



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Papel del bloque ácido y del bloque CAP
en la actividad nucleasa de GdFEN-1”**

TESIS

Que presenta

SOFÍA GABRIELA TOMÁS MORALES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de tesis

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Ciudad de México

Agosto, 2024

Asesores

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dra. Ana Laura Torres Huerta

Profesora - Investigadora

Escuela de ingeniería y ciencias

Tecnológico de Monterrey



Cinvestav

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 16 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco bajo la dirección de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz. Este trabajo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) bajo la beca asignada al número de CVU 1228423.

Dedicatoria

A Bequer, Blick, Albi y Verdi.

Agradecimiento

Quiero agradecer principalmente a mi familia.

A mi madre, quien estuvo a mi lado y me dio su apoyo en todo momento, desde el inicio de este nuevo proyecto. Gracias por enseñarme a ser perseverante y a dar todo de mí para lograr mis metas, pero sobretodo por enseñarme a elegir mi felicidad en lo que hago.

A mi padre, quien estuvo para mí ayudándome todo el tiempo, dándome consejos y conocimientos para mi vida y la maestría. Gracias por enseñarme a ser la mejor versión de mí y a nunca darme por vencida ni frente a las circunstancias más difíciles.

A mi hermana Janik, quien me ofreció su sabiduría y me demostró que a pesar de todo siempre encontrare la luz que existe en la oscuridad. Gracias por ser mi guía y mi ejemplo a seguir.

A mi hermana Alexia, quien me brindó su compañía todos los días, dejando atrás mis problemas. Gracias por escuchar todo lo que digo y por recordarme que un día lograre mis sueños.

A mi pareja Jonathan, quien me dio su amor y su comprensión incondicional. Gracias por ser mi fortaleza y decirme que siempre habrá recompensas para quienes den lo mejor de sí mismos.

A mi cuñado Paul, quien me ofreció su apoyo y alegría. Gracias por hacerme reír y ayudarme a encontrar la solución ante lo imposible.

A mi fiel compañero Bécquer, quien estuvo junto a mí en las noches más largas, siendo la mejor distracción. Gracias por no separarte de mi lado y dejar atrás el silencio con tus aullidos.

A mis compañeros Blick, Albi y Verdi que, aunque, ya no están conmigo siempre serán parte de lo que soy hoy día.

A mi abuelos Maternos (Nahum Morales y Raquel Heredia), a mis abuelos paternos (Juan Tomás y Yolanda Velázquez) y a mi familia que siempre estuvieron al pendiente de mi progreso.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por aceptarme en su laboratorio, guiarme y permitirme agrandar mis conocimientos.

A la Dra. Ana Laura Torres Huerta y el Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe por el asesoramiento y sugerencias a este proyecto.

A la Dra. María Luisa Bazán Tejeda por sus consejos, su gran apoyo y cariño durante la maestría.

A mis compañeros y amigos de laboratorio (Mariel, Sergio, Luis, Laura, Fabiola, Leonardo, Sara y Diego) por su compañía, consejos, y sobretodo buenos momentos durante esta etapa.

A mis amigos de toda la vida (Miguel y Adriana) por su cariño, no solo en los tiempos fáciles, también por estar ahí para mí en los momentos más difíciles.

A mis amigos del CINVESTAV, especialmente Hiram, por su amistad y comprensión, haciendo que todo tuviera un lado divertido.

A Israel Vázquez, por sus recomendaciones y apoyo técnico en el laboratorio.

A Gabriela Mora por su profesionalismo, eficiencia y gran apoyo que me brindó durante esta etapa.

A la Dra. Dulce Delgadillo por sus consejos y eficiencia durante este proyecto.

¡Gracias!

Índice	
Índice de Figuras	9
Índice de tablas	10
Lista de abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	15
1. Introducción	17
1.1 Generalidades de <i>Giardia duodenalis</i>	17
1.2 Ciclo de vida	18
1.3 Ensamblados	20
1.4 Consideraciones genómicas	20
1.5 Reparación del DNA	21
1.6 Vía de reparación por escisión de base	23
1.6.1 Mecanismo de la vía BER	23
1.6.2 FEN-1	26
2. Antecedentes directos	28
3. Justificación	34
4. Hipótesis	34
5. Objetivos	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos específicos	34
6. Estrategia experimental	35
7. Metodología	35
7.1 Análisis bioinformático	35
7.2 Mutación del bloque ácido o CAP de FEN-1 de <i>G. duodenalis</i>	36
7.2.1 Análisis de candidatas	36
Inducción piloto	37
Western Blot (WB)	37
Secuenciación	38

7.2.2	Preparación de células de <i>E. coli</i> químicamente competentes...	39
7.2.3	Transformación de células de <i>E. coli</i> químicamente competentes	39
7.2.4	Extracción de DNA plasmídico	40
	EasyPrep	40
	MiniPrep	40
7.3	Sobreexpresión y purificación de GdFEN-1 silvestre y mutantes..	41
7.3.1	Expresión de enzimas	41
7.3.2	Purificación de enzimas.....	41
7.3.3	Cuantificación por método de Bradford.....	42
7.4	Evaluación de la capacidad de unión GdFEN-1 silvestre y mutantes	42
7.4.1	Diseño e hibridación de sondas fluorescentes de DNA	42
	Electrodiálisis	43
7.5	Evaluación de la actividad nucleasa de XPG y XPF de <i>G. duodenalis</i>	44
8.	Resultados.....	44
8.1	Analizar <i>in silico</i> las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes.	44
8.2	Obtener las mutantes del bloque ácido y el bloque CAP.....	47
8.3	Expresar y purificar las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes.	50
8.4	Determinar la capacidad de unión de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja).....	52
8.5	Determinar la actividad nucleasa de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja).....	55
9.	Discusión	55
10.	Conclusiones	59
11.	Perspectivas	59
12.	Referencias	59
13.	Software	64

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de estructura celular del a) trofozoíto y del b) quiste de <i>G. duodenalis</i>	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	19
Figura 3. Agentes que generan daño al DNA, las lesiones ocasionadas y las vías reparación.....	22
Figura 4. Vía de reparación BER.....	25
Figura 5. Esquema de construcción de la proteína híbrida FEN-1-XPG de <i>H. sapiens</i>	28
Figura 6. Actividad endonucleasa de la proteína híbrida FEN-1-XPG en sustratos de flap y burbujas.	29
Figura 7. Actividad endonucleasa de XPG, FEN-1 y FEN-1-XPG en un sustrato de flap simple y doble.	29
Figura 8. Mapa de la estructura secundaria, los elementos estructurales y los mutantes de FEN1 con una alineamiento de secuencias de los miembros humanos de la superfamilia FEN1 (EXO-1, XPG y GEN).....	31
Figura 9. Eficiencia de escisión de XPG, XFX2 y FEN1 en un sustrato de DNA burbuja.....	31
Figura 10. Búsqueda blastp con XPG/Rad2 de <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i> en <i>Giardiadb</i>	32
Figura 11. Ensayos de interacción entre la proteína y las sondas de DNA	33
Figura 12. Ensayo de actividad nucleasa en sonda DNA-B de GdXPG putativa utilizando Mg^{+2} y Mn^{+2}	33
Figura 13. Diseño e hibridación de sondas fluorescentes de DNA flap y burbuja.	43
Figura 14. Alineamiento de las secuencias de FEN-1 de <i>H. sapiens</i> (HsFEN-1) y de <i>G. duodenalis</i> (GdFEN-1).....	45
Figura 15. Comparación de las predicciones de estructuras terciarias.....	46
Figura 16. Plásmido GdFEN-1-HsBA-pET100.....	47
Figura 17. Plásmido GdFEN-1-HsBC-pET100.....	47

Figura 18. Análisis de candidatas de mutantes en bloque ácido y bloque CAP en GdFEN-1 por geles teñidos con Coomassie y Western blot.....	48
Figura 19. Electroferogramas de candidatas C1-GdFEN-1-HsBA y C3-GdFEN-1-HsBC.....	50
Figura 20. Alineamiento de las secuenciaciones de C1-GdFEN-1-HsBA y C3-GdFEN-1-HsBC.....	50
Figura 21. Purificación de las enzimas recombinantes a) GdFEN-1-WT b) GdFEN-1-HsBA y c) GdFEN-1-HsBC.....	51
Figura 22. Hibridación de las sondas marcadas con fluoresceína.....	52
Figura 23. Capacidad de unión de a) GdFEN-1-WT, b) GdFEN-1-HsBA y c) GdFEN-1-HsBC a la sonda DNA-F.....	53
Figura 24. Capacidad de unión de a) GdFEN-1-WT, b) GdFEN-1-HsBA y c) GdFEN-1-HsBC a la sonda DNA-B.....	54
Figura 25. Actividad nucleasa de GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA frente a sonda a) DNA-F y b) DNA-B.....	55

Índice de tablas

Tabla 1. Ensamblajes de Giardia.....	20
Tabla 2. Primers para la mutagénesis dirigida por sustitución de los bloques ácido y CAP.....	36
Tabla 3. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.....	36
Tabla 4. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.....	38
Tabla 5. Secuencia de los oligos de la sonda flap y burbuja.....	43

Lista de abreviaturas

BER	Reparación por escisión de base
BSA	Suero fetal bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-B	Sonda de DNA burbuja
DNA-DF	Sonda de DNA doble flap
DNA-F	Sonda de DNA flap
DNA-H	Sonda de DNA homodúplex
DSB	Ruptura de cadena doble
dsDNA	DNA de doble cadena
FEN-1	Endonucleasa específica de estructura flap
GdFEN-1	FEN-1 de <i>Giardia duodenalis</i>
GdFEN-1-HsBA	Mutante del bloque ácido de la enzima GdFEN-1
GdFEN-1-HsBC	Mutante del bloque CAP de la enzima GdFEN-1
GdFEN-1-WT	Enzima silvestre GdFEN-1
GdXPG	XPG de <i>Giardia duodenalis</i>
HR	Recombinación homóloga
HsFEN-1	FEN-1 de humano
HsXPG	XPG de humano
kDa	Kilo daltons
LIG3	DNA ligasa III α
LP-VER	Reparación de parche corto de la vía VER
Mb	Mega bases
MBD4	Glucosilasa 4 con dominio de unión a metilo
MMR	Reparación de bases mal apareadas
MPG	Metilpurina glicosilasa
MYH	DNA glicosilasa homóloga de MutY
NEIL1	Glucosilasa similar a la endonucleasa VIII
NER	Reparación por escisión de nucleótido
NHEJ	Unión de extremos por recombinación no homóloga
NTH1	Similar a la endonucleasa III

OGG1	8-oxoguanina DNA glicosilasa
PCNA	Antígeno nuclear celular
pI	Punto isoeléctrico
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
SMUG1	Uracilo DNA glicosilasa monofuncional específica de cadena única
SP-BER	Reparación de parche corto de la vía BER
SSB	Rupturas de cadena sencilla
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TA	Temperatura ambiente
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino – Tween 20
TDG	DNA glicosilasa de timina
UNG	Uracilo-N glicosilasa
WB	Western blot
XPG	Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein
XRCC1	Proteína 1 de complementación cruzada de reparación de rayos X

Resumen

Giardia duodenalis es un parásito minimalista que presenta enzimas que desempeñan múltiples funciones, en contraste con otros eucariontes. La familia FEN-1, a la cual pertenecen XPG y FEN-1, es una familia de nucleasas que contienen un dominio nucleasa conservado. Se ha encontrado que todas las enzimas pertenecientes a esta familia son capaces de procesar sustrato de DNA tipo flap, pero únicamente XPG puede realizar escisión en sustratos de DNA tipo burbuja.

Previamente, se investigó la capacidad de unión y la actividad nucleasa en sustratos de DNA flap (DNA-F) y burbuja (DNA-B) de GdFEN-1 (GdFEN-1-WT), encontrándose mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética que esta enzima es capaz de unirse a ambos sustratos; además, se determinó que presenta actividad nucleasa, empleando Mg^{+2} o Mn^{+2} como cofactores, prefiriendo a este último.

Se ha reportado que, en eucariontes distintos a *G. duodenalis*, la enzima FEN-1 es capaz de escindir los sustratos de DNA-F, pero no puede procesar el sustrato de DNA-B. En este trabajo con el objetivo de conocer las regiones de FEN-1 responsables de esta actividad, se realizaron sustituciones de las regiones de bloque ácido o CAP de GdFEN-1 por los correspondientes de *Homo sapiens* en la secuencia aminoacídica de la proteína. Para la obtención de las mutantes GdFEN-1 en el bloque ácido (GdFEN-1-HsBA) y en el bloque CAP (GdFEN-1-HsBC) se realizó mutagénesis dirigida de sustitución, y confirmada por secuencias. Los plásmidos portadores de los genes mutantes se transformaron en BL21 de *Escherichia coli*, mismos que se comprobaron por western blot. Posteriormente, se purificaron las enzimas por cromatografía de afinidad para probar su capacidad de unión al DNA-F y DNA-B a partir de ensayos de movilidad electroforética, así como su actividad nucleasa usando Mn^{+2} como cofactor.

Los resultados obtenidos de los ensayos de movilidad electroforética demostraron que tanto la GdFEN-1-WT, como las enzimas mutantes (GdFEN-1-HsBA y GdFEN-1-HsBC), son capaces de unirse al sustrato DNA-F, mientras que en las condiciones

utilizadas sólo GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA pueden unirse al sustrato DNA-B. Por tal razón, los ensayos de actividad nucleasa solo se llevaron a cabo con GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA, observándose que la enzima GdFEN-1-HsBA presenta una actividad nucleasa sin alteraciones ante los sustratos DNA-F y DNA-B, ya que presenta una actividad similar a la enzima silvestre, indicando que la región del bloque ácido no es relevante para la actividad nucleasa de la proteína.

Abstract

Giardia duodenalis is a minimalist parasite that has enzymes that perform several functions, in contrast to other eukaryotes. The FEN-1 family, to which XPG and FEN-1 belong, is a family of nucleases with a conserved nuclease domain. All enzymes in this family have been found capable of processing DNA flap substrates, but only XPG can cleave DNA bubble substrates.

The binding capacity and nuclease activity in DNA Flap (DNA-F) and DNA bubble (DNA-B) substrates of GdFEN-1 (GdFEN-1-WT) has been previously studied. By electrophoretic mobility shift assays, it was found that this enzyme is capable of binding to both substrates; furthermore, it was determined that it exhibits nuclease activity, using Mg^{+2} or Mn^{+2} as cofactors, with a preference for the latter.

It has been reported that in eukaryotes other than *G. duodenalis*, the enzyme FEN-1 can cleave DNA-F substrates but is unable to process the DNA-B substrate. With the aim of identifying the FEN-1 regions responsible for this activity, this study performed substitutions of the acidic block or CAP regions of GdFEN-1 with the acidic block or CAP regions from *Homo sapiens* in the amino acid sequence of the protein. To obtain the GdFEN-1 mutants in the acidic block (GdFEN-1-HsBA) and in the CAP block (GdFEN-1-HsBC), site-directed substitution mutagenesis was performed. The mutant vectors were transformed into BL21-*Escherichia coli*, and their presence was confirmed by western blot. Subsequently, the enzymes were purified by affinity chromatography to test their ability to bind to DNA-F and DNA-B through electrophoretic mobility assays, as well as their nuclease activity using Mn^{+2} as a cofactor.

The results from the electrophoretic mobility assays showed that both GdFEN-1-WT and the mutant enzymes (GdFEN-1-HsBA and GdFEN-1-HsBC) are capable of binding to the DNA-F substrate, whereas under the conditions used, only GdFEN-1-WT and GdFEN-1-HsBA can bind to the DNA-B substrate. For this reason, the nuclease activity assays were conducted only with GdFEN-1-WT and GdFEN-1-HsBA. It was observed that the GdFEN-1-HsBA enzyme exhibits unchanged nuclease activity with both DNA-F and DNA-B substrates, showing a similar

activity to the wild-type enzyme, indicating that at least acidic block is not important for DNA-B cleavage.

1. Introducción

1.1 Generalidades de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis, también conocida como *G. intestinalis* o *G. lamblia* es un organismo eucariote categorizado como un parásito protozoo flagelado binucleado que ocasiona la giardiasis. La giardiasis es una infección generada en el tracto intestinal superior en varios mamíferos, incluyendo al ser humano, que se identifica por la pérdida de peso y diarrea. Debido a que *G. duodenalis* es uno de los parásitos intestinales más comunes en humanos se estima que es capaz de infectar alrededor de 300 millones de personas y a una gran cantidad de animales al año (Ankarklev, Jerlström Hultqvist, Ringqvist, Troel, & G. Svard, 2010; Dixon, 2021; Adam, *Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis*, 2021; Benchimol, Gadelha, & de Souza, 2022).

G. duodenalis presenta dos estados en su ciclo de vida: quiste y trofozoíto (figura 1). El quiste se caracteriza por ser una célula ovalada con dimensiones de 8-12 μm de largo y 7-10 μm de ancho. El quiste posee una pared quística de 0.3-0.5 μm de espesor (compuesta por una capa filamentosa externa y una capa interna con dos membranas) que realiza el papel de resistencia a la lisis hipotónica y al pH ácido, permitiendo así, el paso a través del estómago del huésped. Además de que en esta forma se incluyen cuatro núcleos tetraploides y un disco adhesivo fragmentado disperso en el citoplasma, también se encuentran los cuerpos basales y los axonemas de los flagelos anterior, posterior, ventral y caudal dentro del quiste. En tanto, el trofozoíto se distingue por ser una célula multiflagelar (cuatro pares de flagelos originados en los cuerpos basales que surgen de distintas posiciones) binucleada con una forma de pera con tamaño aproximado de 12-15 μm de largo y 6-8 μm de ancho. Algunas características importantes son que en esta forma hay dos núcleos diploides en la región anterior de la célula, un disco microtubular en la región ventral y un cuerpo medio (formado por microtúbulos) a la mitad posterior, que figura una boca en la cara celular. Además, contiene vesículas periféricas, mitosomas (remanentes de mitocondrias), retículo endoplásmico, gránulos de glucógeno y ribosomas (Benchimol, Gadelha, & de Souza, 2022).

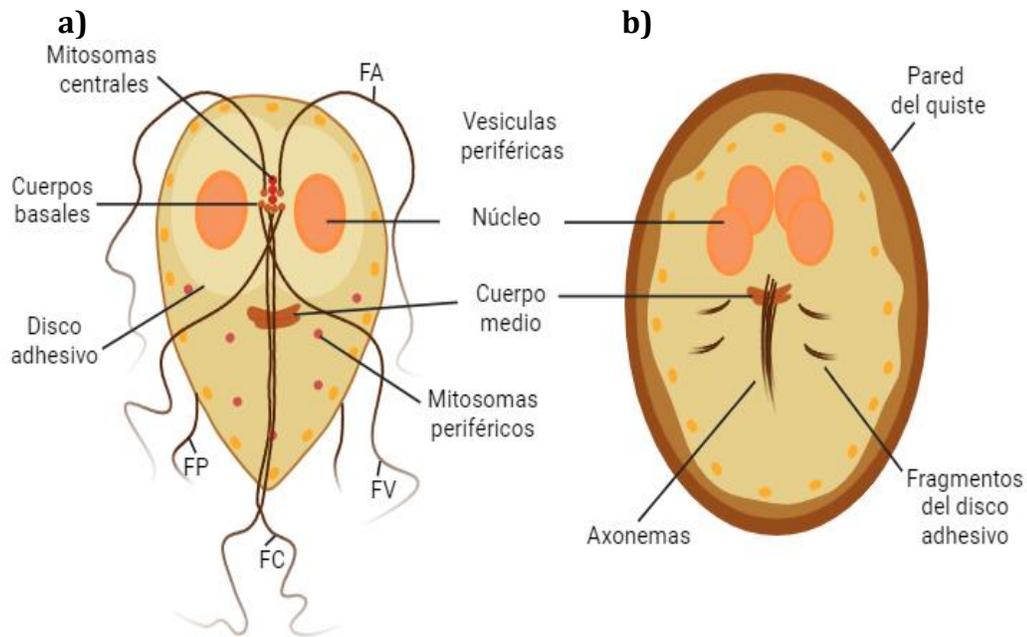


Figura 1. Esquema de estructura celular del **a)** trofozoíto y del **b)** quiste de *G. duodenalis*. De manera específica, el trofozoíto presenta cuatro pares de flagelos, el flagelo anterior (FA), el posterior (FP), el caudal (FC) y el ventral (FV). Mientras que el quiste presenta una pared quística. Imagen creada por Hernández López, 2023.

