UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis de Elementos de la Maquinaria de Deubiquitinación en Trofozoitos de *Giardia intestinalis*

Luisa Fernanda Prada Gómez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2012

Análisis de Elementos de la Maquinaria de Deubiquitinación en Trofozoitos de *Giardia intestinalis*

Luisa Fernanda Prada Gómez
Código: 188128

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Bioquímica

Director:
Moisés Wasserman PhD
Grupo de Investigación:
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica – LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia
2012

RESUMEN

En *Giardia intestinalis* se han identificado diferentes componentes de la ruta de ubiquitinación. Mediante la utilización de herramientas bioinformáticas y algunos ensayos experimentales se han identificado secuencias candidatas a enzimas deubiquitinadoras (DUBs) en el parástio, se cree que estas enzimas son importantes para la regulación de conjugados ubiquitina-proteína *in vivo*. En este trabajo seleccionamos dos DUBs, UBP6 y RPN11, para ser sobre-expresadas y silenciadas en trofozoitos de la cepa G1 mediante la utilización de un vector específico para *Giardia* (pTubHApac). Confirmamos la sobre-expresión de las enzimas mediante la inmunodetección del tag de hemaglutinina (HA) y el silenciamiento mediante ensayos de RT-PCR y qRT-PCR. A partir de los parásitos donde se estaban sobre-expresando las proteínas se pudo determinar por ensayos de inmunofluorescencia la localización de las mismas, se encontró que ambas proteínas se ubican en el citoplasma pero Rpn11 se distribuye en aparentes agregados citoplasmáticos. Los ensayos de RT-PCR mostraron que los parásitos silvestres poseen transcritos anti-sentido que creemos pueden ser importantes para la regulación de las enzimas en el parásito. En los parásitos silenciados para Ubp6 se observó un silenciamiento de alrededor del 24% con respecto a los parásitos silvestres, mientras que en los parásitos silenciados para Rpn11 el silenciamiento fue del 61%. A partir de todas las transfecciones se obtuvieron trofozoitos viables que no mostraron diferencias significativas en el crecimiento con respeto a los parásitos silvestres a lo largo del tiempo, aunque si presentaron cambios morfológicos. De este trabajo pudimos concluir que ambos genes se están transcribiendo durante el estadio vegetativo del parásito, por lo cual se puede pensar que son importantes para la homeostasis de ubiquitina en el parásito. Para Rpn11 los ensayos de sobre-expresión y silenciamiento son las primeras pruebas de la existencia de metaloenzimas de la familia JAMM en *G. intestinalis.*

Palabras Clave: *Giardia intestinalis,* Trofozoitos, enzimas deubiquitinadoras, sobre-expresión, silenciamiento.

ABSTRACT

Several key components of the ubiquitination pathways are known for *Giardia intestinalis*. Using bioinformatic tools and experimental procedures have been already identified some candidates sequences coding for deubiquitinating enzymes (DUBs) in this parasite; it is though DUBs are relevant for the actual regulation of conjugates ubiquitine-protein during life cycle *in vivo*. In the present study we selected two DUBs named Ubp6 y Rpn11 for overexpressing and silencing at trophozoites of the G1 strain through the transfection of the vector pTubHApac specific for *Giardia*. Overexpressed enzymes were confirmed by inmuno-detection of the hemaglutinine tag (HA) while silencing were tested under RT-PCR and qRT-PCR assays. In those parasites showing overexpression it was determined by means of inmuno-luminescence assays that both DUBs enzymes were located in the cytoplasm, although Rpn11 was revealed apparently forming aggregates. The RT-PCR assays in the non-transfected wild parasites showed ARN-antisense transcripts which we deem could have enzymatic regulatory importance. Ubp6 silencing was around 24% compared to expression in wild parasites while Rpn11 silencing reached 61%. All in all, transfections did not affect the viability or growth of trophozoites throughout time compared with wild ones, although some morphological changes were observed. We tested both genes being transcripted along the vegetative life stage of the parasite which make us conclude these are important to keep ubiquitine homeostasis. Rpn11 overexpession-silencing assays are also one of the first experimental proofs of the existence of JAMM type metollo-enzymes existence in *G. intestinalis*.

Palabras Clave: *Giardia intestinalis,* Trophozoites, deubiquitinating enzymes, overexpression, silencing.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN……1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE……3
2.1 *Giardia intestinalis*……3
2.1.1 Ciclo de vida……4
2.2 Ubiquitinación……6
2.3 Enzimas Deubiquitinadoras (DUBs)……7
2.4 ¿Qué se sabe de las enzimas deubiquitinadoras en *Giardia intestinalis*?……8
3. JUSTIFICACIÓN……10
4. OBJETIVOS……11
5. MATERIALES Y MÉTODOS……12
5.1 Selección de DUBs……12
5.2 Diseño de oligonucleótidos para la sobre-expresión y el silenciamiento……12
5.2.1 Extracción de ADN……13
5.2.2 Amplificación de fragmentos de interés……14
5.2.3 Purificación de los productos de PCR……15
5.2.4 Visualización de los productos de PCR……15
5.3 Clonación en el vector pGem-T……16
5.3.1 Ligación……16
5.3.2 Preparación células competentes……16
5.3.3 Transformación ……17
5.3.4 Selección de bacterias recombinantes……17
5.3.5 Extracción de ADN plasmídico……17
5.4 Clonación en el vector pTubHApac……19
5.4.1 Digestión de los vectores y secuencias de interés……19
5.4.2 Ligaciones……19
5.4.3 Transformación……19
5.4.4 Selección de bacterias recombinantes……20
5.5 Transfección de trofozoitos de *Giardia intestinalis*……20
5.5.1 Cultivo de *Giardia intestinalis*……20
5.5.2 Transfección por electroporación……20
5.6 Confirmación de la sobre-expresión de las proteínas de interés……21
5.6.1 Recolección de parásitos……21
5.6.2 SDS PAGE y Western Blot……21
5.6.3 Inmunofluorescencia……22
5.7 Confirmación del silenciamiento de las proteínas de interés……23
5.7.1 Extracción de ARN……23
5.7.2 Ensayos RT-PCR……25
5.7.3 Ensayos qRT-PCR……25
5.7.3.1 Diseño de oligonucleótidos y estandarización de las condiciones de amplificación……25
5.7.3.2 Transcripción reversa……26
5.7.3.3 Curvas de calibración……26
5.7.3.4 qRT-PCR sobre cADN……28
5.8 Ensayos crecimiento……28
5.8.1 Conteos……28
5.8.2 Visualización de cambios morfológicos……29

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……30
6.1 Selección de enzimas deubiquitinadoras……30
6.2 Estandarización de las condiciones de PCR para los fragmentos de interés……32
6.3 Clonación de las enzimas en el vector pTubHApac……34
6.3.1 Clonación de secuencias a sobre-expresar en el vector pGem-T……34
6.3.2 Clonación de los fragmentos a sobre-expresar en el vector pTubHApac……35
6.3.3 Clonación de los fragmentos para el silenciamiento en el vector pTubHApac……36
6.4 Transfección de parásitos……36
6.5 Confirmación de la sobre-expresión de las enzimas de interés……38
6.5.1 SDS PAGE y Western Blot……38
6.5.2 Inmunofluorescencia……39
6.6 Confirmación del silenciamiento de las enzimas de interés……43
6.6.1 Extracción de ARN……43
6.6.2 RT-PCR……43
6.6.3 qRT-PCR……45
6.6.3.1 Curvas de calibración……45
6.6.3.2 PCR en tiempo Real sobre cADN……47
6.7 Cambios morfológicos y de crecimiento en los parásitos transfectados……50
6.7.1 Ensayo de crecimiento……50
6.7.2 Visualización de cambios morfológicos……52
7. CONCLUSIONES……54
8. ANEXOS……55
9. BIBLIOGRAFÍA……58

1. INTRODUCCIÓN

Giardia intestinalis es un parásito de gran importancia no sólo porque es el causante de una enfermedad muy frecuente, la giardiosis, sino también porque es un organismo tempranamente divergente (Sogin ML, *et al.* 1989). Además presenta importantes características como: la presencia de una maquinaria simplificada para la replicación y la transcripción del ADN, el procesamiento del ARN y muchas de las rutas metabólicas (Morrison HG, *et al.* 2007). Estas características hacen de este organismo un excelente modelo para el estudio de diferentes procesos celulares en eucariotas ya que muchos de los hallazgos que se hagan en este modelo biológico permitirían hacer inferencias acerca del comportamiento que podrían tener los mismos fenómenos en eucariotas más complejos.

En nuestro grupo de investigación se han estudiado diferentes procesos relacionados con el proceso de diferenciación de *G. intestinalis* (Niño C & Wasserman M, 2003; Melo SP, *et al.* 2008; Alvarado ME & Wasserman M, 2010). Los resultados del grupo han sugerido la participación de un sistema de recambio de proteínas durante el ciclo de vida del parásito, esto ha motivado investigaciones acerca del sistema de degradación específico de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma, un mecanismo presente en células eucariotas y del cual el grupo ya identificó sus diferentes componentes en *G.intestinalis* (Niño CA*, et al.* 2012; Gallego, *et al.* 2007). Que un organismo tempranamente divergente como *G. intestinalis* posea este tipo de modificación post-traduccional ha llevado a sugerir que la ubiquitinación es un evento que emergió muy temprano en el linaje eucariota (Gallego E, *et al.* 2007).

Aunque la ubiquitinación es quizás la modificación post-traduccional que ha sido más estudiada, algunos elementos relacionados con su regulación como las enzimas deubiquitinadoras (DUBs) son poco conocidas. Estas enzimas son proteasas específicas que hidrolizan la ubiquitina de proproteínas o conjugados de ubiquitina con la proteína blanco (Reyes-Turcu FE, *et al.* 2009), son muy importantes porque son las encargadas de generar ubiquitina madura (Ozkaynak E, *et al.* 1987), antagonizar las funciones de la ubiquitinación (Verma R, *et al*. 2002) y mantener unos niveles estables de ubiquitina libre en la célula (Amerik AYu, *et al.* 1997).

Por la importancia de estas enzimas es necesario realizar estudios que permitan identificar en que procesos celulares y de diferenciación se encuentran involucradas; para esto *G. intestinalis* es un excelente modelo. En este trabajo se propuso hacer un análisis de la expresión y funcionalidad de

las enzimas deubiquitinadoras en trofozoitos de *G. intestinalis* a partir de la sobre-expresión y el silenciamiento de dos secuencias candidatas; con esto se buscaba establecer si se estaba dando la transcripción de estos genes, cuáles son los efectos del silenciamiento de los mismos y determinar la posible localización de las enzimas en el estadio vegetativo del parásito.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis es un parásito protozoario intestinal que desde su descubrimiento en 1681 por Antony van Leeuwenhock (Adam RD, 2001), ha sido estudiado debido a que es el causante de una enfermedad intestinal, la giardiosis, y es considerado un eucariota tempranamente divergente. La giardiosis se caracteriza por ser una enfermedad común en niños menores de 10 años y de alta prevalencia en lugares con problemas sanitarios. Cuando el parásito invade el intestino del hospedero puede causar problemas de pérdida de peso, malnutrición, retardo en el crecimiento, diarrea, nausea, anorexia, fiebre y fatiga, aunque en algunos casos se pueden presentar cuadros asintomáticos (Thompson RC, *et al*. 1993; Faubert GM, 1996). De los diferentes ensambles o genotipos (A-H) identificados para el género *Giardia*, los humanos son infectados por el ensamble A y B (Upcroft JA, *et al.* 2010; Jerlström-Hultqvist J, *et al.* 2010).

Mediante comparaciones del rRNA 16S de *G. intestinalis* con los de otros organismos se pudo establecer que *G. intestinalis* representa el linaje más tempranamente divergente en la línea de descendencia eucariota, además se encontró que el rRNA del parásito conserva características procariotas (Sogin ML, *et al*. 1989). Otras de las características que hacen de este parásito un buen modelo para el estudio de diferentes procesos celulares en eucariotas son: la presencia de una maquinaria simplificada para la replicación y la transcripción del ADN, el procesamiento del ARN y muchas de las rutas metabólicas (Morrison HG, *et al.* 2007). También se destaca la presencia de mitocondrias altamente reducidas (mitosomas) y estructuras similares a un Golgi que sólo son observables durante el proceso de enquistación (Luján HD, *et al.* 1995; Dolezal P, *et al.* 2005).

Este parásito se caracteriza por tener un ciclo de vida en el que se observan dos formas que se diferencian tanto en morfología como en la bioquímica: el quiste (la infectiva) y el trofozoito (la vegetativa). El quiste (Figura 1A) es de gran importancia ya que le permite al parásito sobrevivir en agua fresca, ser relativamente resistente a desinfectantes y resistir al paso a través del estómago de un nuevo hospedero. Tiene forma ovoide con un diámetro aproximado de 7-10 µm. Posee cuatro núcleos (16N) y se encuentra cubierto por una pared exterior de 0,3-0,5 µm de grosor la cual está compuesta de una capa filamentosa externa, formada por tres proteínas (CWP 1-3) y N-Acetilgalactosamina (GalNAc), y una capa membranosa interna con dos membranas (Adam RD, 2001; Bernarder R, *et al.* 2001).

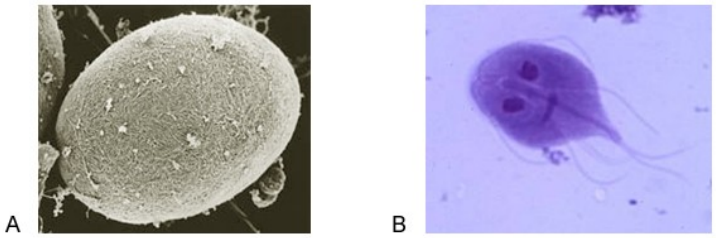


Figura 1. Morfología de *Giardia.* A) Fotografía de un quiste de *Giardia* tomada por microscopía electrónica de barrido. Fuente: http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/imagenes.cfm?FOTO=41. **B)** Fotografía de un trofozoito de *Giardia* en microscopía de luz. Fuente: http://www.gefor.4t.com/parasitologia/giardialamblia.html.

El trofozoito (Figura 1B) es la forma móvil del parásito y la que produce los síntomas de la giardiosis. Tiene forma de pera y mide aproximadamente 12-15 µm de largo y 5-9 µm de ancho. Presenta un cuerpo medio, dos núcleos (4N), cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) y un disco ventral que es de gran importancia en el desarrollo de invasión al hospedero y en la viabilidad de los parásitos (Gillin FD, *et al.* 1996; Adam RD, 2001). En la membrana de los trofozoitos se expresan proteínas variantes de superficie (VSP), las cuales han sido ampliamente estudiadas ya que son los principales antígenos que reconoce el hospedero y presentan un mecanismo de recambio que solo permite la expresión de una de estas proteínas en la membrana celular (Prucca CG & Luján HD, 2009). A diferencia del quiste los trofozoitos necesitan condiciones anaeróbicas para sobrevivir y multiplicarse, además de condiciones específicas de temperatura, pH y salinidad (Adam RD, 2001).

2.1.1 Ciclo de Vida

El quiste es la forma mediante la cual se transmite la enfermedad ya sea a través de agua o alimentos contaminados. Después de que el hospedero ingiere los quistes (Figura 2) se inicia el proceso de exquistación, este consta de dos etapas: la primera en la que el quiste es puesto en contacto con el pH ácido del estómago y la segunda donde se encuentra con un ambiente rico en proteasas y ligeramente alcalino en la parte alta del intestino delgado. Durante la primera etapa el quiste detecta los estímulos a través de la pared, lo cual lleva a una respuesta altamente coordinada en la que se dan cambios en los niveles de mARN, hay ligeros cambios del pH intracelular y se da la aparición de pliegues de membrana que podrían ser importantes para determinar la polaridad de los trofozoitos (Hetsko ML, *et al.* 1998). Durante esta etapa también se ha encontrado que las vesículas periféricas almacenan una fosfatasa (AcPh), similar a las

encontradas en mamíferos, la cual es liberada al espacio periplásmico y es importante para que se dé la exquistación (Touz MC, *et al.* 2002). En la segunda etapa de la exquistación de igual forma hay variaciones en los niveles de mARN, se da el rompimiento de la pared por la acción de proteasas tipo cisteína (Ward W, *et al.* 1997; Hetsko ML, *et al.* 1998). El proceso de exquistación se completa cuando del quiste emerge el exquizoito, una célula oval, con cuatro núcleos (16N) y un metabolismo intermedio entre un trofozoito y un quiste; el exquizoito rápidamente se divide por citoquinesis, dos veces sin la replicación del DNA, en dos trofozoitos activos los cuales se dividen nuevamente por fisión binaria para generar un total de cuatro trofozoitos que colonizan el duodeno a partir de un quiste (Adam RD, 2001; Bernard R, *et al.* 2001).

Cuando los trofozoitos alcanzan la parte media del intestino delgado, el yeyuno, se da un proceso conocido como enquistación, este proceso se ve estimulado por el exceso de sales biliares y la disminución en colesterol disponible en el ambiente. A lo largo de la enquistación se dan cambios bioquímicos y morfológicos importantes que se pueden dividir en tres etapas: a) recepción de estímulos para la formación del quiste y la consecuente activación de genes específicos; b) biogénesis de organelos secretores y la síntesis, empaquetamiento, transporte y liberación de materiales de la pared celular; y c) el ensamble de la pared extracelular (Luján HD, *et al.* 1998).

Durante la enquistación se expresan las proteínas de la pared celular (CWP1, CWP2 y CWP3) que se caracterizan por tener regiones con alto porcentaje de identidad. Estas proteínas son transportadas en vesículas secretoras (ESVs) en las cuales sufren modificaciones importantes, como el clivaje del extremo C-terminal de la CWP2 por parte de una proteasa cisteína (ESCP), que al parecer es vital para el proceso de formación de la pared celular (Luján HD, *et al.* 1998; Touz MC, *et al.* 2002). En esta etapa también se observan dos rondas sucesivas de replicación de los cromosomas sin un evento de citoquinesis (Bernard R, *et al.* 2001) y el desensamblaje y empaquetamiento de organelos como el disco ventral y los flagelos (Gillin FD, *et al.* 1996; Adam RD, 2001). Cuando se completa la enquistación los quistes son expulsados a través de las heces y pueden empezar un nuevo ciclo en el mismo hospedero o en otro (Adam RD, 2001).

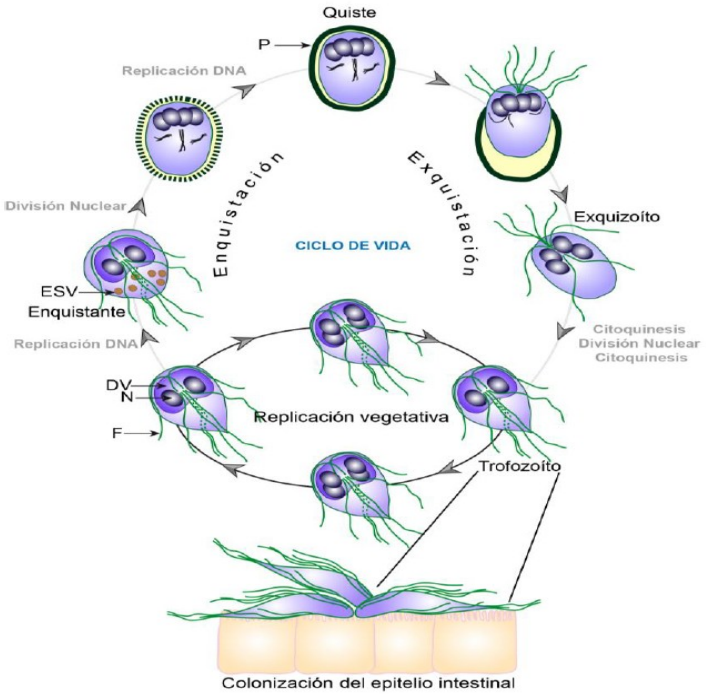


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Giardia Intestinalis*. En la figura se observan las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito. (P) Pared del quiste, (DV) Disco ventral, (ESV) vesículas específicas de enquistación, (F) flagelo y (N) núcleo. Fuente: Tesis: Análisis de la ubiquitinación de proteínas en la diferenciación de *Giardia intestinalis*. Niño CA, 2011.

