc usando transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen, 18080044) y hexámeros aleatorios (IDT, 51011825), mientras que las RT-qPCR se realizaron con Luna universal qPCR master mix (New England Biolabs, M3003) en un CFX connect real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los primers para cada gen se muestran en la Tabla 2. Todos los protocolos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de expresión relativo de cada gen se determinó utilizando el método del ciclo umbral ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y el gen relacionado con la actina se utilizó como control de carga para normalizar los valores.

8.8. Construcción de plásmidos y transfección de parásitos.

La región codificante de GdSir2.4 se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico de trofozoítos de *Giardia* utilizando los primers Sir2.4 F y Sir2.4 R (Tabla 2), produciendo un fragmento de 1788 pb que introduce los sitios de restricción EcoRV y XhoI. El fragmento de DNA purificado se clonó en el plásmido pJET 1.2 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Thermo Scientific, K1231). El plásmido pJET1.2 con el inserto se sometió a doble digestión y el fragmento escindido se purificó y clonó en el plásmido pc-3HA-NEO⁷⁵. La secuencia de GdSir2.4 y la etiqueta HA se amplificaron mediante PCR utilizando los primers Sir2.4 F y etiqueta HA (Tabla 2). El fragmento de DNA se purificó y se clonó en el plásmido pNLop4⁷⁶ que tiene un casete de resistencia a puromicina. El diagrama del plásmido aparece en la figura 2A. Para generar una variante no funcional de GdSir2.4, se realizó mutagénesis dirigida con el kit QuikChange Lightning (Agilent, 210518). Así, los nucleótidos 616 y 617

de CA fueron reemplazados por GG en el plásmido pNLop4-GdSir2.4 para sustituir la histidina 206 con una glicina (Figura 2B). Se utilizaron los primers Mut2.4 F y Mut2.4 R (Tabla 2). Los trofozoítos de *Giardia* se transfectaron con los plásmidos construidos mediante electroporación y se añadieron 10 µg/ml de puromicina a los transfectantes 24 h más tarde. La selección se realizó por una semana donde se cambió el medio cada 3 días. Para inducir la expresión de las proteínas se utilizó 10 µg/mL de DOX durante 12 h.

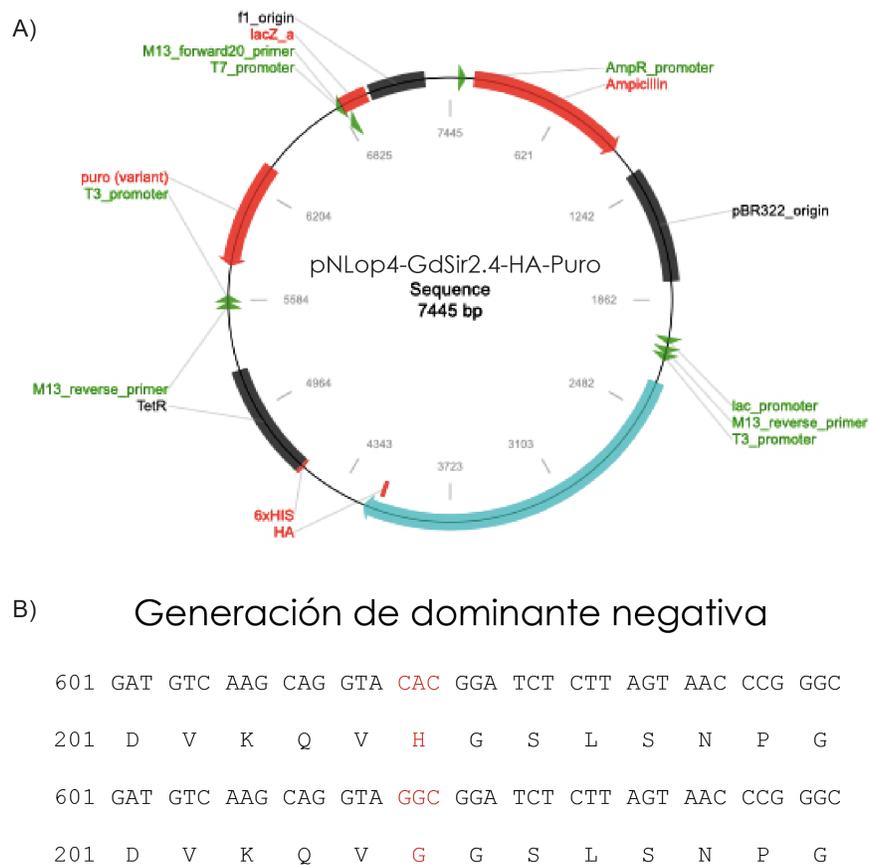


Figura 3. Plásmido construido para sobreexpresar a GdSir2.4 silvestre y a la dominante negativa. A) Diagrama del plásmido pNLop4-GdSir2.4-HA-Puro utilizado en el presente trabajo para sobreexpresar la proteína GdSir2.4 en los trofozoítos de *Giardia* después de la adición de tetraciclina al medio. B) Cambios en la secuencia del plásmido pNLop4-GdSir2.4-HA-Puro realizados para crear una proteína dominante negativa que no tuviera actividad enzimática al modificar a la histidina 206 con una glicina.

8.9. Inmunofluorescencia

Las células de *Giardia* transfectadas e inducidas se unieron a cubreobjetos y luego se fijaron con metanol-acetona 1:1 durante 15 min a -20°C . Se hicieron tres lavados con PBS y luego se incubaron durante 30 min a 37°C con tampón de bloqueo de inmunofluorescencia (Triton X-100 al 0,1%, BSA al 2% en PBS). A continuación, añadimos el anticuerpo anti-2,2,7-trimetilguanosina de ratón (Santa Cruz, sc-32724) diluido 1: 200 en tampón de anticuerpo (Triton X-100 al 0,05%, BSA al 0,5% en PBS) y lo incubamos durante la noche a 4°C . Después de tres lavados con PBS, se añadió anticuerpo anti-HA de conejo (Invitrogen, 71-5500) diluido 1:50 en tampón de anticuerpo y se incubó durante la noche a 4°C . Se realizaron tres lavados con PBS y se añadió el anticuerpo IgG (H + L) -Alexa Fluor 488 anti-ratón de burro (Invitrogen, A21202) en una dilución 1: 200 con tampón de anticuerpo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Se añadió anticuerpo de cabra anti-conejo IgG (H + L) -Alexa Fluor 594 (Jackson Immunoresearch Laboratories, 111-585-144) en una dilución 1: 200 con tampón de anticuerpo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando un medio de montaje protector de vectores que contenía DAPI (Vector Laboratories, H1200) y se sellaron con esmalte de uñas. Las imágenes se adquirieron con el sistema láser confocal Nikon C2.

8.10. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

La cromatina de los trofozoítos de *Giardia* se obtuvo utilizando el kit Magna ChIP HiSens (Millipore, 17-10460) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La cromatina se sometió a ultrasonidos hasta un tamaño de ADN medio de aproximadamente 200 a 1000 pb con 4 ciclos de 15 s encendidos/50 s apagados al 60% de amplitud. Los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo anti-HA de conejo (Invitrogen, 71-5500), anticuerpo primario de lisina anti-acetilada de conejo (Cell Signaling Technologies, 9441), anticuerpo anti-H3K9ac de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-8655), anticuerpo anti-lisina de conejo, anticuerpo H4K16 (Sigma-Aldrich, 07-329) y anticuerpo anti-IgG de ratón (Thermo-Scientific, 31878). Estos anticuerpos fueron evaluados previamente en otros reportes^{66,77}. Todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1: 200. Aproximadamente 2 ng de ADN inmunoprecipitado y material de entrada se analizaron mediante qPCR como se mencionó anteriormente usando los primers descritos en la Tabla 2. Las curvas estándar para los primers se derivaron de una serie de diluciones del DNA de entrada y su valor R^2 varió de 0,92 a 0,95. Las señales de

ChIP se dividieron por la señal no específica (IgG), y la señal de ChIP se representa como el aumento de veces de la señal con respecto a la señal de fondo.

8.11. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks para verificar su normalidad. Se utilizó el ANOVA post hoc de Dunnet para las comparaciones. Para realizar el análisis se utilizó GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

9. RESULTADOS

9.1. El rDNA en *Giardia* tiene una distribución diferencial de cromatina y marcas epigenéticas en las diferentes subunidades.

Para conocer de forma general cómo se compacta la cromatina a través del rDNA realizamos un análisis de hipersensibilidad a la DNasaI. Encontramos que el nivel de eucromatina más alto en el rDNA de *Giardia* se encuentra al comienzo de la región IGS, y luego de manera gradual se compacta hasta llegar al punto con la heterocromatina más alta dentro de la subunidad 18S luego de lo cual la cromatina comienza a relajarse gradualmente (Figura 3). Ahora, para investigar si la expresión del rRNA en este parásito está regulada por modificaciones de histonas, realizamos ChIPs utilizando diferentes anticuerpos. Las marcas H3K9ac, H4K16ac, y H3K4me3 se enriquecieron en la región IGS en *Giardia*. Así, de forma similar a las células humanas⁷⁸, las modificaciones de histonas detectadas en el rDNA de *Giardia* se concentraron en la región IGS, mientras que dentro de las secuencias codificantes de las subunidades 18S, 5.8 y 28S la presencia de estas modificaciones es relativamente bajo (Figura 4). Esto se correlaciona bien con los resultados de los ensayos de sensibilidad a la DNasa I, ya que la activación de las marcas de acetilación y metilación de histonas que detectamos sugiere un aumento de eucromatina en estas regiones.

9.2. La nicotinamida (NAM) induce la expresión de rRNA, mientras que la tricostatina A (TSA) y la 3-deazaneplanocina A (DZNep) la reprimen

Para elucidar los posibles mecanismos epigenéticos que podrían regular la expresión del rRNA en *Giardia*, se utilizaron reactivos que inhiben efectos epigenéticos específicos. Se usó tricostatina A (TSA) para inhibir las HDAC independientes de NAD⁺, nicotinamida (NAM) para inhibir las HDACs dependientes de NAD⁺ o sirtuinas, y se usó 3-deazanplanocina A (DZNep) para inhibir las histonas metiltransferasas (HMT). TSA y NAM se usaron previamente en este parásito^{66,77}, mientras que DZNep se usó para apuntar a metiltransferasas de histonas dependientes de S-adenosil-metionina (SAM-HMT) en *Giardia*^{43,79,80}. La metilación del DNA no se examinó en este trabajo, ya que esta no se ha sido reportada en este protozoario⁴⁸.