1.2 Ciclo de vida

El ciclo celular de *G. duodenalis* se caracteriza por mantener una ploidía distinta entre sus dos estados (quiste y trofozoíto). En los trofozoítos cada núcleo varía entre un estado diploide y tetraploide, produciendo una ploidía celular de $4n$ y $8n$, mientras que en los quistes hay una ploidía celular de $8n$ y $16n$. Durante su ciclo de vida ocurren dos transiciones: enquistamiento y desenquistamiento. En el proceso de enquistación los trofozoítos están expuestos a un pH alcalino provocando que se detenga el ciclo celular antes de entrar a la fase M. El trofozoíto se encapsula en la pared del quiste y lleva a cabo la replicación DNA. La célula entra en la fase G2 del ciclo celular, dando lugar a una célula con dos núcleos tetraploides, los cuales se dividen y suscitan cuatro núcleos diploides. Durante el final del enquistamiento el DNA se replica nuevamente, dando origen a un quiste con cuatro núcleos tetraploides. En el proceso de desenquistamiento los quistes se exponen a un pH ácido y a la presencia de péptidos, generando una célula conocida como excizoíto. Esta célula, además de mantener un metabolismo intermedio entre el trofozoíto y el quiste, contiene ocho flagelos y cuatro núcleos

diploides que originan una ploidía genómica de $16n$. A continuación, el excizoíto se divide dos veces, formando cuatro trofozoítos con dos núcleos diploides cada uno (figura 2) (Svärd, Hagblom, & Palm, 2003; Ankarklev, Jerlström Hultqvist, Ringqvist, Troel, & G. Svard, 2010; Adam, *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis, 2021; Benchimol, Gadelha, & de Souza, 2022).

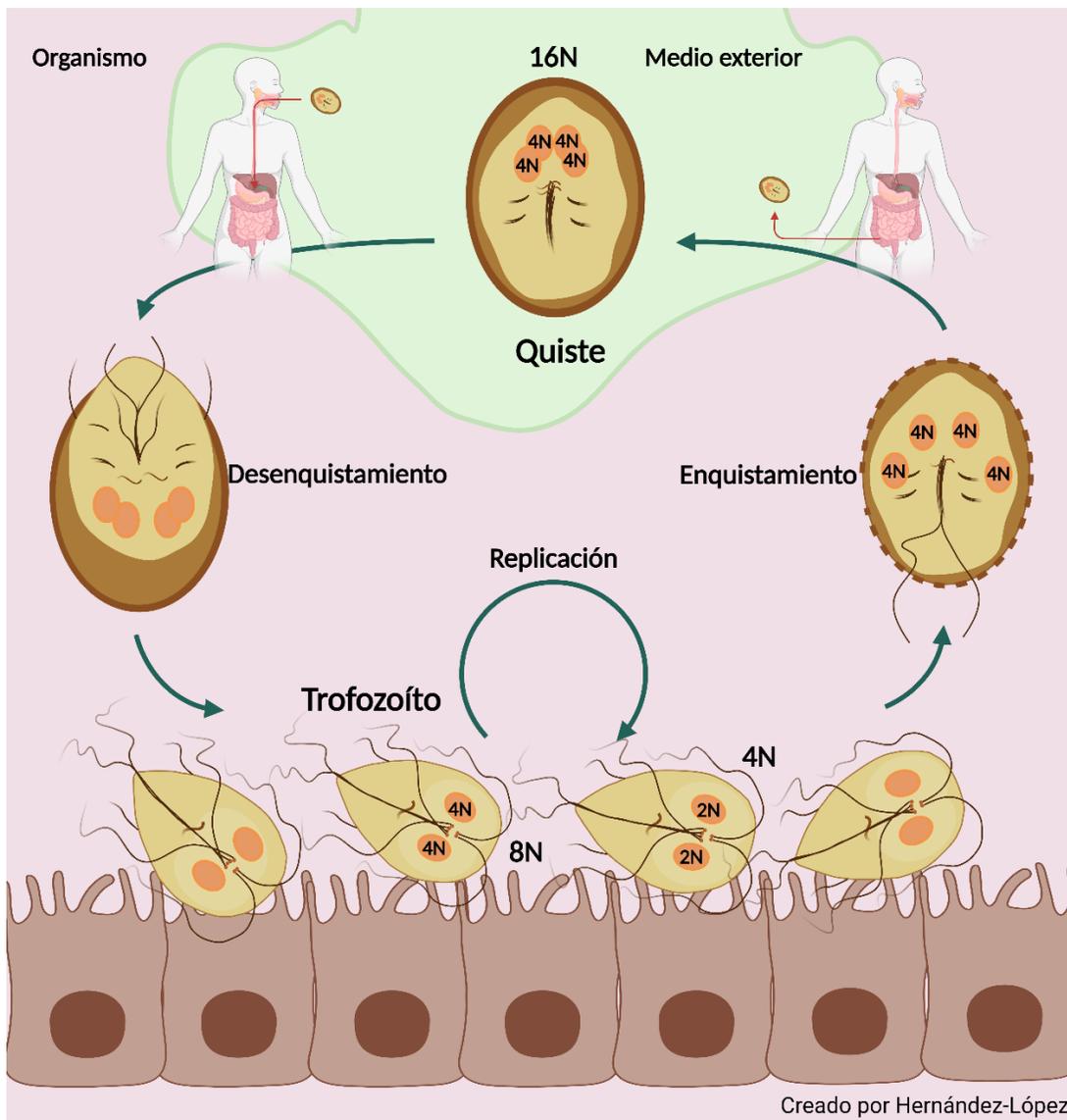


Figura 2. Ciclo de vida de *G. duodenalis*.

La infección comienza con la ingesta del quiste por el hospedero, seguida del desenquistamiento en estómago dando lugar a dos trofozoítos. Una vez en este lugar el trofozoíto se adhiere al epitelio intestinal, donde realizara la replicación de los trofozoítos. En esta forma de vida se genera una segunda transición, el enquistamiento, en intestino delgado. Y, finalmente, se excreta el quistes a través de heces. Imagen creada por Hernández López, 2023.

1.3 Ensamblajes

G. duodenalis se divide en ocho ensamblajes o genotipos (A a H) que se diferencian por su especificidad de huésped, de los cuales solo los ensamblajes A y B afectan al ser humano. Se sabe que filogenéticamente, los genotipos C y D pertenecen a un solo clado, pero son sumamente distintos entre sí como los genotipos A y B (Adam, *Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis*, 2021).

Tabla 1. Ensamblajes de *Giardia*.

Ensamble	Hospedero	Nombre de especie propuesto
AI	Principalmente animales, pero también en humanos	<i>Giardia duodenalis</i>
AII	Humanos, muchos otros mamíferos	<i>Giardia duodenalis</i>
B	Humanos, muchos otros mamíferos	<i>Giardia enterica</i>
C	Perros	<i>Giardia canis</i>
D	Perros	<i>Giardia canis</i>
E	Vacas, ovejas, alpacas, cabras y cerdos	<i>Giardia bovis</i>
F	Gatos	<i>Giardia cati</i>
G	Ratas y ratones	<i>Giardia simondi</i>
H	Focas (marinos vertebrados)	NA

Tabla Tomada de Adam, *Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis*, 2021.

1.4 Consideraciones genómicas

A partir de diversos estudios se ha determinado que *Giardia* presenta una ploidía de 4 (dos núcleos diploides) y cinco cromosomas entre 1-5 Mb en los que se divide su genoma. Se ha estimado que el genoma completo de *Giardia* es de 12 Mb, aproximadamente, y es compacto ya que contiene una mínima cantidad de regiones no codificantes. Debido a que los intrones en este organismo son extremadamente raros solo se han podido identificar ocho empalmados *en cis* y cinco empalmados *en trans*. Su genoma está constituido por 4863 genes que codifican proteínas y 306 pseudogenes (Adam, *The Giardia lamblia genome*, 2000; Adam, *Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis*, 2021).

Al ser un eucariote, *G. duodenalis* exhibe características perteneciente a este tipo de célula. Un claro ejemplo es la transcripción en el núcleo, el proceso de traducción en el citoplasma, el proceso de poliadenilación, pero las regiones UTR 5' cortas y la falta general de intrones son características que comparte con los

organismos procariontes. Otro aspecto importante es que la mayoría de las transcripciones de *G. duodenalis* no parecen estar protegidas en sus extremos 5' (Adam, Biology of Giardia lamblia, 2001).

El grado de heterocigosidad alélica varía dependiendo la reproducción que exhiban los organismos. Los organismos con reproducción sexual mantienen un nivel bajo <1% (0.05 a 0.1% en humanos). Sin embargo, en organismos que tienen una ploidía de dos o más con una reproducción únicamente asexual durante largos períodos de tiempo, siempre que no intervenga la conversión de genes mitóticos y el entrecruzamiento, pueden tener un nivel mucho mayor (Yu, Jr., William, & Adam, 2002). En los diferentes ensamblajes de *Giardia* se ha mostrado que presentan un porcentaje de heterocigosidad alélica muy bajo, oscilan entre <0.01 % y 0.5 % aunque aún no se conocen las razones por lo que esto sucede. Ya que en los organismos con reproducción sexual mantienen un nivel de heterocigosidad alélica limitado por el emparejamiento cromosómico durante la meiosis, y los niveles de *Giardia* están dentro del rango estimado en los organismos con reproducción sexual, hasta el momento no se ha demostrado que *Giardia* lleve a cabo este tipo de reproducción (Adam, Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis, 2021).

1.5 Reparación del DNA

Uno de los procesos más importantes en todos los seres vivos es el mantenimiento de la estabilidad genómica. Debido a que el DNA constantemente se encuentra expuesto a distintas condiciones que pueden inducir daños como agentes genotóxicos que modifican las bases o la pentosa, la creación de aductos, el entrecruzamiento de cadenas o el corte del esqueleto fosfatos que genera rupturas de cadena sencilla (SSB) o de cadena doble (DSB) existen distintas vías de reparación dirigidas a lesiones de manera específica. Algunas de las vías principales son reparación por recombinación homóloga (HR), unión de extremos por recombinación no homóloga (NHEJ), reparación de bases mal apareadas (MMR), reparación por escisión de nucleótido (NER) y reparación por escisión de

base (BER) (Tafurt & Marin, 2014; Moon, y otros, 2023). Las lesiones ocasionadas por algún tipo de daño y vías de reparación están indicadas en la Figura 3.

La vía HR es un mecanismo por el cual se repara los daños a la doble cadena del DNA (ruptura de dsDNA) sin pérdida de información genética, mediante el intercambio físico de un segmento de la cadena de DNA homólogo intacto. Mientras que la vía NHEJ es empleada por las células para mantener la estabilidad genómica, aunque esta vía provoque errores, ya sea por inserciones o deleciones. No requiere una cadena homóloga que funcione como plantilla porque los extremos rotos se ligan directamente (Bernstein, Bernstein, Payne, & Garewal, 2002; Moon, y otros, 2023).

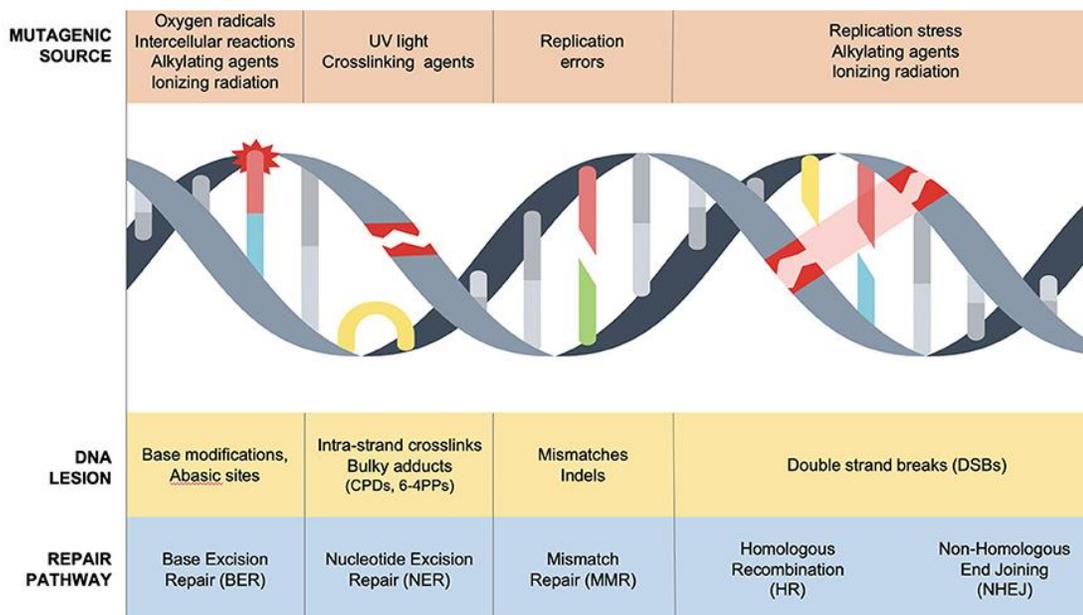


Figura 3. Agentes que generan daño al DNA, las lesiones ocasionadas y las vías de reparación. Imagen tomada de Sharma, Lewis, & Wlodarski, 2020.

La vía MMR es responsable de la corrección de errores de replicación, como inserciones, deleciones, bases mal apareadas (no coincidentes) y los bucles extrahelicoidales. En tanto que la vía NER se encarga de las reparaciones del DNA que presenta lesiones que distorsionan la hélice (aductos de DNA), como los dímeros de ciclobutano pirimidina y los 6-4 fotoproductos. Y la vía BER repara el rompimiento de cadena sencilla, causada generalmente por bases modificadas. BER elimina la base ya sea por reparación de parche corto (repara solo una base)

o de parche largo (repara de 2-15 nucleótidos) (Bernstein, Bernstein, Payne, & Garewal, 2002; Moon, y otros, 2023).

1.6 Vía de reparación por escisión de base

La vía de reparación del DNA por escisión de base (BER) es la vía responsable de resolver las lesiones del DNA provocados por agentes metilantes, desaminantes y oxidantes (sitio abásico o sitio AP -apurínico/apirimidínico), así como las depurinaciones espontáneas (comúnmente 10,000 por célula por día). BER elimina daños SSB del DNA, que con mayor frecuencia son causadas por bases modificadas. Estas bases pueden ser adenina y guanina que pierden espontáneamente su esqueleto de desoxirribosa, guanina que reaccionó con radicales hidroxilos formando 8-oxoguanina o citosina y 5-metilcitosina que se desaminaron en timina y uracilo respectivamente, entre otros (Iyama & Wilson, 2013; Ronner, 2017; Moon, y otros, 2023).

En esta vía existen dos subvías que difieren considerablemente: la reparación de parche corto que se encarga de reparar una sola base (SP-BER) y la reparación de parche largo (LP-BER) que procesa los daños ocasionados de 2 a 15 bases. Esta última, se activa al encontrarse con productos de la oxidación de una desoxirribosa u otros productos que no puede corregir la subvía de parche corto (Bernstein, Bernstein, Payne, & Garewal, 2002; Asagoshi, y otros, 2010; Devlin, 2015; Ronner, 2017; Moon, y otros, 2023).

1.6.1 Mecanismo de la vía BER

Ambas vías de BER (SP-BER y LP-BER) comienzan por un conjunto de glicosilasas específicas de lesión que reconocen el daño producido por la base alterada (figura 4). Existen dos tipos de DNA glicosilasas, las monofuncionales y las bifuncionales. Las DNA glicosilasas monofuncionales presentan únicamente actividad glicosilasa, que incluye UNG (uracilo-N glicosilasa), SMUG1 (uracilo DNA glicosilasa monofuncional específica de cadena única), MBD4 (glucosilasa 4 con dominio de unión a metilo), TDG (DNA glicosilasa de timina), MYH (DNA glicosilasa homóloga de MutY), MPG (metilpurina glicosilasa). En tanto que, las

DNA glicosilasas bifuncionales poseen una actividad intrínseca 3' AP liasa junto con la actividad glicosilasa, que incluye OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilasa), NTH1 (similar a la endonucleasa III) y NEIL1 (glicosilasa similar a la endonucleasa VIII) (Nemec, Wallace, & B., 2010). Este tipo de enzimas (DNA glicosilasas) eliminan cualquier tipo de base purina o pirimidina que presente un daño, formando un sitio AP. Los sitios abásicos creados por DNA glicosilasas monofuncionales se reparan mediante la vía SP-BER, mientras que los sitios AP generados por las glicosilasas bifuncionales se remedian por medio de la vía LP-BER (Hasan, Rizvi, Parveen, & Mir, 2022). Una vez reconocido el daño, la base es escindida de su azúcar radical en el DNA, dejando un sitio AP. La especificidad de la vía está conferida por las diferentes DNA-glicosilasas que eliminan distintos tipos de daños.

A continuación, la endonucleasa AP (APE1, la AP endonucleasa más importante en el ser humano) corta el esqueleto de fosfodiéster en extremo 5' del sitio AP, ocasionando una ruptura de DNA de cadena sencilla (ssDNA). Posteriormente, se recluta la DNA polimerasa que al tener actividad AP liasa, elimina el azúcar-fosfato abásico, dejando un hueco de un nucleótido que contiene 3'-OH libre. La DNA pol es dependiente del antígeno nuclear celular (PCNA) para poder desplazar la cadena dañada (Huggins, y otros, 2002; Asagoshi, y otros, 2010; Iyama & Wilson, 2013; Devlin, 2015; Niederhuber, Armitage, Doroshov, Kastan, & Joel, 2020).

En la vía SP-BER, la pol β es la que se encarga de dejar el extremo 3'-OH libre para luego, unirse la proteína 1 de complementación cruzada de reparación de rayos X (XRCC1). Esta enzima sirve como andamio para presentar un sitio de unión no reactivo y así puedan interactuar la pol β con la DNA ligasa III α (LIG3). Finalmente, en forma de complejo (pol β - XRCC1- LIG3-PCNA), la LIG3 une la desoxirribosa del nucleótido de reemplazo con la cadena principal de desoxirribosilfosfato. Mientras que en la vía LP-BER, se une la pol δ/ϵ , seguida de la endonucleasa específica de estructura flap (FEN-1 por sus siglas en inglés) que realiza la escisión de nucleótidos desplazados 5' (flap). Y finalmente, el último paso de la reparación es la ligación. En esta subvía se emplea la LIG1, que mantiene una interacción con

la PCNA y la pol β . (Huggins, y otros, 2002; Asagoshi, y otros, 2010; Leyns & Gonzalez, 2012; Iyama & Wilson, 2013; Devlin, 2015; Niederhuber, Armitage, Doroshow, Kastan, & Joel, 2020; Li, Cao, Liu, Tang, & Guo, 2022; Wang, Yu, & Wang, 2023; Shadfar, Parakh, Jamali, & Atkin, 2023).

