



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“Construcción de vectores genéticos para la transfección del
protozooario parásito *Giardia lamblia*”**

Elaborado por:
Raúl Bonilla Moreno

Director de tesis:
M. en C. Lilia A. Alvarado

SINODALES:
Dr. Jorge Campos Contreras
M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras
Dr. Elías Piedra Ibarra
Dr. Sergio Vaca Pacheco

MAYO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Lilia Amelia Alvarado por el seguimiento dado a este trabajo y por promover la conclusión del mismo, gracias por su tiempo y sobretodo por no dejar de creer en este proyecto.

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por su generosidad, por darle valor al conocimiento al compartirlo, así como por sus consejos que promovieron la terminación de este trabajo.

A los revisores de Tesis, Dr. Elías Piedra Ibarra, Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dr. Jorge Campos Contreras a la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras por sus sugerencias y tiempo dedicado a este trabajo.

Al M. en C. Alejandro Monsalvo por su apoyo técnico en la secuenciación de las construcciones elaboradas en este trabajo.

A los amigos de laboratorio (Martha, Marco, Raúl, Bety, Elena, Isabel, Oscar, Lalo) y a todas aquellas personas quienes han contribuido con este trabajo con su apoyo y su tiempo, gracias por hacer del laboratorio 1 de Biomedicina Molecular un lugar más agradable donde trabajar.

Al CINVESTAV por brindar las condiciones para la generación de conocimiento y por permitir mi desarrollo profesional.

Al Centro Medico Nacional Siglo XXI por impulsar la investigación, como parte fundamental de su misión.

DEDICATORIAS

A mi papá:

Por su apoyo incondicional.

A mis hermanos:

Gracias por su confianza y por su cariño que siempre ha sido un impulso para crecer

A mi mamá:

Gracias por enseñarme que podemos lograr ser mejores a pesar de las dificultades y por estar siempre conmigo.

A Saúl Goitia, Claudia López, Clau, Adán, Fabián, Edith, Iván, Sebastián, Santiago, Selene, Emanuel y el bebe (Ricardo), por ser parte de mi familia.

A mis amigos:

Por haber compartido conmigo parte de sus vidas

A Evelyn:

Por haber entrado en mi vida para compartir los buenos y malos momentos, por impulsarme siempre a ser alguien mejor, por creer en nuestros sueños y por ser mi mayor motivación.

INDICE

Resumen	
Introducción	1
El parásito	1
Morfología	1
Ciclo de vida	3
La enfermedad	4
Diagnóstico	4
Tratamiento	4
Genoma	5
Variación antigénica	6
ANTECEDENTES	7
Transporte de proteínas	7
Proteasas de cisteína	7
Transfección	8
Gen reportero	9
Transfección en <i>Giardia lamblia</i>	10
Objetivos	14
Estrategia Experimental	15
Material y Métodos	16
Resultados y Discusión	24
Conclusiones	36
Apéndices	37
Bibliografía	46

RESUMEN

Giardia lamblia es un protozooario parásito binucleado flagelado que causa infección intestinal en el hombre. *Giardia* carece de mitocondrias y peroxisomas, y es considerado uno de los parásitos que diversificó de las ramas más tempranas del árbol evolutivo eucariótico, es decir, el eucariota más primitivo. *Giardia* tiene un ciclo de vida simple, que incluye un quiste que es la forma resistente e infectiva y una forma vegetativa el trofozoíto, que se encuentra parasitando el intestino del hospedero. El trofozoíto de *Giardia* carece de aparato de Golgi, aun así tiene un sofisticado sistema de clasificación y tráfico proteínico, que puede separar proteínas para dirigir las a diferentes sitios dentro de la célula. En el caso de las proteasas de cisteína de *Giardia*, estas son dirigidas a sitios específicos de la célula donde son activadas y están involucradas en muchos de los aspectos de la relación parásito-hospedero, por lo que es importante conocer en que fase del ciclo de vida del parásito se induce su producción y cual es su ubicación dentro del mismo para inferir un posible papel en la enfermedad. Por este motivo la finalidad del presente trabajo es fusionar dos fragmentos genéticos del gen CP1 que codifica para una cisteín proteasa de *Giardia lamblia* a un gen reportero que codifica para la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Para llevarlo a cabo, mediante la técnica de PCR, se amplificaron dos fragmentos de ADN de *Giardia lamblia*, uno de 355 pb (correspondiente a la región promotora del gen CP1) y otro de 484 pb (correspondiente a la región promotora y la región amino terminal del gen CP1), así como el gen *gfp* de 720 pb los cuales se clonaron independientemente en el vector pBluescript II KS+. Posteriormente los fragmentos de 355 pb y 484 pb de *Giardia* fueron subclonados al vector que contenía la secuencia codificante del *gfp* (pBS-*gfp*). Las construcciones fueron verificadas por digestión enzimática, por PCR y por secuenciación.