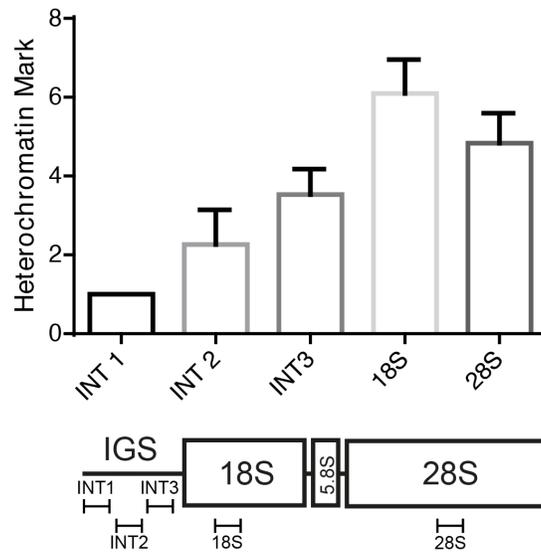
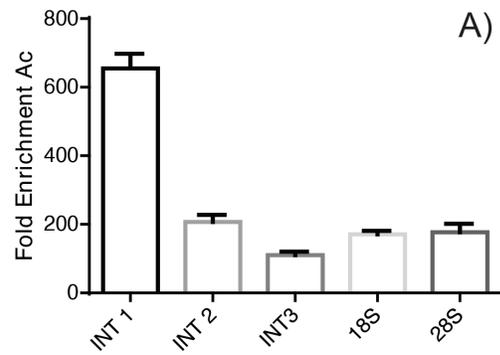
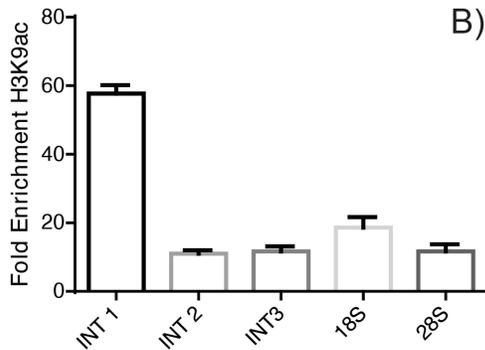


Figura 3. Distribución de heterocromatina en rDNA de *Giardia*. Resultados del ensayo de sensibilidad a la DNasa I para determinar el estado de compactación de la cromatina. La heterocromatina aumenta gradualmente desde la región IGS a la subunidad 18S donde se produce la mayor compactación y luego vuelve a disminuir gradualmente. El conjunto de primers de PCR utilizado para cada muestra (Tabla 2) se indica en el eje x del gráfico, y la ubicación del producto de PCR en relación con la unidad del rDNA se muestra en el diagrama esquemático a continuación. Tomando el inicio de la traducción como punto de referencia, los primers se diseñaron como: primers INT1 en la posición -930, primers INT2 en la posición -525, primers INT3 en la posición -250, primers 18S en la posición +340 y primers 28S en la posición +3490. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

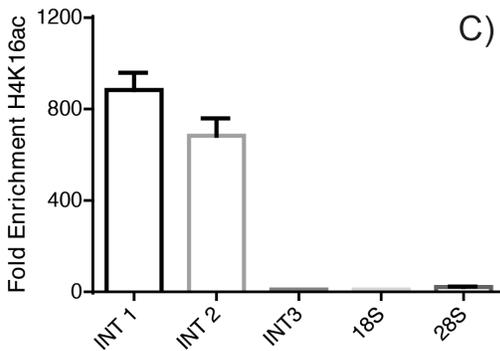
Se examinaron dos concentraciones para cada inhibidor: 50 nM y 200 nM para TSA, 5 mM y 10 mM para NAM y 10 y 50 nM para DZNEp. Los tres reactivos dieron como resultado cambios en los niveles de rRNA en las células de *Giardia* (Figura 5A). La disminución del rRNA tras el tratamiento con TSA y DZNEp sugiere la participación de HDACs y HMT dependientes de NAD⁺, respectivamente, en la activación de la expresión del rRNA. El aumento de los niveles de rRNA con NAM sugiere una participación de las sirtuinas en su expresión. Para examinar si estos efectos dependen de la síntesis de proteínas, tratamos las células con los tres inhibidores en concentraciones que causaron el mayor efecto sobre la expresión de rRNA junto con cicloheximida (CHX). El efecto estimulante de NAM y los efectos inhibidores de TSA y DZNEp sobre la expresión de rRNA se anularon cuando se bloqueó la síntesis de proteínas, lo que sugiere que los efectos de estos reactivos sobre la expresión de rRNA están mediados por proteínas que actúan como reguladores (Figura 5B).



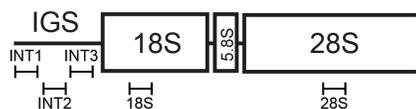
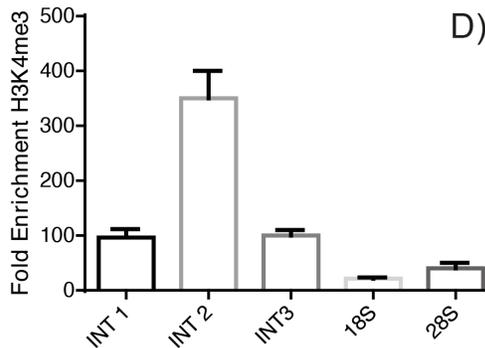
A) Se buscó en la base de datos del genoma de *Giardia* a través de BLAST coincidencias con proteínas asociadas con sirtuinas en complejos silenciadores de rRNA en humanos y levaduras³⁷ (Tabla 3). Hubo coincidencias de secuencia más altas entre las proteínas candidatas de *Giardia* con los ortólogos humanos que con los ortólogos de levadura. En particular, se identificaron ortólogos de *Giardia* de cinco proteínas principales que se encuentran en el complejo que contiene sirtuina y que participan en el silenciamiento nucleolar dependiente de la energía.



B) Se buscó en la base de datos del genoma de *Giardia* a través de BLAST coincidencias con proteínas asociadas con sirtuinas en complejos silenciadores de rRNA en humanos y levaduras³⁷ (Tabla 3). Hubo coincidencias de secuencia más altas entre las proteínas candidatas de *Giardia* con los ortólogos humanos que con los ortólogos de levadura. En particular, se identificaron ortólogos de *Giardia* de cinco proteínas principales que se encuentran en el complejo que contiene sirtuina y que participan en el silenciamiento nucleolar dependiente de la energía.



C) Los resultados de los ChIPs utilizando diferentes anticuerpos para las marcas epigenéticas. Se analizaron A) acetilación general del rDNA, B) H3K9ac, C) H4K16ac y D) H3K4me3, que son marcas de activación. La mayoría de las modificaciones epigenéticas analizadas se encontraron en la región IGS, siendo bajas en las regiones codificantes de las diferentes subunidades de rRNA. El conjunto de primers de PCR utilizado para cada muestra (Tabla 2) se indica en el eje x del gráfico, y la ubicación del producto de PCR en relación con la unidad del rDNA se muestra en el diagrama esquemático a continuación. Tomando el inicio de la traducción como punto de referencia, los primers se diseñaron como: primers INT1 en la posición -930, primers INT2 en la posición -525, primers INT3 en la posición -250, primers 18S en la posición +340 y primers 28S en la posición +3490. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes



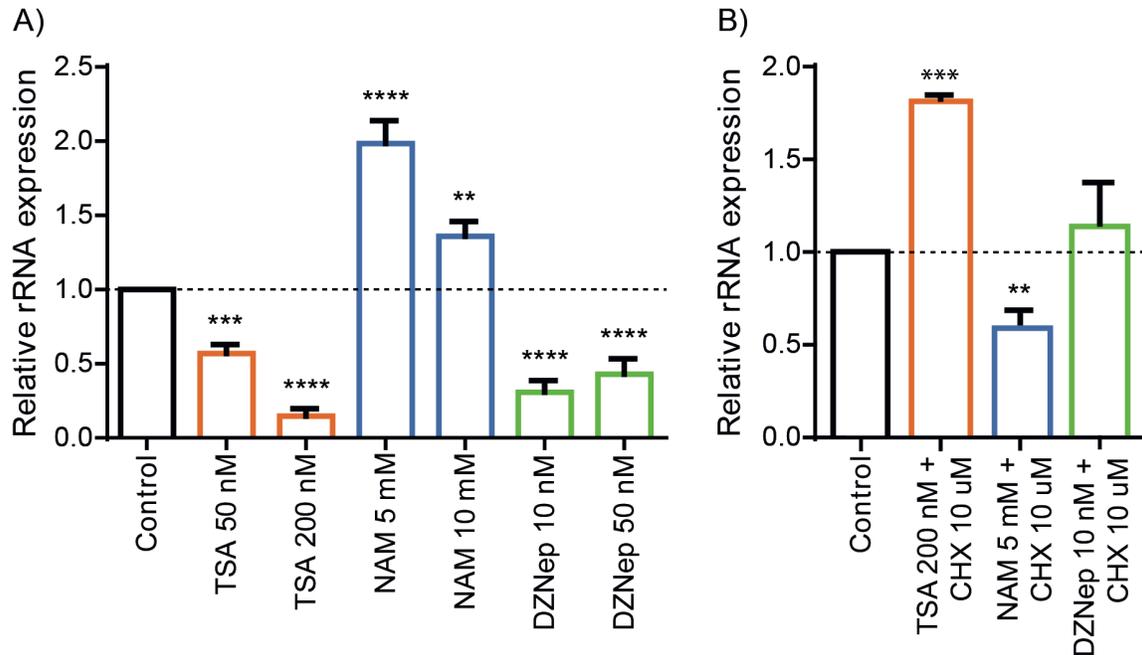


Figura 5. La expresión del rRNA está regulada por mecanismos epigenéticos. A) Efectos de TSA, NAM y DZNep sobre la expresión de rRNA en *Giardia*. B) CHX revierte los efectos de TSA, NAM y DZNep sobre la expresión de rRNA por CHX. Los datos se normalizaron con el gen relacionado con la actina. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. La significancia estadística se indica como * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$.

9.3. Durante el ciclo celular de *Giardia*, se regula la transcripción del rRNA

Para examinar los niveles de rRNA durante el ciclo celular de *Giardia*, se utilizó elutriación centrífuga en contraflujo en cultivos de *Giardia* asincrónicos para obtener fracciones enriquecidas con células en fases específicas del ciclo celular (Figura 6A y 6B). Se extrajo RNA de estas fracciones e intentamos utilizar la PCR de punto final para amplificar el precursor del rRNA 45S que representaría el rRNA no procesado recién sintetizado. Sin embargo, no fue posible obtener de manera consistente este gran producto de PCR largo (~5000 pb) debido al alto contenido de GC (75,1%) y las fuertes estructuras secundarias de la plantilla de rRNA. Por lo tanto, usamos primers para la subunidad 18S (Tabla 2) para examinar por RT-qPCR. Se observaron dos picos de rRNA: un pico (~35 veces) en la Fracción 2 que está enriquecido en células G1 y un segundo pico (~45 veces aumento) en la Fracción 10 que está enriquecido en células G2 tardías (Figura 6C). Dado que los niveles máximos de rRNA 18S maduro están por detrás del pico de síntesis de ARN de novo en otros

eucariotas⁸¹, es probable que la síntesis máxima de rRNA de novo en *Giardia* se produzca en G1/S tardío y G2 temprano.