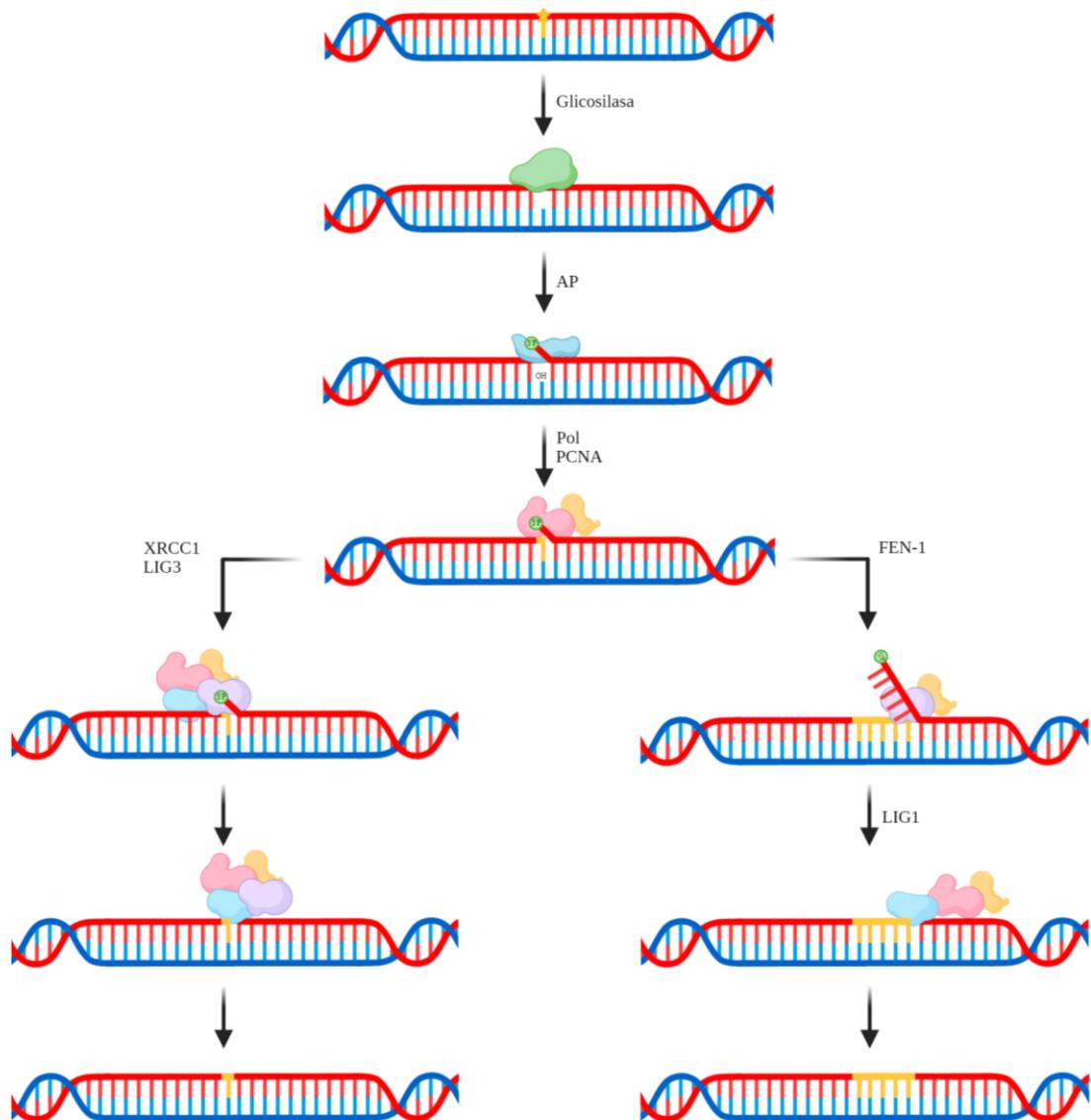


Figura 4. Vía de reparación BER.

La vía BER comienza por el reconocimiento del daño por un conjunto de glicosilasas, quienes eliminan cualquier tipo de base purina o pirimidina que presente un daño, formando un sitio AP. Este sitio es cortado en su esqueleto de fosfodiéster en extremo 5' por una endonucleasa AP ocasionando una ruptura de DNA. De manera subsiguiente, la DNA polimerasa se recluta junto con la PCNA, eliminando el azúcar-fosfato abásico y dejando un hueco de un nucleótido con 3'-OH libre, mientras PCNA desplaza la cadena dañada. En este paso la vía BER se divide en dos subvías. En la subvía SP-BER la pol crea un complejo con la XRCC1 y la LIG3, que se encargara de cortar y unir el último enlace. Tanto que en la subvía LP-BER se une FEN-1 para escindir el flap. Y, finalmente la LIG1, en complejo con la Pol y PCNA genera la ligación. Creada por Sofia Tomás.

1.6.2 FEN-1

La endonucleasa específica de estructura flap (FEN-1) es una enzima de aproximadamente 40 kDa que pertenece a la familia FEN-1 de nucleasas específicas de estructura con las que comparte dos regiones conservadas, N (N-terminal) e I (interna). Se ha demostrado, mediante estructuras cristalinas de las proteínas pertenecientes a la familia FEN-1 de diferentes especies, que dichas regiones (N e I) forman un dominio globular conservado en el que se encuentra el sitio activo (Asp23, Asp34, Asp86, Glu158, Glu160, Asp179 y Asp181). Los miembros de la familia FEN-1 poseen una separación entre las regiones N e I de <70 aminoácidos (aa) (excepto la XPG, que contiene 600 aminoácidos entre ambas regiones), en donde se forma un arco helicoidal por arriba del sitio activo. Este arco se encarga de la unión y catálisis del DNA. Además, FEN-1 presenta una pequeña cuña hidrófoba expuesta en la superficie y un bolsillo de unión a 1 nt, que confiere especificidad a las estructuras de doble flap, también parece favorecer al posicionamiento del flap 5' de ssDNA cerca del sitio activo. Un tercer motivo ubicado en el extremo C-terminal está involucrado en la interacción con PCNA (Chapados, y otros, 2004; Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007; Tsutakawa, y otros, 2011).

Investigaciones previas han descrito más a fondo los sitios conservados de FEN-1. Esta enzima se distingue por tener dos dominios o bloques importantes, el bloque ácido y el bloque CAP. Se ha sugerido que el bloque ácido es un bucle específico (único de FEN-1) que impide que el DNA pase más allá de la cavidad de una base por repulsión de carga. Mientras que el bloque CAP, aunque también está presente en otra enzima de la misma familia, este mantiene una secuencia específica. Este bloque se encuentra sobre el arco helicoidal y deja el Gateway (puerta de enlace) abierto, pero limita el acceso del sitio activo a los extremos. Los aminoácidos pertenecientes a las cadenas laterales positivas interactúan con la cadena de plantilla en la unión a ssDNA y dsDNA (Tsutakawa, y otros, 2011; Tsutakawa, y otros, 2017).

A pesar de que varios miembros familia FEN-1 como FEN-1, EXO1, GEN-1 y XPG comparten un dominio de nucleasa conservado que pueden procesar moléculas con flaps, solo esta última es capaz de procesar adicional y eficientemente sustratos de burbujas o bucles, usando como cofactor tanto a Mg^{+2} como a Mn^{+2} . En tanto que GEN1 reconoce y escinde uniones de Holliday, FEN-1 (participa en la vía BER) prefiere un dúplex mellado con flaps monocatenarios 5' y 3' y EXO1 un flap corto 5' (Hohl, Thorel, Clarkson, & Schärer, 2003; Grasby, Finger, Tsutakawa, Atack, & Tainer, 2012; González Corrochano, y otros, 2020).

FEN-1 es capaz de reconocer de manera específica la columna vertebral de una hebra de DNA monocatenaria 5' y rastrear el sitio de escisión, que se encuentra en la unión donde las dos cadenas del DNA se unen a la hebra monocatenaria. También hidroliza los dsDNA que contiene un espacio o mella. Su actividad de la endonucleasa no depende de la longitud del flap o colgajo 5', puede cortar DNA y RNA sin proteínas accesorias (Hosfield, Mol, Shen, & Tainer, 1998).

Además de su participación en la vía de reparación por escisión de base, también se encuentra presente en la maduración del fragmento de Okazaki. FEN-1 es fundamental, ya que reconoce la estructura, se une a la base del flap y escinde con precisión, eliminando el RNA junto con una parte del DNA iniciador para crear una mella que será resuelta por una ligasa. Así mismo, se encuentra involucrada en la estabilidad de los telómeros formando un complejo con la telomerasa para asegurarse de la eficiencia de replicación de los telómeros (Finger & Shen, 2010; Balakrishnan & Bambara, 2013).

2. Antecedentes directos

En el 2007, Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic y Jaquier Gubler realizaron un estudio que se publicó con el nombre de “Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity”. En este estudio pusieron a prueba la región espaciadora de XPG, mediante la creación de una proteína híbrida. La proteína estaba conformada por la enzima FEN-1 con la inserción de la región espaciadora de XPG entre los dominios N e I como se muestra en la siguiente figura 5. Cabe resaltar que tanto XPG, como FEN-1 eran enzimas de *H. sapiens*.

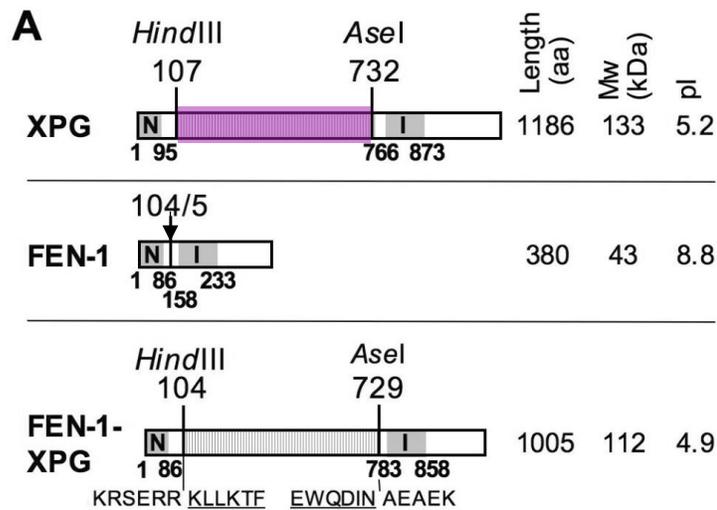


Figura 5. Esquema de construcción de la proteína híbrida FEN-1-XPG de *H. sapiens*. Imagen tomada de Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007. La región espaciadora de XPG (1° panel) entre los aminoácidos 107 y 732 (región morada) fueron añadidas en FEN-1 (2° panel) entre los aminoácidos 104 y 105 (marcada con flecha negra) para formar la proteína híbrida FEN-1-XPG (3° panel). Para cada una de las enzimas se muestra su tamaño de aminoácidos, su peso molecular en kDa y su pI.

El estudio demostró que, aunque ambas enzimas (FEN-1 y XPG) son nucleasas de la misma familia, no mantienen la misma actividad frente a diferentes sustratos. FEN-1 realiza su actividad nucleasa en flap y doble flap, mostrando preferencia a este último, mientras que no presenta actividad en burbuja (se une, pero no realiza el corte). XPG tiene actividad nucleasa en flap, doble flap y burbuja. El resultado obtenido fue que la proteína híbrida logró escindir una sonda burbuja, pero pobremente, la mayor parte de la sonda permaneció intacta. , (figura 6 y 7).

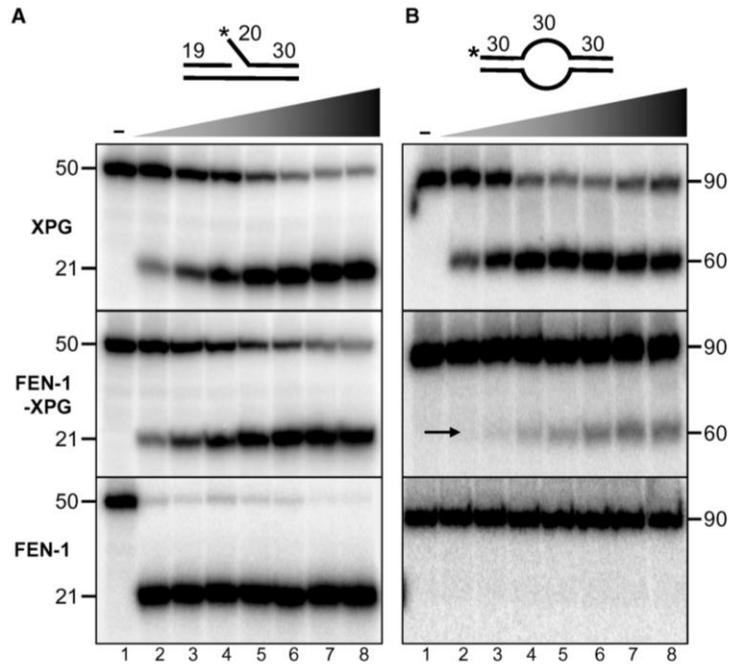


Figura 6. Actividad endonucleasa de la proteína híbrida FEN-1-XPG en sustratos de flap y burbujas. En ambos ensayos se usaron concentraciones crecientes (0.5 nM a 40 nM) de las proteínas (XPG, FEN-1-XPG y FEN-1). Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida al 12 %. En carril 1 se muestra la sonda libre, carril 2-8-interacción sonda DNA-B/DNA-F y proteína. Imagen tomada de Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007.

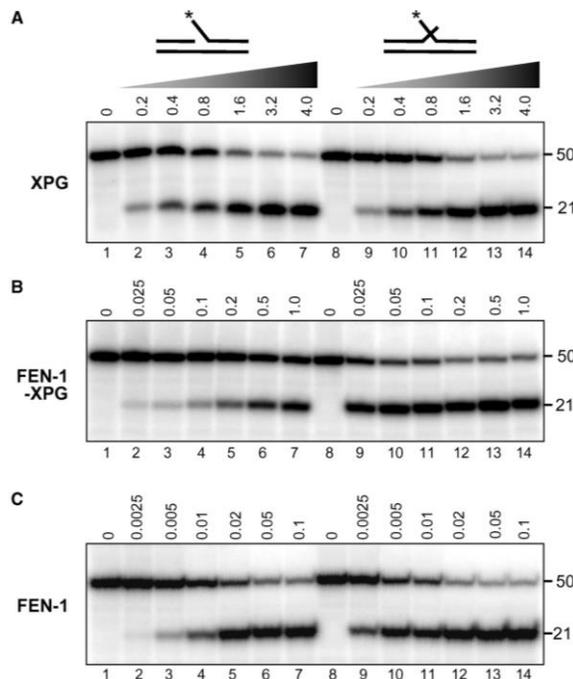
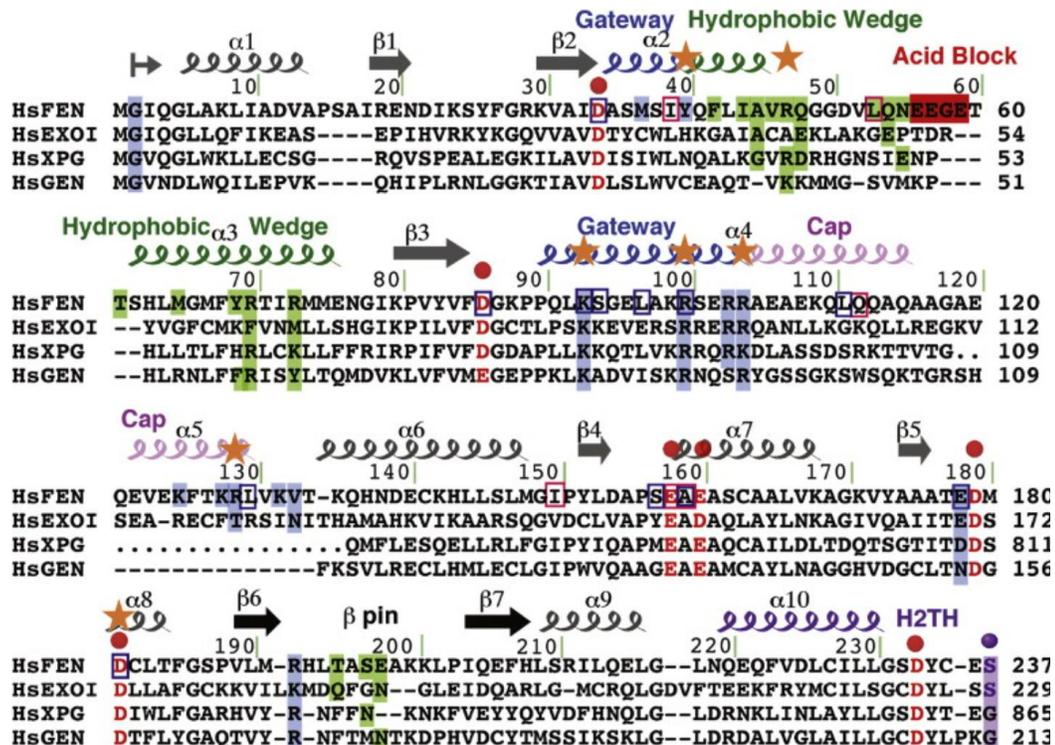


Figura 7. Actividad endonucleasa de XPG, FEN-1 y FEN-1-XPG en un sustrato de flap simple y doble. Los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes (2.5 pM a 0.1 nM) de las proteínas (XPG, FEN-1-XPG y FEN-1). Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida al 12 %. En carril 1 y 8 se muestran la sonda libre, carril 2-7 y 9-14-interacción sonda DNA-F/DNA-DF y proteína. Imagen tomada de Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007

En el 2011, Tsutakawa, y otros, publicaron un trabajo bajo el nombre de “Human Flap Endonuclease Structures, DNA Double-Base Flipping, and a Unified Understanding of the FEN1 Superfamily”, donde describieron ampliamente la estructura terciaria de HsFEN-1, incluyendo sitios conservados, dominios, sitio activo, bloques importantes, entre otros (figura 8). En este estudio, los autores mencionan que el bloque ácido (EEGE, entre los residuos 56-59) es un bucle específico que por repulsión de cargas puede impedir el paso al DNA. Mientras que el bloque CAP proporciona selectividad a los extremos 5'. Este bloque que, aunque también está presente en EXO-1, mantiene una secuencia única en FEN-1. Por ellos los investigadores, decidieron generar una enzima híbrida. La proteína híbrida llamada XFX2, estaba conformada primordialmente por la secuencia aminoacídica de HsXPG con el intercambio de la región espaciadora por la secuencia α 4 y α 5 de HsFEN-1 (región donde se encuentra el bloque CAP de HsFEN-1) con el objetivo de saber si de esta forma podía participar en el procesamiento de DNA burbuja (figura 9).