2.2 Ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traduccional que se da por la unión covalente de ubiquitina, una proteína de 76 residuos que es altamente conservada, a la proteína sustrato. La conjugación de ubiquitina al sustrato generalmente involucra tres pasos (Figura 3): Inicialmente la enzima E1 (activadora de ubiquitina) activa la ubiquitina en una reacción dependiente de ATP que genera un intermedio tioéster de alta energía, luego una enzima E2 (proteínas transportadoras de ubiquitina o enzimas conjugantes de ubiquitina) transfiere la ubiquitina activada, mediante un intermedio tioéster, al sustrato que se encuentra unido a un miembro de la familia de proteínas de ligasa de ubiquitina, E3 (Glickman MH & Ciechanover A, 2002). Esta última familia de enzimas es un elemento de regulación de la ruta de ubiquitinación ya que catalizan el último paso en el proceso de conjugación de la ubiquitina al sustrato. Por ser factores de reconocimiento del sistema presentan variaciones, dentro de las cuales se puede encontrar enzimas con dominios que permiten diferentes tipos de interacciones con el sustrato (Pickart CM & Eddins MJ, 2004).

Figura 3. Esquema de los pasos básicos en la modificación del sustrato por ubiquitina. Se representan los pasos que llevan a la activación de la ubiquitina y su posterior unión al sustrato. Fuente: Pickart CM & Eddins MJ, 2004.

La molécula de ubiquitina es generalmente transferida a un grupo ε-NH_2 de una lisina interna de la proteína blanco, para generar un enlace isopetídico, aunque en algunos casos la ubiquitina es conjugada al grupo amino terminal del sustrato. Posteriores adiciones sucesivas de ubiquitina activada se dan sobre los residuos internos de lisina de la previamente conjugada molécula de ubiquitina, de esta forma se sintetizan las cadenas de poliubiquitina (Glickman MH & Ciechanover A, 2002).

2.3 Enzimas Deubiquitinadoras (DUBs)

Las enzimas deubiquitinadoras son proteasas específicas que hidrolizan la ubiquitina de proproteínas o conjugados de ubiquitina-proteína (Reyes-Turcu FE, *et al.* 2009). Esto lo hacen mediante la hidrólisis de enlaces éster, tioéster y amida que involucran el grupo carboxilo G76 de la Ubiquitina (Wilkinson KD, 1997). Estas enzimas realizan diferentes funciones en la homeostasis de la ubiquitina como:

a) Obtención de ubiquitina madura a partir del procesamiento de proproteínas de ubiquitinina. La ubiquitina se puede expresar fusionada a alguna proteína ribosomal o como poliubiquitina lineal donde hay múltiples copias de ubiquitina (Catic A & Ploegh HL, 2005). Los genes de poliubiquitina también pueden tener un residuo en el extremo C terminal, lo cual se cree puede prevenir la participación de la poliubiquitina sin procesar en procesos de conjugación (Ozkaynak E, *et al.* 1987).
b) Antagonistas de las proteínas de ubiquitinación (Verma R, *et al.* 2002).
c) Enzimas regeneradoras de ubiquitina a partir de poliubiquitina libre no anclada (Amerik AYu, *et al.* 1997).

La deubiquitinación al igual que la ubiquitinación es un proceso altamente regulado que ha sido implicado en numerosos procesos celulares que incluyen la endocitosis (Clagué MJ & Urbé S,

2006), regulación del ciclo celular (Song L & Rape M, 2008), la degradación de proteínas dependiente del proteosoma y lisosoma (Verma R, *et al.* 2002), la expresión génica (Daniel JA & Grant PA, 2007), la reparación de ADN (Kennedy RD & D'Andrea AD, 2005), la activación de kinasas (Komada M, 2008) y patogénesis (Lindner HA, 2007) entre otros.

Las enzimas deubiquitinadoras se pueden subdividir en cinco familias: hidrolasas de ubiquitina C-terminal (UCHs), proteasas específicas de ubiquitina (USPs), proteasas del tumor de ovario (OTUs), las del dominio Josephin (MJDs) y las metaloenzimas JAB1/MPN/MOV34 (JAMMs). Las primeras cuatro familias son proteasas de tipo cisteína como la papaína mientras que la última hace parte de la familia de metaloproteasas con dominio dependiente de zinc. Aunque estas enzimas presentan dominios similares en su sitio activo y por lo tanto en la actividad catalítica, presentan diferencias en cuanto al reconocimiento del sustrato a hidrolizar y en la especificidad hacia las cadenas de ubiquitina (Komander D, *et al.* 2009). Debido a la importancia de estas enzimas en la ruta de ubiquitinación y a que están implicadas en numerosos procesos celulares, poseen diferentes mecanismos de regulación como: cambios conformacionales que se dan por la unión al sustrato; modificaciones post-traduccionales donde las enzimas pueden ser blanco de fosforilación, ubiquitinación o sensibles a regulación redox; la presencia de dominios adicionales de unión a ubiquitina los cuales regulan su actividad o especificidad; la sub localización celular (Amerik AY & Hochstrasser M, 2004; Nijman SM, *et al.* 2005; Komander D, *et al.* 2009).

2.4 ¿Qué se sabe de las enzimas deubiquitinadoras en *Giardia intestinalis*?

En *Giardia intestinalis* se han identificado dos genes de ubiquitina, un gen independiente de expresión constitutiva (Gallego E, *et al.* 2007) y otro que se encuentra fusionado a una proteína ribosomal ($GlUb_{S27a}$), donde la ubiquitina permanece unida a la subunidad S27a y es importante para el ensamblaje ribosomal (Catic A, *et al.* 2007). Además se han identificado otras enzimas (E1, E2s, E3s y DUBs) de la ruta de activación de la ubiquitina, cuya expresión es variable durante el ciclo de vida del parásito, lo cual podría sugerir que la ubiquitinación es un evento evolutivamente importante que emergió muy temprano en el linaje eucariota (Gallego E, *et al.* 2007). Para E1 se ha encontrado que es vital para la viabilidad del parásito y que a nivel de mARN y proteína es regulada durante el proceso de enquistación (Niño CA, *et al.* 2012).

La actividad de la ubiquitinación en trofozoitos de *G. intestinalis* se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* con extracto de proteínas de trofozoitos, un sistema regenerador de ATP,

ubiquitina exógena e inhibidores de enzimas deubiquitinadoras, donde aparecen proteínas de peso molecular mayor a 60KDa, lo cual muestra que *G. intestinalis* posee la maquinaria de ubiquitinación (Gallego E, *et al.* 2007). Se ha planteado que las DUBs podrían tener un papel importante en la regulación de la formación de conjugados ubiquitina-proteína *in vivo*.

Se han identificado enzimas deubiquitinadoras en diferentes organismos incluyendo *G. intestinalis.* Catic y colaboradores (2007) utilizando sondas electrofílicas identificaron tres enzimas, las cuales no están involucradas en el procesamiento de $GlUb_{S27a}$. Mediante la implementación de un modelo *in silico* realizado en nuestro grupo de investigación, Castellanos (2009) identificó 12 genes de posibles enzimas deubiquitinadoras dentro de las que se encuentran las previamente reportadas por Gallego y colaboradores (2007) y Catic y colabores (2007). El trabajo de Castellanos además sugirió, por experimentos de actividad exploratorios, que la proteína recombinante GlOTU posee actividad deubiquitinadora, validando el prospecto bioinformático. Otra evidencia que soporta la existencia de enzimas deubiquitinadoras en *G. intestinalis* es la identificación de enzimas homólogas a Ubp14 y Doa4 mediante la implementación de un ensayo de ‘’pulldown’’ (Niño CA, 2012). Estos resultados abren un camino hacia la exploración de actividad deubiquitinadora de las secuencias encontradas por Castellanos, el estudio de la actividad de estas enzimas en *G. intestinalis* llevaría a un mayor conocimiento acerca de su función en la biología de la ubiquitina y en general de los procesos celulares de eucariotas superiores.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que en *Giardia intestinalis* se ha identificado la ruta de ubiquitinación y que esta es importante para la viabilidad del parásito (Gallego E, *et al.* 2007; Niño CA, 2012), poco se conoce sobre el papel de esta modificación post-traduccional en otros procesos celulares diferentes a la degradación de proteínas por el proteosoma. Dentro de los diferentes estudios que se han realizado acerca de la ruta ubiquitina-proteosoma se han identificado varias enzimas deubiquitinadoras, las cuales juegan un papel importante en la regulación de este proceso (Catic A, *et al.* 2007; Gallego E, *et al.* 2007; Niño CA, 2011).

Aunque se sabe que estas enzimas participan en numerosos procesos celulares, es escaso el conocimiento acerca de sus funciones, blancos y regulación. En *G. intestinalis* son pocos los reportes sobre estas enzimas, por lo que resulta de gran importancia investigar cuáles son sus posibles funciones y niveles de expresión, para de esta forma comenzar a establecer en que procesos celulares se encuentran involucradas durante el ciclo de vida del parásito.

Como punto de partida para establecer cuál es la función y expresión de las enzimas deubiquitinadoras en *G. intestinalis* se tienen doce posibles enzimas candidatas, dentro de las cuales se encuentran enzimas previamente reportadas por otros estudios bioinformáticos (Gallego E, *et al.* 2007) y experimentales (Catic A, *et al*. 2007). A partir de estas enzimas se van seleccionar dos, para determinar sus niveles de expresión y efectos en morfología y crecimiento en trofozoitos de *G. intestinalis y* así poder entender su papel en el desarrollo del estadio móvil de este organismo tempranamente divergente.

4. OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Análizar de la expresión y funcionalidad de enzimas deubiquitinadoras en trofozoitos de *Giardia intestinalis.*

- **Objetivos Específicos**

- Realizar estudios de bioinformática que proporcionen los elementos necesarios para la selección de dos enzimas deubiquitinadoras.
- Analizar los niveles de expresión de las enzimas seleccionadas en trofozoitos de *G. intestinalis*.
- Realizar la transformación de trofozoitos de *G. intestinalis* mediante la sobre-expresión e inhibición de las enzimas deubiquitinadoras.
- Determinar si se dan cambios a nivel de crecimiento y morfología en trofozoitos de *G. intestinalis* transformados.
- Determinar la posible localización de las enzimas en trofozoitos de *G. intestinalis.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Selección de DUBs

Las dos secuencias candidatas a enzimas deubiquitinadoras se seleccionaron a partir del trabajo realizado por Catellanos (2009), para esto se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: residuos del sitio activo identificados con la base de datos MEROPS 9.3 (http://merops.sanger.ac.uk), específicamente la opción BLASTp, los reportes de posible actividad deubiquitinadora en *G. intestinalis,* se utilizaron como evidencia experimental que diera soporte a la identificación por bioinformática, e información sobre las enzimas homólogas en otros organismos.

5.2 Diseño de oligonucleótidos para la sobre-expresión y el silenciamiento

Para la sobreexpresión y el silenciamiento de las enzimas seleccionadas se diseñaron manualmente oligonucleótidos que permitieran la clonación de los fragmentos de interés en un vector específico para *G. intestinalis*.

Se diseñaron dos tipos de oligonucleótidos, los que se van a usar para clonar genes que se sobre-expresen, amplifican el ORF de cada una de las secuencias, mientras que los que se van a utilizar para generar ARN interferente amplifican regiones anti-sentido de aproximadamente 500 pares de bases. En la tabla 1 se puede observar la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos y los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción en sus extremos, para facilitar el reconocimiento por parte de las enzimas se agregaron en el extremo 5´ bases adicionales.

Tabla 1. Oligonucleótidos sentidos y anti-sentido para fragmentos de la sobre-expresión y el silenciamiento. En la tabla se muestra el ID de las secuencias candidatas a enzimas deubiquitinadoras que fueron seleccionadas. Se observan los oligonucleótidos sentido y anti-sentido utilizados para la sobre-expresión (azul) y el silenciamiento (negro), se subraya las secuencias reconocidas por cada enzima de restricción: NcoI (CCATGG), Bgl II (AGATCT), BamHI (GGATCC), SmaI (CCCGGG), NotI (GCGGCCGC).

Secuencia candidata a enzima deubiquitinadora	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
(GL50803_8189)	5´-CATGCCATGGATGTCTAATGACAGTGTACCCAT-3´	5-’GCGCCCGGGGAGCCCAATAGCCGTGTACTCAT-3’
	5’-ATAAGAATGCGGCCGCCATCACGCTCCAGGTTTTCTTCA-3’	5’-CGCGGATCCAAAGAGAGTTAAAAGCTCCTTAG-3’

(GL50803_16823)	5'-CGCAGATCTATGCACCGGTCGACAATGCTGGAGACGGTC-3'	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACTTGGGGTCCCCATGACATGGCTG-3'
	5'-ATAAGAATGCGGCCGCCGATGAATAGTACATCCGGCAAGCTCGTTA-3'	5'-CGCGGATCCCCCCATGACATGGCTGAAGACAGTCAGAGA-3'

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) y almacenados a -20°C. Las diluciones se realizaron en agua DEPC (agua tratada con Dietil-pirocarbonato).

5.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se recolectaron trofozoitos de *G. intestinalis* en PBS, se utilizó el kit de Invitrogen Easy-DNA™, cuyo protocolo se detalla a continuación:

Aislamiento de ADN

1. Se agregaron 350 µL de solución A (solución degradadora) a la suspensión de células y se mezcló en el vortex en intervalos de 1 segundo.
2. Se incubó a 65º C por 10 minutos.
3. Luego se añadieron 150 µL de solución B y se mezcló vigorosamente en el vórtex hasta ver la muestra homogénea.
4. Se adicionaron 500 µL de cloroformo y se mezcló en el vortex hasta que disminuyó la viscosidad y se obtuvo una mezcla homogénea.
5. Se centrifugó a velocidad máxima por 10-20 minutos a 4º C para separar las fases y se transfirió la fase superior (acuosa) a un nuevo tubo.

Precipitación de ADN

6. Se agregó 1 mL de etanol absoluto (-20°C) y se mezcló.
7. La muestra se incubó en hielo por media hora.
8. Se centrifugó a velocidad máxima por 10-15 minutos a 4º C y se retiró el etanol del pellet.
9. Se agregaron 500 µL de etanol al 80% (-20°C) y se mezcló invirtiendo el tubo de 3-5 veces.
10. Se centrifugó a velocidad máxima por 3-5 minutos a 4º C y se retiró el etanol.
11. Se Centrifugó a velocidad máxima por 2-3 minutos a 4º C y se removió el etanol residual.
12. Se dejó secar al ambiente por 20 minutos.

13. Se resuspendió el pellet en 98 µL de buffer TE[1]. Se adicionaron 2 µL de ARNasa y se incubó por media hora a 37°C.

Extracción de ARNasa

14. Se repitieron los pasos 6 a 12 para retirar la ARNasa.
15. Se resuspendió el pellet en 100 µL de buffer TE incubando a 37º C por 30 minutos.
16. Finalmente se almacenó a 4º C hasta el momento de su uso.

La cuantificación se hizo por medición de la absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro Milton Roy GENESYS 5, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50ng/ µL de ADN. Para estimar la pureza, se midió la absorbancia a 280nm con el fin de calcular la relación A_{260}/A_{280} y determinar si había contaminación por proteínas, el cociente o relación esperada debe estar entre 1,8 y 2,0.

5.2.2 Amplificación de fragmentos de interés

Los oligonucleótidos mencionados anteriormente se utilizaron para estandarizar las condiciones de PCR de los productos de interés. Las únicas condiciones que se evaluaron fueron la temperatura de anillaje (°C) y la concentración de $MgCl_2$; Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25µl, las concentraciones finales de los reactivos utilizados fueron las siguientes: [Buffer PCR[2]] = 1X; [oligonucleótidos] = 0,5 µM; [dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP] = 0,2mM; [Taq DNA polimerasa] = 2,5U; [$MgCl_2$] = 1, 2 y 3 mM y [ADN] = 100 ng, se completó el volumen con agua de PCR.

En la figura 4 se observa el ciclo térmico utilizado para las parejas de oligonucleótidos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR system 2400 Perkin Elmer.

[1] Buffer TE: 10mM de Tris Cl pH 7.4 y 1mM de EDTA pH 8.0.
[2] Buffer de PCR 1X: 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl y Triton X-100 al 0.1%.

Figura 4. Perfil térmico utilizado para las reacciones de estandarización del PCR. El mismo perfil se utilizó con todas las parejas de oligonucleótidos.

Los productos para la sobre-expresión fueron sometidos al final del ciclo térmico a 15 minutos de amplificación a 72°C con la enzima Ampli taq.

Después de estandarizar las condiciones de amplificación para cada pareja de oligonucleótidos, estos parámetros se utilizaron para amplificar los productos utilizando 1,25U de la enzima *Pfu* Polymerasa (Fermentas).

5.2.3 Purificación de los productos de PCR

Los genes diseñados para la sobreexpresión y el silenciamiento se obtuvieron mediante reacciones de PCR utilizando la enzima *Pfu* Polymerasa y las condiciones ya mencionadas en el numeral 5.2.2.

La purificación de los genes amplificados para la sobreexpresión se realizó desde el tubo de PCR con el kit Wizard ®PCR Preps DNA Purification System (Promega).

Los genes diseñados para el silenciamiento se amplificaron y posteriormente se purificaron de los geles de agarosa utilizando el kit DNA Gel Extraction de Milipore.

5.2.4 Visualización de los productos de PCR

Se utilizó electroforesis horizontal en geles de agarosa para la visualización de los productos de PCR. El porcentaje de agarosa utilizado dependió en la mayoría de los casos del producto a visualizar, para productos de menos de 1000 pb (pares de bases) se utilizaron geles del 1,5%, mientras que para productos de mayor tamaño se utilizaron geles de agarosa del 1%. Los geles se

corrieron con buffer TBE 0,5X[3]. En cada carril se sembraron entre 2 y 5 µL de producto de PCR mezclados con 1µL de buffer de carga[4].

Inicialmente para correr los geles se aplicaron 100 V por 15 minutos y luego se bajó el voltaje a 80 V hasta que terminó la corrida. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio al 0,1% por un periodo de 15 a 30 minutos. Finalmente se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta y las imágenes obtenidas se fotografiaron en el analizador de imágenes Molecular Imager® Gel Doc™ XR con el software CFX Manager versión 1.6 de Bio-Rad.

5.3 Clonación en el vector pGem-T

5.3.1 Ligación

Los productos de PCR de la sobre-expresión se ligaron con el pGem®-T Easy Vector System (PROMEGA). Para esto se tomó 1 µL del vector (50ng), 3 µL de producto de PCR, 1 µL de T4 DNA ligasa y 5 µL de buffer de ligación para completar un volumen final de 10 µL. Se incubó durante 12 horas a 4°C.