Tabla 3. Posibles proteínas asociadas a las sirtuinas en el silenciamiento del rRNA. Se realizaron búsquedas bioinformáticas para identificar otras proteínas implicadas en la regulación de la expresión de rRNA en *Giardia* mediante el uso de las secuencias de principales proteínas en los complejos silenciadores del rRNA en levadura y humano.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Proteína	Contraparte en <i>Giardia</i>	E-value	Complejo
Fob1	---	---	Silenciamiento de rDNA dependiente de Sir2 Silenciamiento de rDNA independiente de Sir2
Net1	---	---	Silenciamiento de rDNA dependiente de Sir2
Cdc14	GL50803_9270	1e-62	Silenciamiento de rDNA dependiente de Sir2
Sir2	GL50803_10708	1e-34	Silenciamiento de rDNA dependiente de Sir2
	GL50803_10707	4e-34	
	GL50803_11676	4e-08	
Tof2	---	---	Silenciamiento de rDNA independiente de Sir2
Csm1	---	---	Silenciamiento de rDNA independiente de Sir2
Lrs4	---	---	Silenciamiento de rDNA independiente de Sir2
<i>Homo sapiens</i>			
Proteína	Contraparte en <i>Giardia</i>	E-value	Complejo
SNF2h	GL50803_112978	2e-109	Complejo remodelador nucleolar
	GL50803_8228	1e-78	
	GL50803_87205	6e-58	
	GL50803_16370	1e-51	
	GL50803_16143	8e-46	
	GL50803_7890	1e-15	
TIP5	GL50803_21502	2e-07	Complejo remodelador nucleolar
NML	GL50803_14327	4e-23	Complejo silenciador nucleolar dependiente de energía

SUV39H1	GL50803_9130	3e-19	Complejo silenciador nucleolar dependiente de energía
	GL50803_221691	4e-14	
	GL50803_13838	1e-13	
	GL50803_8921	1e-08	
SIRT1	GL50803_10708	6e-45	Complejo silenciador nucleolar dependiente de energía
	GL50803_10707	3e-38	
	GL50803_11676	7e-12	
	GL50803_16569	3e-07	
HDAC1/2	GL50803_3281	2e-139	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
RbAp46/48	GL50803_14753	1e-37	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
	GL50803_14174	8e-12	
	GL50803_4549	6e-08	
	GL50803_2562	2e-07	
	GL50803_13667	9e-07	
	GL50803_11953	2e-06	
GL50803_33762	1e-06		
MTA1-3	---	---	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
MBD2/3	---	---	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
GATAD2a/b	---	---	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
CHD3/4	GL50803_112978	3e-123	Remodelación y desacetilación de nucleosomas
	GL50803_8228	4e-90	
	GL50803_16370	1e-50	
	GL50803_87205	3e-50	
	GL50803_16143	9e-41	
	GL50803_7890	1e-15	

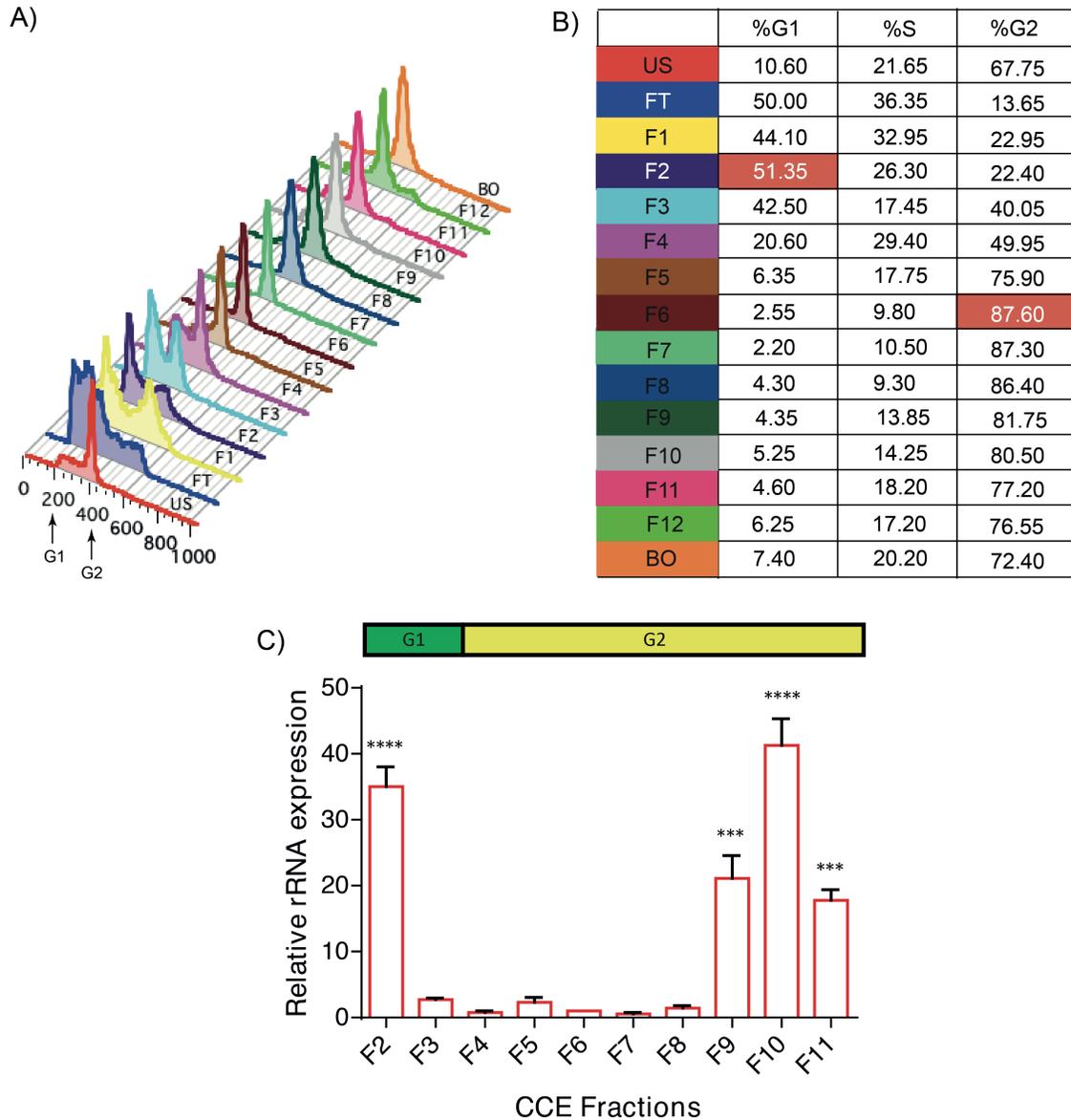


Figura 6. Análisis del ciclo celular de las fracciones de elutriación y los niveles de expresión del rRNA.

A) Análisis de citometría de flujo de un conjunto representativo de muestras de elutriación. El pico en 200 en el eje X corresponde a las células en G1, mientras que el pico en 400 corresponde a las células en G2. B) Porcentaje representativo de células en cada fase del ciclo celular para cada una de las fracciones obtenidas por elutriación. US, muestra sin clasificar; FT, fracción de flujo continuo; BO, fracción de explosión. C) Se midieron los niveles de rRNA 18S en cada fracción obtenida. Los datos se normalizaron con el gen relacionado con la actina y los niveles de expresión son relativos a los determinados para la fracción 6. Las barras G1/S y G2 encima del gráfico indican el tipo de célula predominante según los resultados de la citometría de flujo. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. La significancia estadística se indica como * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$.

Dado que se ha demostrado que las sirtuinas juegan un papel importante en la regulación del rRNA y *Giardia* posee cinco de ellas⁴², se determinaron los niveles de expresión de cada sirtuina en las fracciones de elutriación. Los niveles de mRNA de GdSir2.1 son los más altos en G2 (Fracción 6), GdSir2.3 es más alto en G1/S (Fracción 3), mientras que los niveles más altos de GdSir2.2 (Fracciones 2 y 3) y GdSir2.4 (Fracción 2) están en la fase G1. Aunque los niveles de mRNA de GdSir2.5 variaron entre las fracciones de elutriación, ninguno de estos cambios se asocia de manera consistente con una etapa particular del ciclo celular (Figura 7). La correlación de los picos en los niveles de GdSir2.2, GdSir2.3 y GdSir2.4 en G1 con los niveles bajos de rRNA en la primera mitad de G2 (Fracción 4 a fracción 8) sugiere que las tres proteínas pueden estar involucradas en el silenciamiento de la transcripción de novo de rRNA en esta parte de la fase G2. La disminución de los niveles de GdSir2.2, GdSir2.3 y GdSir2.4 por el punto en G2 representado por las células que están enriquecidas en la Fracción 8 permitiría la des-represión de la expresión de rRNA en la última parte de G2 representada por las Fracciones 9 - 11. Dado que Carranza et al. (2016)⁶⁶ demostraron que GdSir2.4 co-localiza con un marcador nucleolar, nos centramos inicialmente en el papel de esta proteína en la expresión de rRNA.

9.4. NAM induce un arresto del ciclo celular en G2 en los trofozoítos de *Giardia* y promueve cambios en la expresión transcripcional de las sirtuinas

Los trofozoítos de *Giardia* se expusieron a 5 mM, 10 mM o 15 mM de NAM durante 6, 12 o 24 h, y posteriormente se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. El análisis del ciclo celular reveló un fuerte arresto en la fase G2 que depende de la dosis de NAM y el tiempo de exposición (Figura 8A). Debido a que el nocodazol es el fármaco estándar para inducir la detención de G2 en *Giardia*⁸², las células tratadas con este fármaco se utilizaron como control. NAM no induce endorreplicación como nocodazol. Además, observamos que la detención en la fase G2 por nicotinamida se mantiene hasta aproximadamente 6 h después de que el medio con este fármaco se retiró y se reemplazó por un medio libre de fármaco (Figura 8B).