INTRODUCCION

El parásito

Giardia lamblia, (*G. intestinales*, *G. duodenalis*) es un parásito protozoario flagelado binucleado que causa infección intestinal en varias especies de mamíferos incluido el hombre (Singer, 1998). Es el protozoario más común aislado a partir de heces humanas y es una causa común de diarrea. (Adam, 2001), este flagelado fue primero descubierto por Leeuwenhock en 1681 en sus propias heces; pero fue descrito hasta 1859 por Lambl (Garcia y Brockner,1993). A pesar de su descubrimiento temprano, recientemente *Giardia* fue aceptada como un patógeno humano debido a que las infecciones que produce no son invasivas y frecuentemente son asintomáticas. (Adam, 2001)

Actualmente hay considerable debate sobre la clasificación apropiada de este organismo (Garcia y Brockner,1993). Diferentes criterios como la especificidad del hospedero y la morfología, así como diferencias más sutiles apreciadas por microscopia electrónica han sido usados para dividir el género *Giardia* dentro de seis especies: *G. lamblia*, que infecta al humano y una variedad de mamíferos, *Giardia agilis* que infecta anfibios; *Giardia muris* que infecta roedores, *G. ardea* y *G. psittaci* que infectan aves y *G. microti* que infecta roedores y castores (Adam, 2001). Más recientemente los aislados de *G. lamblia* han sido divididos en tres subgrupos en base a varios criterios bioquímicos y genéticos (Singer, 1998), *G. lamblia* es considerado actualmente como un grupo heterogéneo de organismos relacionados. (Nash, 1995)

Giardia está ubicada en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, en la clase Zoomastigophorea, junto con otros parásitos flagelados humanos como son Trypanosoma, Leishmania, Trichomonas y Dientamoeba, así mismo fue clasificada en el Orden Diplomonadida en el Suborden Diplomonadina y en la familia Hexamitidae. (Martínez y Elías, 1995)

Morfología

El trofozoíto de *G. lamblia* mide aproximadamente de 10 a 20 μm de largo por 5 a 15 μm de ancho. Es descrito usualmente como un organismo en forma de “gota”, con el extremo posterior afilado, presenta una superficie ventral cóncava y una superficie dorsal convexa.

Sobre la superficie ventral que ocupa los dos tercios anteriores del organismo, presenta una estructura que se denomina disco succionario, disco estriado o disco ventral. Esta estructura funciona como una copa de succión, proporcionando al trofozoíto el mecanismo de adherencia a la mucosa intestinal del hospedero. El trofozoíto presenta dos pequeños cuerpos curvados llamados cuerpos medios, así como cuatro pares de flagelos y un par de núcleos idénticos. (Adam, 2001)

A diferencia de la mayoría de otros eucariotas, *G. lamblia* carece de mitocondrias, aunque el descubrimiento de genes mitocondriales en *G. lamblia* indica que posiblemente *Giardia* presentó mitocondria en el curso de la evolución, no presenta peroxisomas, retículo endoplásmico liso y nucléolo. Presenta dos núcleos idénticos y en el citoplasma se observan vacuolas lisosomales, así como gránulos de glicógeno y ribosomales y una estructura parecida a un aparato de Golgi ha sido reportado exclusivamente en trofozoítos enquistados (Adam, 2001). Estas características, junto con un análisis filogenético de la secuencia de la subunidad pequeña de su ARN ribosomal, que muestra una gran similitud con la secuencia de archaeobacteria, sugieren que *Giardia* está entre los organismos más primitivos que existen dentro del árbol evolutivo eucariótico. (Adam, 2001)