5.3.2 Preparación células competentes

Para la obtención de células competentes se utilizó el método del cloruro de calcio sobre células *Escherichia coli* TOP10, la explicación detallada se da a continuación:

1. Se picó el stock de células almacenado a – 70°C en 5 mL de medio LB[5], el inóculo creció durante la noche con agitación constante a 37°C.
2. El inóculo se estrió en LB-agar[6], incubando por 12 horas a 37º C.
3. Se tomó una colonia y se llevó a 5 mL de LB. Incubación durante 12 horas a 37°C.
4. De este inóculo se tomó 1 mL y se adicionó a 100 mL de medio LB, crecieron a 37°C y con una agitación aproximada de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,2 – 0,3 uA, a 600 nm. Luego se dividió el volumen en 2 tubos de 50 mL y se mantuvo a 4°C por 10 minutos.
5. Se centrifugó a 7000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
6. El pellet se resuspendió en 10 mL de $CaCl_2$ 100mM frío. Se dejó 15 minutos a 4°C.

[3] Buffer TBE 0.5X: pH 8.3. contiene 44.5 mM de Tris-Cl , 44.5 mM de H_3BO_3 y 1 mM de EDTA.
[4] Buffer de carga en electroforesis: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xylene cyanol y 30% de glicerol en agua destilada y desionizada.
[5] Medio LB: 10g/L de Triptona, 5g/L de extracto de levadura y 10g/L de cloruro de sodio.
[6] Medio LB-agar contiene 10g/L de Triptona, 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de cloruro de sodio y 15g/L de agar.

7. Las células se centrifugaron nuevamente a 7000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
8. Se resuspendió el pellet en 2 mL de $CaCl_2$.
9. Se agregó glicerol estéril para una concentración final del 30% v/v.
10. Se hicieron alícuotas de 50 ó 100 µL y se almacenaron a -70°C.

5.3.3 Transformación

La transformación de las bacterias se hizo por choque térmico, el protocolo detallado se muestra a continuación:

1. Se mezclaron 5 µL de la ligación con 100 µL de bacterias *E. coli* TOP 10.
2. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C, luego por 2 minutos a 42°C y por último 10 minutos a 4°C.
3. Se agregaron 400 µL de LB y se dejó en recuperación durante 2 horas a 37°C y 200 rpm.
4. Se sembraron 200µL en medio sólido LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal[7] y se incubó a 37°C durante toda la noche.

5.3.4 Selección de bacterias recombinantes

Los clones recombinantes se rastrearon por PCR de colonia teniendo en cuenta el color de las colonias aisladas. Para esto se picaron colonias en su mayoría blancas o azules en eppendorf con 20 µL de H_2O de PCR, luego se colocaron durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo. De cada una de estas muestras se tomaron 5 µL como plantilla para las reacciones de PCR. Como control positivo de cada una de las reacciones se hizo una reacción de PCR sobre ADN genómico.

Las colonias positivas se picaron en 10 mL de LB con ampicilina, una parte del inóculo se almacenó en el banco de cepas a -70°C y la otra se utilizó para extraer el ADN plasmídico.

5.3.5 Extracción de ADN plasmídico.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina (miniprep), el cual se explica a continuación:

Se tomó un volumen de 1,5 mL del cultivo de bacterias y se transfirió a un tubo eppendorf, luego se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos, luego el sobrenadante se descartó.

[7] LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal: medio LB, 100µg/mL de Ampicilina, 0.5mM de IPTG y 80µg/mL de X-Gal.

Resuspensión.

Se agregaron 200 µL de una solución isotónica[8], se incubó durante 5 minutos a 4°C.

Lisis Alcalina.

Se agregaron 250 µL de la solución de lisis[9], se incubó por máximo 5 minutos a 4°C.

Neutralización

Se agregaron 250 µL de la solución de neutralización[10], se incubó por 5 minutos a 4°C. Luego se centrifugó por 15 minutos a 1200 x g. El sobrenadante con el ADN plasmídico se trasladó a un tubo limpio.

Digestión ARN

Se adicionó 1 µL (20mg/mL) de ARNsa y se incubó por 30 minutos a 37°C.

Extracción Fenol-Cloroformo

Se agregó 1 volumen de Fenol-Cloroformo a la solución del plásmido, agitándose suavemente, luego se centrifugó por 10 minutos a 6000 rpm. La fracción superior acuosa donde permanece el plásmido se transfirió a un nuevo tubo.

Precipitación del plásmido

Se adicionaron entre 2,5 y 3 volúmenes de etanol absoluto (4°C) y 1/10 del volumen de una sal (acetato de sodio 3M, pH 5,2) al ADN plasmídico. Se mezcló por inversión y se incubo durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g y 4°C, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se descartó.

Lavado del Pellet

El plásmido se lavó mediante la adición de 900 µL de etanol al 70% (4°C). Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g y 4°C, el sobrenadante se descartó. Se dejó secar el pellet por unos minutos para eliminar los residuos de alcohol.

Resuspensión del Pellet

El pellet se resuspendió en 50 µL de agua DEPC y se almacenó a -20°C.

El ADN plasmídico se cuantificó por medición de la absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro Milton Roy GENESYS 5, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50ng/ µL de ADN. De igual forma se visualizó en geles de agarosa al 0,8% junto con el marcador de 1Kb (Biolabs) y lambda Hind (Promega).

[8] Solución isotónica: 50mM Glucosa, 25mM Tris-Cl pH: 8, 10mM EDTA.
[9] Solución de lisis: 0,2 M NaOH, 1% (P/V) SDS.
[10] Solución de neutralización: 3M Acetato de Potasio.

5.4 Clonación en el vector pTubHApac

Los fragmentos de la sobreexpresión y el silenciamiento se clonaron en los vectores pTubHApac, este vector es específico para *G. intestinalis*.

5.4.1 Digestión de los vectores y secuencias de interés

Para linealizar cada uno de los vectores se utilizaron las enzimas que se muestran en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Enzimas utilizadas para linealizar los plásmidos pTubHApac.

Vector	Enzimas
pTubHApacNT	BamHI Y NotI
pTubHApacCT	NcoI y EcoRV

Tanto los productos de PCR para el silenciamiento como las secuencias para la sobre-expresión, clonadas en el vector pGem-T, fueron sometidas a digestiones con las enzimas de restricción señaladas en la tabla 1. Las dobles digestiones se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Los productos de las digestiones se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el kit DNA Gel Extraction (Millipore) y posteriormente se corrieron nuevamente en geles de agarosa para ser visualizados.

5.4.2 Ligaciones

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 20 µL, se utilizó una proporción (1:2) vector y producto. Se agregaron 5 µL del vector linearizado y 10µL de producto, se utilizó 1µL de enzima T4 ligasa de fermentas. La reacción se incubó a 22°C durante toda la noche.

5.4.3 Transformación

Para la transformación se utilizó el protocolo que se describe a continuación:

1. Se adicionaron 10 µL de ligación a 100µL de células *E. coli* DH5α, estas células se hicieron competentes utilizando el método del cloruro de calcio descrito en el numeral 5.3.2.
2. Se incubaron las células por 20 minutos a 4°C, luego por 2 minutos a 42°C y por último 2 minutos a 4°C.

3. Las células se pusieron en recuperación, para esto se agregaron 850 µL de LB y se dejó en agitación constante por más de una hora a 37°C.
4. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 3000 rpm, el pellet se sembró en cajas con LB/agar. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C.

5.4.4 Selección de bacterias recombinantes

Se utilizó la misma metodología planteada en el numeral 5.3.4, pero en este caso se rastrearon todas las colonias que crecieron. La extracción de los plásmidos se realizó como en el numeral 5.3.5.

5.5 Transfección de trofozoitos de *Giardia intestinalis*

Los plásmidos obtenidos se utilizaron para transfectar los trofozoitos de *G. intestinalis* mediante electroporación.

5.5.1 Cultivo de *Giardia intestinalis*

Se cultivaron *in vitro* trofozoitos del aislado colombiano de *G. intestinalis*, MHOM/Co/97/G1, en tubos de vidrio con una inclinación de 15° y a 37°C, en medio modificado Diamond's TYI-S-33[11] (Keister DB, 1983) complementado con antibiótico[12] para evitar la contaminación por bacterias.

5.5.2 Transfección por electroporación

La transfección de los trofozoitos de *G. intestinalis* se realizó por electroporación, se utilizó la metodología que se menciona a continuación:

1. Se enfriaron a 4°C durante 10 minutos tubos de 8 mL con parásitos en monocapa, luego se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos.
2. El pellet de cada tubo se resuspendió en 600 µL de medio modificado Diamond's TYI-S-33. Para cada transfección se utilizaron 300 µL de estos parásitos y como mínimo 20 µg del plásmido de interés.

[11] 1 Litro de medio TYI-S-33 contiene: 1,0g de K2HPO4 trihidratado, 0,6g de KH2PO4 anhidro, 20g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 10g de D-glucosa, 2g de clorhidrato de L-cisteína, 2g de Cloruro de Sodio, 0,1g de ácido ascórbico, 22,8mg de citrato férrico amónico, 0,5g de bilis bovina, se ajusta el pH a 7,0 con NaOH. Se adicionan 100 mL de suero bovino. El medio se esteriliza por filtración a través de membranas de 0,2 µm (Millipore).

[12] Concentración final del Antibiótico: 10U/mL de penicilina y 1 µg/mL de estreptomicina.
Para 1L de medio adicionar también 100µL de Gentamicina, stock (10 mg/mL).

3. Las transfecciones se realizaron en el electroporador Bio-Rad gene pulser™ 165-2076 en cubetas de 0,4 cm (Bio-Rad), que se enfriaban a 4°C antes de introducir en ellas los parásitos y el plásmido, bajo las siguientes condiciones:
   - 960 µFD
   - 0,35 mV
   - 800 Ohms
4. Después de la electroporación los parásitos se pusieron en tubos de 8 mL con medio modificado Diamond's TYI-S-33. A las 24 horas se inició un esquema de aplicación de puromicina a una concentración final 100µM (Sigma). Se utilizaron como control parásitos no transfectados, para establecer cuando se tenían parásitos resistentes al antibiótico.

5.6 Confirmación de la sobre-expresión de las proteínas de interés

A partir de los parásitos transfectados resistentes a la Puromicina se hicieron extractos para confirmar la sobreexpresión de las proteínas de interés por inmunodetección del tag de hemaglutinina.

5.6.1 Recolección de parásitos

Para recolectar los parásitos fue necesario que se enfriaran los tubos a 4°C durante 20 minutos, luego se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el medio y el pellet se resuspendió en PBS estéril, esto se hizo hasta completar 3 lavados. Finalmente se hicieron diluciones y se procedió al conteo de los parásitos en cámara de Neubauer. Los parásitos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.6.2 SDS-PAGE y Western Blot

Los parásitos recolectados se resuspendieron en buffer de carga para electroforesis SDS-PAGE[13]y se incubaron por 5 minutos a 94°C. Los extractos se resolvieron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se corrió en buffer de electroforesis SDS-PAGE[14] a voltaje 80 voltios hasta alcanzar la parte superior del gel separador y luego se llevó a 120 voltios

[13] Buffer de carga para electroforesis SDS-PAGE: 50mM Tris-HCl pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 10% glicerol.
[14] Buffer de electroforesis SDS-PAGE: Tris 25mM pH 8,3, Glicina 192mM y SDS 1%.

hasta terminar de correr el gel. Para la visualización de los extractos resueltos los geles se tiñeron con coomasie[15].

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore), empleando buffer de transferencia[16] y aplicando 200 mA por 2 horas a 4°C. La inmunodetección de las proteínas con el tag de hemaglutinina se realizó con el método de fosfatasa alcalina que se describe a continuación:

1. Bloqueo de la membrana durante toda la noche en TBST-leche 5%[17].
2. Se hicieron 3 lavados de 3 minutos cada uno con TBST[18].
3. Se incubó durante una hora con anti-HA (Sigma) (1:500) en TBST-leche, luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST-leche y un último lavado de 3 minutos con TBST.
4. Se incubó durante una hora con anti-ratón Biotina (Sigma) (1:2000) en TBST, luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST-leche y un último lavado de 3 minutos con TBST.
5. Se incubó media hora con estreptavidina-fosfatasa alcalina (Promega) (1:3000) en TBST, luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST.
6. La membrana se reveló utilizando 5 ml de buffer sustrato[19] y el sustrato cromogénico NBT/BCIP[20] (Nitro-blue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3'-Indolyphosphate p-toluidine salt, Promega).

Como control de carga se utilizó un anticuerpo para calmodulina (Anti-CAM), la inmunodetección de este anticuerpo se hizo de forma simultánea con el anti-HA y utilizando el mismo protocolo. La concentración del anticuerpo primario fue (1:3000) y la del anti-conejo Biotina (1:2000).

5.6.3 Inmunofluorescencia

Los parásitos utilizados para inmunofluorescencia se fijaron utilizando metanol, siguiendo la metodología descrita a continuación:

[15] Tinción de Coomasie: 0.5 g Coomasie brillant blue R250, 250mL Isopropanol, 112mL Ácido acético, 550mL H_2O.
[16] Buffer de transferencia: Tris 25mM pH 8,3, Glicina 192mM, y metanol 10% v/v.
[17] TBST-leche 5%: Tris 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, Tween 20 1% v/v y leche descremada 5%.
[18] TBST: Tris 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, Tween 20 1% v/v.
[19] Buffer sustrato: Tris-HCl 100mM pH 9.0, NaCl 150mM, MgCl2 1mM.
[20] NBT/BCIP: por cada 5 mL de buffer sustrato se deben usar 16,5 µL de NBT (50 mg/mL) y 16,5 µL de BCIP (25 mg/mL).

1. Tubos de 8 mL con parásitos se tuvieron durante 20 minutos a 4°C, luego de agitar los tubos se tomaron 800 µL del sobrenadante y se pasaron a eppendorf de 1,5 mL.
2. Los eppendorf se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos a 4°C. El medio de cultivo se retiró y el pellet se resuspendió en 300 µL de PBS filtrado por membranas de 0,45 µm (Millipore)
3. Del pellet resuspendido en PBS se pusieron gotas en una lámina de vidrio y se permitió la adhesión de las células por 20 minutos a 37°C en cámara húmeda.
4. Las láminas se fijaron con metanol durante 7 minutos a -20°C.
5. Las células se permeabilizaron con acetona por 5 minutos a -20°C.
6. Las células se hidrataron con PBS por 10 minutos a 37°C.
7. El bloqueo se realizó con PBS suero bovino (GIBCO) al 3% durante 15 minutos a 37°C.
8. Se colocó el anticuerpo primario, anti-HA (Sigma), en el buffer de bloqueo con diluciones (1:500) ó (1:1000) durante 1 hora a 37°C.
9. Se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con la solución de bloqueo.
10. Se colocó el anticuerpo secundario, anti-ratón ALEXA 594 (Invitrogen), en una dilución (1:500) en PBS por una hora a 37°C.
11. Se repitieron los lavados como en el paso 9
12. Se tiñeron los núcleos usando DAPI (1:7000), la dilución se hizo en PBS. Se dejó actuar durante 5 minutos y luego se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS.

Las imágenes de fluorescencia se tomaron en el Microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti, con el objetivo de 60X (Apertura numérica: 1,4. Distancia de trabajo: 0,13. Tipo: CFI PNANAPO VC. DIC: DIC N2). Se utilizó la cámara DS-U2 Nikon y el software NIS-Elements AR versión 3.2.

5.7 Confirmación del silenciamiento de las proteínas de interés

5.7.1 Extracción de ARN

Los parásitos se recolectaron como se mencionó en el numeral 5.6.1. El último lavado se hizo en agua DEPC.

Para la extracción del ARN se utilizó el método de trizol que se describe a continuación:

Las células se resuspendieron en 1 mL de Trizol (Invitrogen) por pipeteo constante.

Fase de separación

Se incubaron las muestras homogenizadas por 5 minutos entre 15 y 30°C para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µL de Cloroformo por 1 mL de Trizol. Se agitaron vigorosamente los tubos por 15 segundos y luego se incubaron de 2 a 3 minutos entre 15 y 30 °C. Se centrifugaron las muestras a no más de 12000 x g por 15 minutos entre 2 y 8 °C. Después de la centrifugación la mezcla se separó en tres fases: la fase roja inferior, fase fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa incolora en la parte superior.

Precipitación del ARN

Se transfirió la fase acuosa, donde está el ARN, a un tubo nuevo. La precipitación del ARN se llevó a cabo agregando alcohol isopropílico, se utilizaron 500 µL de alcohol por 1 mL de Trizol usado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras entre 15 y 30°C por 10 minutos y se centrifugaron a no más de 12000 x g por 10 minutos entre 2 y 8 °C. El ARN precipitado formó un pellet con aspecto de gel en la parte inferior del tubo.

Lavado del ARN

El sobrenadante se removió. El pellet del ARN se lavó una vez con etanol al 75%, añadiendo al menos 1 mL por 1mL de Trizol usado para la homogenización inicial. Se mezcló por agitación con vortex y se centrifugó a no más de 7500 x g por 5 minutos entre 2 y 8 °C.

Redisolviendo el ARN

Al final del procedimiento brevemente se puso a secar el pellet de ARN. Para disolver el ARN se agregó agua DEPC y se incubó por 10 minutos a 60°C.

Tratamiento con ADNasa

Se agregó 1µL de ADNasa (Promega) y se dejó actuar por una hora a 37°C. Luego se verificó la pureza del ARN utilizando 1µL como plantilla para una reacción de PCR, después de retirar la ADNasa por extracción fenol-cloroformo se procedió a la cuantificación con el espectrofotómetro Milton Roy GENESYS 5 a 260nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 40ng/ µL de ARN.

5.7.2 Ensayos RT-PCR

Este proceso consta de tres etapas que se describen a continuación:

1. El ARN (40ng) se hibridizó con el primer anti-sentido o el sentido a una concentración final de 0,5µM por 5 minutos a 70°C. La mezcla se enfrió rápidamente a 4°C. En un volumen de 15 µL.
2. La transcripción reversa se realizó en un volumen final de 25 µL, se adicionó el buffer de reacción H-MLV, los 4 dNTPs a una concentración final de 0,5mM, 1u de enzima M-MLV Reverse Transcriptase de Promega (200u/µL) y se incubó durante una hora a 42°C.
3. Por último se adicionó el oligonucleótido sentido o anti-sentido a una concentración final de 0,5µM, 2,5 U de ADN Taq polimerasa y se continuó con la reacción de PCR siguiendo el mismo programa térmico.

   Como control negativo se utilizó un tubo sin transcriptasa reversa, esto asegura que no hay ADN.

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa como lo descrito en el numeral 5.2.4.

5.7.3 Ensayos qRT-PCR

5.7.3.1 Diseño oligonucleótidos y estandarización de las condiciones de amplificación

Para los ensayos de PCR en tiempo real se diseñaron oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) con el programa Primer Design versión 1.01, los cuales se muestran en la tabla 3. Estos son los parámetros que se tuvieron en cuenta para su construcción:

- ✓ Temperatura de anillaje entre 50 y 60º C, preferiblemente de 58 a 60°C.
- ✓ Mínimo y máximo contenido de GC entre 40% y 60%.
- ✓ Mínimas interacciones entre los oligonucleótidos.
- ✓ Tamaño del amplicón entre 50 – 250pb.
- ✓ Se evitaron oligonucleótidos con G en el extremo 5’.
- ✓ Se evitaron oligonucleótidos que tuvieran en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3’ más de tres G y/o C.

Tabla 3. Oligonucleótidos sentidos y anti-sentido para ensayos de qRT-PCR.

Secuencia candidata a enzima deubiquitinadora	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
GL50803_8189	5'-CTTTGGAGCAGCTCTACA-3'	5'-AGCTGTGGCTTAATCAGA-3'
GL50803_16823	5'-TCATTGTCTCTCACGTTG-3'	5'-TCTACAGAGTCTGCCTGG-3'

Las condiciones de amplificación que se utilizaron para la estandarización son las mismas del numeral 5.2.2, las únicas variaciones fueron las temperaturas de anillaje (56 y 58°C) y las concentraciones de $MgCl_2$ (2 y 3 mM) evaluadas.