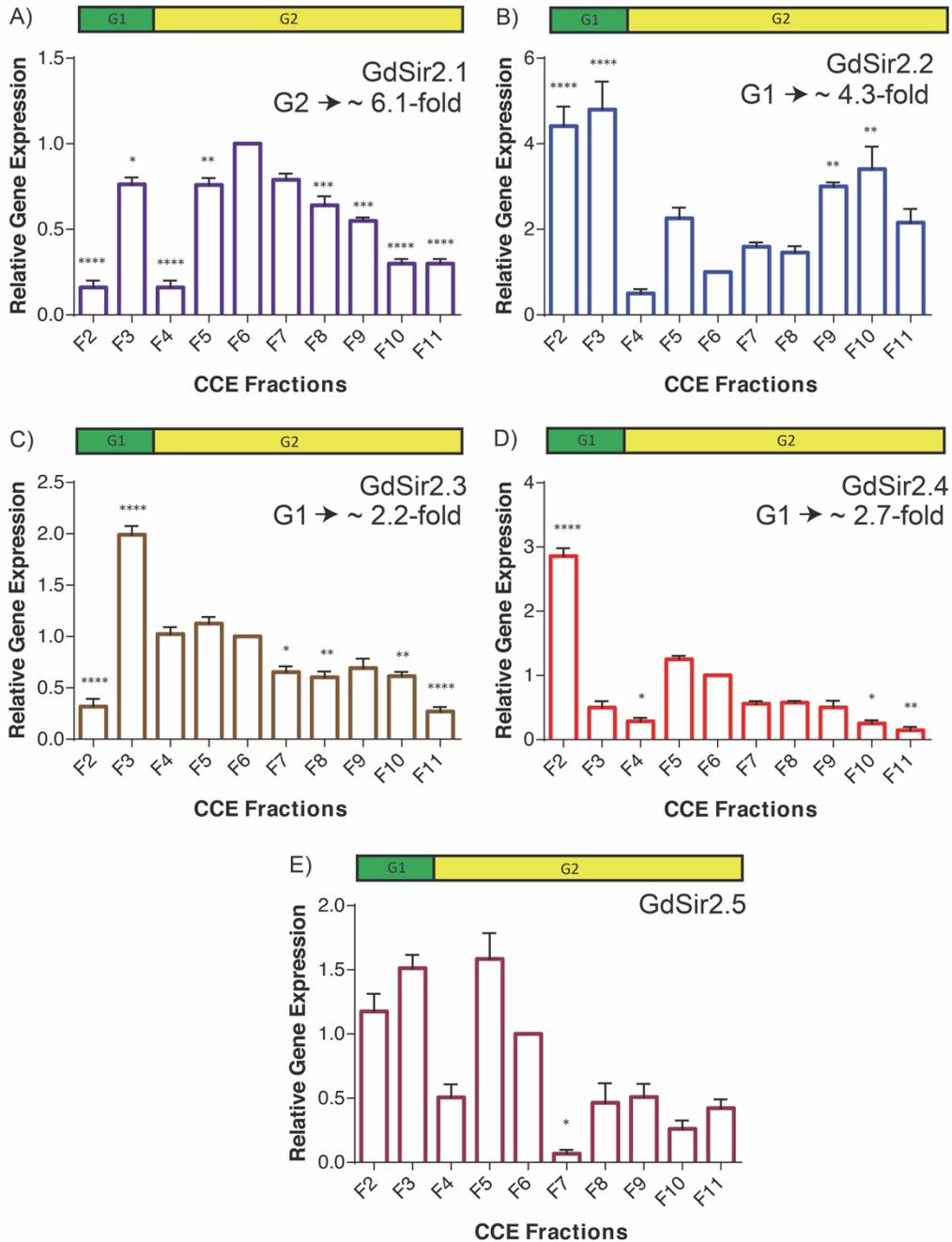


Figura 7. Expresión de sirtuinas de *Giardia* en cada fracción de elutriación. Los niveles de expresión de A) GdSir2.1, B) GdSir2.2, C) GdSir2.3, D) GdSir2.4 y E) GdSir2.5 se midieron en cada fracción obtenida después de la elutriación. Los datos se normalizaron con el gen relacionado con la actina y los niveles de expresión son relativos a los determinados para la fracción 6. Las barras G1/S y G2 encima del gráfico indican el tipo de célula predominante según los resultados de la citometría de flujo. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. La significancia estadística se indica como * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$.

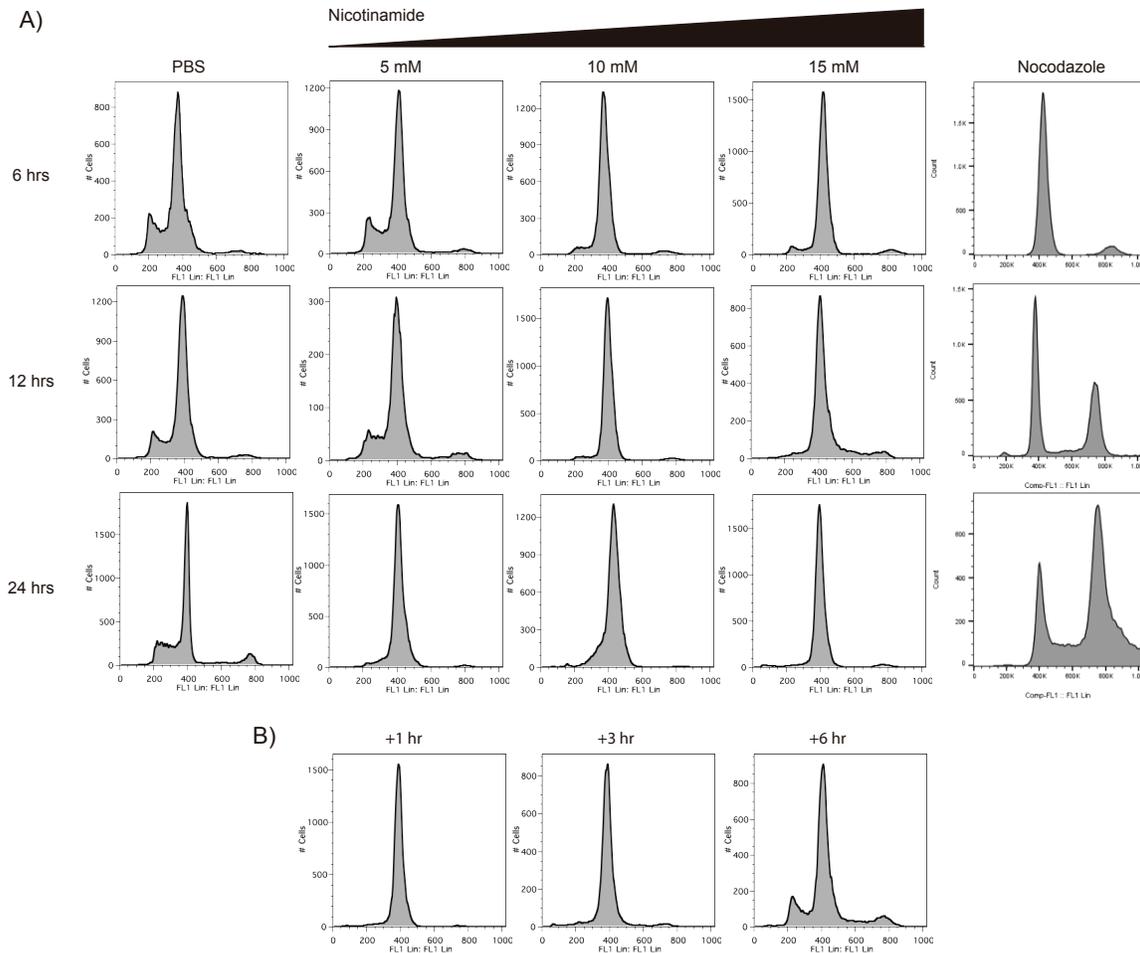


Figura 8. NAM arresta a los trofozoítos de *Giardia* en fase G2 de forma dosis y tiempo dependiente.

A) Análisis del ciclo celular de trofozoítos expuestos a NAM 5 mM, 10 mM o 15 mM durante 6, 12 o 24 h mostrando una fuerte arresto en la fase G2. Se utilizó nocodazol 5 μ M como control de detención de G2. B) La detención se mantiene hasta 6 h después de que el medio con nicotinamida se reemplaza por medio sin fármaco.

Dado que las sirtuinas de *Giardia* son blancos de NAM, investigamos si el tratamiento con este fármaco provoca cambios en su expresión. De esta manera, observamos que el tratamiento con NAM regulaba positivamente la expresión de GdSir2.2, GdSir2.4 y GdSir2.5 en aproximadamente 2.7, 2.2 y 1.5 veces, respectivamente, mientras que la expresión de GdSir2.1 y GdSir2.3 se redujo a aproximadamente la mitad en ambos casos (Figura 9A). Además, para evaluar si hay un aumento correspondiente en la actividad de acetilación, se llevó a cabo un western blot de lisinas acetiladas y se obtuvo un ligero aumento en los niveles

de proteína acetilada, 1,2 veces con 5 mM y 15 mM y 1,3 veces con 10 mM, que es consistente con la inhibición de las sirtuinas por la nicotinamida (Figura 9B y 9C).

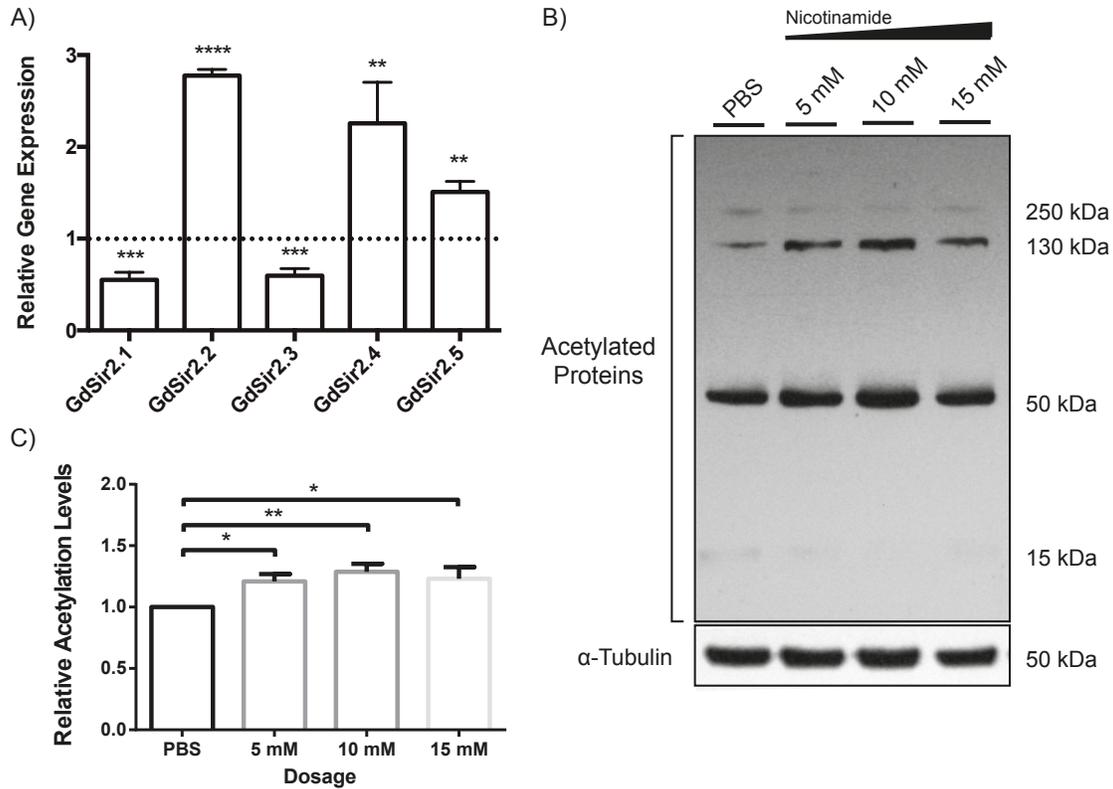


Figura 9. NAM promueve cambios en la expresión transcripcional de las sirtuinas. A) Cambios en la expresión transcripcional (qRT-PCR) de las sirtuinas de *Giardia* después del tratamiento con NAM. La línea de puntos indica los niveles basales de las células no tratadas para cada sirtuina. B) Niveles de proteínas acetiladas detectadas por western blot en células tratadas con PBS y dosis crecientes de NAM. C) Análisis densitométrico. La significancia estadística se indica como * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$.