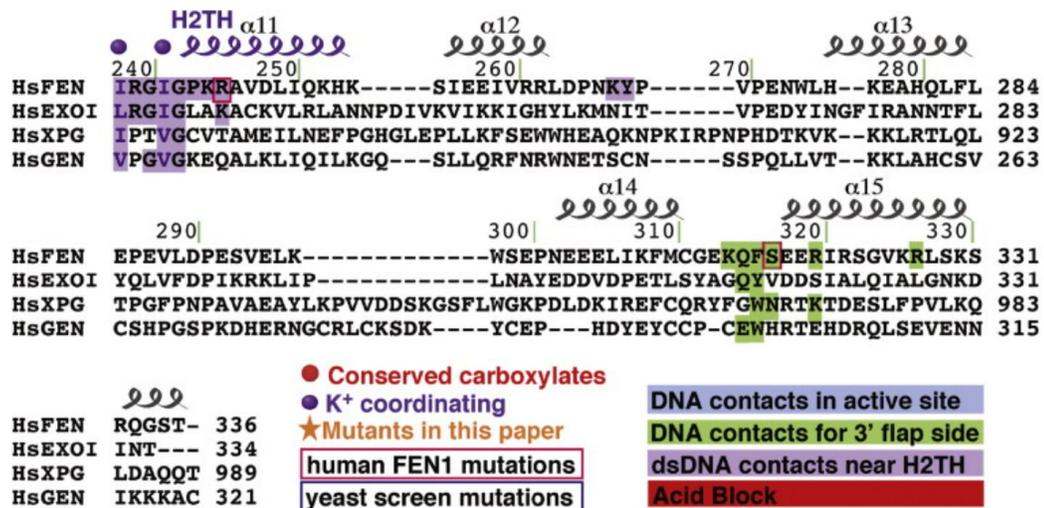


Figura 8. Mapa de la estructura secundaria, los elementos estructurales y los mutantes de FEN1 con una alineamiento de secuencias de los miembros humanos de la superfamilia FEN1 (EXO-1, XPG y GEN). Los aa en azul son importantes para el contacto DNA-sitio activo, en verde para el contacto DNA-extremo 3' del flap, en morado dsDNA-H2TH y en rojo el bloque ácido. Imagen tomada de Tsutakawa, y otros, (2011).

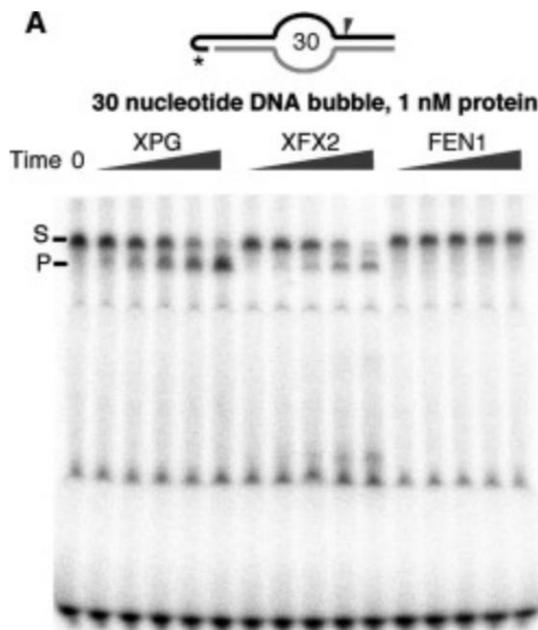


Figura 9. Eficiencia de escisión de XPG, XFX2 y FEN1 en un sustrato de DNA burbuja. Los ensayos se realizaron con concentraciones de proteína 1 nM a diferentes tiempos de incubación (5, 15, 30, 60 y 120 min). Los ensayos se resolvieron en un gel desnaturalizante de acrilamida (19:1) al 20 %. En carril 1 se muestra el tiempo 0, carril 2, 7, y 12 - 5 min, carril 3, 8 y 13-15 min, carril 4, 9 y 14-30 min, carril 5, 10 y 15-1 h y carril 6, 11 y 16- 2 h. La letra S significa sustrato y la P producto. Imagen tomada de Tsutakawa, y cols (2011).

Ellos esperaban que al adicionar el bloque CAP sobre la puerta de enlace se reduciría o inhibiría la capacidad de cortar DNA-B. Con estos resultados, como se esperaba XPG si es capaz de escindir DNA burbuja, y FEN-1 no posee esta actividad. Respecto a la enzima hibrida XFX2, la actividad de nucleasa se vio

significativamente reducida en el sustrato burbuja en comparación con XPG (figura 9). Concluyendo que, el bloque CAP contribuye a la selectividad del sustrato, y esto reduce la actividad nucleasa en DNA burbuja. También, sugirieron que XPG al carecer de un bloqueo ácido no posee un obstáculo directo para procesar el sustrato burbuja. Esto indica que la región espaciadora no es la única parte de la XPG que participa en el procesamiento de los sustratos burbuja.

Izaguirre Hernández (2020) realizó un estudio de FEN-1 de *G. duodenalis* cuando intentaba conocer la actividad nucleasa de XPG. Esto sucedió debido a que al emplear la secuencia de XPG de humano (*H. sapiens*) o de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la base de datos “Giardiadb” (todavía no estaba actualizada y no mostraba los nombres de todas las enzimas) la enzima más parecida fue FEN-1 de *G. duodenalis* (figura 10). Debido a esto, para su investigación ella se basó en HsXPG, la cual necesita 12 nt aprox. de DNA de doble cadena para poder unirse, por lo que las sondas diseñadas otorgan el espacio suficiente para formar el complejo de unión entre la sonda-XPG.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Gene ID	Transcript ID	Organism	Score	E-Value
GL50803_16953	GL50803_16953-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	82.4	5E-17
GL50803_14208	GL50803_14208-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	55.1	6E-8
GL50803_9922	GL50803_9922-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	44.7	9E-5

<i>Homo sapiens</i>				
Gene ID	Transcript ID	Organism	Score	E-Value
GL50803_16953	GL50803_16953-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	61.2	3E-10
GL50803_14208	GL50803_14208-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	51.6	9E-7
GL50803_9922	GL50803_9922-t26_1	Giardia Assemblage A isolate WB	33.1	0.32E0

Figura 10. Búsqueda blastp con XPG/Rad2 de *H. sapiens* y *S. cerevisiae* en Giardiadb. GdFEN-1 posee el ID-GL50803_16953, E-Value con *S. cerevisiae* de 5×10^{-17} y con *H. sapiens* de 3×10^{-10} , mientras que GdXPG tiene el ID-GL50803_14208, E-Value con *S. cerevisiae* de 6×10^{-8} y con *H. sapiens* de 9×10^{-7} . Basándose en el valor de E-Value, (mientras más pequeño sea el resultado es más confiable). Izaguirre Hernández tomo a GdFEN-1 como la enzima con mayor parentesco a HsXPG.

El trabajo de Izaguirre Hernández (2020) titulado como “Identificación y caracterización bioquímica in vitro de la nucleasa putativa GdXPG/Rad2 de *Giardia duodenalis*” demostró que la enzima FEN-1 de *G. duodenalis* es capaz de unirse tanto a DNA homodúplex como a DNA burbuja (figura 11).

Además, descubrió que, contrario a lo encontrado en diversos estudios de FEN-1 de organismos eucariotes (como es el caso del estudio de Hohl, Dunand Sauthier,

Staresinic, & Jaquier Gubler, 2007), presenta actividad nucleasa en DNA con estructura de burbuja (DNA-B) ya sea en presencia de Mg^{+2} o de Mn^{+2} (figura 12).

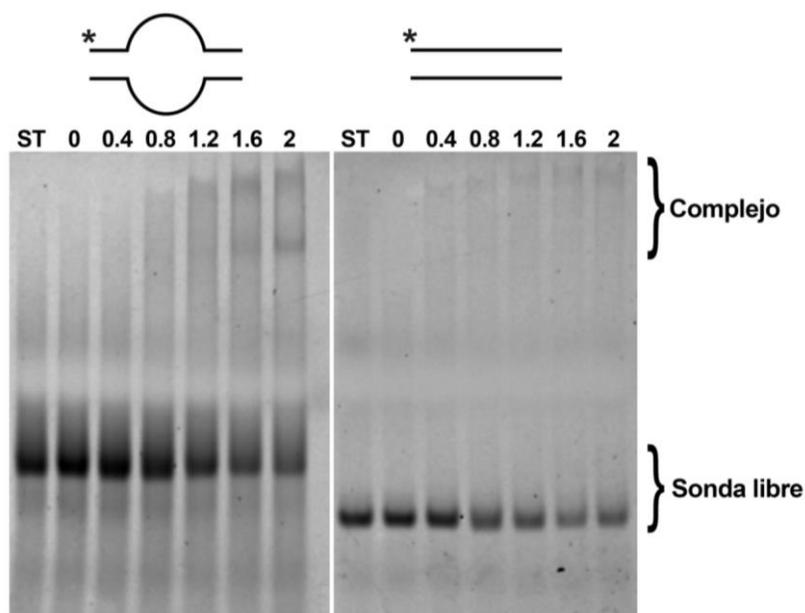


Figura 11. Ensayos de interacción entre la proteína y las sondas de DNA.

Los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes (0.4 μ M a 2 μ M) de las proteínas (XPG, FEN-1-XPG y FEN-1). Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 7 %. En carril 1 se muestra el extracto de proteína de células sin transformar con el plásmido, carril 2- la sondas libre, carril 3-7-interacción sonda DNA-B/DNA-H (homodúplex) y proteína. Imagen tomada de Izaguirre Hernández, 2020.

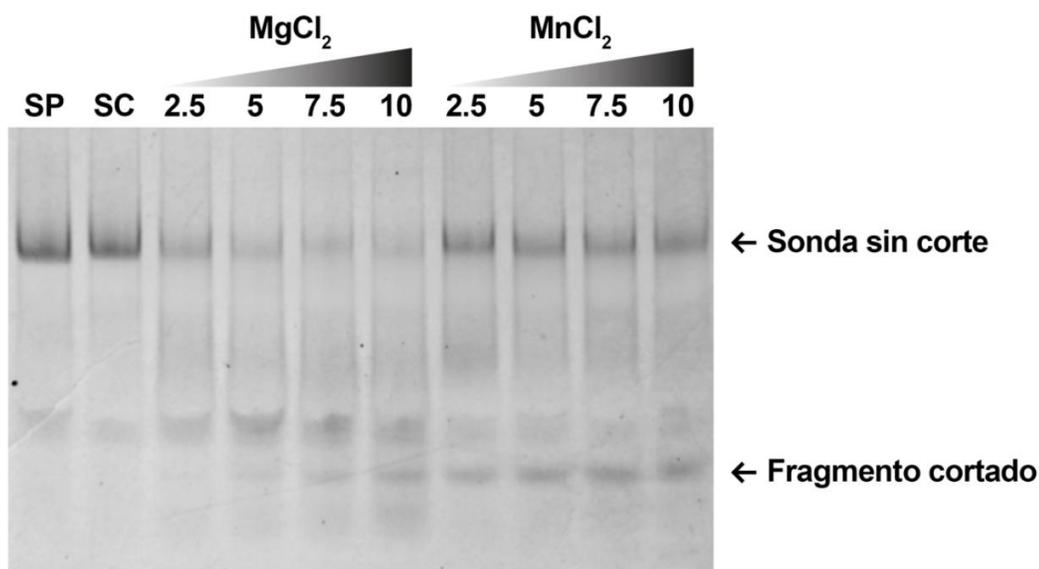


Figura 12. Ensayo de actividad nucleasa en sonda DNA-B de GdXPG putativa utilizando Mg^{+2} y Mn^{+2} .

Los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes (2.5 μ M a 10 μ M) de las cofactor ($MgCl_2$ y $MnCl_2$). Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 12 %. En carril 1 se encuentra le cofactor sin proteína (SP), carril 2- sin cofactor (SC), carril 2-10-actividad nucleasa. Imagen tomada de Izaguirre Hernández, 2020.

Con todos estos antecedentes, en este trabajo, con el objeto de entender como la FEN-1 de *G. duodenalis* podía escindir DNA burbuja, se analizó que parte de la proteína FEN-1 era relevante para dicha actividad, así analizamos los dominios o bloque ácido y/o bloque CAP.

3. Justificación

Giardia es un organismo que causa giardiasis y esta constituye un problema de salud importante. Por lo que el estudio de las enzimas de reparación del DNA en Giardia, puede proveer algunos posibles blancos terapéuticos. La caracterización del mecanismo para que la enzima GdFEN-1 (enzima importante en la reparación de lesiones en el DNA mediante la vía de reparación BER) pueda llevar a cabo la actividad de nucleasa en DNA burbuja, ayudará a entender cómo operan estas enzimas en este parásito y eventualmente podría sugerir algunos blancos terapéuticos.

4. Hipótesis

El bloque ácido o el bloque CAP son importantes en la actividad nucleasa para procesar al sustrato burbuja.

5. Objetivos

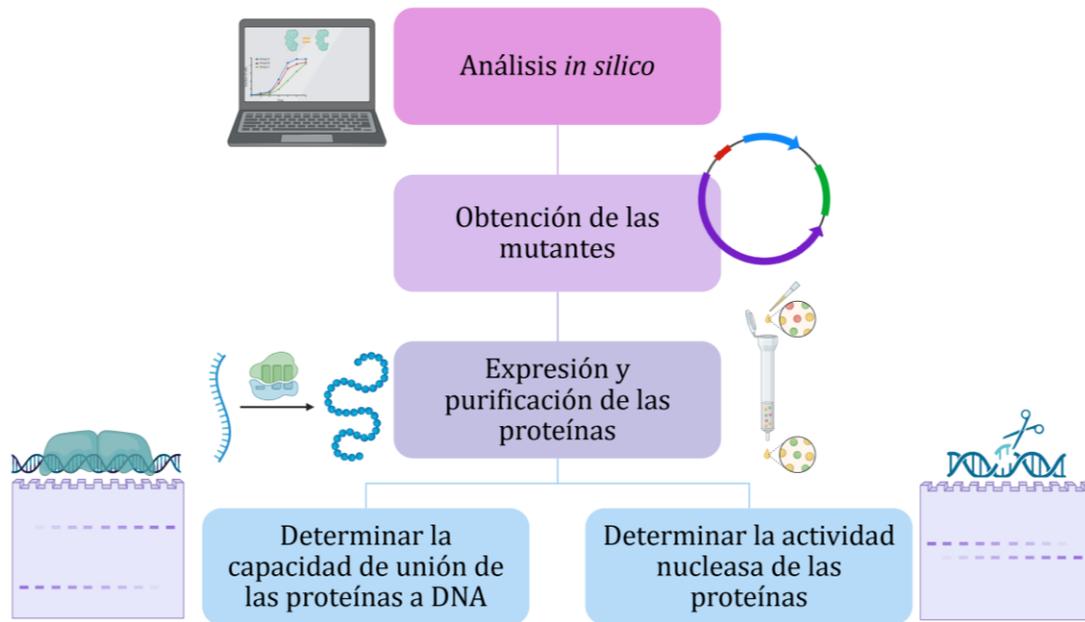
5.1 Objetivo general

Generar y expresar la mutante GdFEN-1-HsBA (bloque ácido) y GdFEN-1-HsBC (bloque CAP), para evaluar su actividad de nucleasa burbuja.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes.
2. Obtener las mutantes del bloque ácido y el bloque CAP.
3. Expresar y purificar las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes.
4. Determinar la capacidad de unión de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja).
5. Determinar la actividad nucleasa de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja).

6. Estrategia experimental



7. Metodología

7.1 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático empezó con el alineamiento de las secuencias de la FEN-1 de *G. duodenalis* y de *H. sapiens* empleando la herramienta de Espript3 <https://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/> con la finalidad de conocer las regiones conservadas y los bloques ácido y CAP. Posteriormente, se usó el programa SnapGene® software (from Dotmatics) para intercambiar las secuencias de los bloques (ácido y CAP) de *G. duodenalis* por los bloques de *H. sapiens*.

Una vez intercambiado los bloques se llevó a cabo la predicción de las estructuras terciarias mediante el programa AlphaFold2 y se realizó el análisis de homología de estructuras mediante solapamiento con la ayuda del programa Chimera 1.16 para observar los cambios estructurales. También se utilizó el recurso bioinformático de ExPASy <https://www.expasy.org/> para conocer, vincular, parámetros físico-químicos y el punto isoeléctrico (pI) de cada enzima.

7.2 Mutación del bloque ácido o CAP de FEN-1 de *G. duodenalis*

Para poder realizar la sustitución de los bloques (ácido y CAP) de *G. duodenalis* por los de *H. sapiens*. Las reacciones de mutagénesis dirigida por sustitución se llevaron a cabo utilizando el kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (NEB). Lo primero a realizar fue el diseño de los primers forward y reverse para cada uno de los bloques de interés (tabla 2). Para para el diseño de primer, como lo indicó el proveedor se empleó el programa este paso se por se usó el programa NEBaseChanger <https://nebasechanger.neb.com/>.

Tabla 2. Primers para la mutagénesis dirigida por sustitución de los bloques ácido y CAP.

Bloque	Primer	Secuencia
Bloque ácido	Forward	5' GCGAGACAACAAGCCACCTAGTG 3'
	Reverse	5' CCTCCTCGTTAGCTAAGGCCGTG 3'
Bloque CAP	Forward	5' TTTACAAAGCGCCTTGTGAAGGTCACGCAG 3'
	Reverse	5' CTTCTCAACCTCCTGAAGGTTTCCTTCCTCC 3'

Después de diseñar los primers, se realizó la reacción de PCR (1X Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 0.05µM primer forward, 0.05µM primer reverse, 1 – 25 ng de DNA (GdFEN-1-pET100)) con las condiciones mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.

Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
x1	Desnaturalización inicial	98	30''
	Desnaturalización	98	10''
x25	Alineamiento	57	30''
	Extensión	72	3:30'
x1	Extensión final	72	2'
	Hold	4	∞

Terminada la PCR, se tomó 1 µL de la reacción y se incubó 5 min a 37 °C con la reacción de KLD (1X de buffer de reacción KLD, 1X Mix de enzimas KLD). Pasada la incubación, se agregaron 5 µl de cada reacción para transformar células DH5α de *E. coli* químicamente competentes.

7.2.1 Análisis de candidatas

Se analizaron 5 colonias candidatas que contuvieran el GdFEN-1-pET100 con la mutación en el bloque ácido (GdFEN-1-HsBA-pET100) o bloque CAP (GdFEN-1-

HsBC-pET100). Primero se extrajo el DNA plasmídico por miniprep, se transformaron células BL21 de *E. coli* y con objeto de descartar todas aquellas mutantes que estuvieran fuera de marco de lectura, se indujeron con IPTG para realizar un gel de acrilamida y un western blot (WB). Más adelante, todas las colonias candidatas positivas (sobreexpresión de una proteína de 41.630 kDa) fueron sometidas a secuenciación.

Inducción piloto

Para descartar las colonias candidatas que contuvieran proteínas fuera de fase se realizó una inducción piloto. Se partió de un cultivo semilla de 1 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó en agitación a 37 °C de 16-18 horas. Posteriormente se preparó un cultivo semilla para inocular 10 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez llegada a la densidad óptica deseada se añadió IPTG con concentración final de 1 mM y se incubaron a 37 °C en agitación por 3 h. Posteriormente, se centrifugaron 3 mL de las muestras a 13,500 rpm por 2 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo celular en 300 µl de solución 1x LAEMMLI con 2.5% β-mercaptoetanol. Se hirvieron por 5 min y se resolvieron en dos geles de acrilamida desnaturalizante al 10 % por 90 min a 100 V (uno para teñirlo con azul de Coomassie y otro para el WB).

Western Blot (WB)

Para el WB se empleó un gel de acrilamida al 10% y se realizó la transferencia semihúmeda en membrana PDVF (previamente activada con metanol absoluto y equilibrada con buffer) a 100 v por 1:30 h. La membrana se bloqueó con una solución de 5 % de leche en buffer 1x TBS-T (20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20; pH=7.6) por 1 h en agitación a temperatura ambiente (TA). Se decantó la solución de leche-TBS-T y se añadió el anticuerpo primario contra la etiqueta de histidinas (1:7,000) en solución TBS-T y se incubó durante 16 horas a 4 °C. Transcurrida la incubación se retiró el anticuerpo primario, se efectuaron 3 lavados con TBS-T por 10 min en agitación y se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón (1:20,000, sigma-aldrich, #H1029) con el que se incubó 1 h a TA. Se lavo

la membrana 3 veces como se describió anteriormente y se reveló utilizando el reactivo de quimioluminiscencia de Western Lightning Plus-ECL de PerkinElmer. Además, posterior al WB se tiñó la membrana con rojo de ponceau.