5.7.3.2 Transcripción reversa

Para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se sintetizó cADN a partir de ARN de parásitos control, no transfectados, y parásitos transfectados en los que se estaba silenciando alguna de las secuencias candidatas. La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando el kit DyNAmo™ cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR (Finnzymes), la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µL y utilizando las siguientes condiciones de reacción: [Buffer RT[21]] = 1X; [Oligo dT] = 5ng/µL; [Transcriptasa reversa M-MuLV RNasa H+] = 2µL y [ARN] = 1µg. El volumen se completó con agua DEPC. El programa térmico que se utilizó se describe a continuación:

Tabla 4. Prográma térmico utilizado para la síntesis de cADN.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Predenaturación*	65	5
Extensión de primers	25	10
Síntesis cDNA	42	60
Reacción de terminación	85	5
Enfriamiento	4	5

*Este paso se realizó antes de adicionar el buffer 2X RT y la transcriptasa reversa.

El cADN y sus diluciones se almacenaron en alícuotas a -70°C.

5.7.3.3 Curvas de calibración

Para la cuantificación Absoluta de los transcritos de los genes de interés en trofozoitos de *G. intestinalis* fue necesaria la construcción de curvas de calibración. Estas curvas se generaron a

[21] Buffer RT 2X contiene: 10mM de $MgCl_2$ e incluye mezcla de dNTPs.

partir de ADN plasmídico, secuencias a sobre-expresar clonadas en el vector pGem-T. Los plásmidos se extrajeron con el kit Wizard ®*Plus* Minipreps DNA purification System (Promega), utilizando la metodología que se explica a continuación:

1. Un cultivo de bacterias crecidas en LB-Ampicilina de entre 3-5 mL se centrifugó por 10 minutos a 10000 x g.
2. El pellet se resuspendió en 300µL de solución de resuspensión.
3. Se adicionaron 300µL de solución de lisis y se mezcló por inversión del tubo.
4. Se agregaron 300µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión.
5. Se centrifugó el lisado a 10000 x g por 5 minutos.
6. Se adicionó 1 mL de resina a una columna Luer-Lok® mediante una jeringa. Posteriormente se hizo pasar el lisado obtenido anteriormente.
7. Se adicionaron 2 mL de solución de lavado y se pasó a través de la columna.
8. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos. Luego la columna fue transferida a un tubo nuevo.
9. Se adicionaron 50µL de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
10. Se centrifugó a 12000 rpm por 20 segundos y se almacenó el ADN a -20º C hasta el momento de su uso.

Los plásmidos obtenidos se cuantificaron por espectrometría a 260 nm. A partir de cada uno de los stocks de plásmido se realizaron entre 7 y 8 diluciones seriadas (1:10) en agua DEPC. Las diluciones seleccionadas y el control negativo se corrieron por duplicado y al mismo tiempo en el equipo CFX96™Real-Time PCR (Bio-Rad) del Departamento de Química de la Universidad Nacional, se utilizó el kit DyNAmo™SYBR® Green qPCR (Finnzymes).

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: [Mezcla 2X[22]] = 1X; [Oligonucleótidos] = 0,3 µM cada uno; [ADN plasmídico] = 10^8 a 10^4 copias. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10 µL completando con agua DEPC. El programa de temperatura se detalla a continuación (Tabla 5). Los datos fueron recolectados y procesados en el programa CFX Manager versión 1.6 (Bio-Rad).

[22] Mezcla 2X contiene: *Tbr* DNA polimerasa modificada, SYBR Green I, buffer optimizado de PCR, 5 mM $MgCl_2$, mezcla dNTPs incluyendo dUTP)

Tabla 5. Programa térmico utilizado en los ensayos de PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Adquisición de Datos
Denaturación inicial			
Denaturación	95	10 min	Ninguno
Amplificación: 35 ciclos			
Denaturación	95	15 seg	Ninguno
Anillaje	60	20 seg	Ninguno
Extensión	72	30 seg	Sencillo
Curva de Melting			
	65-95	5 seg	Continuo

5.7.3.4 qRT-PCR sobre cADN

La cuantificación absoluta de los transcritos se realizó a partir del cADN sintetizado de parásitos control, no transfectados, y aquellos que se transfectaron con el plásmido que contiene una secuencia anti-sentido para cada uno de los genes. Este cADN se sintetizó como se mencionó en el numeral 5.7.3.2. En los ensayos de PCR en tiempo real para cada reacción se utilizaron 4 µL de una dilución (1:10) realizada a partir del stock de cADN. Las muestras se corrieron por triplicado y al mismo tiempo que las curvas de calibración y el control negativo.

Las condiciones de la reacción se especifican en el numeral 5.7.3.3.

5.8 Ensayos crecimiento

Con los parásitos no transfectados, control, así como con los transfectantes se realizaron ensayos de conteo y visualización de morfología para determinar posibles cambios en la morfología y las tazas de crecimiento entre los parásitos evaluados.

5.8.1 Conteos

Para los ensayos de crecimiento se partió de tubos con parásitos formando monocapa, estos se enfriaron durante 20 minutos a 4°C, luego se contaron los parásitos en cámara de Neubauer. Después de establecer el número de parásitos por tubo, se pusieron inóculos de 100.000 parásitos en tubos eppendorf de 1,5mL. Para cada clase de parásitos se pusieron los inóculos por triplicado para ser contados a las 24 y 48 horas.

Los conteos se realizaron a partir de diluciones en PBS, cada muestra se contó dos veces. Los datos obtenidos se evaluaron con la prueba no paramétrica de Friedman.

5.8.2 Visualización de cambios morfológicos

Para visualizar la morfología de los parásitos control y los transfectados se realizaron los primeros tres pasos del numeral 5.6.3. Luego los parásitos fueron fijados con un lavado en metanol y por último se tiñeron con Giemsa durante 10 minutos. Las fotografías de las muestras se tomaron en el mismo microscopio que se utilizó para las imágenes de fluorescencia, se utilizó el DIC (Differential interference contrast) y el objetivo de 60X.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección de enzimas deubiquitinadoras

Para la selección de las dos secuencias candidatas a enzimas deubiquitinadoras se tomó como punto de partida el estudio bioinformático realizado por Castellanos (2009). A partir de las 12 secuencias candidatas a enzimas deubiquitinadoras se hizo una revisión de la literatura en búsqueda de reportes de actividad de estas enzimas en *G. intestinalis*, además se identificaron los residuos de los sitios catalíticos para cada una de las enzimas mediante la base de datos MEROPS 9.3 (BLASTp) y se compararon con los reportados para cada una de las familias de enzimas.

Las enzimas que se seleccionaron son ortólogas a UBP6 y RPN11 en levadura, por esta razón las secuencias candidatas en este parásito se denominaron GlUBP6 y GlRPN11 respectivamente.

- GlUBP6 (GL50803_8189)

Aunque en *G. intestinalis* son escasos los reportes de actividad deubiquitinidora, el estudio realizado por Catic reportó una enzima homóloga a UBP6. Esta fue identificada como una de las siete enzimas homólogas a proteasas de tipo cisteína específicas de ubiquitina en el parásito. Además en este mismo estudio mediante la utilización de la sonda electrofílica, ubiquitina-VME, fue identificada esta enzima junto con otras dos.

- GlRPN11 (GL50803_16823)

La búsqueda de residuos del sitio activo se realizó en MEROPS, una base de datos para peptidasas, sus inhibidores y sustratos. El principio de organización de la base de datos es una jerarquía de clasificación en donde los grupos de petidasas e inhibidores homólogos son agrupados en especies de proteínas que luego son agrupadas en familias y posteriormente en clanes (Rawlings ND, *et al.* 2012).

Al hacer la identificación de los residuos del sitio activo para cada una de las secuencias candidatas encontramos que GlRPN11 ha sido identificada por la base de datos como una proteína homóloga a la peptidasa PSMD14 o proteasome regulatory subunit RPN11 de *Saccharomyces cerevisiae*. En la figura 5 se muestran los residuos del sitio activo identificados para GlRPN11, la proteína posee el motivo característico (EX_nHS/THX_7SXXD) de una de las familias de enzimas deubiquitinadoras. En este motivo la histidina y el ácido aspártico coordinan el zinc, mientras que el ácido glutámico forma puentes de hidrógeno con el agua (Maytal-Kivity V, *et al.* 2002; Tran HJ, *et al.* 2003;

Ambroggio XI, *et al.* 2004). La base de datos también muestra que la proteína hace parte del clan MP, el cual contiene metalopeptidasas, y la familia M67, la cual contiene isopeptidasas que liberan ubiquitina de proteínas ubiquitinadas.

Diferentes estudios sobre RPN11 en levadura han mostrado que el motivo es de gran importancia y que las mutaciones de los residuos del sitio activo afectan la función *in vivo* de la proteína, aumentando la susceptibilidad a condiciones de stress (Verma R, *et al.* 2002).

Otro de los factores que se tuvo en cuenta para la selección de *Glrpn11* y *Glubp6* fue la información reportada por la base de datos del genoma de *Giardia* (http://www.giardiadb.org), donde para ambas secuencias candidatas se reporta su transcripción en el estadio vegetativo del parásito, trofozoitos, y otras etapas del ciclo de vida (figura 6) mediante la técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Esta técnica se utiliza para cuantificar la distribución de transcritos de mARN en muestras biológicas por secuenciación de un gran set de tags (Velculescu VE, *et al.* 1995; Gilchrist MA, *et al.* 2007)

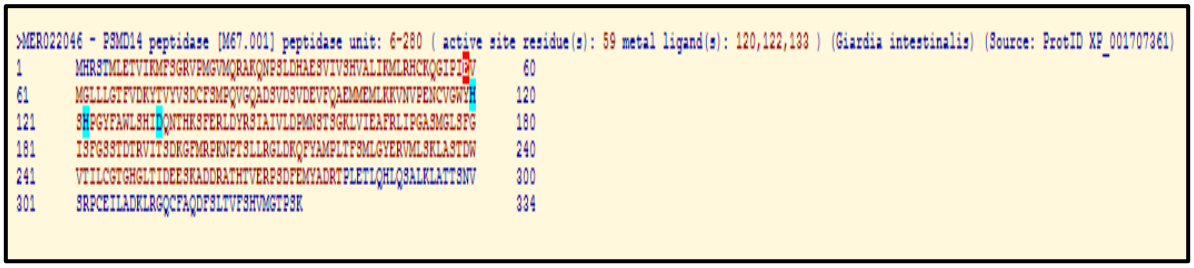
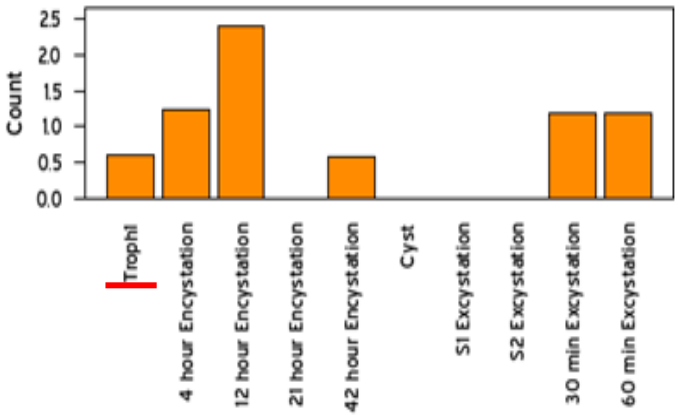
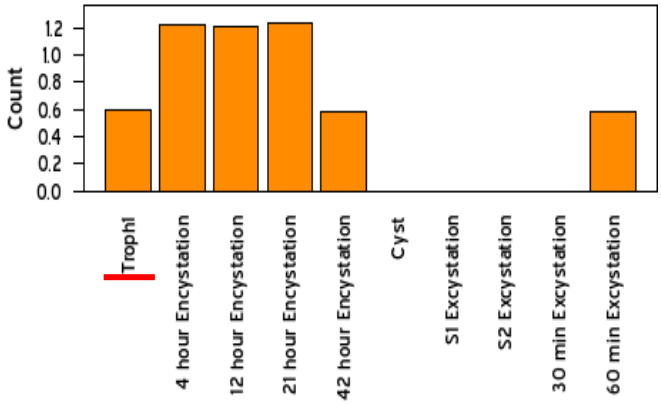


Figura 5. Motivo JAMM (EX_nHS/THX_7SXXD) identificado en GlRPN11 por el programa MEROPS. Secuencia homóloga a PSMD14. En rojo color rojo se señalan los residuos que están remplazando el sitio activo. En color azul se muestran los residuos que se están ligando al metal.

En otros organismos como levadura se ha reportado que ambas enzimas representan un punto clave de regulación de la ubiquitinación ya que hacen parte de la partícula reguladora del proteosoma o se asocian con esta. La partícula reguladora puede dividirse en dos sub complejos, la base y la tapa. La tapa consiste de nueve proteínas no-ATPasa incluyendo la enzima deubiquitinadora RPN11, cuya actividad es esencial para la eficiente degradación del sustrato (Verma R, *et al.* 2002). La base contiene seis distintas ATPasas AAA+, que forman un anillo hetero hexamérico y constituyen el motor molecular del proteosoma, además contiene cuatro subunidades no-ATPasa, una de ellas (RPN1) une a UBP6, otra enzima deubiquitinadora no esencial (Lander GC, *et al.* 2012).



GL50803_8189
Glubp6



GL50803_16823
Glrpn11

Figura 6. Gráficas con los datos de experimentos SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) durante el ciclo de vida de *Giardia in vitro*. En estas dos gráficas para ambos genes se observa que hay presencia del transcrito en trofozoitos del parásito (subrayado con rojo). El **eje X** muestra las diferentes etapas del ciclo de vida, los tiempos post exquistación o enquistación son indicados en horas. **Tropho1**: Trofozoitos; **4 hour Encystation:** 4 horas de enquistación; **12 hour Encystation:** 12 horas de enquistación; **21 hour Encystation:** 21 horas de enquistación; **Cyst:** Quiste; **S1 Excystation:** S1 (Estado 1: Condiciones de ácido que imitan a las del estómago) Exquistación; **S2 Excystation:** S2 (Estado 2: Tripsina y condiciones ligeramente alcalinas que imitan al intestino delgado); **30 min Excystation:** 30 minutos de exquistación; **60 min Excystation:** 60 minutos de exquistación. El **eje y** indica los counts: suma de todos los tags informativos observados para determinado gen en determinado experimento. Tomado de http://www.giardiadb.org

6.2 Estandarización de las condiciones de PCR para los fragmentos de interés

Para la obtención de ADN se partió de 139 millones de trofozoitos de *G. intestinalis* del clon WB y se utilizó el kit Easy-DNA™ (Invitrogen). Luego de verificar la calidad y estado del ADN se iniciaron los ensayos de estandarización de amplificación de los fragmentos de interés, esto se hizo utilizando como plantilla 100 ng de ADN genómico. Durante la estandarización de los oligonucleótidos se observó que hay amplificación de los productos de interés cuando se utiliza

una concentración 2 y 3 mM de $MgCl_2$, y con las dos temperaturas de anillaje reportadas en el numeral 5.2.2.

En la figura 7 se observa la amplificación de los productos para la sobre-expresión y el silenciamiento utilizando una concentración de 3mM de $MgCl_2$, para todos los productos la temperatura de anillaje utilizada fue de 60°C, excepto para la sobre-expresión de *GlUbp6* (55°C). Bajo estos parámetros se utilizó la enzima de alta fidelidad *Pfu* polimerasa.

Se seleccionaron estas condiciones de amplificación porque con ellas se observó la mayor cantidad de producto y para la mayoría de las reacciones muy baja producción de dímeros, los cuales no fueron problema al momento de clonar ya que se purificaron los productos de interés. La amplificación de un solo producto sugiere que los oligonucleótidos están bien diseñados y que son específicos.

Los productos de la sobre-expresión fueron purificados a partir de la reacción de PCR mientras que los del silenciamiento se purificaron del gel. En ambos casos después de las purificaciones los productos se visualizaron en geles de agarosa para hacer una estimación de la cantidad de producto necesario para las reacciones de ligación (imágenes no mostradas).

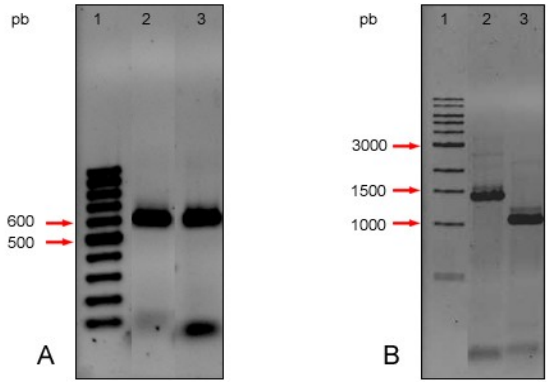


Figura 7. Condiciones de amplificación utilizadas para la obtención de productos de la sobre-expresión y el silenciamiento. A) Gel de agarosa del 1% para los productos del silenciamiento. 1: Marcador 100pb (3µL); 2: GlUbp6iN (522pb) (4µL); 3: GlRpn11iN (529pb) (4µL). **B)** Gel de agarosa del 1% para los productos de la sobreexpresión. 1: Marcador 1Kb (1µL); 2: GlUbp6sC (1380pb) (4µL); GlRpn11sN (1005pb) (4µL).

6.3 Clonación de las enzimas en el vector pTubHApac

6.3.1 Clonación de secuencias a sobre-expresar en el vector pGem-T

Después de la amplificación de las secuencias a sobre-expresar se clonaron los fragmentos en el vector pGem-T. A partir de las colonias positivas que se identificaron se extrajo el plásmido y se confirmó mediante PCR, con los oligonucleótidos específicos para cada gen, la presencia del fragmento de interés. En la figura 8 se observan los productos del PCR sobre los plásmidos GlUbp6pGemT y GlRpn11pGemT.

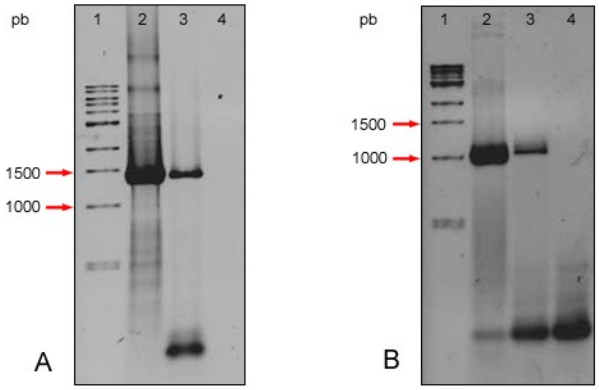


Figura 8. Visualización de la reacción de PCR de los fragmentos de la sobre-expresión clonados en pGem-T. A) Gel de agarosa del 1% para productos del PCR sobre GlUbp6pGemT. 1: Marcador 1 Kb; 2: GlUbp6pGemT; 3: Control positivo (1380 pb); 4: Control negativo. Contiene todos los reactivos de amplificación menos la plantilla. **B)** Gel de agarosa del 1% para productos del PCR sobre GlRpn11pGemT. 1: Marcador 1Kb; 2: GlRpn11sNpGemT (5µL); 3: Control positivo (1005 pb); 4: Control negativo: tiene todos los reactivos de la reacción de amplificación excepto la plantilla. Para los controles positivos se utilizaron como plantilla 100ng de ADN genómico. En ambos geles se sembró 1µL de marcador y 5µL de las diferentes muestras.

Con los plásmidos ya confirmados se realizaron digestiones (Figura 9) con las enzimas especificadas para cada pareja de oligonucleótidos según lo indicado en el numeral 5.2. Esta primera clonación en el vector pGem-T permitió confirmar la acción de las enzimas de digestión por la liberación de los fragmentos del tamaño esperado; al mismo tiempo estos plásmidos se utilizaron para las curvas de calibración de los ensayos de qRT-PCR.