9.5. GdSir2.4 produce cambios epigenéticos a lo largo de la secuencia de rRNA

Para evaluar el papel de GdSir2.4 en la expresión de rRNA, hicimos construcciones de plásmidos para sobreexpresar la proteína de tipo salvaje (WT) y una mutante negativa dominante (GdSir2.4mut) donde el sitio catalítico se inactivó modificando la histidina en la posición 206 que se ha propuesto que actúe como aceptor de protones en la reacción de desacetilación⁷⁷. Las construcciones contenían versiones etiquetadas con hemaglutinina

(HA) carboxilo-terminal de WT y GdSir2.4mut y su expresión estaba regulada por doxiciclina (DOX)⁷⁶ para reducir los posibles efectos nocivos de prolongar la sobreexpresión de Sir2.4 en la *Giardia* transfectada. El análisis de microscopía inmunofluorescente de trofozoítos de *Giardia* transfectados con estas construcciones después de la adición de DOX mostró que el WT y GdSir2.4mut co-localizan con el marcador 2,2,7-trimetilguanosina que es abundante en el nucleolo (Figura 10A). Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpo anti-HA en *Giardia* que expresa las versiones etiquetadas con HA de GdSir2.4 y GdSir2.4mut para examinar su unión a la unidad de rDNA que consta de las secuencias 18S, 5.8S y 28S. Observamos la unión predominante de estas proteínas en los sitios (INT2 e INT3) en el espaciador intergénico (IGS) ubicado corriente arriba de la región de codificación 18S (Figura 10B) mientras que en INT1 hay una baja ocupación de GdSir2.4. A continuación, se examinó mediante RT-qPCR el efecto de la sobreexpresión del mutante negativo dominante o de tipo silvestre sobre la expresión del rRNA. La sobreexpresión de GdSir2.4mut dio como resultado un aumento en la expresión de rRNA, mientras que la sobreexpresión de la proteína WT dio como resultado una ligera disminución en la expresión de rRNA que no es estadísticamente significativa (Figura 11A). Luego examinamos el efecto de la sobreexpresión

de GdSir2.4 y GdSir2.4mut en las marcas epigenéticas del rDNA. *Giardia* que sobreexpresa el mutante negativo dominante GdSir2.4mut muestra un aumento significativo en la acetilación general de lisina y H4K16ac en dos sitios (INT2 e INT3) en la región IGS de la unidad de rDNA en comparación con *Giardia* que sobreexpresa la proteína WT y el control de plásmido vacío (Figura 11B). También hay un ligero aumento en H3K9ac en el sitio INT3 en la región IGS con la sobreexpresión de GdSir2.4mut en comparación con la sobreexpresión de GdSir2.4 y el plásmido de control. Esto es similar a lo que ocurre en otros eucariotas, cuando aumenta la transcripción del rRNA, las etiquetas de acetilación se concentran en el promotor del rRNA cerca del inicio de la transcripción³⁷. De hecho, la mayoría de los promotores identificados en *Giardia* están muy cerca del inicio de la transcripción^{23,83,84}. Estos resultados sugieren que GdSir2.4 tiene un papel en la regulación epigenética de la expresión de rRNA.

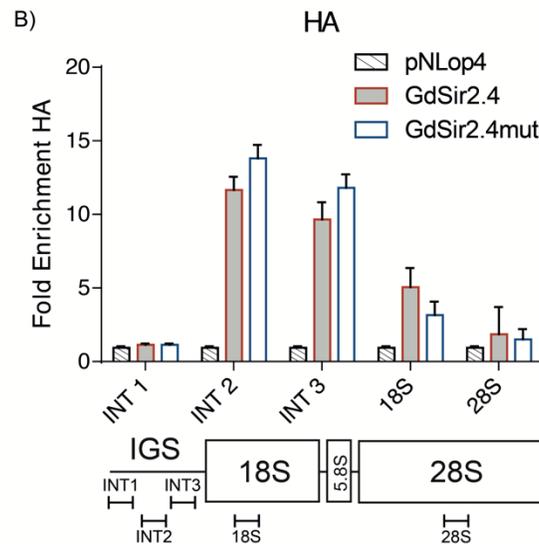
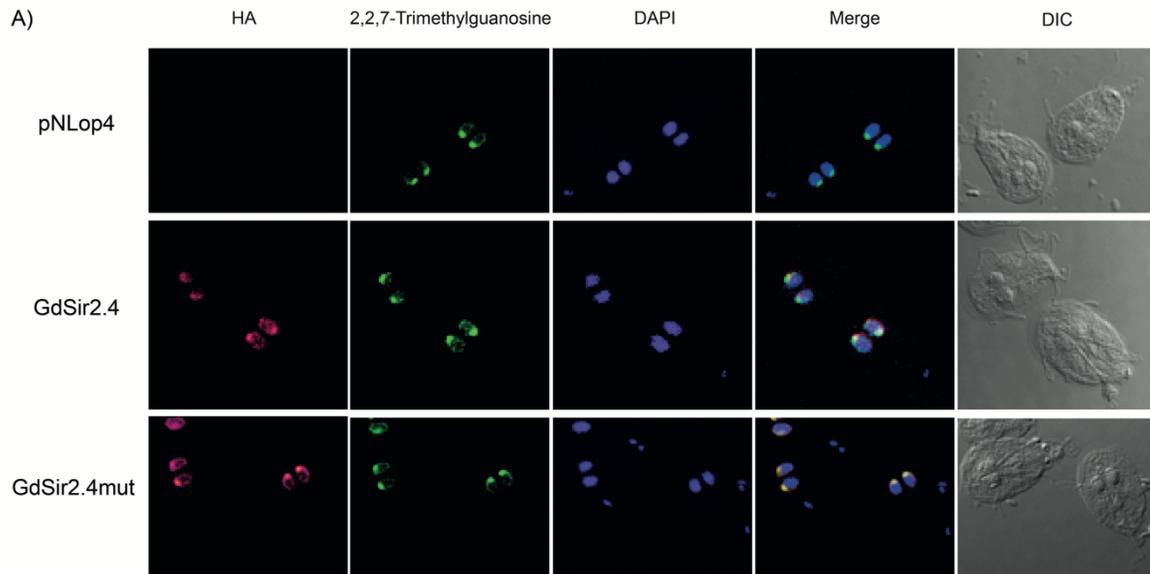


Figura 10. GdSir2.4 se localiza en la región IGS del rDNA dentro del nucleolo. A) Microscopía fluorescente de células que expresan el plásmido vacío (pNLop4), GdSir2.4 tipo salvaje etiquetado con HA y el GdSir2.4mut inactivo. Las dos formas de GdSir2.4 se observan en el nucleolo y colocalizan con la estructura del casquete de 2,2,7-trimetilguanosina. B) El análisis de ChIPs de células que expresan GdSir2.4 y GdSir2.4mut marcados con HA muestra que ambas proteínas se unen a la región IGS de la unidad de ADNr. El conjunto de primers de PCR utilizado para cada muestra (Tabla 2) se indica en el eje x del gráfico, y la ubicación del producto de PCR en relación con la unidad del rDNA se muestra en el diagrama esquemático a continuación. Tomando el inicio de la traducción como punto de referencia, los primers se diseñaron como: primers INT1 en la posición -930, primers INT2 en la posición -525, primers INT3 en la posición -250, primers 18S en la posición +340 y primers 28S en la posición +3490. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

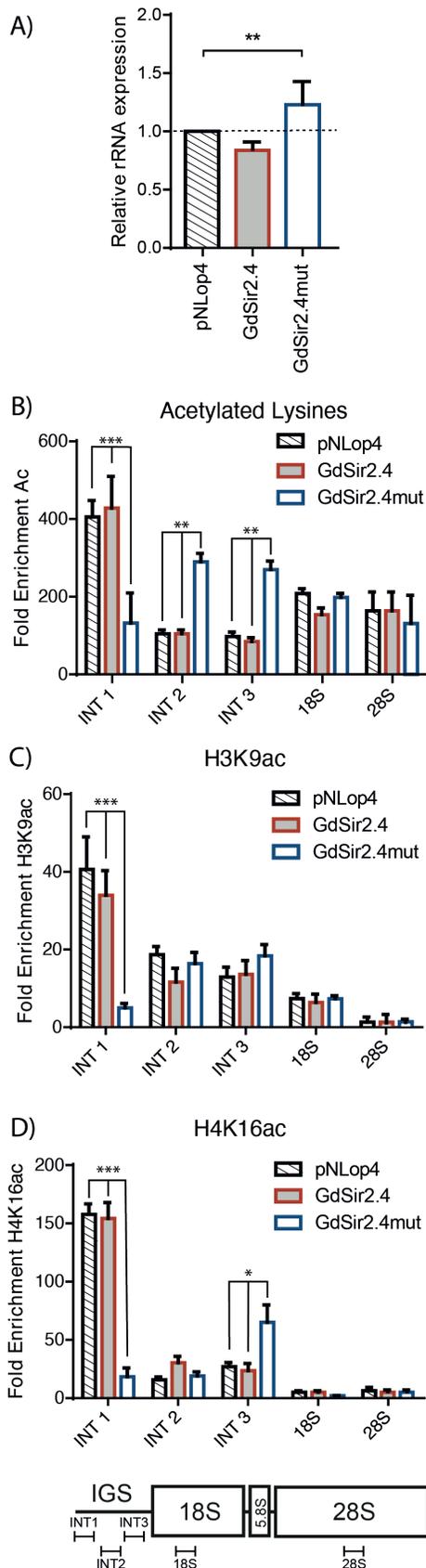


Figura 11. GdSir2.4 participa en la regulación del rRNA.

A) Análisis comparativo de la expresión de rRNA en células transfectadas con el plásmido vacío (pNLop4), GdSir2.4 de tipo salvaje marcado con HA y GdSir2.4mut inactivo. Los datos de RT-qPCR se normalizaron con el gen relacionado con la actina. Se muestran los resultados de cinco experimentos independientes. ChIPs a lo largo del rDNA utilizando los anticuerpos para detectar B) acetilación general, C) H3K9ac y D) H4K16ac. Los primers de PCR se diseñaron para amplificar regiones que abarcan la unidad de rDNA. El producto de PCR de cada conjunto de primers en relación con su ubicación en la unidad de rDNA se muestra en el diagrama esquemático a continuación. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. La significancia estadística se indica como * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$.

10. DISCUSIÓN

Para conocer de forma general cómo se encuentra la cromatina a través del rDNA de *Giardia* realizamos un análisis de hipersensibilidad a la DNasa I. Encontramos que la cromatina menos compactada se encuentra al comienzo de la región IGS, y luego de manera gradual se compacta hasta llegar al punto con la heterocromatina más alta dentro de la subunidad 18S, después de lo cual vuelve a relajarse gradualmente. Interesantemente, se ha informado que *Giardia* tiene una baja condensación de cromatina (3.1 Mb/ μ m) en comparación con otros eucariotas como *Trichomonas* (17 Mb/ μ m) y humanos (26.6 Mb/ μ m)³¹. Ahora, para investigar si la expresión de rRNA en este parásito está regulada por modificaciones epigenéticas, realizamos ChIPs utilizando diferentes anticuerpos. De forma similar a las células humanas⁷⁸, las modificaciones de histonas detectadas en el rDNA de *Giardia* se concentraron en la región IGS, mientras que dentro de las secuencias codificantes de las subunidades 18S, 5.8 y 28S se encuentran relativamente en bajos niveles estas modificaciones. Esto se correlaciona bien con los resultados de los ensayos de sensibilidad a la DNasa I, ya que la activación de las marcas de acetilación y metilación de histonas que detectamos sugiere un aumento de eucromatina en estas regiones. Esta ampliamente documentado que la acetilación de histonas es un evento importante para regular la expresión del rRNA en eucariotas. La acetilación de las lisinas 9 y 14 en la histona H3 (H3K9ac y H3K14ac), así como la lisina 16 en la histona H4 (H4K16ac) dentro de la región del NTS1 del rDNA de levadura activa su expresión³⁷. Además, H4K16ac es muy importante en eucariotas en el plegado y compactación de cromatina⁸⁵. Consistentemente con esto, las marcas de activación H3K9ac y H4K16ac también se enriquecieron en la región IGS en *Giardia*. Interesantemente, la metilación y desmetilación de histonas tienen hoy en día papeles importantes en la activación o el silenciamiento (Jambhekar et al., 2019). La marca de activación de H3K4me3 (trimetilación de lisina 4 en histona H3) está altamente enriquecida en promotores activos cerca de los sitios de inicio de la transcripción (TSS) y se correlaciona positivamente con la transcripción. En varios eucariotas, incluida la región IGS de *Giardia* de acuerdo con nuestros hallazgos, esta marca de histona regula positivamente la expresión de los loci de rRNA³⁷. Todos estos datos sugieren que la región promotora del rDNA se encuentra dentro de la región IGS.