Secuenciación

Las colonias candidatas que resultaron ser positivas en el gel de acrilamida teñido con Coomassie, membrana teñida con rojo de ponceau y western blot, fueron analizadas mediante secuenciación. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el kit BigDye Direct Cycle Sequencing de Thermo Fisher Scientific. Se añadió el plásmido GdFEN-1-HsBA-pET100/ GdFEN-1-HsBC-pET100 (100 ng), el oligonucleótido (3.2 μ M, 5' GGCGATATAGGCCGCCAGCA 3') y H₂O miliQ a un tubo con un volumen total de para PCR que se incubó a 72 °C por 5 minutos y después a TA por 5 minutos para favorecer la hibridación. Posteriormente, se añadió el buffer de reacción (4 μ L) el Master Mix BigDye (4 μ L) para la PCR (tabla 4).

Tabla 4. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.

Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
x1	Desnaturalización inicial	96	5'
x30	Desnaturalización	96	20''
	Alineamiento	53	20''
	Extensión	60	4'
x1	Extensión final	4	7'
	Hold	4	∞

La reacción se transfirió a un tubo de 1.5 ml al que se añadieron: 5 μ l de 125 mM EDTA pH 8 y 60 μ l de etanol 100 % grado biología molecular y se incubó a TA por 30 minutos. En seguida, se centrifugó a 13,500 rpm por 20 minutos y se llevaron a cabo dos lavados con etanol 70 % centrifugando a 13,500 rpm. La reacción se dejó secar a TA y fue leída en el equipo 310 Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific de laboratorios LANSE-Cinvestav. El electroferograma resultante se examinó mediante la aplicación SnapGene y la secuencia obtenida en MultAlin <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

7.2.2 Preparación de células de *E. coli* químicamente competentes

Se prepararon Las células competentes de *E. coli* siguiendo el protocolo Hanahan (Sambrook & Russell, 2001). En cajas Petri con medio LB sólido se sembró una colonia de células DH5 α (RecA1 y EndA1- F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK- mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*) y BL21 (deficiente en proteasas Lon y OmpT, F- *ompT hsdS_B* (r_B-, m_B-) *gal dcm* (DE3)) de *E. coli* y se incubó a 37 °C de 16-18 horas. Una colonia se inoculó en 5 mL de medio LB líquido para un cultivo semilla, se incubó en agitación a 37 °C de 16-18 horas. Posteriormente, el cultivo semilla se empleó para inocular un cultivo de 100 mL de medio LB líquido que se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar OD₆₀₀ de 0.5. Se centrifugó a 5,000 rpm 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo celular en 8 mL de buffer TFB I estéril (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 15% glicerol; pH 5.8). Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. El cultivo celular se resuspendió en 1 ml de buffer TFB II estéril (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% glicerol; pH 6.5) y se repartió en alícuotas de 50 μ l, inmediatamente congeladas con hielo seco, y se almacenaron a -80 °C.

7.2.3 Transformación de células de *E. coli* químicamente competentes

Para transformar las bacterias y calcular su eficiencia se usaron el plásmido pET 100. Se tomó una alícuota de las bacterias químicamente competentes y se agregó 300 ng del plásmido. Se incubó 30 min en hielo, un 1 min a 42 °C y 1 min en hielo. Inmediatamente, se añadió 1 mL de medio LB líquido y se incubó en agitación a 37 °C por 1 h. Finalmente, se utilizaron 100 μ l para sembrar en caja Petri con medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37 °C de 16-18 h.

Para conocer la eficiencia se contaron las colonias obtenidas y empleo la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{No. de colonias} * \text{Vol. total}}{(\mu\text{g de plasmido} * \text{Vol. de siembra})}$$

7.2.4 Extracción de DNA plasmídico

EasyPrep

En este método se siguió el protocolo establecido por Berghammer y Auer (1993). Se inocularon células de *E. coli* en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron alrededor de 16-18 horas a 37 °C en agitación. Más tarde se centrifugó a 13,000-13,500 rpm por 2 min y se resuspendió el cultivo celular en 50 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0.1 mg/mL BSA, 0.2 mg/mL RNAsa A, 15% m/v sacarosa, 2 mg/mL lisozima). Se incubaron a TA por 5 min, se hirvieron 1 min y, de inmediato, se colocaron en hielo 1 min. En seguida, se centrifugaron a 13,000- 13,500 rpm por 15 min y, finalmente, se recuperó el sobrenadante que se almacenara a -20 °C. La integridad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5x (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA 0.001M) que se sometió 100 V por 30 min.

MiniPrep

El método se realizó siguiendo el protocolo establecido por Qiagen con algunas modificaciones. Se inocularon células de *E. coli* en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron alrededor de 16-18 horas a 37 °C en agitación. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min para generar el cultivo celular. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo celular con 500 µL de buffer P1 (50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAsa A). A continuación, se aplicó un vortex y se añadió 500 µL de buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)). Se mezcló por inversión y se incubó 5 min a TA para agregar 500 µL de Buffer P3 (3 M acetato de potasio pH 5.5). Nuevamente se mezcló, pero se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó, recuperó el sobrenadante y precipitó el DNA con 750 µL de isopropanol frío por 1 h a -20°C. Después, se centrifugó 15 min a 14,000 rpm, se decantó el sobrenadante. El cultivo celular se centrifugó con 50 µL de etanol 70% (para realizar un lavado), se retiró el sobrenadante, se dejó secar el cultivo celular aproximadamente 15-20 min a TA y se resuspendió en 50-100 µL de H₂O bidestilada. La integridad se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5x que se sometió 100 V por 30 min.

7.3 Sobreexpresión y purificación de GdFEN-1 silvestre y mutantes

La cepa BL21 de *E. coli* transformada se empleó para expresar las proteínas de interés (GdFEN-1-WT, GdFEN-1-HsBA y GdFEN-1-HsBC) en condiciones determinadas. Más adelante, se purificaron por cromatografía de afinidad y se cuantificó por el método de Bradford.

7.3.1 Expresión de enzimas

Para la inducción de las proteínas se realizó un cultivo semilla de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó en agitación a 37 °C de 16-18 horas. Se manejó un cultivo semilla para inocular 500 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.5. Prontamente, llegada a la densidad óptica deseada se añadió IPTG con concentración final de 1 mM y se incubaron a 37 °C en agitación por 3 h. Posteriormente, se efectuó la metodología de purificación.

7.3.2 Purificación de enzimas

La purificación de las enzimas se llevó cabo siguiendo el protocolo establecido en el manual de usuario del vector (Life Technologies, 2010). Siguiendo a la inducción con IPTG, el cultivo se centrifugó por 10 min a 7,000 rpm y se desechó el sobrenadante, mientras que el cultivo celular fue resuspendido en 6.25 mL de Buffer A 30 mM y se sonicó 10 veces con una potencia de 100% en intervalos de 5 seg con descansos de 35 seg. Consecutivamente, se centrifugó a 15,000 rpm durante 40 min y se recuperó el sobrenadante, que después fue filtrado con una membrana con tamaño de poro de 0.20 µm para generar el extracto total. Se colocó 1 mL de perlas agarosa-níquel en la columna y se equilibró con el uso de buffer A 30 mM. Se añadió el extracto total a la columna, se dejó reposar 15 min y se eluyó para recuperar la fracción no unida. En seguida, se añadieron 7 mL de buffer A 30 mM (50 mM NaH₂PO₄*H₂O, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 0.8 mM PMSF, 80 mM) y se eluyó (primer lavado). Inmediatamente, se agregó 7 mL de buffer A 50 mM (50 mM NaH₂PO₄*H₂O, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 0.8 mM PMSF, 80 mM Benzamidina) y se eluyó (segundo lavado). Por último, se adicionó 10 mL de buffer

B 300 mM (50 mM NaH₂PO₄*H₂O, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 0.8 mM PMSE, 80 mM Benzamidina) y se colectaron 10 fracciones de 1 mL.

De cada fracción se tomó 40 µl para realizar un gel de acrilamida al 10%. El resto de las fracciones obtenidas (1-10) se centrifugó en una columna de Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter Devices 30 K por 10 min a 7500 g. Se desechó el filtrado y se recuperó la enzima concentrada con 80 µl de buffer T-150 (pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 0.4 nM EDTA, 0.15 M KCl). Finalmente, se dividió en alícuotas de 20 µl que se almacenaron a -80 °C con 15 % de glicerol.

7.3.3 Cuantificación por método de Bradford

La cuantificación de las enzimas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se preparó una curva patrón por duplicado utilizando BSA en concentraciones de 0 a 3 mg/mL. Se usó muestras de proteína concentrada y diluida 1:4 por duplicado. En el ensayo se aplicaron 180 µl de reactivo de Bradford en las reacciones, se usó una microplaca de 96 pozos y el equipo Chromate 4300 de Awareness Technology Inc.

7.4 Evaluación de la capacidad de unión GdFEN-1 silvestre y mutantes

En estos ensayos de cambio de movilidad electroforética, concentraciones crecientes de la proteína purificada (GdFEN-1-WT, GdFEN-1-HsBA o GdFEN-1-HsBC) se incubaron con las sondas de DNA (flap o burbuja) en un buffer de unión (40 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂) Siguiendo el protocolo establecido por García Lepe, (2022). Las reacciones se resolvieron en un gel de poliacrilamida nativo al 4 %, en buffer TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.5 y 0.5 mM ácido etilendiaminote-traacético). Los complejos DNA-proteína se visualizaron a 600 nm en un escáner Odyssey®FC Scanner Imaging System (LI-COR Biosciences).

7.4.1 Diseño e hibridación de sondas fluorescentes de DNA

Previamente se diseñaron dos sondas de DNA (flap y burbuja) que tuvieran un oligonucleótido marcado con 6-carboxil fluoresceína en el extremo 5' (García-

Lepe, manuscrito en preparación). Los primers utilizados para las sondas que se sintetizaron por la compañía T4Oligo se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los oligos de la sonda flap y burbuja

Primer	Secuencia
A-bubble 5' FAM*	*5' CGCGGATCCCCTACGCCGATTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTACGTATGCCACGAATTCGCG 3'
B-bubble	5' CGCGAATTCGTGGCATAACGTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTCGGCGTAGTGGGATCCGCG 3'
D-flap	5' CCGTCTAGACTCGCATCTC 3'
E-flap	5' CGCGAATTCGTGGCATAACGTAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGAGATGCGAGTCTAGACCGG 3'

La elección de la sonda se basó en el estudio de García Lepe (manuscrito en proceso).

Para la sonda flap (DNA-F) se emplearon cantidades equimolares de los primers E y D, se incubaron a 80 °C por 5 min y se dejó enfriar a TA hasta los 50 °C. Posteriormente, se añadió el primer A (en cantidades equimolares), se incubaron a 50 °C por 5 min y se dejó enfriar a TA por 2 h. Para la sonda burbuja (DNA-B) se hibridaron cantidades equimolares del primer A y B, se incubaron a 70 °C por 5 min y se dejaron enfriar a TA por 2 h. Las sondas se almacenaron en oscuridad a -20 °C. La figura 13 muestra el esquema de la hibridación de ambas sondas.

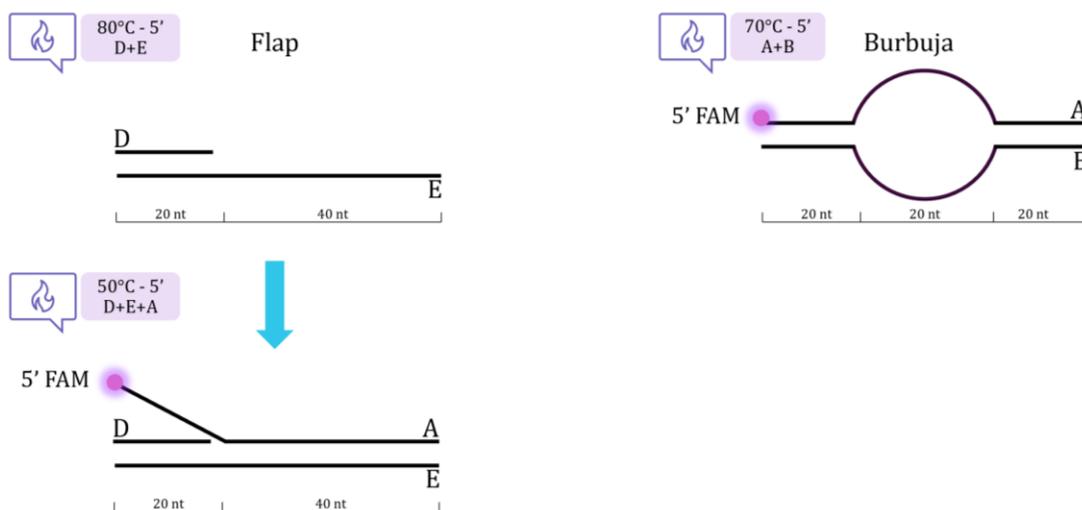


Figura 13. Diseño e hibridación de sondas fluorescentes de DNA flap y burbuja.

Electrodiálisis

La reacción anterior se cargó en un gel de acrilamida al 10 % preparado con TAE 1X que se sometió a electroforesis a 100 V por 40 min. Posteriormente, el gel se visualizó a 600 nm en un escáner Odyssey®FC Scanner Imaging System (LI-COR

Biosciences) y se cortó la porción del gel correspondiente al tamaño de la sonda. Se colocó en una membrana de diálisis (Spectra/Por molecular porous membrane tubing2, MWCO: 6 - 8 kDa, Spectrum Laboratories, Inc.) con 300 μ L de TAE 1X y se sometió a electroforesis a 100 V por 30 min. A continuación, se recuperó el buffer en un tubo de 1.5 ml al que se añadieron 2 volúmenes de etanol 100 % grado biología molecular, 10 mM $MgCl_2$, 0.2 M NaCl y se incubó a -20 °C por 12-20 h para precipitar el DNA. Finalmente, se centrifugó a 13,500 rpm por 1 h, se hicieron 3 lavados de pastilla con etanol 70 % grado biología molecular, se dejó secar a TA y se resuspendió en 20-30 μ l de agua estéril libre de nucleasas.

7.5 Evaluación de la actividad nucleasa de las enzimas.

Para determinar la actividad nucleasa, una concentración fija (4 μ M) de la proteína purificada (GdFEN-1-WT o GdFEN-1-HsBA) se incubó con la sonda flap o burbuja (5 pmol), en buffer para nucleasa (30 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 50 μ g/mL BSA, 5 mM $MnCl_2$) por 1 h. Después, las reacciones se detuvieron con 0.1 mg/mL de proteinasa K y dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) al 3 %. Prontamente, las reacciones resolvieron en un gel de poliacrilamida nativo al 7 %, en buffer TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.5 y 0.5 mM ácido etilendiaminotetraacético). Las bandas de DNA se visualizaron a 600 nm y se tomaron fotos en un escáner Odyssey®FC Scanner Imaging System (LI-COR Biosciences).

8. Resultados

8.1 Analizar *in silico* las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes

Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas FEN-1 de *H. sapiens* (HsFEN-1) y de *G. duodenalis* (GdFEN-1) mediante la herramienta Esript3 para conocer las regiones conservadas. Además, empleando Conserved Domains and Protein Classification de NCBI se encontró que ambas enzimas contienen dominios conservados como el dominio N-terminal, la interacción con PCNA y el dominio I. Dentro del dominio N-terminal se encuentra el bloque ácido (recuadro verde), mientras que en el dominio I se encuentra el bloque CAP (recuadro naranja). Los dominios y los bloques se muestran en figura 14.

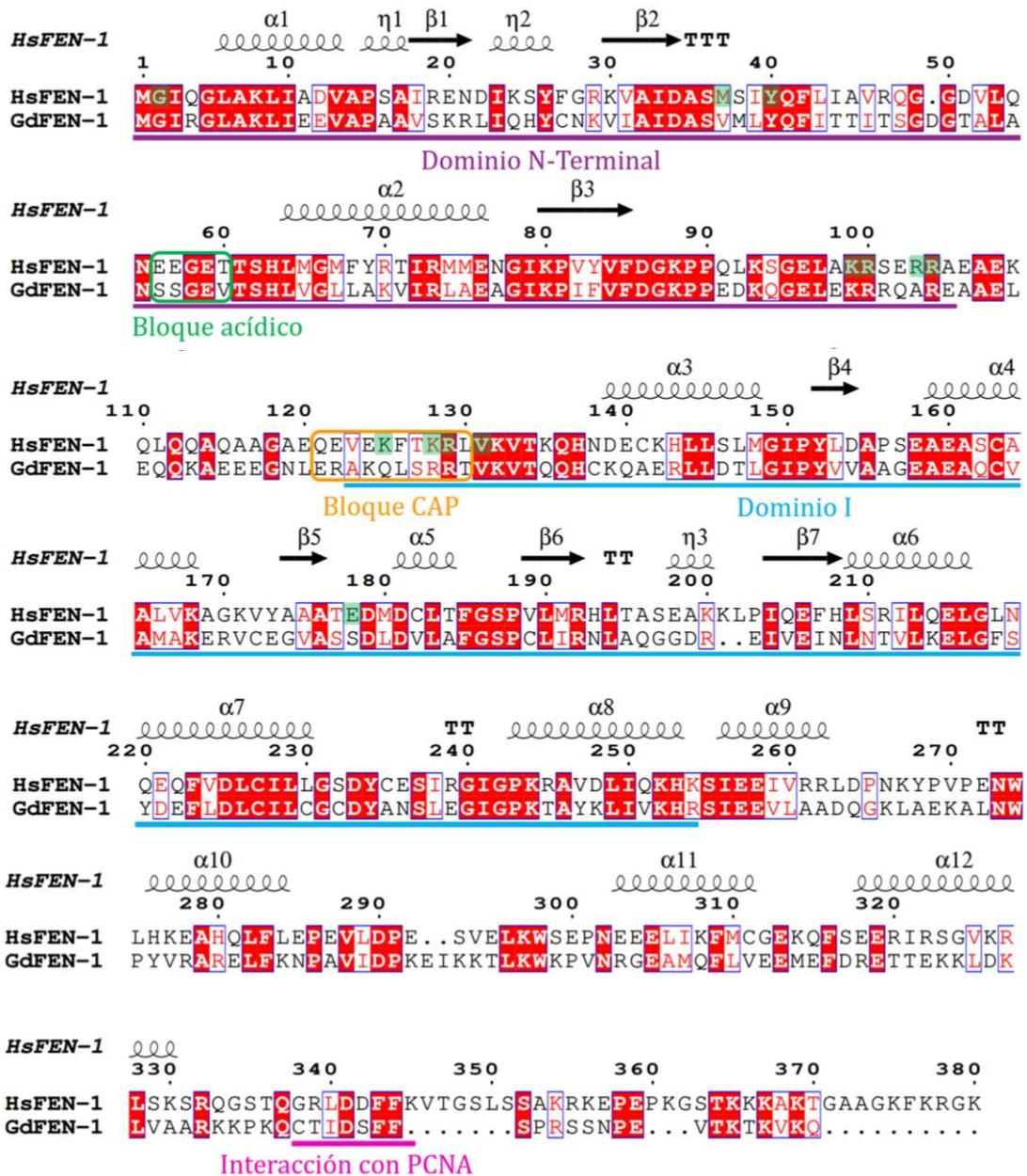


Figura 14. Alineamiento de las secuencias de FEN-1 de *H. sapiens* (HsFEN-1) y de *G. duodenalis* (GdFEN-1). Los aminoácidos resaltados de color verde son importantes para que el DNA este en contacto con el sitio activo. Los aminoácidos blancos en cuadro rojo mantienen identidad estricta, los rojos son aminoácidos similares. además, en la parte de arriba de cada renglón del alineamiento se muestra la estructura secundaria. HsFEN-1 posee el ID- NP_004102y GdFEN-1 el ID-GL50803_14208.