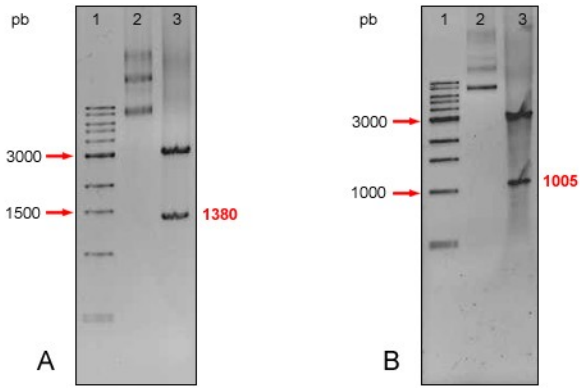


Figura 9. Visualización de las digestiones de los plásmidos con las secuencias a sobre-expresar. A) Gel de agarosa del 0,8% para digestión de GlUbp6pGemT. 1: Marcador 1 Kb; 2: GlUbp6pGemT (2µL); 3: GlUbp6pGemT Digerido (4µL). **B)** Gel de agarosa del 1% para digestión de GlRpn11pGemT. 1: Marcador 1Kb; 2: GlRpn11pGemT (2µL); 3: GlRpn11pGemT Digerido (5µL). Del marcador se sembró 1µL. Los números en rojo en la parte derecha de los geles muestran el tamaño de las bandas de interés, secuencias a sobre-expresar.

6.3.2 Clonación de los fragmentos a sobre-expresar en el vector pTubHApac

Los productos liberados por la digestión de los vectores GlUbp6pGemT y GlRpn11pGemT fueron clonados en el vector pTubHApac. Este vector es específico para *G. intestinalis*, contiene el promotor α2-tubulina y la región 5' del gen β-Giardina del parásito (Elmendorf HG, *et al.* 2001), además se caracteriza por expresar las proteínas con un tag de hemaglutinina (HA) que puede estar ubicado en el extremo carboxilo (CT) o amino (NT) terminal y un gen de resistencia a puromicina (Touz MC, *et al.* 2002) (Anexo 1). Estos vectores fueron diseñados por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Dr. Hugo Luján (Universidad Católica de Córdoba, Córdoba – Argentina) y regalados a nuestro laboratorio.

Para la sobre-expresión de las proteínas se evaluó cuál de los dos vectores se iba a utilizar ya que lo que se buscaba era determinar la posible localización de las proteínas de interés, para esto se tuvo en cuenta la información reportada en las proteínas homólogas de levadura. El ORF de *Glubp6* se clonó en el vector pTubHApac-CT (Glubp6spTubHApac-CT) porque para UBP6 en levadura se ha reportado que el extremo N-terminal posee un dominio similar a Ubiquitina (Ubl) que media la interacción con la base de la partícula regulatoria, además esta interacción incrementa la actividad catalítica de la enzima (Hanna J, *et al.* 2006). El ORF de *Glrpn11* se clonó en el vector pTubHApac-NT (Glrpn11spTubHApac-NT) porque para RPN11 en levadura se ha observado que el extremo C-terminal se requiere para la estabilización de la base y la tapa de la partícula reguladora del proteosoma (Rinaldi T, *et al.* 2004).

Los ORF se clonaron en el vector ya mencionado, a partir de las colonias rastreadas se seleccionaron las colonias positivas y de estas se extrajeron los plásmidos de interés utilizando el método de lisis alcalina. En la figura 10 se muestra los productos del PCR sobre los plásmidos extraidos, estos PCR se hicieron utilizando los oligonucleótidos de la sobre-expresión y el silenciamiento. Los plásmidos se cuantificaron y se utilizaron para transfectar trofozoitos de *G. intestinalis.*

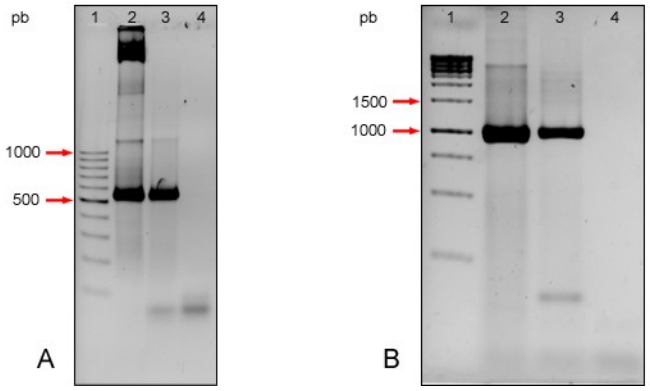


Figura 10. Visualización de la los productos de PCR de los fragmentos de la sobre-expresión clonados en el vector pTubHApac. A) Gel de agarosa del 1,5%, PCR sobre el plásmido Glubp6spTubHApac-CT. 1: Marcador 100pb (1µL); 2: Glubp6spTubHApac-CT (5µL); 3: Control positivo (522 pb)(5µL); 4: Control negativo (5µL). Para esta reacción se utilizaron los oligonucleótidos del silenciamiento de GlUbp6. **B)** Gel de agarosa del 1,5%, PCR sobre el plásmido Glrpn11spTubHApac-NT. 1: Marcador 1Kb (1,5µL); 2: Glrpn11spTubHApac-NT (5µL); 3: Control positivo (1005 pb)(5µL); 4: Control negativo. Para esta reacción se utilizaron los oligonucleótidos de la sobre-expresión de GlRpn11. Para los controles positivos se utilizaron como plantilla 100ng de ADN genómico.

6.3.3 Clonación de los fragmentos para el silenciamiento en el vector pTubHApac

Los productos para el silenciamiento se amplificaron y purificaron de geles de agarosa, luego de las digestiones fueron clonados directamente en el vector pTubHApac-NT, para las dos secuencias se utilizó el mismo vector (Glubp6ipTubHApac-NT, Glrpn11ipTubHApac-NT). Los plásmidos obtenidos de las colonias positivas fueron confirmados por PCR (Figura 11) y cuantificados para su posterior utilización en la transformación de los parásitos.

6.4 Transfección de parásitos

Los genes de la sobreexpresión y el silenciamiento de ambas enzimas fueron clonados en el vector pTubHApac, con los plásmidos obtenidos se transfectaron por electroporación trofozoitos de *G. intestinalis* de la cepa colombiana MHOM/Co/97/G1. Esta cepa se utilizó debido a que en el momento en que se realizaron los experimentos había inconvenientes con el proceso de selección

de los parásitos de la cepa WB transfectados, la adición de puromicina no afectaba la viabilidad de los parásitos no transfectados (control).

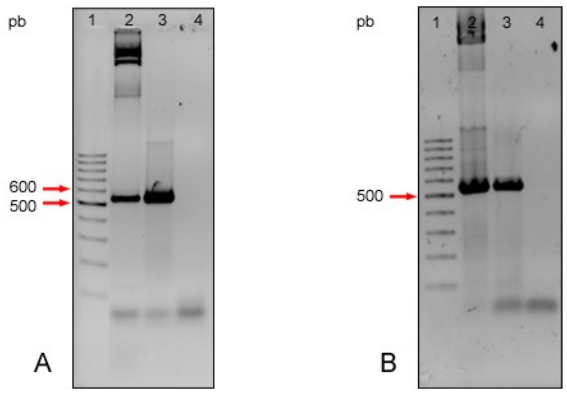


Figura 11. Visualización de los productos de PCR de los fragmentos de silenciamiento clonados en el vector pTubHApac. A) Gel de agarosa del 1,5%, PCR sobre el plásmido Glubp6ipTubHApac-NT. 1: Marcador 100pb (1µL); 2: Glubp6ipTubHApac-NT (5µL); 3: Control positivo (522 pb)(5µL); 4: Control negativo (5µL). **B)** Gel de agarosa del 1,5%, PCR sobre el plásmido Glrpn11ipTubHApac-NT. 1: Marcador 1Kb (1µL); 2: Glrpn11ipTubHApac-NT (5µL); 3: Control positivo (529 pb)(5µL); 4: Control negativo (5µL). Para ambas reacciones se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para el silenciamiento. En los controles positivos se utilizó como plantilla 100ng de ADN genómico.

Un estudio reveló que la cepa colombiana propablemente pertecence al ensamblaje A al igual que WB, esto basado en la similitud de los perfiles de amplificación de G1 con los de líneas de cultivo estándares utilizando la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Ravid Z, *et al.* 2007).

Las condiciones de electroporación que se tuvieron en cuenta para transfectar los parásitos se mencionan en el numeral 5.5.2. La cantidad de plásmido utilizado (20 µg), se estandarizó teniendo en cuenta el reporte realizado por Yee y Nash (1995) donde determinaron que cuando los parásitos se transfectan de forma trasiente con luciferasa, la actividad enzimática aumenta en proporción a la concentración de ADN electroporado. En nuestro laboratorio seleccionamos 20 µg como la cantida mínima necesaria después de haber ensayado con cantidades inferiores de forma no exitosa.

Aunque después de la extracción de los plásmidos estos fueron cuantificados por espectrometría, los plásmidos se corrieron en geles de agarosa al 0,8% (Figura 12) junto con el marcador lambda Hind III para verificar la cuantificación y hacer una estimación más acertada de la cantidad requerida.

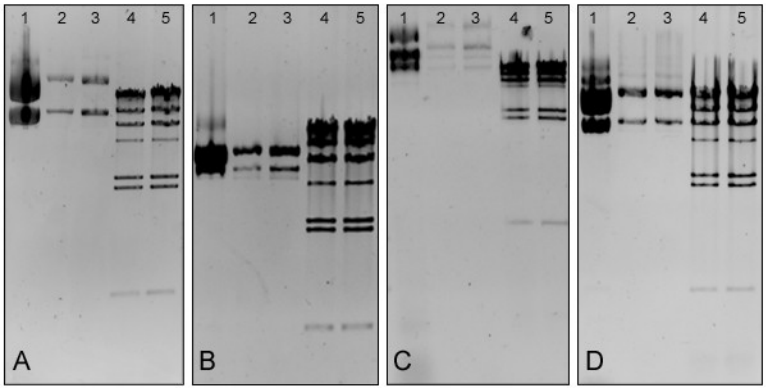


Figura 12. Visualización de las plásmidos utilizados para transfectar los trofozoitos de *G. intestinalis.* A) Gel de agarosa del 0,8%, Visualización de Glubp6spTubHApac-CT. 1: Glubp6spTubHApac-CT (1µL); 2: Glubp6spTubHApac-CT Diluido (1:100) (2µL); 3: Glubp6spTubHApac-CT Diluido (1:100) (4µL); 4: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (2µL); 5: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (3µL). **B)** Gel de agarosa del 0,8%, Visualización de Glubp6ipTubHApac-NT. 1: Glubp6ipTubHApac-NT (1µL); 2: Glubp6ipTubHApac-NT Diluido (1:50) (2µL); 3: Glubp6ipTubHApac-NT Diluido (1:50) (4µL); 4: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (2µL); 5: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (3µL). **C)** Gel de agarosa del 0,8%, Visualización de Glrpn11spTubHApac-NT. 1: Glrpn11spTubHApac-NT (1µL); 2: Glrpn11spTubHApac-NT Diluido (1:50) (2µL); 3: Glrpn11spTubHApac-NT Diluido (1:50) (4µL); 4: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (2µL); 5: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (3µL). **D)** Gel de agarosa del 0,8%, Visualización de Glrpn11ipTubHApac-NT. 1: Glrpn11ipTubHApac-NT (1µL); 2: Glrpn11ipTubHApac-NT Diluido (1:50) (2µL); 3: Glrpn11ipTubHApac-NT Diluido (1:50) (4µL); 4: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (2µL); 5: Marcador Lambda Hind (100ng/µL) (3µL).

6.5 Confirmación de la sobre-expresión de las enzimas de interés

6.5.1 SDS-PAGE y Western Blot

Después de transfectar trofozoitos G1 de forma independiente con los plásmidos que contenían las secuencias a sobre-expresar (Glubp6spTubHApac-CT y Glrpn11spTubHApac-NT), los parásitos se seleccionaron con puromicina y se analizaron por inmunoblot para confirmar la sobre-expresión de las proteínas de interés.

En la figura 13 A se muestra el gel al 12% de SDS-PAGE, en este aunque no se visualiza un aumento en las bandas del tamaño esperado para cada proteína si se observa que en los parásitos transfectados en comparación al control aparecen bandas de diferentes tamaños que se señalan con líneas negras en la parte derecha del gel. Este gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para hacer la inmunodetección del anti-HA, en la figura 13 B se observa que para el control no se identifica ninguna banda como es de esperar, mientras que para los parásitos transfectados con Glubp6spTubHApac-CT (denominados GlUbp6sC) se identificó una banda de 58 KDa que corresponde con el tamaño esperado para dicha proteína (50,5KDa es el tamaño de la proteína más 7,5KDa del tag de Hemaglutinina), adicionalmente se observan dos bandas de un poco más de 45 KDa. Es posible que estas bandas sean productos de degradación pues se ha

reportado que la inmunodetección de UBP6 de levadura con un anticuerpo específico resulta en la generación de productos clivados adicionales a la banda del tamaño esperado (Park KC, *et al.* 1997).

Para los parásitos transfectados con Glrpn11spTubHApac-NT (denominados GlRpn11sN) se identificó una banda de aproximadamente 44,8 KDa que coincide que con el tamaño reportado por la base de datos para esta proteína (37,3KDa) más el ''tag'' de Hemaglutinina (7,5KDa).

Como control de carga se utilizó calmodulina (CAM), una proteína de 17 KDa de expresión constitutiva durante el ciclo de vida del parásito.

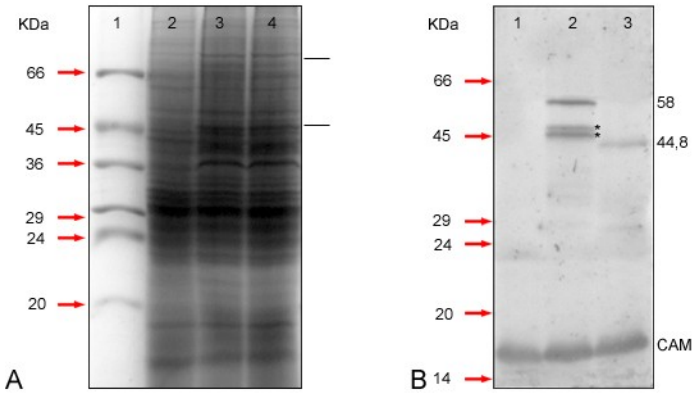


Figura 13. Confirmación de la sobre-expresión de las proteínas GlUbp6 y GlRpn11. A partir de parásitos transfectados y seleccionados se realizaron extractos de los trofozoitos completos para la inmunodetección del tag de hemaglutinina. **A)** SDS-PAGE al 12%. 1: Marcador LMW. 2: Parásitos no transfectados (G1). 3: Parásitos GlUbp6sC. 4: Parásitos GlRpn11sN. **B)** Inmunoblot del tag de HA (1:500) en extractos de trofozoitos. 1: Parásitos no transfectados (G1). 2: Parásitos GlUbp6sC. 3: Parásitos GlRpn11sN. En cada carril se sembraron 1.000.000 parásitos. Calmodulina (CAM) se usó como control de carga y se detectó con anti-gCAM (1:1000). En la parte derecha del western se señala el tamaño de cada una de las bandas visulizadas. El asterisco (*) muestra las bandas producto de degradación. Sistema de revelado estreptavidina fosfatasa alcalina (1:3000) y NBT/BCIP.

6.5.2 Inmunofluorescencia

Los parásitos control, G1, y los que estaban sobre expresando las proteínas de interés se visualizaron por inmunofluorescencia utilizando el anti-HA. Las imágenes de fluorescencia se tomaron en el microscopio Confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti utilizando el objetivo de 60X.

Durante la realización de los experimentos se utilizaron dos controles, uno en el que parásitos G1 no transfectados era sometidos al tratamiento completo, utilizando la misma concentración de anticuerpo primario que con los transformados, y parásitos que estaban sobre-expresando las proteínas pero en lugar de anti-HA se utilizó PBS. Ambos controles permitieron verificar que la

señal observada era específica y que solo se estaba generando en parásitos transfectados por inmunodetección de la hemaglutinina (resultados no mostrados).

En los parásitos GlUbp6sC se visualizó una distribución granular para GlUBP6 en el citoplasma de los parásitos, con una mayor concentración hacia la parte posterior (Figura 14 C, flecha blanca). No se observó co-localización con DAPI, lo cual muestra que no se ubica en los núcleos del parásito (Figura 14 D). En los campos visualizados se encontraron parásitos de mayor tamaño que tienden a perder la forma de pera y a hacerse más redondos (Figura 14 A y C, la punta de flecha señalan los parásitos que han perdido su forma de pera), estos al parecer presentan una mayor intensidad de la fluorescencia. También es evidente que todos los parásitos no sobre-expresan la proteína en la misma proporción, esto por los niveles de fluorescencia visualizados.

Los parásitos GlRpn11sN mostraron que la localización de la proteína también es citoplasmática pero se ubica en agregados granulares más definidos (Figura 15 C, flecha blanca), en algunos parásitos se concentra en la parte lateral posterior de los trofozoitos (Figura 15 C, La punta de flecha señala la parte lateral de los parásitos donde hay una mayor acumulación de la proteína) y se observa una menor cantidad en la parte anterior de los parásitos. No se observó inmunolocalización nuclear. La mayoría de los parásitos visualizados presentan un alto nivel de fluorescencia, aunque también se observaron parásitos que tienden a perder la forma característica de pera.

Diferentes estudios han mostrado que la localización del proteosoma en la célula depende del tipo de célula y de la etapa del ciclo celular en la que se encuentre (Peters JM, *et al.* 1994). En *Giardia* no se tiene información sobre la distribución a nivel celular del complejo proteosomal.

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha estudiado la localización de la proteína RPN11 fusionada a GFP (green fluorescent protein) y se ha observado que la proteína se ubica esencialmente en el citoplasma de forma no uniforme, lo cual ha sugerido asociación con estructuras citoplasmáticas (Rinaldi T, *et al.* 1998). Aunque en los trofozoitos de *Giardia* se observa una localización similar, es necesario utilizar anticuerpos específicos para estructuras citoplasmáticas del parásito y de esta forma establecer si en realidad existe algún tipo de asociación con organelos del citoplasma. Estudios de Ubp6-GFP en *S. cerevisiae* han mostrado que la localización de la proteína es nuclear, contario a lo que nosotros reportamos para la localización de la proteína en el estadio vegetativo de *Giardia*.