Para indagar los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión del rRNA de *Giardia*, utilizamos tres tipos de inhibidores, dos para HDACs y uno para HMT. TSA inhibe la actividad de las HDAC independientes de NAD⁺ al interactuar con su sitio catalítico, cerca del sitio activo, a través de su motivo de hidroxamato, lo que evita que el cofactor de zinc se una correctamente y medie en la escisión de amidas⁸⁶. Se ha demostrado que TSA promueve la variación antigénica en *Giardia*^{66,87}. En *Giardia*, se ha demostrado que su único HDAC identificado (GL50803_3281) tiene los residuos en la región catalítico que coordinan la unión del zinc y están en contacto con TSA⁴². NAM, el segundo inhibidor probado, inhibe las HDAC dependientes de NAD⁺ que también se conocen como sirtuinas. NAM reacciona con el intermedio O-alkil amidato cargado positivamente que resulta del ataque nucleofílico del oxígeno del grupo carbonil de la acetilisina al C1' de la nicotinamida ribosa de NAD⁺, regenerando así NAD⁺ y acetilisina⁸⁸. Se ha demostrado previamente que NAM provoca un arresto del ciclo celular en la fase G2 en *Giardia* y cambia la expresión de sirtuinas⁷⁷. Otros grupos han informado que NAM provoca un retraso en el enquistamiento e inhibición de la actividad desacetilasa de GdSir2.2^{66,72}. Dado que TSA y NAM evitan que las HDAC eliminen los grupos acetilo de histonas, estos reactivos inhiben la represión génica. DZNep, al ser un análogo de 3-desazaadenosina, inhibe la actividad de las S-adenosilhomocisteína hidrolasas y, en consecuencia, previene las reacciones de metilación de las metiltransferasas dependientes de S-adenosil-metionina (SAM-MT). Específicamente, DZNep provoca la eliminación de las marcas represivas H3K27me3 y H4K20me3, y permite la reexpresión de genes⁸⁹. Aunque este fármaco no se había probado previamente en *Giardia*, la presencia de varias histonas metiltransferasas putativas en su genoma nos llevó a probar sus efectos. De hecho, se ha demostrado que la HMT1 de *Giardia* promueve el proceso de enquistamiento⁴³. Nuestros resultados indican que las marcas de acetilación y metilación en las histonas sobre la secuencia de rDNA son importantes para mantener niveles adecuados de rRNA, y que las sirtuinas juegan un papel importante en su expresión. Además, nuestros resultados de experimentos con inhibidores mostraron que otras proteínas colaboran con las sirtuinas para llevar a cabo esta función, similar a lo que se informó anteriormente en otros eucariotas³⁷. Esas proteínas adicionales pueden ser ortólogos de *Giardia* de los humanos y las levaduras que forman parte de los complejos de silenciamiento nucleolar. Con todos estos datos se diseñó el modelo que aparece en la figura 10A y 10B.

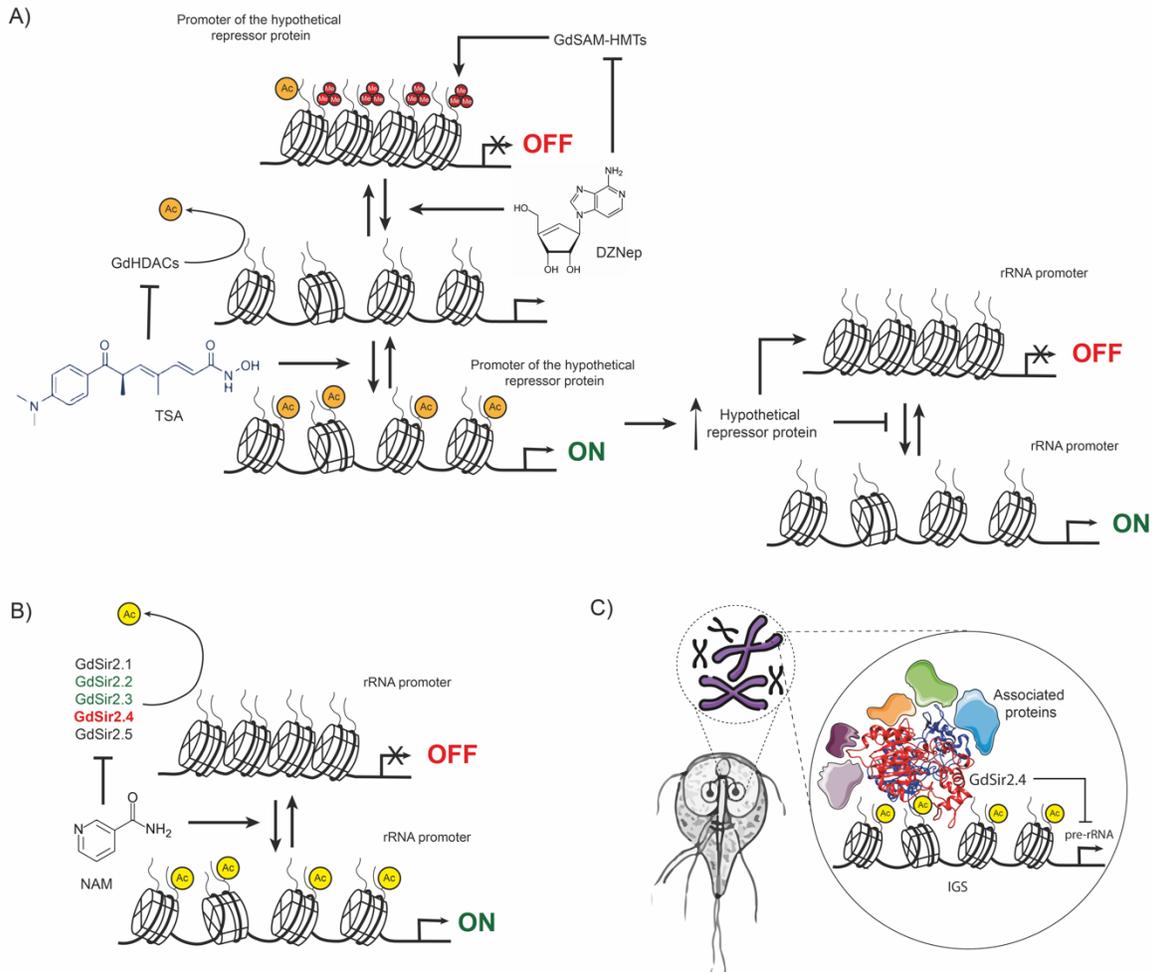


Figura 10. Mecanismos reguladores de la expresión de rRNA de *Giardia*. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen los siguientes modelos para la regulación de la expresión de rRNA en *Giardia*. Diversos mecanismos epigenéticos regulan la expresión del rRNA de *Giardia*. A) Los resultados con DZNep y TSA sugieren la presencia de otros represores, además de las sirtuinas, que regulan la expresión del rRNA. DZNep evita que se agreguen marcas de metilación represivas en las histonas que se colocan en el promotor de este represor potencial inhibiendo GdSAM-HMT, mientras que TSA inhibiendo las HDAC independientes de NAD⁺ hace que las histonas se acetilen. Ambos compuestos permiten una sobreexpresión de estos represores, lo que favorece el estado represivo de la transcripción del rRNA. Los grupos acetilo de las histonas que activan la expresión génica se indican con círculos amarillos (Ac) y los grupos metilo de las histonas que deprimen la expresión génica se indican con círculos rojos (Me). B) Las sirtuinas silencian la transcripción de rRNA mediante la eliminación de grupos acetilo en histonas en el promotor. NAM inhibe las sirtuinas y por ende desreprime la transcripción de rRNA. GdSir2.4 se resalta en rojo ya que en este trabajo verificamos su participación en la regulación de la expresión del rRNA. GdSir2.2 y GdSir2.3 se muestran en verde ya que también pueden estar involucrados en la regulación de la expresión del rRNA, sin embargo, esto

aún no se ha verificado. C) GdSir2.4 se encuentra en la región IGS del rDNA y elimina los grupos acetilo de las histonas en esta región de la cromatina para silenciar la transcripción del ARNr. GdSir2.4 puede formar complejos y cooperar con otras proteínas para regular la expresión de rRNA.

Luego, analizamos la expresión del rRNA durante el ciclo celular de *Giardia*, ya que los niveles de rRNA se regulan durante este proceso en la mayoría de eucariotas para evitar un gasto energético innecesario⁹⁰. Además, existe un punto de control entre la fase G1 y S que detecta los niveles de ribosomas, y el ciclo celular se detiene si estos niveles son inadecuados⁹¹. En otros eucariontes, la transcripción del rRNA es máxima durante las fases S y G2, cesa casi por completo en la mitosis y luego se reanuda en la entrada a la fase G1³⁶. Dado que no existen fármacos que permitan sincronizar los trofozoítos de *Giardia* en una fase específica del ciclo celular sin causar daño al ADN o endorreplicación, se utilizó elutriación centrífuga en contraflujo para obtener fracciones enriquecidas con células en las fases G1, S y G2, para evaluar los niveles del rRNA en el ciclo celular del parásito. Nuestros resultados muestran que los niveles del rRNA tienen un pico al principio de G1 y otro pico al final del G2 durante el ciclo celular de *Giardia*. Dado que nuestros resultados con inhibidores sugieren que las sirtuinas tienen un papel importante en el silenciamiento del rRNA, examinamos la expresión de estas proteínas durante el ciclo celular. Observamos que GdSir2.1 y GdSir2.3 se expresan principalmente en la fase G1, GdSir2.2 y GdSir2.4 se expresan en la fase G2 y GdSir2.5 se expresa en niveles relativamente constantes a lo largo del ciclo celular. Esta expresión diferencial de las sirtuinas durante el ciclo celular también se observa en otros eucariontes, donde las actividades enzimáticas de estas proteínas también están reguladas por modificaciones postraduccionales^{56,92}. En humanos, SIRT2 controla la transición G2/M regulando los niveles de H4K16ac y consecuentemente también de H4K20me, así como la salida de la mitosis a través de su relación con APC/C, SIRT1 juega un papel importante en la condensación de cromatina durante la mitosis y controla la transición G1/S a través de su interacción con Rb/E2F1⁵⁶. Interesantemente, la secuencia de aminoácidos de GdSir2.2 es, de todas las sirtuinas humanas, la más similar a SIRT1 (E-value: 2e-38) y GdSir2.4 a SIRT2 (E-value: 6e-18).