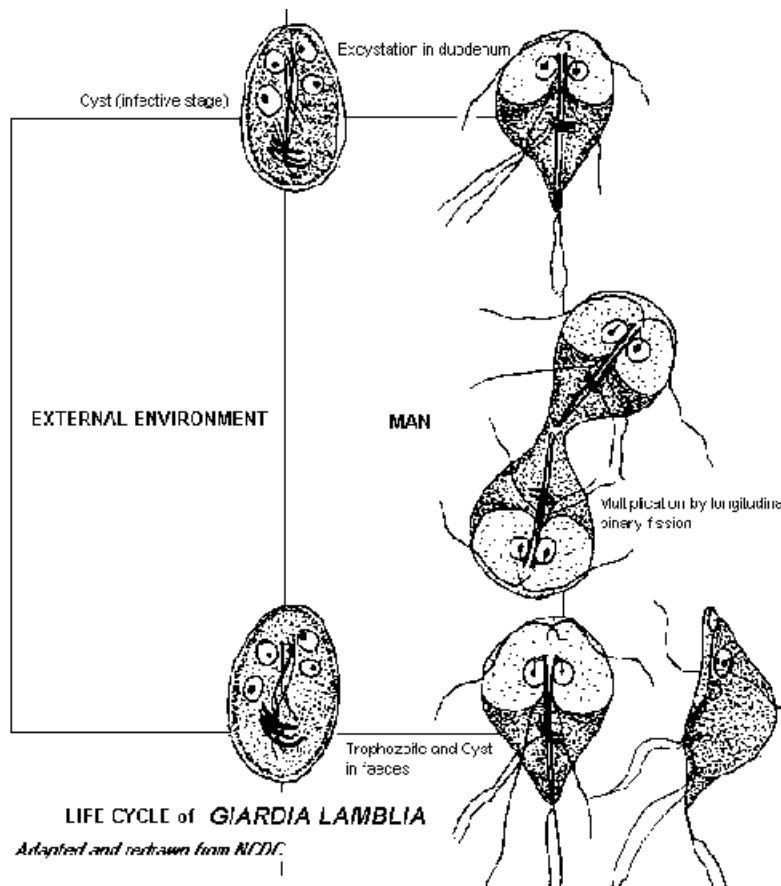
Los quistes generalmente son ovoides y miden de 11 a 14 μm de longitud y de 7 a 10 μm de ancho, tienen de dos a cuatro núcleos, axonemas y cuerpos medios. La pared del quiste mide aproximadamente 0.3 μm de grosor. Está compuesto de N-acetilgalactosamina como principal azúcar y en menor proporción de N-acetilglucosamina. (García y Brockner, 1993)

Los quistes y trofozoítos contienen vacuolas ovoides que son adyacentes a la membrana plasmática y se les conoce como vesículas periféricas (PV). En los trofozoítos estas se encuentran a lo largo de las superficies dorsal y ventral, pero no en la región del disco ventral. Estas vacuolas contienen una variedad de actividad enzimáticas, como son hidrolasa, fosfatasa ácida, DNAsa, RNAsa y proteasas. (Adam, 2001)

Otra característica que separa a *Giardia* de otros eucariotas superiores es su metabolismo predominantemente anaerobio, además de que todas las enzimas de metabolismo reportadas para *Giardia* están presentes en el citoplasma. (Adam, 2001)

Ciclo de vida

Giardia tiene un ciclo de vida simple, que incluye el quiste que es la forma infectiva y resistente del parásito y el trofozoíto que parasita el intestino delgado del hospedero. El ciclo se inicia con la ingestión del quiste maduro (que ha duplicado sus estructuras internas), es ingerido, y al llegar al estómago del hospedero se inicia el proceso de desenquistamiento como respuesta a un estímulo fisiológico, producido por cambios en osmolaridad y pH así como por presencia de proteasas en el duodeno del intestino delgado donde se desenquista para dar origen a dos trofozoítos, los cuales se adhieren a la pared intestinal donde se dividen por fisión binaria longitudinal y causan los síntomas de la giardiasis. Con el paso del bolo alimenticio algunos de los trofozoítos llegan a intestino grueso donde las condiciones son adversas y se induce el enquistamiento en el cual los trofozoítos retraen los flagelos, el citoplasma se condensa, y la pared del quiste es secretada. El ciclo se completa cuando los quistes se excretan en las heces. (Adam, 2001)



Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

La enfermedad

La giardiasis es, más frecuente en niños de edad preescolar que en adultos y más común en climas cálidos que en fríos, teniendo una distribución mundial. Esta parasitosis se puede presentar de manera asintomática y sintomática. Los síntomas característicos de la giardiasis incluyen diarrea, náuseas, vómito y pérdida de peso (Singer, 1998). Otros síntomas incluyen dolor epigástrico, inflamación, decremento de apetito, aumento de grasa y mucus en las heces. (García y Brockner, 1993)