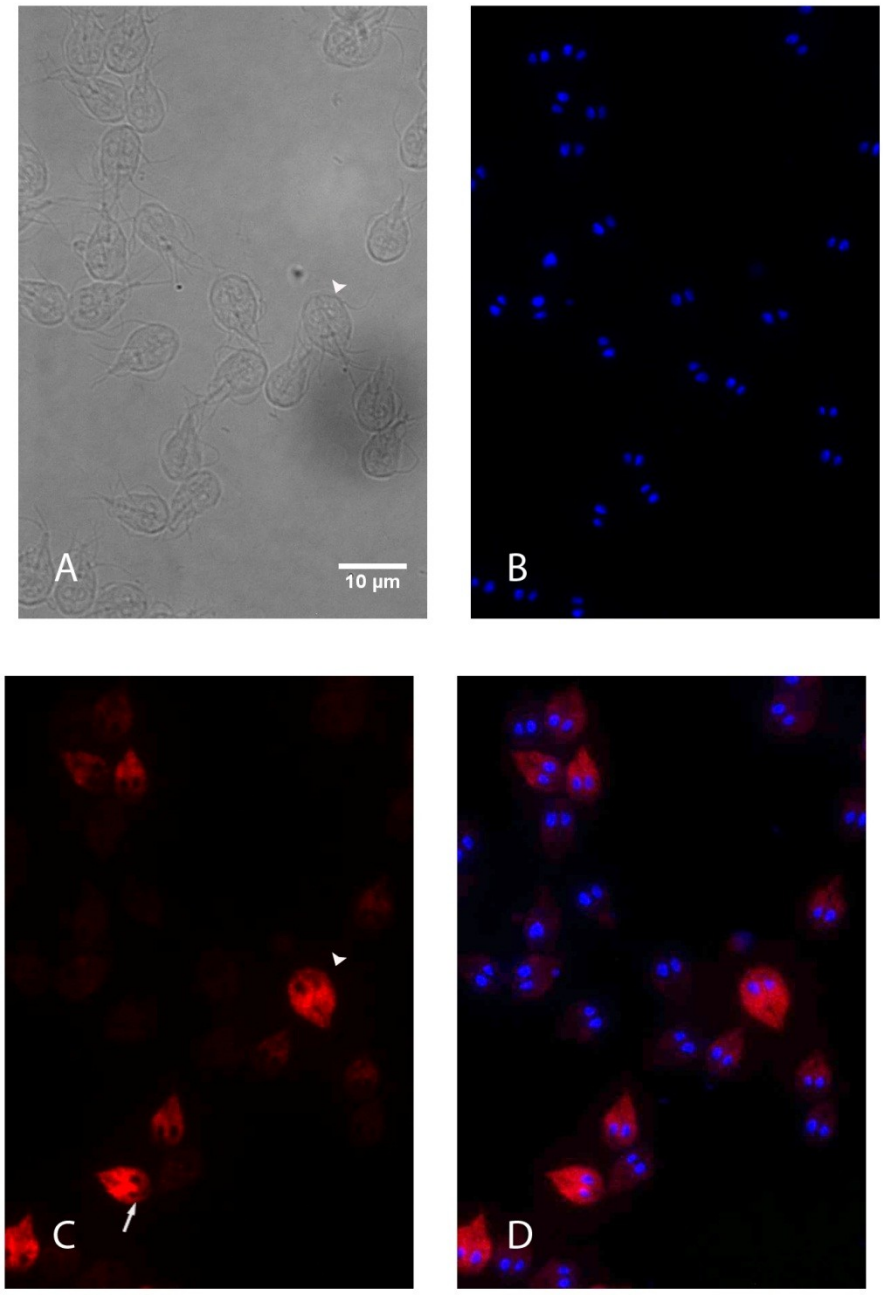


Figura 14. Inmunolocalización de GlUBP6 en trofozoitos que sobre-expresan la proteína. La región codificante completa del gen *GlUbp6* fue clonada en el vector pTubHApacCT, se transfectaron trofozoítos G1 con el constructo generado, Glubp6spTubHApac-CT. **A)** (DIC) Microscopía de luz. **B)** Inmunofluorescencia con DAPI (1:7000). El DAPI es una tinción fluorescente que se une a las regiones ricas en ADN, por esta razón se están marcando los dos núcleos del parásito. **C)** Inmunofluorescencia con Anti-HA (1:1000). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón marcado con el fluoróforo Alexa 594 (Invitrogen), cuyo color de emisión es el rojo. **D)** Sobre posición de la imagen B y C. La flecha blanca señala la distribución de la proteína hacia la parte posterior del parásito. Las puntas de flecha señalan los parásitos que han perdido su forma de pera. Todas las fotos corresponden a un mismo campo y fueron tomadas con un objetivo de 60X. La escala corresponde a 10 µm.

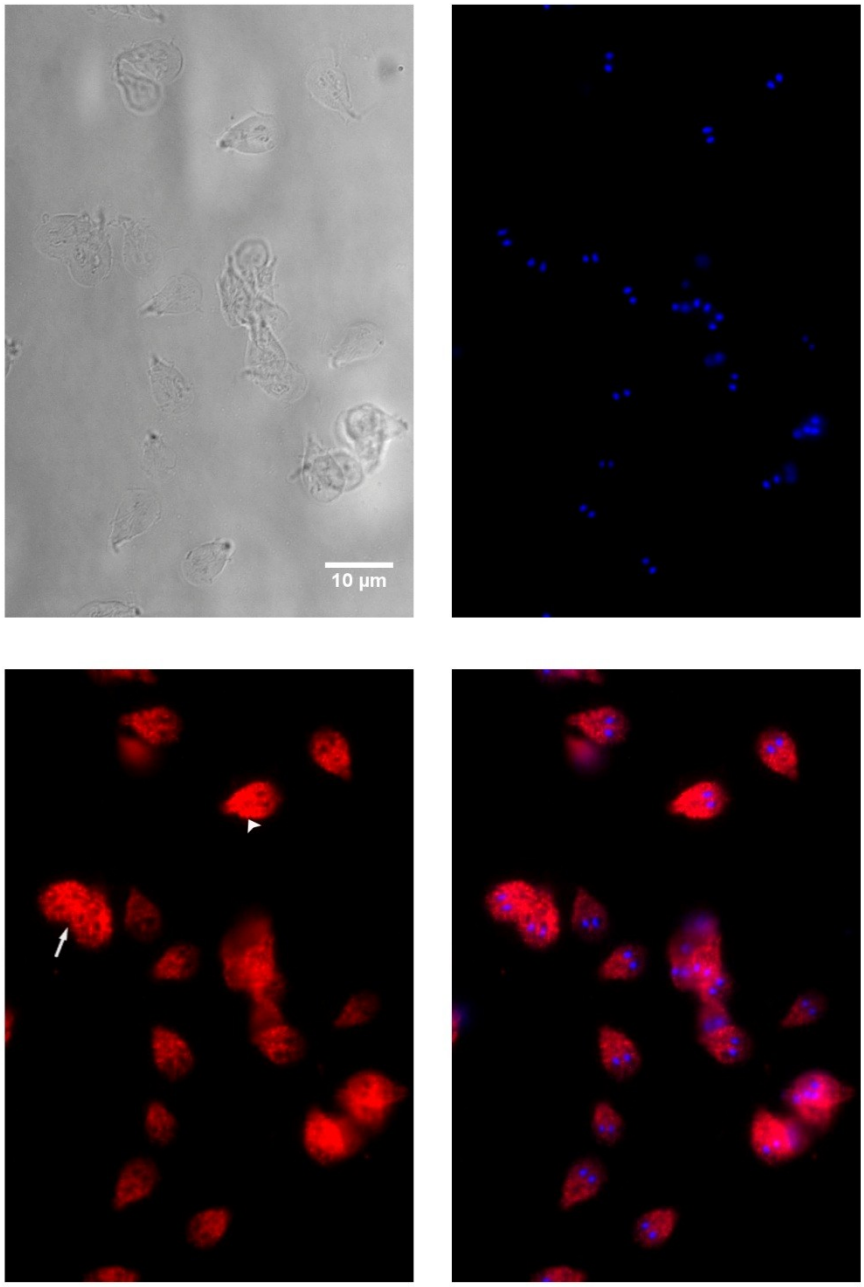


Figura 15. Inmunolocalización de GlRPN11 en trofozoitos que sobre-expresan la proteína. La región codificante completa del gen *Glrpn11* fue clonada en el vector pTubHApacNT, se transfectaron trofozoítos G1 con el constructo generado, Glrpn11spTubHApac-NT. **A)** (DIC) Microscopía de luz. **B)** Inmunofluorescencia con DAPI (1:7000). **C)** Inmunofluorescencia con Anti-HA (1:500). **D)** Sobre posición de la imagen B y C. La flecha blanca señala la distribución granular de la proteína. La punta de flecha señala la parte lateral de los parásitos donde hay una mayor acumulación de la proteína. Todas las fotos corresponden a un mismo campo y fueron tomadas con un objetivo de 60X. La escala corresponde a 10 µm.

6.6 Confirmación del silenciamiento de las enzimas de interés

6.6.1 Extracción de ARN

Para el éxito de los experimentos de RT-PCR y qRT-PCR es de gran importancia la calidad del ARN obtenido. Se realizó la extracción de ARN de parásitos G1, GlUbp6iN y GlRpn11 (trasnfectados con los plásmidos Glubp6ipTubHApac-NT y Glrpn11ipTubHApac-NT respectivamente), en la tabla 6 se observa el número de parásitos del que se partió y la concentración del ARN obtenido utilizando el método del Trizol, referenciado en el numeral 5.7.1. Después del tratamiento con la ADNasa se visualizó en un gel de agarosa del 1% (Figura 16) donde se observó que la cuantificación del ARN es adecuada y que él está en buenas condiciones. El ARN se utilizó como plantilla en una reacción de PCR para confirmar la correcta acción de la enzima y la pureza del ARN (resultados no mostrados). Luego el ARN se cuantificó por espectrofotometría.

Tabla 6. Concentración de ARN extraído a partir de parásitos control y transfectados. En la tabla se muestra la concentración de ARN (ng/µL) obtenido a partir de trozoitos control y trasnformados con los plásminos para el silenciamiento de cada una de las enzimas. Tanto los parásitos control como los transfectados con cada plásmido fueron recolectados al mismo tiempo, de igual forma se realizó la extracción de ARN.

Trofozoitos	Número de células	Concentración ARN (ng/µL)
G1 (control)	101.250.000	584,4
G1 (GlUbp6ipTubNT)	41.250.000	362,4
G1 (GlRpn11ipTubNT)	66.990.000	273,6

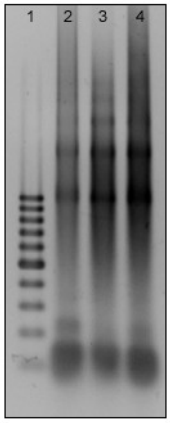


Figura 16. Visualización del ARN. Visualización del ARN extraído a partir de trofozoitos control (G1) y transfectados. Gel de agarosa del 1%. 1: Marcador 100 pb. 2: ARN G1. 3: ARN GlUbp6iN. 4 ARN GlRpn11iN. De todos los ARN se cargaron 1000 ng. .

6.6.2 RT-PCR

Después de la obtención de un ARN de buena calidad se hicieron algunos ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados para amplificar los fragmentos del silenciamiento. Se utilizaron 40 ng de ARN como plantilla y el perfil térmico del item 5.2.2. Se amplificaron las secuencias sentido y

anti-sentido para el mARN de GlUbp6 y GlRpn11 a partir de ARN de parásitos control (G1) y parásitos en los que se estaban silenciando estos genes (GlUbp6iN y GlRpn11iN). En la figura 17 se muestran los resultados, en el caso de GlUbp6 (Figura 17 A, parte superior) se observa que hay gran cantidad de mARN anti-sentido en los tres tipos de parásitos aunque es mayor la cantidad en los que fueron silenciados para este gen; en el caso del mARN sentido no se observa una diferencia visual considerable. Para GlRpn11 se visualiza una mayor cantidad de mARN anti-sentido en los parásitos silenciados para este gen (Figura 17 B, parte superior), mientras que para los mARN sentido se observa que hay menos en los parásitos silenciados.

Aunque con este experimento es difícil establecer si hubo silenciamiento o no y en que proporción por la sensibilidad de la técnica, si se observa una importante producción de mARN anti-sentido en los parásitos silenciados; la presencia de secuencias anti-sentido en las tres clases de parásitos claramente refleja que en el transcriptoma del parásito hay abundancia de estos transcritos (Elmendorf HG, *et al.* 2001), los cuáles han sido relacionados en procesos como la variación antigénica donde la expresión de VSP al parecer se ve regulada por la acción de maquinaria que participa en el procesamiento de ARN de interferencia (Prucca CG, *et al.* 2008).

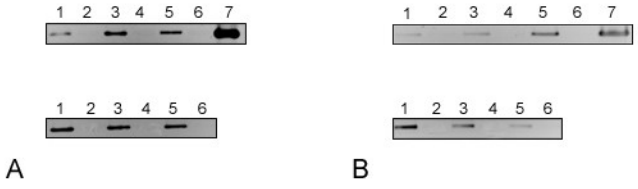


Figura 17. Visualización del ensayo de RT-PCR. A) Ensayo RT-PCR para GlUbp6. En la parte superior se observa la amplificación de las secuencias anti-sentido. **1:** G1. **2:** Negativo G1. **3:** GlUbp6iN. **4:** Negativo GlUbp6iN. **5:** GlRpn11iN. **6:** Negativo GlRpn11iN. **7:** Control positivo. En la parte inferior se observa la amplificación de las secuencias sentido. **1:** G1. **2:** Negativo G1. **3:** GlUbp6iN. **4:** Negativo GlUbp6iN. **5:** GlRpn11iN. **6:** Negativo GlRpn11iN. El tamaño del producto esperado son 522 pb, ya que se utilizaron los oligonucleotidos para el silenciamiento de GlUbp6. **B)** Ensayo RT-PCR para GlRpn11. En la parte superior se observa la amplificación de las secuencias anti-sentido. **1:** G1. **2:** Negativo G1. **3:** GlUbp6iN. **4:** Negativo GlUbp6iN. **5:** GlRpn11iN. **6:** Negativo GlRpn11iN. **7:** Control positivo. En la parte inferior se observa la amplificación de las secuencias sentido. **1:** G1. **2:** Negativo G1. **3:** GlUbp6iN. **4:** Negativo GlUbp6iN. **5:** GlRpn11iN. **6:** Negativo GlRpn11iN. El tamaño del producto esperado son 522 pb, ya que se utilizaron los oligonucleotidos para el silenciamiento de GlRpn11. En cada pozo se sembraron 3µL de muestra.

6.6.3 qRT-PCR

Para la realización de los ensayos de RT-PCR en tiempo real se construyeron curvas de calibración a partir de los plásmidos en pGemT (Glubp6pGemT y Glrpn11pGemT) que fueron extraidos con el kit Wizard® *Plus* Minipreps DNA purification System (Promega) que se explica en el numeral 5.7.3.3. Los plásmidos se cuantificaron por espectrofotometría y con estos se realizaron diluciones seriadas que se utilizaron para la construcción de las curvas de calibración que se corrieron de forma simultanea con muestras de cADN sintetizado a partir del ARN de parásitos control y silenciados.

En la tabla 7 se muestra la concentración del stock de plásmidos utilizados para la construcción de las curvas de calibración.

Tabla 7. Concentración de ADN de plásmido. Cada ADN plasmídico extraído se cuantifico por el método espectrofotométrico. Se detalla el tamaño del plásmido, la relación de absorbancias obtenida y la concentración calculada.

Gen	Tamaño vector + inserto (pb)	Relación $A_{260/280}$	Concentración (ng/µL)	Concentración (No. Copias/µL)
GlUbp6	4414	1,35	268	7,80E+10
GlRpn11	4045	1,14	327,5	7,51E+10

6.6.3.1 Curvas de calibración

Después de hacer ensayos preliminares con diluciones de los plásmidos, se seleccionaron algunas teniendo en cuenta el Ct (Cycle threshold) en el cual amplificaban los cADNs de interés. Para la realización de las curvas cada estándar se corrió por duplicado junto con dos controles negativos. A continuación se muestran las curvas de calibración para cada uno de los genes de interés.

- *GlUbp6*

Para la realización de la curva de calibración del gen *GlUbp6* se incluyeron diluciones que van desde 7,80E+08 hasta 7,80E+04 número de copias/µL. En la tabla 8 se muestra las concentraciones utilizadas, los valores de Ct para cada muestra y el promedio de los duplicados, el cual fue utilizado para la curva de calibración.

Tabla 8. Diluciones de GlUbp6pGemT utlizadas en la curva de calibración. Se muestran la concentración para cada dilución, así como los valores de Ct obtenidos y el promedio de los mismos.

Concentración (Número de copias/µL)	Ct	Ct	Promedio Ct
7,80E+08	12,16	12,47	12,32
7,80E+06	22,42	20,38	21,40
7,80E+05	26,99	26,99	26,99
7,80E+04	31,47	31,28	31,38

En la figura 18 se muestra la gráfica de amplificación para los cuatro estándares junto con la recta de calibración. La ecuación deducida de la recta se muestra en la figura 18 B.

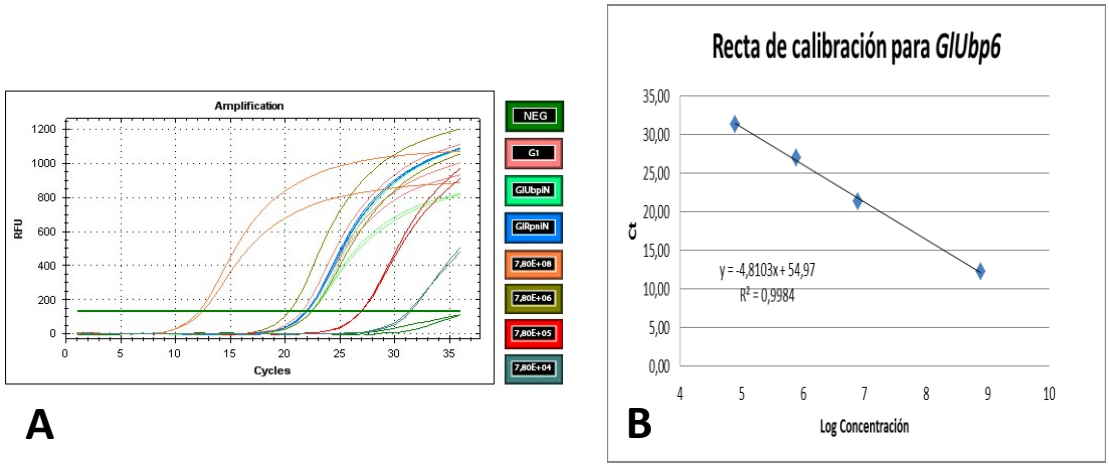


Figura 18. Curvas de amplificación y recta de calibración para *GlUbp6*. A) Gráfica de amplificación de los cuatro estándares y el control negativo, cada uno por duplicado. **B)** Recta de calibración construida a patir de cuatro estándares.

- *GlRpn11*

Para la realización de la curva de calibración del gen *GlRpn11* se incluyeron diluciones que van desde 7,51E+08 hasta 7,51E+04 número de copias/µL. En la tabla 9 se muestra las concentraciones utilizadas, los valores de Ct para cada muestra y el promedio de los duplicados, el cual fue utilizado para la curva de calibración.

Tabla 9. Diluciones de GlRpn11pGemT utlizadas en la curva de calibración. Se muestran la concentración para cada dilución, así como los valores de Ct obtenidos y el promedio de los mismos.

Concentración (Número de copias/µL)	Ct	Ct	Promedio Ct
7,51E+08	7,53	9,05	8,29
7,51E+07	13,73	13,76	13,75
7,51E+06	18,12	18,07	18,10

7,51E+05	24,18	24,42	24,30
7,51E+04	26,58	28,9	27,74

En la figura 19 se muestra la gráfica de amplificación de los estándares de la curva y la recta de calibración con su ecuación.