En *Giardia*, las cinco sirtuinas están ubicadas en diferentes compartimentos de la célula: GdSir2.1 se encuentra en el citoplasma^{66,73}, GdSir2.2, GdSir2.4 y GdSir2.5 están en el núcleo y GdSir2.3 se localiza en la región perinuclear^{66,72}. Durante el enquistamiento de *Giardia*, la

expresión de GdSir2.1 disminuye y la expresión de GdSir2.3 aumenta⁶⁵. NAM, un inhibidor de las HDAC dependientes de NAD⁺, provoca en *Giardia* un aumento en la expresión de GdSir2.2, GdSir2.4 y GdSir2.5, una reducción de la expresión de GdSir2.1 y GdSir2.3, así como un arresto del ciclo celular en G2⁷⁷. El aumento en la expresión de GdSir2.2 y GdSir2.4 podría ser un mecanismo de compensación por el cual los trofozoítos intentan avanzar a la siguiente fase del ciclo, mientras que GdSir2.1 y GdSir2.3 podrían disminuir ya que su actividad no es requerida para el paso de esa fase. Estos efectos también sugieren que la actividad de la sirtuina desacetilasa es necesaria para la modificación postraduccional de otras proteínas además de las histonas. Por ejemplo, en humanos, la acetilación de TAF₁₆₈ por PCAF estimula su interacción con el promotor del rRNA, aumentando así su transcripción, mientras que la desacetilación por SIRT1 conduce a su silenciamiento. Por su parte, SIRT7 es requerida en la transcripción del rRNA para activar a la fibrillarina y causar la metilación de H2A^{Q104}, así como para la activación de la RNA polimerasa 1^{36,93}.

En cuanto a las sirtuinas que se encuentran en el núcleo, se puede suponer que regulan la expresión de varios genes, donde de manera importante para nuestro trabajo, Carranza et al. (2016)⁶⁶ mostraron que GdSir2.4 colocaliza con la estructura del cap 2,2,7-trimetilguanosina asociada con el extremo 5' de los RNA nucleares pequeños y los RNA nucleolares pequeños, lo que sugiere que esta sirtuina puede estar involucrada en la expresión del rRNA. Intentamos explorar más a fondo el papel de GdSir2.4 en la regulación de la expresión del rRNA al sobreexpresar una versión WT y una versión negativa dominante de esta proteína en *Giardia*. La proteína dominante negativa (GdSir2.4mut) se creó sustituyendo una glicina por histidina en la posición 206 en el sitio activo de GdSir2.4. Este residuo está altamente conservado entre las sirtuinas ya que forma interacciones de van der Waals con la región alifática de la cadena lateral de acetilisina y actúa como aceptor de protones para catalizar la reacción de desacetilación⁵⁰. Determinamos mediante ensayos de ChIP que GdSir2.4 está posicionado en la región espaciadora intergénica (IGS) de la unidad de ADN_r, entre las posiciones -600 y +1, y frente a la región codificante de la subunidad 18S. Esta unión de GdSir2.4 está asociada con cambios en los niveles de acetilación de la cromatina en esta región de rDNA y el nivel de expresión de rRNA. Sin embargo, los cambios observados son discretos, lo que sugiere que se requieren otras proteínas no identificadas en asociación con GdSir2.4 para regular los niveles de rRNA. Cabe señalar que debido a que la región INT1 no contiene a GdSir2.4, los

niveles de acetilación ahí presentes no se deben a ella y el resultado con la mutante puede indicar que esta regula por otras proteínas como pueden ser GdSir2.2 o GdSir2.3, las cuales también son candidatas. La sobreexpresión de GdSir2.4mut produjo un aumento significativo en la expresión de rRNA, lo que indica que su actividad desacetilasa no puede ser reemplazada por otra proteína. En el caso de la sobreexpresión de GdSir2.4, no se observó una disminución significativa en la expresión de rRNA como era de esperar, esto posiblemente debido a que su actividad está inhibida por modificaciones postraduccionales como ocurre en otros eucariotes⁹⁴. Además, es posible que esta sirtuina, además de la desacetilación, pueda llevar otras reacciones como ADP-ribosilación, desmalonilación o desuccinilación, como se describió previamente en estas proteínas⁹⁵. La conclusión de este trabajo es que GdSir2.4 en conjunto con otras proteínas, posiblemente en un complejo o actuando de forma consecutiva, participa en la regulación de la expresión del rRNA de *Giardia* (Figura 10C). Esta regulación es necesaria para mantener niveles adecuados de ribosomas, así como para mantener la estabilidad genómica en la célula. Así, GdSir2.4 podría considerarse como un posible blanco terapéutico para la creación de nuevos fármacos anti-giardiales.

11. CONCLUSIONES

- En *Giardia*, la expresión del rRNA esta regulada por mecanismos epigenéticos, principalmente de acetilación y metilación de histonas, y donde las sirtuinas desempeñan un papel importante.
- A través del ciclo celular de *Giardia* ocurren cambios en la expresión del rRNA, ocurriendo la expresión de novo en la fase G2.
- El tratamiento con nicotinamida ocasiona un arresto en la fase G2 en los trofozoítos de *Giardia*, que se correlaciona con cambios en la expresión de las sirtuinas.
- GdSir2.1 se expresa principalmente en la fase G2, mientras GdSir2.2, GdSir2.3 y GdSir2.4 lo hacen en la fase G1. GdSir2.5 no presenta un patrón consistente.
- La sirtuina GdSir2.4 colocaliza con el nucleólo y se posiciona en la región intergénica del rDNA.
- GdSir2.4 participa en la regulación de la expresión del rRNA junto con otras proteínas aún no identificadas, probablemente formando complejos de silenciamiento como ocurre en otros eucariontes.

12. PERSPECTIVAS

- Delimitar por métodos experimentales el inicio de la transcripción y caracterizar el promotor del rRNA de *Giardia*
- Identificar los demás componentes involucrados en el silenciamiento del rRNA de *Giardia*, particularmente si GdSir2.2 y GdSir2.3 participan en el proceso.
- Investigar otros procesos donde GdSir2.4 pueda estar involucrado como enquistamiento, variación antigénica, resistencia a antibióticos, entre otros.
- Valorar in vitro y en modelos animales si GdSir2.4 puede ser un blanco terapéutico.

13. REFERENCIAS

1. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429-514. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
2. Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia*. Odom AR, ed. *PLoS Pathog.* 2018;14(9):e1007250. doi:10.1371/journal.ppat.1007250
3. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature.* 2003;426(6963):172-176. doi:10.1038/nature01945
4. Acosta-Virgen K, Chávez-Munguía B, Talamás-Lara D, et al. *Giardia lamblia* : Identification of peroxisomal-like proteins. *Exp Parasitol.* 2018;191(June):36-43. doi:10.1016/j.exppara.2018.06.006
5. Marti M, Regös A, Li Y, et al. An Ancestral Secretory Apparatus in the Protozoan Parasite *Giardia intestinalis*. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24837-24848. doi:10.1074/jbc.M302082200
6. Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:47-52. doi:10.1016/j.mib.2016.07.019
7. Barash NR, Nosala C, Pham JK, et al. *Giardia* Colonizes and Encysts in High-Density Foci in the Murine Small Intestine. Blader IJ, ed. *mSphere.* 2017;2(3):e00343-16. doi:10.1128/mSphere.00343-16
8. Heyworth MF. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite.* 2016;23:13. doi:10.1051/parasite/2016013
9. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems☆. *Int J Parasitol.* 2010;40(9):1063-1074. doi:10.1016/j.ijpara.2010.02.015
10. Tangtrongsup S, Scorza V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp Infections in Dogs and Cats. *Top Companion Anim Med.* 2010;25(3):155-162. doi:10.1053/j.tcam.2010.07.003
11. Tůmová P, Uzlíková M, Jurczyk T, Nohýnková E. Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen.* 2016;5(4):560-574. doi:10.1002/mbo3.351

12. Xu F, Jex A, Svärd SG. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Sci Data*. 2020;7(1):38. doi:10.1038/s41597-020-0377-y
13. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, et al. Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science (80-)*. 2007;317(5846):1921-1926. doi:10.1126/science.1143837
14. Kamikawa YF, Donohoe ME. The localization of histone H3K27me3 demethylase Jmjd3 is dynamically regulated. *Epigenetics*. 2014;9(6):834-841. doi:10.4161/epi.28524
15. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(6):413-422. doi:10.1038/nrmicro2317
16. Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *Int J Parasitol*. 2019;49(1):1-11. doi:10.1016/j.ijpara.2018.07.003
17. Ansell BRE, McConville MJ, Ma'ayeh SY, et al. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):888-901. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.009
18. Vivancos V, González-Alvarez I, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez M. Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(15):1287-1303. doi:10.2174/1568026618666181002095314
19. Dalton S. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends Cell Biol*. 2015;25(10):592-600. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.007
20. Bernander R, Palm JED, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol*. 2001;3(1):55-62. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x
21. Markova K, Uzlikova M, Tumova P, et al. Absence of a conventional spindle mitotic checkpoint in the binucleated single-celled parasite *Giardia intestinalis*. *Eur J Cell Biol*. 2016;95(10):355-367. doi:10.1016/j.ejcb.2016.07.003
22. Wu G, McArthur AG, Fiser A, Šali A, Sogin ML, Müller M. Core histones of the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol*. 2000;17(8):1156-1163. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026398
23. Yee J, Tang A, Lau W-L, et al. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic

- organization, promoter structure, and expression. *BMC Mol Biol.* 2007;8(1):26.
doi:10.1186/1471-2199-8-26
24. Tůmová P, Hofštetrová K, Nohýnková E, Hovorka O, Král J. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma.* 2007;116(1):65-78. doi:10.1007/s00412-006-0082-4
 25. Dawson SC, Sagolla MS, Cande WZ. The cenH3 histone variant defines centromeres in *Giardia intestinalis*. *Chromosoma.* 2007;116(2):175-184. doi:10.1007/s00412-006-0091-3
 26. Sagolla MS, Dawson SC, Mancuso JJ, Cande WZ. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci.* 2006;119(23):4889-4900. doi:10.1242/jcs.03276
 27. Hardin WR, Li R, Xu J, et al. Myosin-independent cytokinesis in *Giardia* utilizes flagella to coordinate force generation and direct membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(29):E5854-E5863. doi:10.1073/pnas.1705096114
 28. De Souza CPC, Osmani SA. Mitosis, Not Just Open or Closed. *Eukaryot Cell.* 2007;6(9):1521-1527. doi:10.1128/EC.00178-07
 29. Benchimol M, Piva B, Campanati L, de Souza W. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy—new insights. *J Struct Biol.* 2004;147(2):102-115. doi:10.1016/j.jsb.2004.01.017
 30. Tůmová P, Kulda J, Nohýnková E. Cell division of *Giardia intestinalis*: Assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007;64(4):288-298. doi:10.1002/cm.20183
 31. Tůmová P, Uzlíková M, Wanner G, Nohýnková E. Structural organization of very small chromosomes: study on a single-celled evolutionary distant eukaryote *Giardia intestinalis*. *Chromosoma.* 2015;124(1):81-94. doi:10.1007/s00412-014-0486-5
 32. Nohýnková E, Tůmová P, Kulda J. Cell Division of *Giardia intestinalis* : Flagellar Developmental Cycle Involves Transformation and Exchange of Flagella between Mastigonts of a Diplomonad Cell. *Eukaryot Cell.* 2006;5(4):753-761.
doi:10.1128/EC.5.4.753-761.2006
 33. Wingfield J, Lechtreck K-F. Chlamydomonas Basal Bodies as Flagella Organizing Centers. *Cells.* 2018;7(7):79. doi:10.3390/cells7070079