Se generó la predicción de la estructura terciaria de la enzima GdFEN-1 silvestre (GdFEN-1-WT), la enzima mutante en el bloque ácido (GdFEN-1-HsBA) y la mutante en el bloque CAP (GdFEN-1-HsBC). Al comparar GdFEN-1-HsBA con GdFEN-1-WT se observó que al intercambiar los bloques ácidos a simple vista no afecta la configuración de la estructura terciaria ni su estructura desordenada

(figura 15, **a**)). Así como también, al empalmar las estructuras terciarias de las enzimas GdFEN-1-HsBC y GdFEN-1-WT se concluyó que no existe una diferencia significativa ni altera la estructura α -hélice (figura 15, **b**)) Además, con la ayuda de ExPASy se identificó que la enzima GdFEN-1-WT tiene un punto isoeléctrico de 7.97, mientras que la GdFEN1-HsBA y GdFEN1-HsBC presentan un pI de 6.92.

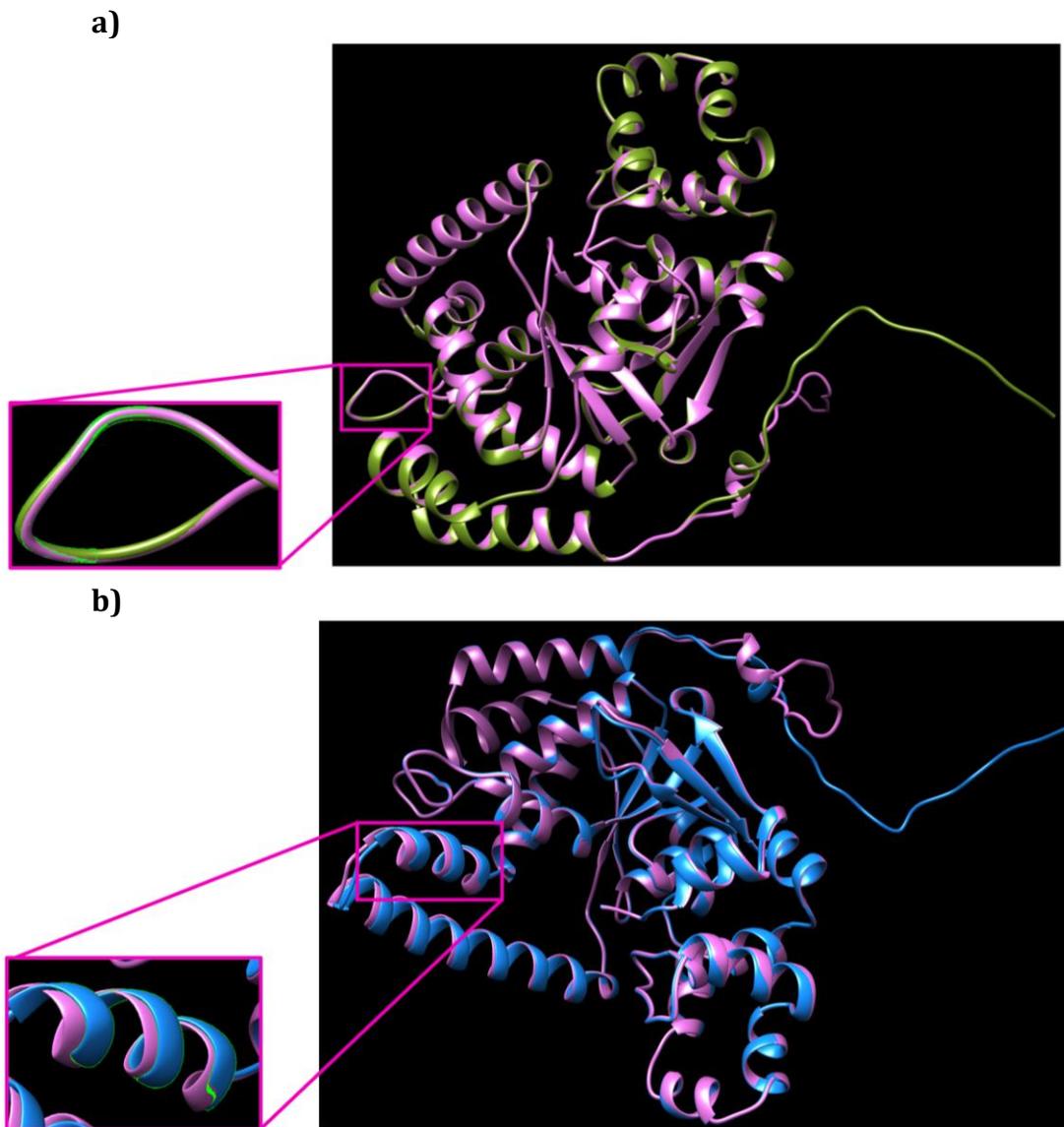


Figura 15. Comparación de las predicciones de estructuras terciarias. **a)** GdFEN-1-WT (morado) y GdFEN-1-HsBA (verde), **b)** GdFEN-1-WT (morado) y GdFEN-1-HsBC (azul). El recuadro rosa es un aumento a la región donde ocurre la mutagénesis dirigida de sustitución del bloque ácido y el bloque CAP. Las estructuras terciarias de cada enzima se predijeron con AlphaFold y se realizó el superposición mediante Chimera 1.16.

8.2 Obtener las mutantes del bloque ácido y el bloque CAP

Para la obtención de las mutantes se empleó el kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (NEB) como se indica en el apartado de metodología. A partir del plásmido FEN-1-pET100 se generaron los plásmidos portadores de las mutantes de GdFEN1 y se nombraron GdFEN1-HsBA-pET100 (mutante del bloque ácido, figura 16) y GdFEN1-HsBC-pET100 (mutante del bloque CAP, figura 17).

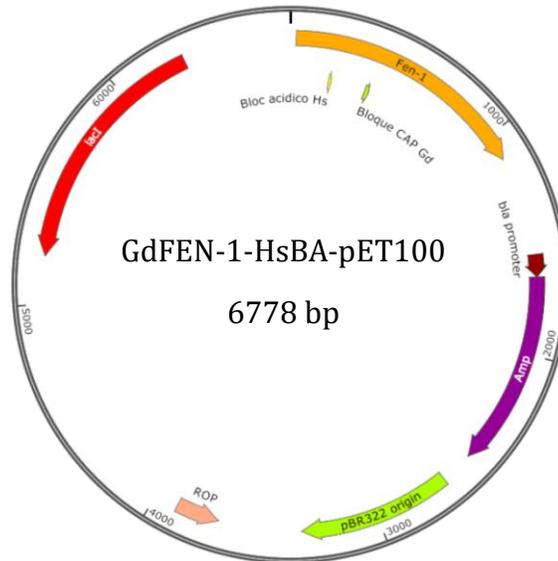


Figura 16. Plásmido GdFEN-1-HsBA-pET100

El vector contiene el gen que traduce a la enzima FEN-1 (flecha naranja) con la mutación en el bloque ácido (flecha amarilla). Contiene gen de resistencia a la ampicilina (flecha morada) y su promotor (flecha vino) y el gen LacI (flecha roja) para la inducción con IPTG. Imagen realizada mediante SnapGene.

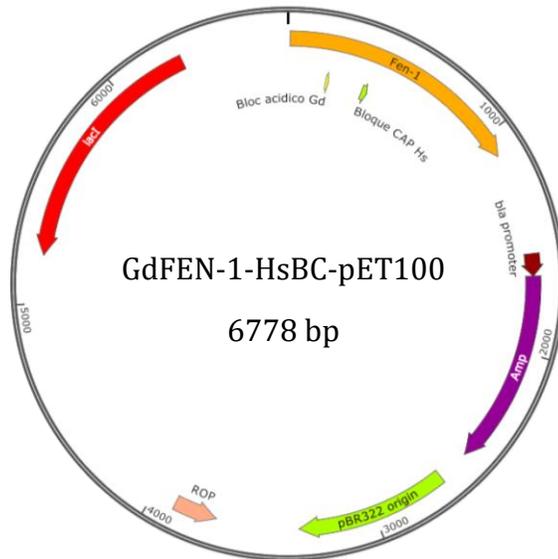


Figura 17. Plásmido GdFEN-1-HsBC-pET100

El vector contiene el gen que traduce a la enzima FEN-1 (flecha naranja) con la mutación en el bloque CAP (flecha verde pequeña). Contiene gen de resistencia a la ampicilina (flecha morada) y su promotor (flecha vino) y el gen LacI (flecha roja) para la inducción con IPTG. Imagen realizada mediante SnapGene.

Una vez obtenido los plásmidos con las mutaciones deseadas se transformaron en células de DH5 α de *E. coli* y las colonias candidatas fueron analizadas. Se extrajo el plásmido y se transformaron en células de BL21 de *E. coli*. Se sometieron a una inducción piloto con 1 mM de IPTG por 3 h. En seguida, se prepararon las muestras para analizarlas por medio de gel de acrilamida teñido con Coomassie, Western Blot (WB) y la membrana del WB teñida con rojo de ponceau.

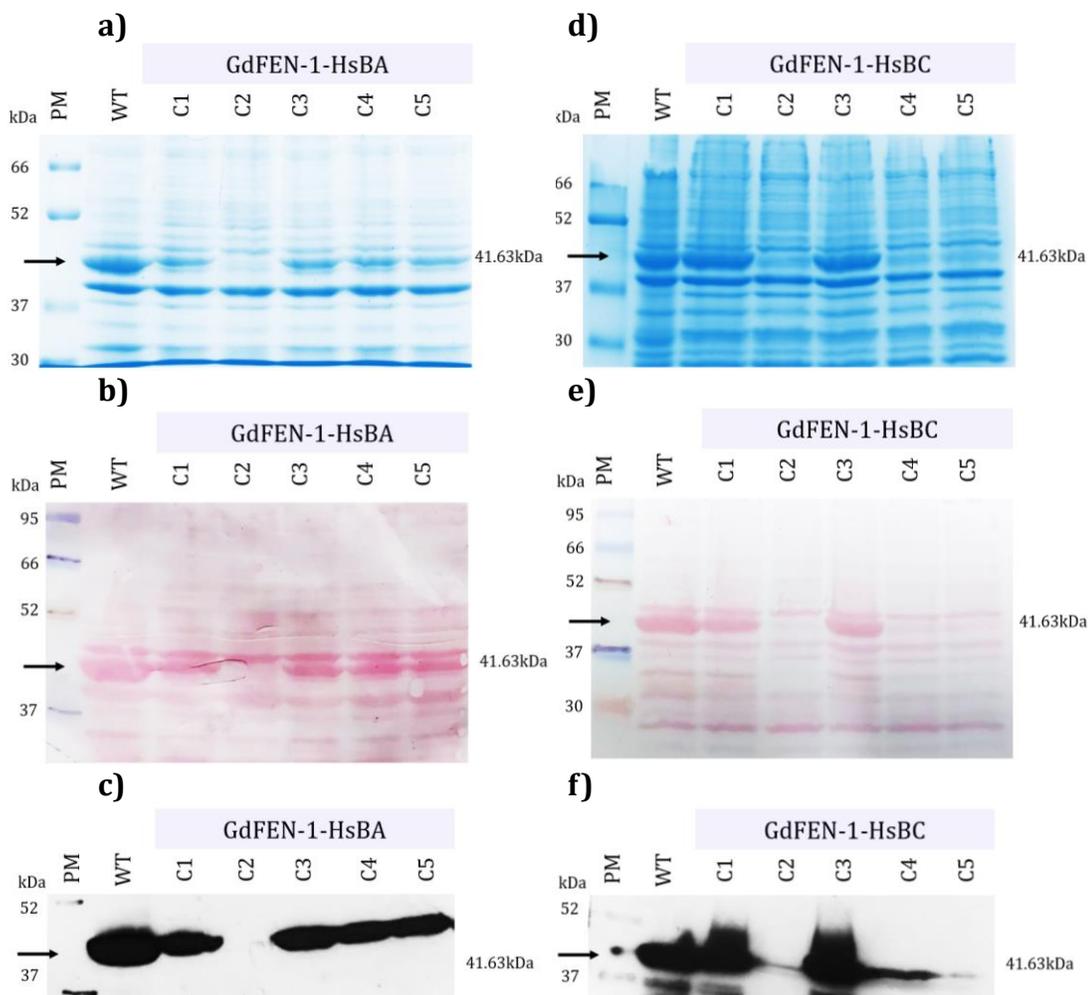


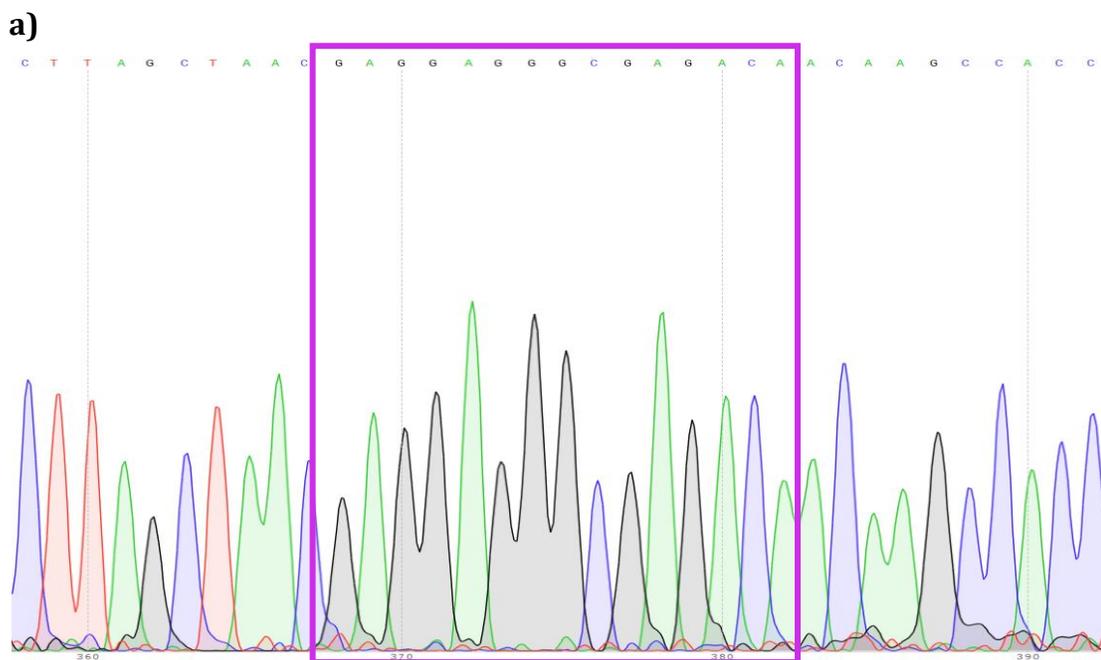
Figura 18. Análisis de candidatas de mutantes en bloque ácido y bloque CAP en GdFEN-1 por geles teñidos con Coomassie y Western blot.

a) y d) Gel nativo de acrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie para descartar las proteínas fuera de fase. **b) y e)** Las membranas utilizadas para el western blot se tiñeron con rojo de ponceau. **c) y f)** Los ensayos de WB fueron realizados con el anticuerpo primario anti-histidina (1:7,000) y el anticuerpo secundario anti-mouse (1:20,000). El marcador de peso molecular (PM) (BIO-HELIX, BLUltra Prestained Protein Ladder; broad range 6.5–270 kDa, PM001-0500) se muestra en carril 1, carril 2-GdFEN-1-WT, carril 3-7-colonias candidatas (C1-5). La enzima es indicada con una flecha negra, su peso es de 41.630 kDa.

En la figura 18 se muestran los resultados de 5 clonas candidatas. En los incisos **a)**, **b)** y **c)** se muestran que de las clonas transformadas con el plásmido GdFEN-1-HsBA-pET100, únicamente, la C2 presenta no expresa la proteína en fase. Mientras que en los incisos **d)**, **e)** y **f)** se observa que de las colonias transformadas con el vector GdFEN-1-HsBC-pET100 solo la C1 y la C3 expresan.

Una vez analizados los resultados anteriores se realizó una secuenciación a las colonias elegidas con la finalidad de confirmar que la secuencia original había sido sustituida por el bloque ya ácido o CAP de humano, o para eliminar aquellas que se hubiera realizado un cambio no deseado. Para la mutante del bloque ácido se eligió secuenciar la colonia C1 (C1-GdFEN-1-HsBA), en tanto que para la mutante del bloque CAP se optó por la colonia C3 (C3-GdFEN-1-HsBC).

La secuencia obtenida de los electroferogramas (figura 19) se alineó en la plataforma de MultAlin con la secuencia del GdFEN-1-WT y la secuencia de **a)** GdFEN-1-HsBA o **b)** GdFEN-1-HsBC realizada *in silico* en SnapGene (figura 20). En ambas secuenciaciones se puede observar que la mutación de las bases se presenta en el sitio deseado y no existe ningún cambio en otro lugar de la secuencia.



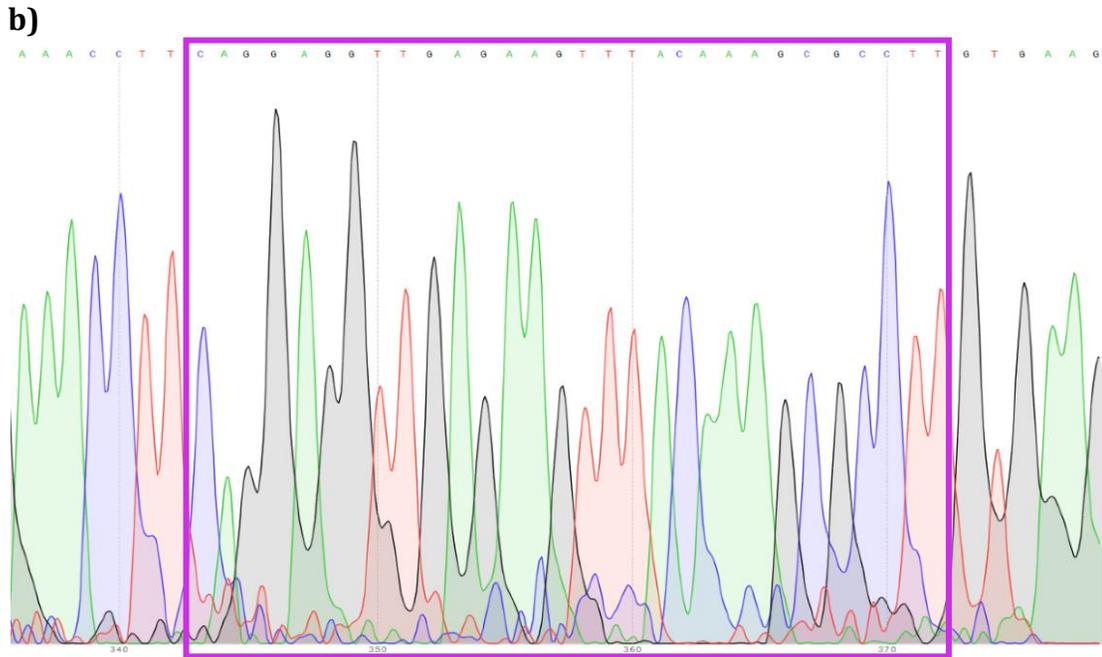


Figura 19. Electroferogramas de candidatas C1-GdFEN-1-HsBA y C3-GdFEN-1-HsBC. Se empleó en SnapGene para visualizar las secuencias, el recuadro morado indica las bases de los bloques.