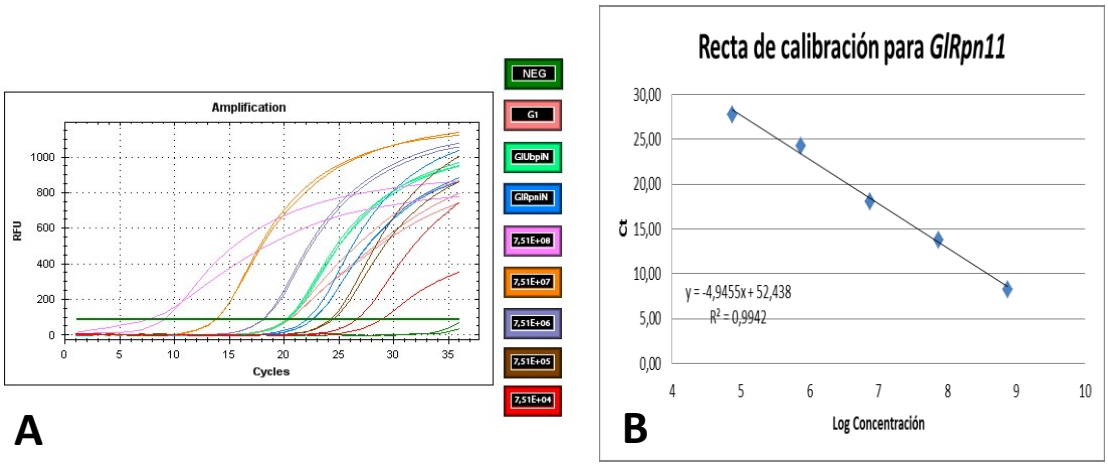


Figura 19. Curvas de amplificación y recta de calibración para *GlRpn11*. A) Gráfica de amplificación de los cuatro estándares y el control negativo, cada uno por duplicado. **B)** Recta de calibración construida a patir de cinco estándares.

6.6.3.2 PCR en tiempo Real sobre cADN

A partir del ARN extraído de parásitos control y de los transfectados con fragmentos anti-sentido para el silenciamiento de las enzimas se sintetizó cADN mediante la reacción de transcripción reversa, estos cADNs fueron producidos al mismo tiempo y a partir de 1 µg de ARN. Para los ensayos de PCR en tiempo real se tomaron 4 µL de una dilución 1:10.

Antes de correr todo el experimento se hicieron ensayos previos con 20 y 50 ng de cADN para determinar cuál era la cantidad necesaria para realizar los ensayos, se seleccionó 20 ng como la cantidad a utilizar ya que no mostró muchas diferencias en los valores de Ct, al gastarse menor cantidad de plantilla fue seleccionada. Cada cADN fue corrido por triplicado y al mismo tiempo que su respectiva curva de calibración.

Mediante las curvas de melting generadas se pudo confirmar que sólo se estaba amplificando el producto de interés (Anexo 2).

- *GlUbp6*

En la tabla 10 se muestran los valores de Ct obtenidos para cada cADN y los cálculos que se realizaron para la obtención del número de copias/ng de ARN para los parásitos control (G1) y los silenciados (GlUbp6iN y GlRpn11iN). Para los parásitos GlUbpiN se observó que con respecto al control hubo un silenciamiento de alrededor del 24% (Figura 20), no se observaron cambios considerables en el número de copias/µL entre el control (G1), 1,56E+06, y los parásitos GlRpn11iN, 1,46E+06, esto muestra que el silenciamiento del gen *Glrpn11* no está afectando los niveles de expresión de *Glubp6*.

Tabla 10. Cuantificación del transcrito del gen GlUbp6. La cuantificación se realizó en trofozoitos de parásitos G1 y transfectados para el silenciamiento de GlUbp6 y GlRpn11. Cada punto se hizo por triplicado. Se muestra el valor de Ct y el número de copias calculado a partir de la ecuación de la recta de calibración.

Muestra	Log Q	CT	No. Copias/µL	No. Copias/µL de cADN	No. Copias/µg ARN	No. Copias/ng ARN	Promedio (No. Copias/ng ARN)	Desviación Estándar (No. Copias/ng ARN)
G1	6,95	21,52	8,99E+06	8,99E+07	1,80E+09	1,80E+06	**1,56E+06**	**2,10E+05**
G1	6,85	22,01	7,11E+06	7,11E+07	1,42E+09	1,42E+06		
G1	6,86	21,97	7,25E+06	7,25E+07	1,45E+09	1,45E+06		
GlUbp6iN	6,77	22,41	5,87E+06	5,87E+07	1,17E+09	1,17E+06	**1,18E+06**	**3,11E+04**
GlUbp6iN	6,76	22,46	5,73E+06	5,73E+07	1,15E+09	1,15E+06		
GlUbp6iN	6,78	22,35	6,04E+06	6,04E+07	1,21E+09	1,21E+06		
GlRpn11iN	6,87	21,92	7,42E+06	7,42E+07	1,48E+09	1,48E+06	**1,46E+06**	**5,77E+04**
GlRpn11iN	6,84	22,06	6,94E+06	6,94E+07	1,39E+09	1,39E+06		
GlRpn11iN	6,87	21,91	7,46E+06	7,46E+07	1,49E+09	1,49E+06		

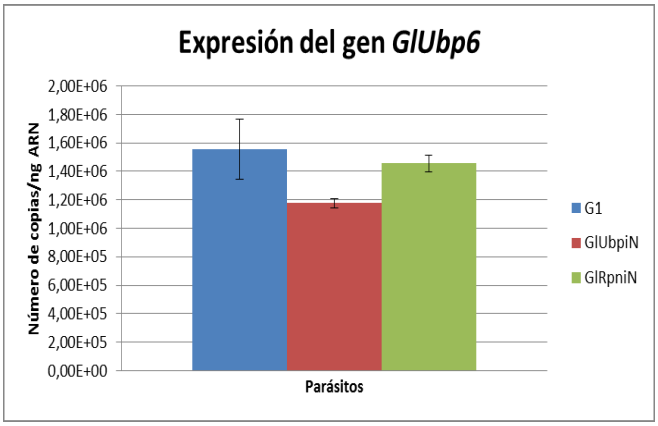


Figura 20. Cuantificación del mARN de GlUbp6. La cuantificación se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos se procesaron manualmente a partir de los valores de Ct registrados por el software CFX Manager versión 1.6 (Bio-Rad). El transcrito para los tres tipos de parásitos (señalados cada uno con un color diferente) es expresado en número de copias por ng de ARN. La desviación estándar se muestra mediante las barras.

- *GlRpn11*

En la tabla 11 se muestran los valores de Ct obtenidos para cada cADN y los cálculos para la obtención del número de copias/ng de ARN para los parásitos control (G1) y los silenciados para el gen *Glubp6* y *Glrpn11*. Se observó un silenciamiento de alrededor del 61% para los parásitos GlRpniN en la expresión del gen *Glrpn11* con respecto a los parásitos control (figura 21). Al parecer el silenciamiento de *Glubp6* no está afectando la expresión de *Glrpn11*.

Tabla 11. Cuantificación del transcrito del gen *GlRpn11*. La cuantificación se realizó en trofozoitos de parásitos G1 y transfectados para silenciar GlUbp6 y GlRpn11. Cada punto se hizo por triplicado. Se muestra el valor de Ct y el número de copias calculado a partir de la ecuación de la recta de calibración.

Muestra	Log Q	CT	No. Copias/µL	No. Copias/µL de cADN	No. Copias/µg ARN	No. Copias/ng ARN	Promedio (No. Copias/ng ARN)	Desviación Estándar (No. Copias/ng ARN)
G1	6,47	20,45	2,94E+06	2,94E+07	5,88E+08	5,88E+05	**6,10E+05**	**3,58E+04**
G1	6,47	20,44	2,95E+06	2,95E+07	5,90E+08	5,90E+05		
G1	6,51	20,23	3,26E+06	3,26E+07	6,51E+08	6,51E+05		
GlUbp6	6,52	20,18	3,33E+06	3,33E+07	6,66E+08	6,66E+05	**6,48E+05**	**2,16E+04**
GlUbp6	6,49	20,32	3,12E+06	3,12E+07	6,24E+08	6,24E+05		
GlUbp6	6,51	20,22	3,27E+06	3,27E+07	6,54E+08	6,54E+05		
GlRpn11	6,05	22,54	1,11E+06	1,11E+07	2,22E+08	2,22E+05	**2,38E+05**	**3,33E+04**
GlRpn11	6,14	22,07	1,38E+06	1,38E+07	2,76E+08	2,76E+05		
GlRpn11	6,03	22,6	1,08E+06	1,08E+07	2,16E+08	2,16E+05		

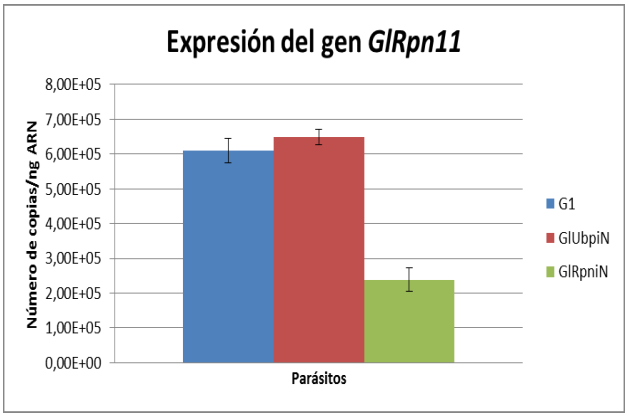


Figura 21. Cuantificación del mARN de GlRpn11. La cuantificación se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos se procesaron manualmente a partir de los valores de Ct registrados por el software CFX Manager versión 1.6 (Bio-Rad). El transcrito para los tres tipos de parásitos (señalados cada uno con un color diferente) es expresado en número de copias por ng de ARN. La desviación estándar se muestra mediante las barras.

Para *Glubp6* y *Glrpn11* los resultados de este experimento y los de RT-PCR (numeral 6.6.2) confirman que los dos genes se trasnscriben en los trofozoitos de *G. intestinalis*, por lo cual aunque no se conoce si las proteínas se están expresando si se puede pensar que pueden llegar a ser importantes para mantener la homeostasis de ubiquitina en este estadío del parásito.

El ensayo de RT-PCR en tiempo real permitió verificar el silenciamiento para *Glubp6* y *Glrpn11* generado por la transfección con secuencias anti-sentido para cada uno de los genes, además se mostró que el silenciamiento de un gen no está afectando la expresión del otro. A partir de los resultados obtenidos también se observó que es mayor la expresión de *Glubp6* con 1,56E+06 número de copias/ng de ARN en comparación a *Glrpn11* con 6,10E+05 número de copias/ ng de ARN, a pesar de que para el primer gen se detectó una mayor cantidad de mARN anti-sentido en los parásitos control, G1 (figura 17 A, pozo 1 imagen superior y figura 17 B, pozo 1 imagen superior).

6.7 Cambios morfológicos y de crecimiento en los parásitos transfectados

Al obtener transfectantes viables que sobre-expresión y silencian a ubp6 y rpn11, quisimos evaluar si en comparación a los parásitos control (G1 no transfectados con ningún vector) había algún cambio visible en el crecimiento o en la morfología de los trofozoitos. Para esto se realizaron ensayos específicos que permitieran responder estas preguntas.

6.7.1 Ensayo de crecimiento

En el ensayo de crecimiento se pusieron 6 inóculos para cada clase de parásitos, tres se contaron a las 24 horas y los otros tres a las 48 horas. A partir de estos triplicados se saco un promedio, el cual se muestra para cada tipo de parásito evaluado en la figura 22. En esta figura se puede observar que los parásitos tienen la misma tendencia de crecimiento a las 24 y 48 horas, en este último periodo de tiempo se observa que que es más marcada la tendencia entre parásitos RpnsN y RpniN, lo cual podría deberse a que en estos últimos el silenciamiento fue mayor al 50%.

Los datos ontenidos se analizaron con la prueba no paramétrica de Friedman trabajando con la siguiente hipótesis nula (H_o): No hay diferencias en las distribuciones para los tratamientos en el tiempo. Aquí distribuciones hacen referencia al crecimiento de una población a lo largo del tiempo y los tratamientos se refieren a los parásitos control (G1 no trasnfectados) y a los transfectados con los diferentes plásmidos (Glubp6spTubHApac-CT, Glrpn11spTubpacHA-NT, Glubp6ipTubpacHA-NT, Glrpn11ipTubpacHA-NT). Con la aplicación de este test y utilizando un α de 0,05 no se rechazó H_o, es decir que no se encontraron diferencias significativas en los crecimientos de las poblaciones a lo largo del tiempo entre los parásitos control y los transformantes.

Para cada uno de los parásitos evaluados se hizo el cálculo del número de duplicaciones y tiempo de duplicación (tabla12), estos resultados muestran la misma tendencia de los datos de la figura 22.

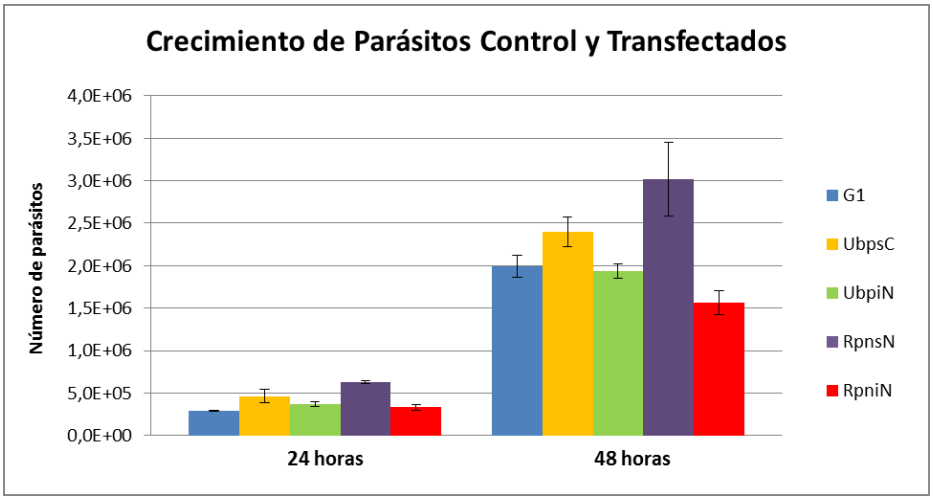


Figura 22. Crecimiento de parásitos control y transfectados. En la gráfica se visualiza el promedio de los conteos realizados para cada tipo de parásitos junto con la desviación estándar de los datos obtenidos. Los conteos se realizaron a las 24 (24 h) y 48 horas (48 h).

Tabla 12. Número de duplicaciones y tiempo de duplicación para los parásitos control y los transfectados. En la primera columna se observan los diferentes tipos de parásitos evaluados, las duplicaciones y tiempo de duplicación se calcularon para las 24 y 48 horas.

	Horas	Duplicaciones	Tiempo Duplicación
G1	24	1,54	15,56
	48	4,32	11,12
UbpsC	24	2,21	10,84
	48	4,58	10,47
UbpiN	24	1,87	12,81
	48	4,27	11,23
RpnsN	24	2,65	9,05
	48	4,91	9,77
RpniN	24	1,73	13,91
	48	3,97	12,10

6.7.2 Visualización de cambios morfológicos

Para visualizar la morfología de los parásitos control y de los transfectados se utilizó la tinción de Giemsa la cual es utilizada para diferenciar la morfología nuclear y citoplasmática de diferentes tipos de células incluyendo parásitos.

Los parásitos control (Figura 23A) conservan su morfología clásica, en forma de pera, y en estos se visualizaron claramente sus flagelos, núcleos y cuerpos medios. Por el contrario en los parásitos transformados (Figura 23 B, C, D y E) aunque hay algunos que son como los del control, otros se visualizan mucho más redondos y con núcleos de mayor tamaño (Figura 23 B, C, D y E, punta de flecha). Esto podría claramente indicar que la sobre-expresión y el silenciamiento de Glubp6 y Glrpn11 está afectando algunos procesos metabólicos en el estadio vegetativo de los parásitos, aunque no se encontraron diferencias significativas en los crecimientos de las poblaciones a lo largo del tiempo (24 y 48 horas) entre los parásitos control y los transformantes, sería interesante evaluar esto a más de 48 horas.

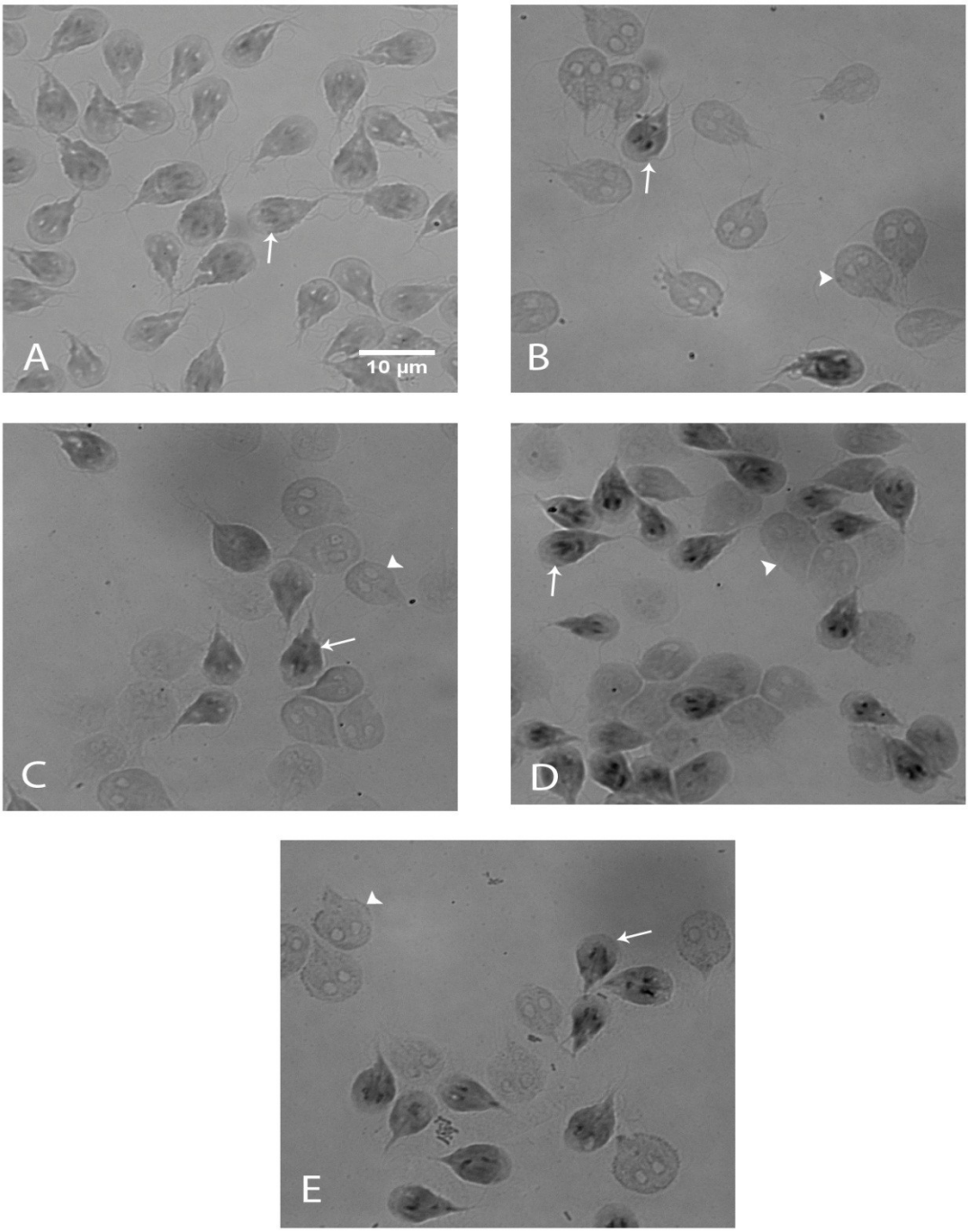


Figura 23. Morfología de parásitos control y transfectados. Los parásitos se tiñeron con Giemsa. **A)** Parásitos G1. **B)** Parásitos GlUbp6sC. **C)** Parásitos GlUbp6iN**. D)** Parásitos GlRpn11sN. **E)** Parásitos GlRpn11iN. Las flechas blancas señalan parásitos con la morfolofía normal. La punta de flecha señala los parásitos cuya morfología se ha visto afectada, son más redondos y de mayor tamaño. Todas las fotos fueron tomadas con DIC, objetivo de 60X. La escala corresponde a 10 µm.