34. Jiráková K, Kulda J, Nohýnková E. How Nuclei of Giardia Pass through Cell Differentiation: Semi-open Mitosis Followed by Nuclear Interconnection. *Protist*. 2012;163(3):465-479. doi:10.1016/j.protis.2011.11.008
35. Grummt I. Wisely chosen paths - regulation of rRNA synthesis. *FEBS J*. 2010;277(22):4626-4639. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07892.x
36. Iyer-Bierhoff A, Grummt I. Stop-and-Go: Dynamics of Nucleolar Transcription During the Cell Cycle. *Epigenetics Insights*. 2019;12:251686571984909. doi:10.1177/2516865719849090
37. Srivastava R, Srivastava R, Ahn SH. The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):545-563. doi:10.1128/MMBR.00005-16
38. Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature*. 1992;355(6357):219-224. doi:10.1038/355219a0
39. Vraných C V., Rivero MR, Merino MC, et al. SUMOylation and deimination of proteins: Two epigenetic modifications involved in Giardia encystation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(9):1805-1817. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.014
40. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(4):a019521. doi:10.1101/cshperspect.a019521
41. Nicholson TB, Veland N, Chen T. Writers, Readers, and Erasers of Epigenetic Marks. In: *Epigenetic Cancer Therapy*. Elsevier; 2015:31-66. doi:10.1016/B978-0-12-800206-3.00003-3
42. Sonda S, Morf L, Bottova I, et al. Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan Giardia lamblia. *Mol Microbiol*. 2010;76(1):48-67. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07062.x
43. Salusso A, Zlocowski N, Mayol GF, Zamponi N, Rópolo AS. Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite Giardia lamblia. *FEBS J*. 2017;284(15):2396-2409. doi:10.1111/febs.14131
44. Kim KT, Mok MTS, Edwards MR. Protein kinase B from Giardia intestinalis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(2):333-341. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.106

45. Niño CA, Chaparro J, Soffientini P, Polo S, Wasserman M. Ubiquitination dynamics in the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen*. 2013;2(3):525-539. doi:10.1002/mbo3.88
46. Iyer LM, Anantharaman V, Wolf MY, Aravind L. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol*. 2008;38(1):1-31. doi:10.1016/j.ijpara.2007.07.018
47. Gavrillov A, Eivazova E, Pirozhkova I, Lipinski M, Razin S, Vassetzky Y. Chromosome Conformation Capture (from 3C to 5C) and Its ChIP-Based Modification. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. ; 2009:171-188. doi:10.1007/978-1-60327-414-2_12
48. Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 2008;456(7223):750-754. doi:10.1038/nature07585
49. Shen Y, Wei W, Zhou D-X. Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends Plant Sci*. 2015;20(10):614-621. doi:10.1016/j.tplants.2015.07.005
50. Sanders BD, Jackson B, Marmorstein R. Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2010;1804(8):1604-1616. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.009
51. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2010;5(1):253-295. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250
52. Finkel T, Deng C-X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 2009;460(7255):587-591. doi:10.1038/nature08197
53. Sauve AA, Youn DY. Sirtuins: NAD⁺-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2012;16(5-6):535-543. doi:10.1016/j.cbpa.2012.10.003
54. Lin H. The Enzymatic Activities of Sirtuins. In: *Introductory Review on Sirtuins in Biology, Aging, and Disease*. Elsevier; 2018:45-62. doi:10.1016/B978-0-12-813499-3.00004-6
55. Sacconay L, Carrupt P-A, Nurisso A. Human sirtuins: Structures and flexibility. *J*

- Struct Biol.* 2016;196(3):534-542. doi:10.1016/j.jsb.2016.10.008
56. Bosch-Presegué L, Vaquero A. Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene.* 2014;33(29):3764-3775. doi:10.1038/onc.2013.344
 57. Religa AA, Waters AP. Sirtuins of parasitic protozoa: In search of function(s). *Mol Biochem Parasitol.* 2012;185(2):71-88. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.08.003
 58. Zheng W. Sirtuins as emerging anti-parasitic targets. *Eur J Med Chem.* 2013;59:132-140. doi:10.1016/j.ejmech.2012.11.014
 59. Lafontaine DLJ. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(1):11-19. doi:10.1038/nsmb.2939
 60. Kabnick KS, Peattie D a. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Trends Genet.* 1990;6:143. doi:10.1016/0168-9525(90)90141-R
 61. Edlind TD, Chakraborty PR. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(19):7889-7901. doi:10.1093/nar/15.19.7889
 62. Upcroft JA, Krauer KG, Upcroft P. Chromosome sequence maps of the *Giardia lamblia* assemblage A isolate WB. *Trends Parasitol.* 2010;26(10):484-491. doi:10.1016/j.pt.2010.07.002
 63. Upcroft P, Chen N, Upcroft JA. Telomeric organization of a variable and inducible toxin gene family in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Genome Res.* 1997;7(1):37-46. doi:10.1101/gr.7.1.37
 64. Nelson JO, Watase GJ, Warsinger-Pepe N, Yamashita YM. Mechanisms of rDNA Copy Number Maintenance. *Trends Genet.* 2019;35(10):734-742. doi:10.1016/j.tig.2019.07.006
 65. Einarsson E, Troell K, Hoepfner MP, Grabherr M, Ribacke U, Svärd SG. Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. Hehl AB, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004571. doi:10.1371/journal.pntd.0004571
 66. Carranza PG, Gargantini PR, Prucca CG, et al. Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81:32-43.

doi:10.1016/j.biocel.2016.10.010

67. Kulakova L, Singer SM, Conrad J, Nash TE. Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Mol Microbiol.* 2006;61(6):1533-1542. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05345.x
68. Emery SJ, Baker L, Ansell BRE, et al. Differential protein expression and post-translational modifications in metronidazole-resistant *Giardia duodenalis*. *Gigascience.* 2018;7(4):1-22. doi:10.1093/gigascience/giy024
69. Ansell BRE, Baker L, Emery SJ, et al. Transcriptomics Indicates Active and Passive Metronidazole Resistance Mechanisms in Three Seminal *Giardia* Lines. *Front Microbiol.* 2017;8(MAR):398. doi:10.3389/fmicb.2017.00398
70. Townson SM, Laqua H, Upcroft P, Boreham PFL, Upcroft JA. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86(5):521-522. doi:10.1016/0035-9203(92)90095-T
71. Emery-Corbin SJ, Hamey JJ, Balan B, Rojas-López L, Svärd SG, Jex AR. Eukaryote-conserved histone post-translational modification landscape in *Giardia duodenalis* revealed by mass spectrometry. *Int J Parasitol.* December 2020. doi:10.1016/j.ijpara.2020.09.006
72. Wang YH, Zheng GX, Li YJ. *Giardia duodenalis* G1Sir2.2, homolog of SIRT1, is a nuclear-located and NAD⁺-dependent deacetylase. *Exp Parasitol.* 2016;169:28-33. doi:10.1016/j.exppara.2016.07.002
73. Herrera T. EA, Contreras LE, Suárez AG, Diaz GJ, Ramírez MH. G1Sir2.1 of *Giardia lamblia* is a NAD⁺-dependent cytoplasmic deacetylase. *Heliyon.* 2019;5(4):e01520. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01520
74. Horlock-Roberts K, Reaume C, Dayer G, Ouellet C, Cook N, Yee J. Drug-Free Approach To Study the Unusual Cell Cycle of *Giardia intestinalis*. Blader IJ, ed. *mSphere.* 2017;2(5):e00384-16. doi:10.1128/mSphere.00384-16
75. Gourguechon S, Cande WZ. Rapid Tagging and Integration of Genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell.* 2011;10(1):142-145. doi:10.1128/EC.00190-10
76. Sun C-H, Tai J-H. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;105(1):51-60. doi:10.1016/S0166-6851(99)00163-2

77. Lagunas-Rangel FA, Bazán-Tejeda ML, García-Villa E, Bermúdez-Cruz RM. Nicotinamide induces G2 cell cycle arrest in *Giardia duodenalis* trophozoites and promotes changes in sirtuins transcriptional expression. *Exp Parasitol.* 2020;209(2508):107822. doi:10.1016/j.exppara.2019.107822
78. Yu F, Shen X, Fan L, Yu Z. Analysis of histone modifications at human ribosomal DNA in liver cancer cell. *Sci Rep.* 2016;5(1):18100. doi:10.1038/srep18100
79. Reguera RM, Redondo CM, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R. S-Adenosylmethionine in protozoan parasites: Functions, synthesis and regulation. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;152(1):1-10. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.11.013
80. Lagunas-Rangel FA, Bermúdez-Cruz RM. Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie.* 2019;156:123-128. doi:10.1016/j.biochi.2018.10.008
81. Koš M, Tollervey D. Yeast Pre-rRNA Processing and Modification Occur Cotranscriptionally. *Mol Cell.* 2010;37(6):809-820. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.024
82. Reaume C, Moore B, Hernández P, et al. Evaluation of drugs and stationary growth on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;187(1):72-76. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.11.005
83. Sun C-H, Tai J-H. Identification and Characterization of a ran Gene Promoter in the Protozoan Pathogen *Giardia lamblia*. *J Biol Chem.* 1999;274(28):19699-19706. doi:10.1074/jbc.274.28.19699
84. Elmendorf HG, Singer SM, Pierce J, Cowan J, Nash TE. Initiator and upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;113(1):157-169. doi:10.1016/S0166-6851(01)00211-0
85. Zhang R, Erler J, Langowski J. Histone Acetylation Regulates Chromatin Accessibility: Role of H4K16 in Inter-nucleosome Interaction. *Biophys J.* 2017;112(3):450-459. doi:10.1016/j.bpj.2016.11.015
86. Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. Trichostatin A - like Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents: Toxicological Point of View. *Curr Med Chem.* 2004;11(12):1629-1643. doi:10.2174/0929867043365099
87. Orozco DR, Garlapati S. Histone deacetylase inhibitors induce expression of

- chromosomally tagged variant-specific surface protein genes in *Giardia lamblia*. *BMC Res Notes*. 2020;13(1):148. doi:10.1186/s13104-020-04995-6
88. Avalos JL, Bever KM, Wolberger C. Mechanism of Sirtuin Inhibition by Nicotinamide: Altering the NAD⁺ Cosubstrate Specificity of a Sir2 Enzyme. *Mol Cell*. 2005;17(6):855-868. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.022
89. Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferase, Promotes Erythroid Differentiation. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8121-8134. doi:10.1074/jbc.M114.548651
90. Tsai RYL, Pederson T. Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB J*. 2014;28(8):3290-3296. doi:10.1096/fj.14-254680
91. Bernstein KA, Bleichert F, Bean JM, Cross FR, Baserga SJ. Ribosome Biogenesis Is Sensed at the Start Cell Cycle Checkpoint. Weis K, ed. *Mol Biol Cell*. 2007;18(3):953-964. doi:10.1091/mbc.e06-06-0512
92. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M. The Molecular Biology of Mammalian SIRT Proteins: SIRT2 Functions on Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle*. 2007;6(9):1011-1018. doi:10.4161/cc.6.9.4219
93. Grummt I. The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*. 2013;122(6):487-497. doi:10.1007/s00412-013-0430-0
94. Zhao K, Zhou Z. Post-translational modifications of nuclear sirtuins. *Genome Instab Dis*. 2020;1(1):34-45. doi:10.1007/s42764-019-00001-x
95. Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in Renal Health and Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1799-1809. doi:10.1681/ASN.2017111218