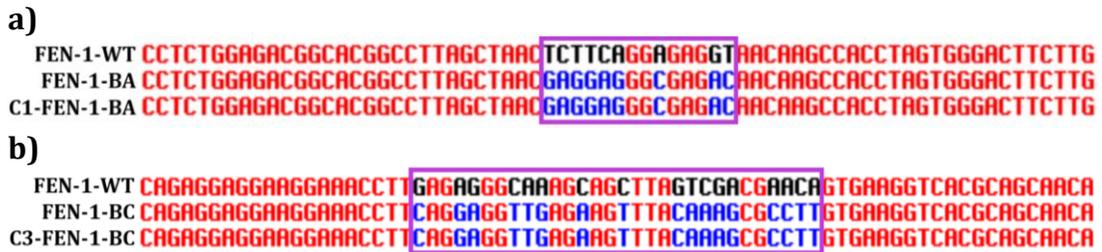


Figura 20. Alineamiento de las secuenciaciones de C1-GdFEN-1-HsBA y C3-GdFEN-1-HsBC. En el primer renglón se muestra la secuencia de la FEN-1-WT de *G. duodenalis*, en el segundo renglón la secuencia de FEN-1-WT de *G. duodenalis* con el cambio del **a)** bloque ácido o **b)** CAP de manera *in silico*, finalmente, en el tercer renglón la secuenciación de las colonias elegidas. El recuadro morado indica las bases pertenecientes al bloque ácido o CAP.

8.3 Expresar y purificar las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes

Las colonias C1-GdFEN-1-HsBA y C3-GdFEN-1-HsBC se sometieron a expresión por inducción de IPTG 1 mM por 3 h en un cultivo de 500 mL. A continuación, se purificó mediante el uso de cromatografía de afinidad con perlas de agarosa-níquel y se recolectaron 10 fracciones (figura 21). Los geles nativos de acrilamida teñidos con azul de Coomassie muestran que para las enzimas **a)** GdFEN-1-WT, **b)** GdFEN-1-HsBA y **c)** GdFEN-1-HsBC las primeras fracciones (F1-4) contiene la mayoría de la proteína purificada. Aun así, se decidió concentrar todas las

fracciones de cada enzima con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína pura para los ensayos posteriores.

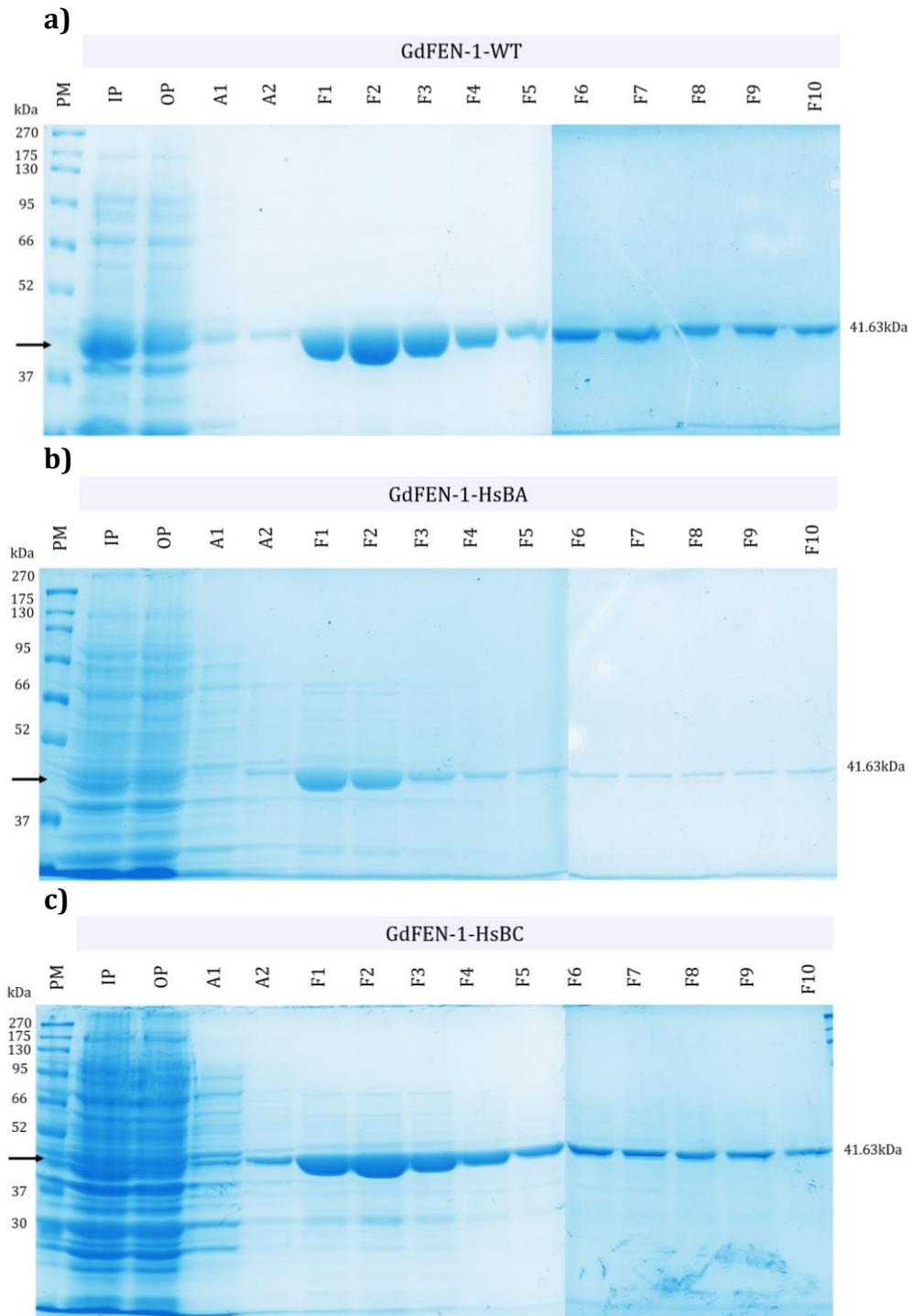


Figura 21. Purificación de la enzimas recombinantes **a)** GdFEN-1-WT **b)** GdFEN-1-HsBA y **c)** GdFEN-1-HsBC. Cada enzima se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 10 %. El marcador de peso molecular (PM) (BIO-HELIX, BLUltra Prestained Protein Ladder, broad range 6.5–270 kDa, PM001-0500) se muestra en carril

1, carril 2- extracto total obtenido de la inducción (IP), carril 3: fracción no unida del extracto total (OP), carril 4-lavado 1: fracción recuperada al lavar con buffer de imidazol 50 mM (A1), carril 5-lavado 2: fracción recuperada al lavar con buffer de imidazol 30 mM (A2), carril 6-15-fracciones de la purificación al agregar buffer de imidazol 300 mM a la columna (F1-10). La enzima es indicada con una flecha negra, su peso es de 41.630 kDa.

8.4 Determinar la capacidad de unión de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja)

Para determinar tanto la capacidad de unión como la actividad nucleasa de las enzimas GdFEN-1-WT, GdFEN-1-HsBA y GdFEN-1-HsBC frente al DNA flap y burbuja se requirió diseñar las sondas DNA-F y DNA-B. Una vez obtenidas las sondas se resolvieron en un gel nativo de acrilamida 7 % a fin de observar la pureza y correcta hibridación. La figura 22, muestra que las ondas obtenidas muestran una sola banda, lo cual indica la correcta preparación de esta.

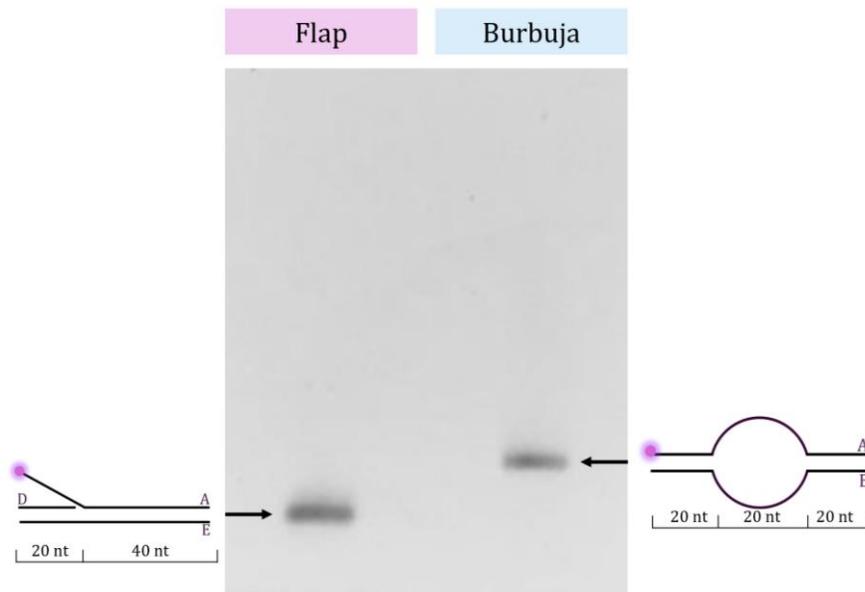


Figura 22. Hibridación de las sondas marcadas con fluoresceína.

Las sondas se resolvieron en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 7 %. En el carril 1 se muestra la sonda flap (60 pb) y en el carril 2 la sonda burbuja (60 pb).

Posterior a la obtención de las sondas, se probó la capacidad de unión de las enzimas GdFEN-1-WT, GdFEN-1-HsBA y GdFEN-1-HSBC ante dichos DNA por ensayos de cambio de movilidad electroforética. Al realizar estos ensayos se puede observar (Fig. 23) que, efectivamente, la **a)** GdFEN-1-WT, como las enzimas mutantes (**b)** GdFEN-1-HsBA y **c)** GdFEN-1-HsBC) son capaces de unirse al sustrato DNA-F.

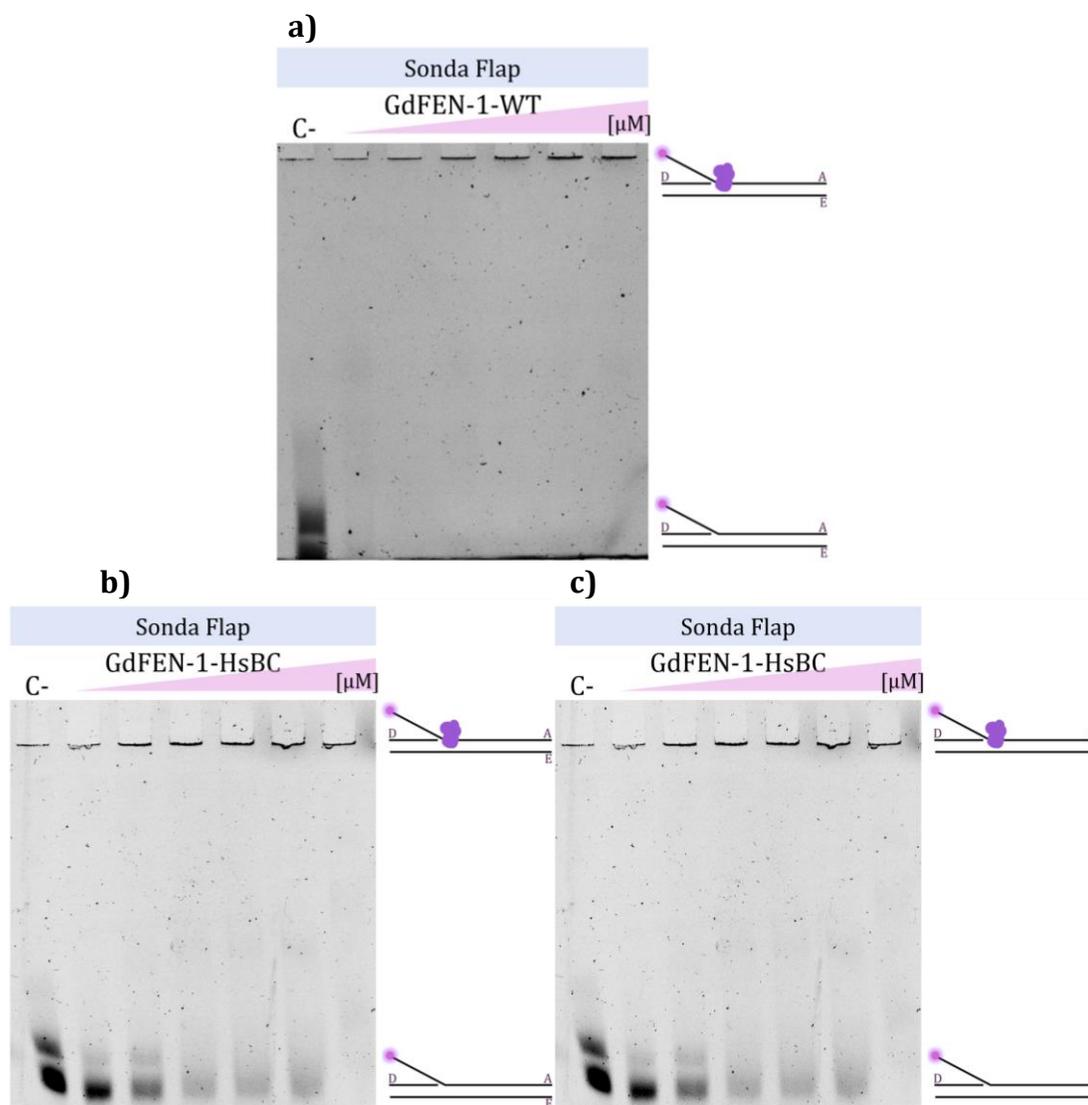


Figura 23. Capacidad de unión de **a)** GdFEN-1-WT, **b)** GdFEN-1-HsBA y **c)** GdFEN-1-HsBC a la sonda DNA-F. Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 4%. En carril 1 se muestra la sonda libre, carril 2-7-interacción Sonda DNA-B y proteína, aumentando la concentración (1 μM a 6 μM).

Mientras que para el sustrato DNA-B solo se muestra unión por parte de **d)** GdFEN-1-WT y **e)** GdFEN-1-HsBA, no existe complejo de sonda-enzima al usar **f)** GdFEN-1-HsBC (Fig. 24). Esto se concluyó ya que al aumentar la concentración de las enzimas se observa que la sonda libre (DNA-B) disminuyó frente a las enzimas GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA por lo que el complejo (DNA-B-enzima) pasa a ser la forma mayoritaria, contrario al efecto de FEN-1-BC, donde la sonda libre no se redujo.

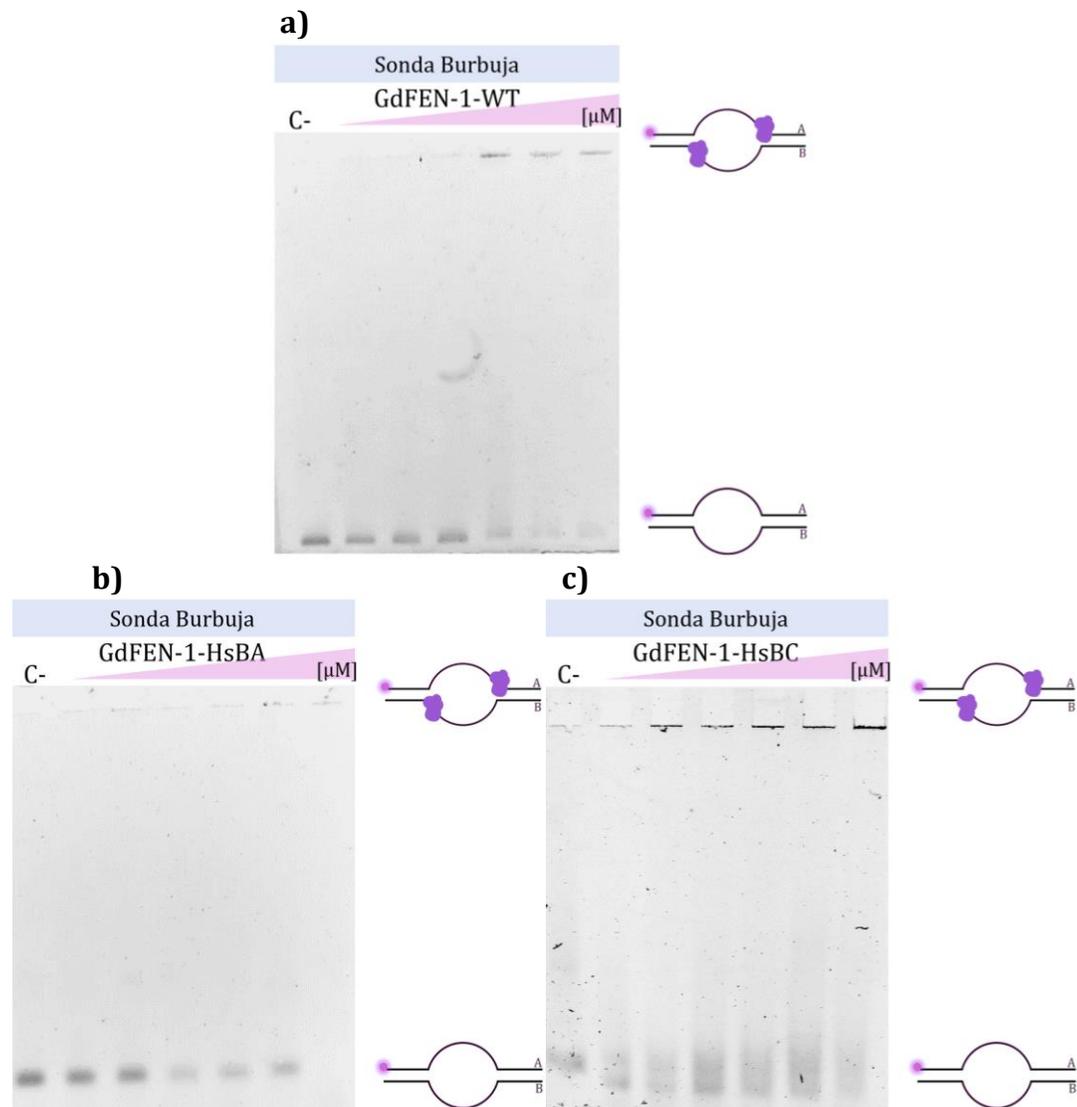


Figura 24. Capacidad de unión de **a)** GdFEN-1-WT, **b)** GdFEN-1-HsBA y **c)** GdFEN-1-HsBC a la sonda DNA-B. Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 4%. En carril 1 se muestra la sonda libre, carril 2-7-interacción Sonda DNA-B y proteína, aumentando la concentración (1 μM a 6 μM).

Posteriormente a los ensayos de unión, se decidió medir la actividad nucleasa únicamente de GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA, debido a que la enzima GdFEN-1-HsBC no presenta unión al DNA burbuja. Se seguirá explorando otras condiciones con la enzima GdFEN-1-HsBC hasta obtener resultados coherentes con lo encontrado en la literatura.