7. CONCLUSIONES

A partir de las dos candidatas a enzimas deubiquitinadoras seleccionadas, *Glubp6* y *Glrpn11,* se puede concluir que si se están expresando sus transcritos durante el estadio vegetativo del parásito, por lo cual se puede pensar que podrían llegar a ser elementos importantes para la homeostasis de Ubiquitina en el mismo.

Se obtuvieron transfectantes viables que sobre-expresan y silencian ambos genes, de la sobre-expresión y el silenciamiento se puede concluir que ambas fueron exitosas. A partir de los parásitos que sobre-expresan las proteínas se puede inferir una localización en agregados citoplasmáticos para ambas proteínas. Es más clara la localización en forma granular, concentrada hacia la parte lateral posterior de los trofozoitos, para GlRPN11.

Con el ARN interferente se lograron silenciar los dos genes, *GlUbp6 y GlRpn11*, siendo mayor el silenciamiento para este último. El silenciamiento de cada uno de los genes no afectó los niveles de transcripción del otro.

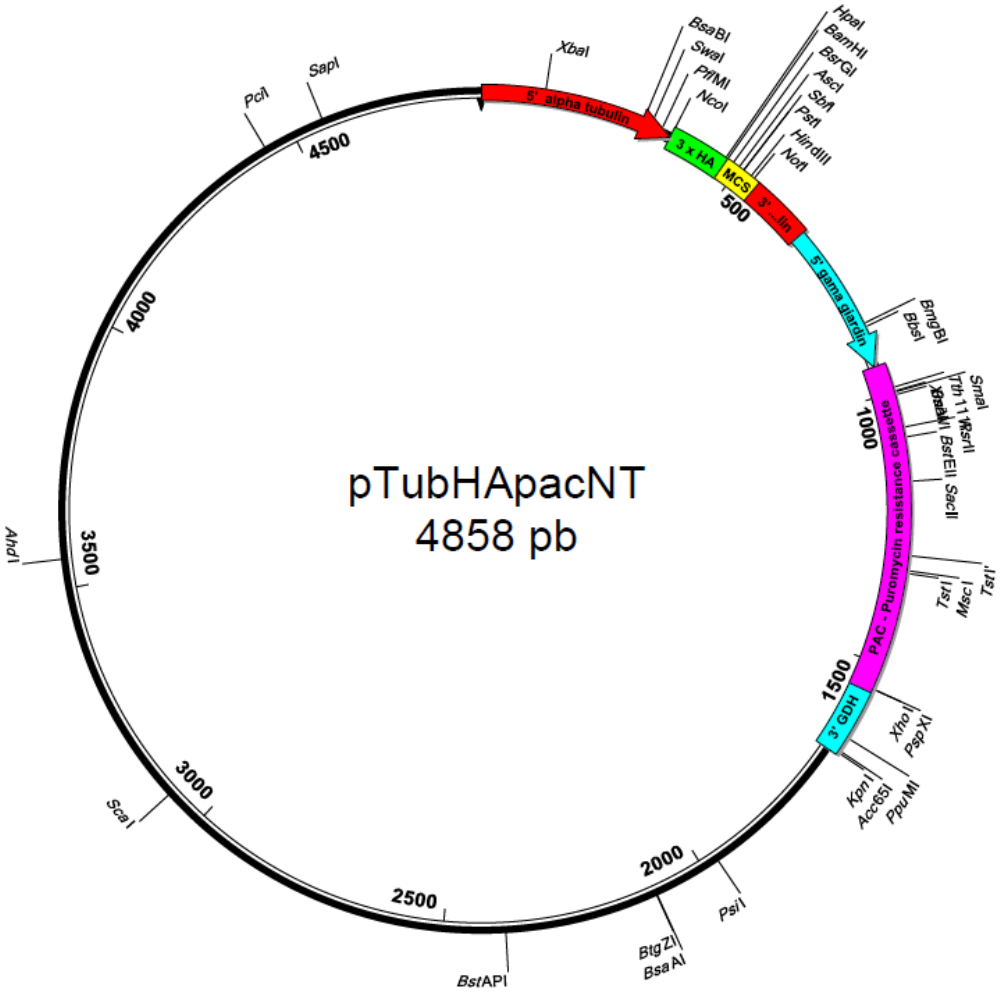
Del ensayo de crecimiento para los parásitos se pudo concluir que no hay diferencias significativas en los crecimientos de las poblaciones a lo largo del tiempo (24 y 48 horas) entre los parásitos control y los transformantes. Aunque si es evidente que hay cambios morfológicos representados en el cambio de forma y aumento de tamaño de los parásitos.

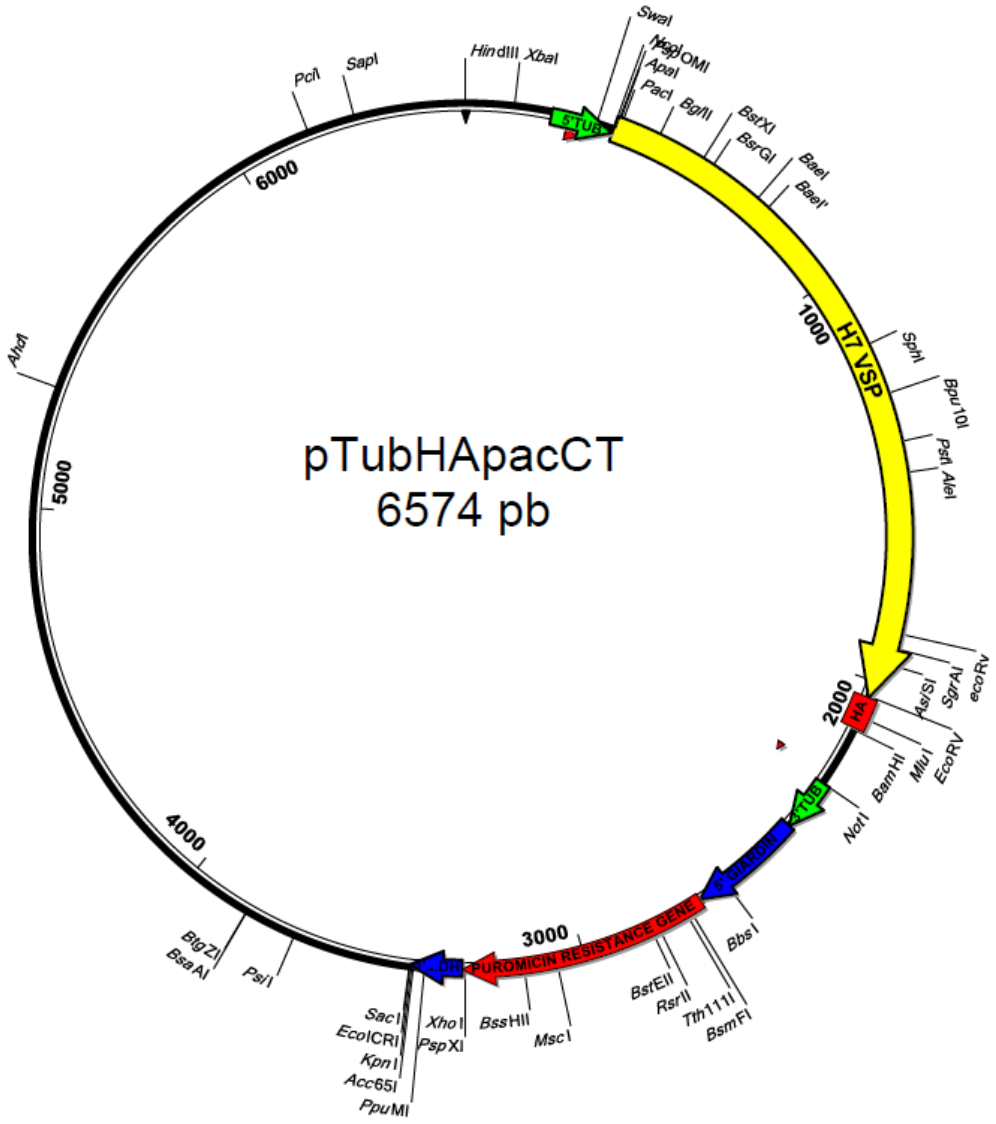
Este trabajo es la primera evidencia de enzimas deubiquitinadoras de la familia JAMM en *G. intestinalis.*

8. ANEXOS

ANEXO 1

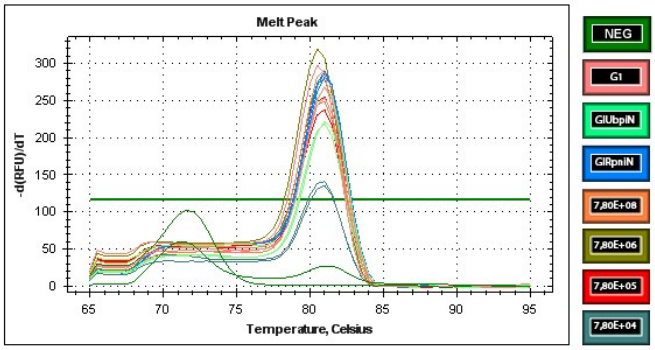
Diagrama de los vectores pTubHApac



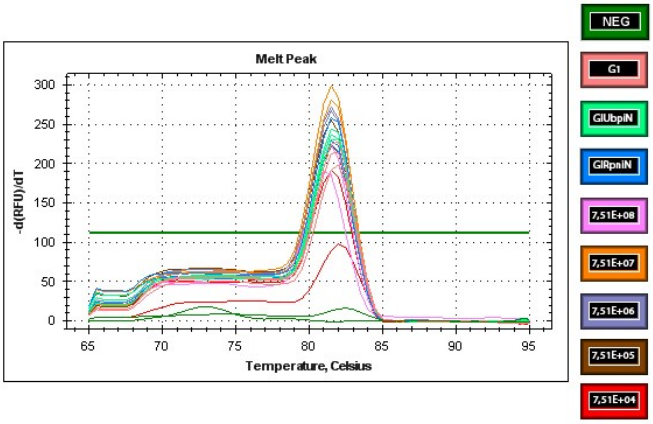

pTubHApacCT
6574 pb
1000
2000
3000
4000
5000
6000
H7 VSP
HA
5'TUB
3'TUB
5'ETARGIN
PUROMICIN RESISTANCE GENE
..bla
SwaI
NaeI
OMI
ApaI
PacI
BglII
BstXI
BsrGI
BaeI
BaeI'
SphI
Bpu10I
PstI
AleI
AsiSI
SgrAI
ecoRV
BamHI
MluI
EcoRV
NotI
BbsI
BstEII
RsrII
Tth111I
BsmFI
BssHII
MscI
XhoI
PspXI
SacI
EcoICRI
KpnI
Acc65I
PpuMI
BtgZI
BsaAI
PsiI
AhdI
PciI
SapI
HindIII
XbaI

ANEXO 2

Curvas de Melting



Curva de Melting para Ubp. Se incluyen las muestras de los parásitos silvestres (G1), silenciados (GlUbpiN y GlRpniN) y todas las diluciones de los estándares que se evaluaron.



Curva de Melting para Rpn. Se incluyen las muestras de los parásitos silvestres (G1), silenciados (GlUbpiN y GlRpniN) y todas las diluciones de los estándares que se evaluaron.

9. BIBLIOGRAFÍA

Adam, R. (2001). Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev., 14*(3), 447-75.

Alvarado, M., & Wasserman, M. (2010). Analysis of phosphorylated proteins and inhibition of kinase activity during Giardia intestinalis excystation. *Parasitol Int, 59*(1), 54-61.

Ambroggio, X., Rees, D., & Deshaies, R. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol, 2*(1), E2.

Amerik, AY., & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta, 1695*(1-3), 189-207.

Amerik, AYu., Swaminathan, S., Krantz, B., Wilkinson, K., & Hochstrasser, M. (1997). In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J, 16*(16), 4826-38.

Bernander, R., Palm, J., & Svärd, S. (2001). Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle. *Cell Microbiol, 3*(1), 55-62.

Castellanos, I. (2009). *Implementación de una metodoogía in silico usando el modelo oculto de Markov para la identificación de proteínas en el mecanismo de señalización con ubiquitina en el sistema Ubiquitina-Proteosoma en el parásito Giardia intestinalis.* Bogotá D.C: Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Catic, A., & Ploegh, H. (2005). Ubiquitin--conserved protein or selfish gene? *Trends Biochem Sci, 30*(11), 600-4.

Catic, A., Sun, Z., Ratner, D., Misaghi, S., Spooner, E., Samuelson, J., y otros. (2007). Sequence and structure evolved separately in a ribosomal ubiquitin variant. *EMBO J, 26*(14), 3474-83.

Chernova, T., Allen, K., Wesoloski, L., Shanks, J., Chernoff, Y., & Wilkinson, K. (2003). Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *J Biol Chem, 278*(52), 52102-15.

Clague, M., & Urbé, S. (2006). Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol, 16*(11), 551-9.

Daniel, J., & Grant, P. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat Res, 618*(1-2), 135-48.

Dolezal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubácová, Z., Bursać, D., Suták, R., y otros. (2005). Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(31), 10924-9.

Elmendorf, H., Singer, S., & Nash, T. (2001). The abundance of sterile transcripts in Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res, 29*(22), 4674-83.

Faubert, G. (1996). The immune response to Giardia. *Parasitol Today., 12*(4), 140-5.

Gallego, E., Alvarado, M., & Wasserman, M. (2007). Identification and expression of the protein ubiquitination system in Giardia intestinalis. *Parasitol Res, 101*(1), 1-7.

GEFOR. (s.f.). Recuperado el 3 de Mayo de 2012, de http://www.gefor.4t.com/parasitologia/giardialamblia.html

Gilchrist, M., Qin, H., & Zaretzki, R. (2007). Modeling SAGE tag formation and its effects on data interpretation within a Bayesian framework. *BMC Bioinformatics, 8*.

Gillin, F., Reiner, D., & McCaffery, J. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote Giardia lamblia. *Annu Rev Microbiol, 50*, 679-705.

Glickman, M., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev, 82*(2), 373-428.

Hanna, J., Hathaway, N., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D., y otros. (2006). Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell, 127*(1), 99-111.

Hetsko, M., McCaffery, J., Svärd, S., Meng, T., Que, X., & Gillin, F. (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of Giardia lamblia in vitro. *Exp Parasitol, 88*(3), 172-83.

Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J., & Svärd, S. (2010). Is human giardiasis caused by two different Giardia species? *Gut Microbes, 1*(6), 379-82.

Keister, D. (1983). Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg, 77*(4), 487-8.

Kennedy, R., & D'Andrea, A. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev, 19*(24), 2925-40.

Komada, M. (2008). Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Curr Drug Discov Technol, 5*(1), 78-84.

Komander, D., Clague, M., & Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10*(8), 550-63.

Lander, G., Estrin, E., Matyskiela, M., Bashore, C., Nogales, E., & Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature, 482*(7384), 186-91.

Lindner, H. (2007). Deubiquitination in virus infection. *Virology, 362*(2), 245-56.

LOS MICROBIOS EN LA RED. (s.f.). Recuperado el 3 de Mayo de 2012, de http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/imagenes.cfm?FOTO=41

Luján, H., Mowatt, M., & Nash, T. (1998). The molecular mechanisms of giardia encystation. *Parasitol Today, 14*(11), 446-50.

Luján, H., Mowatt, M., Conrad, J., Bowers, B., & Nash, T. (1995). Identification of a novel Giardia lamblia cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem, 270*(49), 29307-13.

Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., & Glickman, M. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem, 3*.

Melo, S., Gómez, V., Castellanos, I., Alvarado, M., Hernández, P., Gallego, A., y otros. (2008). Transcription of meiotic-like-pathway genes in Giardia intestinalis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, 103*(4), 347-50.

Morrison, H., McArthur, A., Gillin, F., Aley, S., Adam, R., Olsen, G., y otros. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia. *Science, 317*(5846), 1921-6.

Nijman, S., Luna-Vargas, M., Velds, A., Brummelkamp, T., Dirac, A., Sixma, T., y otros. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell, 123*(5), 773-86.

Niño, C. (2011). *Análisis de la ubiquitinación de proteínas en la diferenciación de Giardia intestinalis.* Bogotá D.C: Tesis de Doctorado. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Niño, C., & Wasserman, M. (2003). Transcription of metabolic enzyme genes during the excystation of Giardia lamblia. *Parasitol Int, 52*(4), 291-8.

Niño, C., Prucca, C., Chaparro, J., Luján, H., & Wasserman, M. (2012). The ubiquitin-activating enzyme (E1) of the early-branching eukaryote Giardia intestinalis shows unusual proteolytic modifications and play important roles during encystation. *Acta Trop, 123*(1), 39-46.

Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M., & Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J, 6*(5), 1429-39.

Park, K., Woo, S., Yoo, Y., Wyndham, A., Baker, R., & Chung, C. (1997). Purification and characterization of UBP6, a new ubiquitin-specific protease in Saccharomyces cerevisiae. *Arch Biochem Biophys, 147*(1), 78-84.

Peters, J., Franke, W., & Kleinschmidt, J. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem, 269*(10), 7709-18.

Pickart, C., & Eddins, M. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta, 1695*(1-3), 55-72.

Prucca, C., & Lujan, H. (2009). Antigenic variation in Giardia lamblia. *Cell Microbiol, 11*(12), 1706-15.

Prucca, C., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E., Rivero, F., Saura, A., y otros. (2008). Antigenic variation in Giardia lamblia is regulated by RNA interference. *Nature, 456*(7223), 750-4.

Ravid, Z., Duque, S., Arévalo, A., Nicholls, R., & Wasserman, M. (2007). Genetic diversity of Giardia intestinalis populations in Colombia. *Biomedica, 27*(1), 34-41.

Rawlings, N., Barrett, A., & Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res, 40*, D343-50.

Reyes-Turcu, F., Ventii, K., & Wilkinson, K. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem, 78*, 363-97.

Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L., y otros. (2004). Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem J, 381*, 275-85.

Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M., & Frontali, L. (1998). A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol Biol Cell, 9*(10), 2917-31.

Sogin, M., Gunderson, J., Elwood, H., Alonso, R., & Peattie, D. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from Giardia lamblia. *Science, 243*(4887), 75-7.

Song, L., & Rape, M. (2008). Reverse the curse--the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol, 20*(2), 156-63.

Thompson, R., Reynoldson, J., & Mendis, A. (1993). Giardia and giardiasis. *Adv Parasitol. , 32*, 71-160.

Touz, M., Nores, M., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J., Mowatt, M., y otros. (2002). The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote Giardia lamblia. *J Biol Chem, 277*(10), 8474-81.

Tran, H., Allen, M., Löwe, J., & Bycroft, M. (2003). Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. *Biochemistry, 42*(39), 11460-5.

Upcroft, J., Krauer, K., & Upcroft, P. (2010). Chromosome sequence maps of the Giardia lamblia assemblage A isolate WB. *Trends Parasitol, 26*(10), 484-91.

Velculescu, V., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science, 270*(5235), 484-7.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W., Yates, J. 3., Koonin, E., y otros. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science, 298*(5593), 611-5.

Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N., Engel, J., Franklin, C., & McKerrow, J. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of Giardia. *Cell, 89*(3), 437-44.

Wilkinson, K. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J, 11*(14), 1245-56.

Yee, J., & Nash, T. (1995). Transient transfection and expression of firefly luciferase in Giardia lamblia. *Proc Natl Acad Sci U S A, 12*, 5615-9.