8.5 Determinar la actividad nucleasa de las proteínas GdFEN-1 silvestre y mutantes en diferentes sustratos de DNA (flap y burbuja)

En la figura 25 se observa que la enzima GdFEN-1-HsBA presentó una actividad nucleasa similar a la de la enzima silvestre (GdFEN-1-WT). Al ser escindido el DNA flap pasó de ser una sonda de 60 pares de nucleótidos a un DNA de cadena sencilla de 20 nucleótidos marcada con fluoresceína en el extremo 5'. Mientras que la sonda burbuja de 60 pares de bases se procesó en una sonda de 20 pares de bases unida a 20 nucleótidos de doble cadena marcada en el extremo 5' con fluoresceína, en total la molécula es de 40 pb.

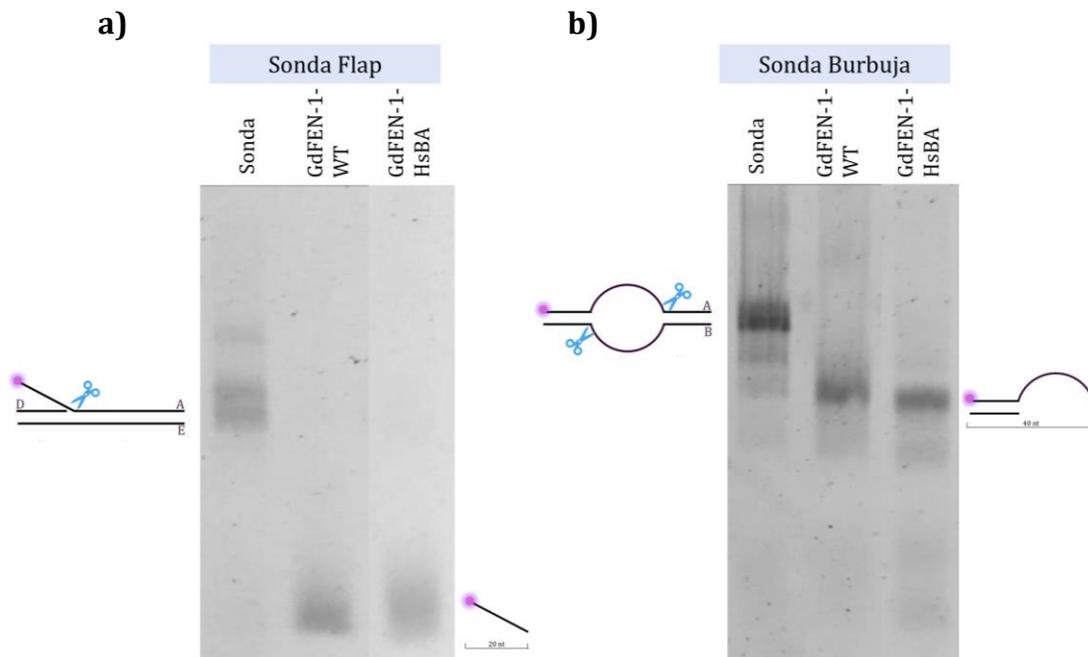


Figura 25. Actividad nucleasa de GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA frente a sonda **a)** DNA-F y **b)** DNA-B. Cada ensayo se resolvió en un gel nativo de acrilamida (29:1) al 7%. En carril 1 se muestra la sonda libre, carril 2-sonda escindida con GdFEN-1-WT y carril 3-sonda escindida con GdFEN-1-BA.

9. Discusión

Giardia duodenalis es un parásito que genera una infección conocida como giardiasis, la cual es extremadamente común en el mundo. Se transmite por vía fecal-oral, ya sea por la ingesta de agua o alimentos contaminados o el contacto directo entre personas o animales contagiados. La infección comienza al ingerir el quiste (forma infecciosa), una vez que ha llegado al tracto superior intestinal se da

la desenquistamiento para convertirse en trofozoíto (forma replicativa). Esta última forma se adhiere a las células epiteliales intestinales del intestino delgado superior donde se replica (Rojas López, Marques, & Svärd, 2022). Puesto que *G. duodenalis* cambia su ploidía continuamente es normal que existan daños en su genoma. En todas las células la estabilidad genómica es de vital importancia y por ende las vías de reparación del DNA ya que son cruciales para la sobrevivencia y sin estas vías las células podrían sufrir importantes daños irreparables provocando la muerte celular.

Con el paso del tiempo estas vías han sido investigadas en organismos modelo, así como en el ser humano, aclarando las funciones de las enzimas que participan en cada una de las vías. La recombinación homologa ha sido ampliamente caracterizada en *G. duodenalis*, sin embargo, no se han abordado otras vías. Por lo que en este trabajo decidimos explorar la vía de reparación por escisión de base BER.

Anteriormente se había comprobado que FEN-1 de *H. sapiens* contiene dominios conservados (dominio N-terminal, la interacción con PCNA y el dominio Intermedia), así como dos bloques (bloque ácido y bloque CAP) que pueden interferir en su actividad nucleasa (Tsutakawa, y otros, 2011; Izaguirre Hernández, 2020; Tsutakawa, y otros, 2020).

Al realizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de FEN-1 de humano y FEN-1 de *G. duodenalis*, como también la búsqueda de los dominios, se encontraron que efectivamente mantiene las regiones conservadas ya mencionadas, así como la localización de ambos bloques (figura 14), sin embargo, los bloques ácido y de CAP no están conservados. En la literatura explican que FEN-1 de forma *in vitro*, es capaz de unirse y escindir DNA Flap, doble Flap y otras estructuras como en donde el 5' se pliega hacia atrás para formar una horquilla (Finger & Shen, 2010; Grasby, Finger, Tsutakawa, Atack, & Tainer, 2012; Dehé & Gaillard, 2017).

Una vez obtenidas las enzimas purificadas, se llevaron a cabo los ensayos de cambio de movilidad electroforética con las sondas de burbuja y flap donde se mostró que, evidentemente, las tres enzimas (GdFEN-1-WT, GdFEN-1-HsBA y GdFEN-1-HsBC) mantiene la capacidad de unión al DNA-F. Estos resultados son coherentes con lo reportado en la literatura, ya que las enzimas FEN-1 de todos los organismos eucariotes son capaces de procesar DNA flap, incluyendo HsFEN-1 (Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007; Tsutakawa, y otros, 2011). Debido a esto al haberse intercambiado los bloques ácido o CAP no tendría por qué verse afectada la unión. Recordando que el sitio activo en HsFEN-1 está compuesto por los residuos Asp23, Asp34, Asp86, Glu158, Glu160, Asp179 y Asp181, el bloque ácido por Glu26, Glu57, Gly58, Glu59 y Thr60 y el bloque CAP por Gln121, Glu122, Val123, Glu124, Lys125, Phe126, Thr127, Lys128, Arg129 y Leu130, en principio no debería existir un efecto inhibitorio, ya que no se cambiaron los residuos del sitio activo al intercambiar los bloques.

Respecto a la unión al DNA burbuja solo se presentó en las enzimas GdFEN-1-WT y GdFEN-1-HsBA, siendo un resultado interesante puesto que en el estudio del 2007 de Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic y Jaquier Gubler, se describió que la enzima FEN-1 de humano es capaz de unirse a sustratos de DNA flap, doble flap e incluso DNA burbuja. Ellos explican que la falta de corte de FEN-1 para escindir el sustrato de burbuja no fueron ocasionadas por una reducción en la unión del sustrato de DNA ya que los ensayos de cambio de movilidad electroforética no revelaron diferencias significativas entre las enzimas empleadas.

La interacción disminuida en GdFEN-1-HsBC con la sonda burbuja en las condiciones que se realizó el EMSA es consistente con los resultados de Tsutakawa y cols (2011). Ellos describieron que de los residuos del bloque CAP, Lys125, Lys128 y Arg129, son importantes para la unión con el DNA por lo que se creía que al haberse intercambiado en el lugar de Gln125 y Arg128, pertenecientes al bloque de *G. duodenalis* podría afectar su unión al DNA.

Debido a la que la literatura muestra resultados contrarios (Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, 2007; Tsutakawa, y otros, 2011; Izaguirre Hernández, 2020) a los obtenidos con la mutante GdFEN-1-HsBC es necesario realizar cambios en las condiciones de los ensayos de capacidad de unión al DNA-B para comprobar si el cambio del bloque CAP interfiere o no en la unión a dicho sustrato de DNA. Para esto se planea probar otros buffers usados por Hohl, Dunand Sauthier, Staresincic, & Jaquier Gubler, (2007) y Tsutakawa, y otros, (2011).

En el artículo de Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity se ilustra que la FEN-1 de humano, aun cuando se une a los sustratos DNA-F y DNA-B, solo es capaz de escindir DNA-F. Contrario a la FEN-1 de *G. duodenalis* la cual si puede procesar ambos tipos de DNA (Izaguirre Hernández, 2020). Se probó que efectivamente GdFEN-1-WT puede escindir ambos sustratos. Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 25, son coherentes con la literatura, ya que, en efecto, es capaz de escindir ambos sustratos.

A partir de los experimentos de actividad nucleasa se demostró que la enzima mutada en el bloque ácido no interfiere con la actividad nucleasa ya que presentó un comportamiento similar a la proteína silvestre GdFEN-1. A pesar de que Tsutakawa, *et al.* (2011) predijeron que el bloque ácido actuaría como impedimento a la actividad nucleasa ante estructuras de DNA burbuja puesto que no permitiría el paso más allá de la burbuja, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el bloque ácido no es el responsable de que FEN-1 no procese sonda burbuja. A partir de esto podemos decir que la estructura y secuencia de aa del bloque ácido no está jugando un papel primordial tanto en la unión del DNA, así como en el impedimento entre la interacción DNA-B-sitio catalítico para la actividad nucleasa.

10. Conclusiones

- El bloque ácido no es relevante para la unión del DNA flap o burbuja.
- El bloque CAP es importante para la capacidad unión al DNA burbuja, pero no para la unión en el DNA flap en las condiciones probadas.
- El bloque ácido no es importante para la actividad nucleasa frente a sustratos de DNA como flap y burbuja.

11. Perspectivas

- Analizar la capacidad de unión al DNA-B y la actividad nucleasa de la proteína GdFEN-1-HsBC en diferentes condiciones.
- Analizar la función de la enzima GdFEN-1 en trofozoíto y quiste.
- Silenciar GdFEN-1 y ver cómo afecta al trofozoíto.

12. Referencias

- Adam, R. D. (2000). The Giardia lamblia genome. *International Journal for Parasitology*, 475-484.
- Adam, R. D. (1 de Julio de 2001). Biology of Giardia lamblia. *Clinical Microbiology Reviews*, 447-475. doi:10.1128/cmr.14.3.447-475.2001
- Adam, R. D. (11 de Agosto de 2021). Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). doi:10.1128/CMR.00024-19
- Ankarklev, J., Jerlström Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troel, K., & G. Svard, S. (19 de Abril de 2010). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Natural Review Microbiology*, 8, 413-422. doi:10.1038/nrmicro2317.
- Asagoshi, K., Tano, K., Chastain, P., Adachi, N., Sonoda, E., Kikuchi, K., . . . Nakamura, J. (Febrero de 2010). FEN1 Functions in Long Patch Base Excision Repair Under Conditions of Oxidative Stress in Vertebrate Cells. *Mol Cancer Res*, 8(2), 204-215. doi:10.1158/1541-7786
- Balakrishnan, L., & Bambara, R. A. (28 de Febrero de 2013). Flap Endonuclease 1. *Annu Rev Biochem*, 82, 119-138.

- Benchimol, M., Gadelha, A., & de Souza, W. (2022). Cell Biology of the Life Cycle of *Giardia intestinalis*. En *Lifecycles of Pathogenic Protists in Humans* (Vol. 35, págs. 465-539). Springer. doi:10.1007/978-3-030-80682-8_11
- Berghammer, H., & Auer, B. (1993). “Easypreps”: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones en *E. coli*. *Biotechniques*, 14(4), 524–528.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., & Garewal, H. (1 de Junio de 2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 511(2), 145-178. doi:10.1016/S1383-5742(02)00009-1
- Chapados, B. R., Hosfield, D. J., Han, S., Qiu, J., Yelent, B., Shen, B., & Tainer, J. A. (8 de Enero de 2004). Structural Basis for FEN-1 Substrate Specificity and PCNA-Mediated Activation in DNA Replication and Repair. *Cell Press*, 116(1), 39-50. doi:10.1016/S0092-8674(03)01036-5
- Dehé, P., & Gaillard, P. (22 de Marzo de 2017). Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 315–330. doi:10.1038/nrm.2016.177
- Devlin, T. M. (2015). *textbook of biochemistry with clinical correlations*. John Wiley & Sons.
- Dexheimer, T. (2007). Chapter 2 DNA Repair Pathways and Mechanisms.
- Dixon, B. R. (Marzo de 2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, 135, 283-289. doi:10.1016/j.rvsc.2020.09.034
- Finger, L. D., & Shen, B. (Enero de 2010). FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 14(10), 955-961. doi:10.4267/2042/44869

- Fleck, O., & Nielsen, O. (14 de Febrero de 2004). DNA repair. *CELL SCIENCE AT A GLANCE*, 117(4), 515-517. doi:10.1242/jcs.00952
- García Lepe, U. O. (2022). "Participación de la reparación del ADN mediante recombinación homóloga durante la regeneración de extremidades en *Ambystoma mexicanum*". Tesis de doctorado, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Genética y biología molecular, Ciudad de Mexico.
- Grasby, J. A., Finger, L. D., Tsutakawa, S. E., Atack, J. M., & Tainer, J. A. (Febrero de 2012). Unpairing and gating: sequence-independent substrate recognition by FEN superfamily nucleases. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(4), 74-84. doi:10.1016/j.tibs.2011.10.003
- Hasan, A., Rizvi, S. F., Parveen, S., & Mir, S. S. (1 de Octubre de 2022). Molecular chaperones in DNA repair mechanisms: Role in genomic instability and proteostasis in cancer. *Life Sciences*, 306. doi:10.1016/j.lfs.2022.120852
- Hernández López, L. A. (2023). *Evaluación de la participación de sirtuinas de Giardia duodenalis en la reparación del ADN*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Genética y biología molecular , Ciudad de Mexico.
- Hohl, M., Dunand Sauthier, I., Staresincic, L., & Jaquier Gubler, P. (Febrero de 2007). Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity. *Nucleic Acids Research* , 35(9), 3053-3063. doi:10.1093/nar/gkm092
- Hohl, M., Thorel, F., Clarkson, S. G., & Schärer, O. D. (Mayo de 2003). Structural Determinants for Substrate Binding and Catalysis by the Structure-specific Endonuclease XPG. *DNA: REPLICATION REPAIR AND RECOMBINATION*, 278(21), 19500-19508. doi:10.1074/jbc.M213155200

- Hosfield, D. J., Mol, C. D., Shen, B., & Tainer, J. A. (2 de Octubre de 1998). Structure of the DNA Repair and Replication Endonuclease and Exonuclease FEN-1. *Cell Press*, *95*(1), 135-146. doi:10.1016/S0092-8674(00)81789-4
- Huggins, C. F., Chafin, D. R., Aoyagi, S., Henricksen, L. A., Bambara, R. A., & Hayes, J. J. (2002). Flap Endonuclease 1 Efficiently Cleaves Base Excision Repair and DNA Replication Intermediates Assembled into Nucleosomes. *Molecular Cell*, *10*(5), 1201-1211. doi:10.1016/S1097-2765(02)00736-0
- Iyama, T., & Wilson, D. I. (Agosto de 2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, *12*(8), 620-636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Izaguirre Hernández, M. T. (2020). *Identificación y caracterización bioquímica in vitro de la nucleasa putativa GdXPG/Rad2 de Giardia duodenalis*. Tesis de MAestria, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Genética y biología molecular, Ciudad de Mexico.
- Leyns, L., & Gonzalez, L. (20 de Abril de 2012). Genomic Integrity of Mouse Embryonic Stem Cells. doi:10.5772/37327
- Moon, J., Kitty, I., Renata, K., Qin, S., Zhao, F., & Kim, W. (1 de Mayo de 2023). DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5). doi:10.3390/ijms24054741
- Nemec, A. A., Wallace, S. S., & B., S. J. (16 de Octubre de 2010). Variant Base Excision Repair Proteins: Contributors to Genomic Instability. *Semin Cancer Biol*, *20*(5), 320-328. doi:10.1016/j.semcancer.2010.10.010
- Niederhuber, J., Armitage, J., Doroshow, J., Kastan, M., & Joel, T. (2020). *Abeloff's clinical oncology* (6 ed.). Elsevier.
- Rojas López, L., Marques, R. C., & Svärd, S. G. (21 de Enero de 2022). *Giardia duodenalis*. *Trends in Parasitology | Parasite of the Month*, *38*(7). doi:10.1016/j.pt.2022.01.001

- Ronner, P. (2017). *Netter Essential Biochemistry* (496 ed.). Elsevier.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (3^o ed.).
- Shadfar, S., Parakh, S., Jamali, M. S., & Atkin, J. D. (14 de Abril de 2023). edox dysregulation as a driver for DNA damage and its relationship to neurodegenerative diseases. *Translational Neurodegeneration*, 12(8).
- Sharma, R., Lewis, S., & Wlodarski, M. W. (23 de Octubre de 2020). DNA Repair Syndromes and Cancer: Insights Into Genetics and Phenotype Patterns. *Frontiers in pediatrics*, 8. doi:10.3389/fped.2020.570084
- Svärd, S. G., Hagblom, P., & Palm, J. D. (Enero de 2003). Giardia lamblia - a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), 3-7. doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11490.x
- Tafurt, Y., & Marin, M. (Julio-Diciembre de 2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95-110.
- Tsutakawa, S., Sarker, A., Clifford, N., Arvai, a., Shin, D., Shih, B., . . . Tainer, J. (10 de Junio de 2020). Human XPG nuclease structure, assembly, and activities with insights for neurodegeneration and cancer from pathogenic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(25), 14127-14138. doi:10.1073/pnas.1921311117
- Tsutakawa, S., Thompson, M., A. ,, Neil, A., Shaw, S., Algasaier, S., . . . Tainer, J. (27 de Junio de 2017). Phosphate steering by Flap Endonuclease 1 promotes 5'-flap specificity and incision to prevent genome instability. *Nat Commun*. doi:10.1038/ncomms16145
- Tsutakawa, S.E, Classen, S., Chapados, B., Arvai, A., Finger, L., . . . Tainer, J. (15 de Abril de 2011). Human Flap Endonuclease Structures, DNA Double-Base Flipping, and a Unified Understanding of the FEN1 Superfamily. *Cell*, 145(2), 198-211. doi:10.1016/j.cell.2011.03.004

Wang, X., Yu, J., & Wang, J. (22 de Enero de 2023). Neural Tube Defects and Folate Deficiency: Is DNA Repair Defective? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). doi:10.3390/ijms24032220

Yu, L. Z., Jr., B., William, A., & Adam, R. D. (1 de Abril de 2002). The Two Nuclei of Giardia Each Have Complete Copies of the Genome and Are Partitioned Equationally at Cytokinesis. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 191-199. doi:10.1128/ec.1.2.191-199.2002

13. Software

- Giardiadb: Base de datos de Giardia, Disponible en: <https://giardiadb.org/giardiadb/>
- NEBaseChanger: NEB - Diseño de primers para mutagénesis dirigida, Disponible en: <https://nebasechanger.neb.com/>
- MultiALin: Alineamiento de secuencias Disponible en: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- Espript3: alineamiento de secuencia de aminoácidos con estructura terciaria, Disponible en: <https://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>
- ExPASy: Disponible en: <https://www.expasy.org/>
- AlphaFold2: predicción de estructura terciaria, Disponible en: <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=kOblAo-xetgx>
- Chimera 1.16: Visualización de estructura terciaria, Disponible para descarga: <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>
- SnapGene, Disponible para descargar con costo en: <https://www.snapgene.com>