Los síntomas y la duración de la giardiasis son variables en gente inmunocompetente y en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia e hipogammaglobulinemia, los síntomas son más severos y la incidencia es mayor. (Gillin y Reiner, 1996)

La principal fuente de infección es a través de agua y alimentos contaminados. El contacto íntimo con individuos infectados, puede ser también un mecanismo de infección. Algunos animales silvestres y domésticos pueden estar parasitados por *Giardia*, sin embargo, la zoonosis del parásito y del humano no ha sido determinada. (García y Brockner, 1993)

Diagnosis

Los exámenes rutinarios de heces por microscopía de luz, son recomendadas para la identificación de protozoarios intestinales. Sin embargo en el caso de *G. lamblia* debido a que los organismos están adheridos fuertemente a la mucosa, es recomendable examinar una serie de cinco muestras. En casos de sospecha de giardiasis el diagnóstico puede ser realizado por aspirado duodenal o por el método de la cápsula del Entero-Test, para la recuperación de los organismos. Otro procedimiento usado es la detección de antígenos en heces por el método de ELISA. (García y Brockner, 1993)

Tratamiento

En la mayoría de los casos, la giardiasis puede ser eliminada con el empleo de albendazol. El metronidazol es también efectivo aunque produce efectos secundarios severos y no es recomendado para mujeres embarazadas. El tinidazol también ha sido utilizado y ha resultado más efectivo que el metronidazol en una dosis sencilla. (García y Brockner, 1993)

Se recomienda que todos los casos de giardiasis comprobada (con o sin sintomatología) sea tratada, ya que la infección puede causar síndrome de mala absorción subclínica, además de que un portador es una fuente potencial de infección para otros. (García y Brockner,1993)

Genoma

Se ha calculado que el contenido G+C del genoma de *G. lamblia* es de 46%. El número de cromosomas que se observan con microscopía de luz es de cuatro por núcleo así como por microscopía de fluorescencia. En contraste, separaciones por campos pulsados de cromosomas intactos, así como microscopía confocal claramente indican la presencia de por lo menos 5 distintos juegos de cromosomas. Los tamaños de los cromosomas varían entre 1×10^6 y 4×10^6 pb, produciendo un total de 1.2×10^7 pb para los cinco cromosomas. A través de un escaneo densitométrico se observó que cada trofozoíto contiene aproximadamente de 30 a 50 moléculas de ADN cromosomal, una posible explicación del dato es que los trofozoítos de *Giardia* son poliploides, conteniendo varias copias de cada cromosoma por núcleo. (Adam, 2000)

Por otra parte, a partir de las secuencias de ADNc que han sido reportadas así como por secuenciación del extremo 5' de ARN y por mapeo S1, se describió una región 5' muy corta no traducida (1 a 6 bases), estas secuencias líder encontradas en ARNs mensajeros de *G. lamblia* sugieren que la unión del ribosoma al ARNm y el punto de inicio de la traducción pueden encontrarse más próximas en este protozoario que en eucariotas superiores. Además existe poca similitud entre la región que circunda el inicio de la traducción en las secuencias de *G. lamblia* y las secuencias consenso de vertebrado. Sin embargo, las secuencias de α y β tubulina se parecen a las secuencias consenso de reconocimiento de *Drosophila* y *S. cerevisiae*. Aunque el aparato de traducción de *G. lamblia* es significativamente diferente al de otros eucariotas, parece diferir aun más con el de los procariotas. (Adam, 2000)

La transcripción es más similar a la de otros eucariotas, en clonas genómicas que han sido secuenciadas una posible caja TATA a sido identificada de 9 a 134 bases "rio arriba" del codón de iniciación. Hacia el extremo 3' hay una región corta de 6 a 19 nucleótidos que no se traduce y que separa el codón de paro de una secuencia AGTPuAAPyr. Esta secuencia se encuentra separada de 7 a 10 bases de una secuencia de poli(A), por lo que la secuencia AGTPuAAPyr se considera una señal de poliadenilación para *Giardia* spp. Cabe mencionar que no se han encontrado intrones en *Giardia*. (Adam, 2001)

Variación antigénica

Giardia presenta proteínas variables que cubren la superficie completa del parásito. Las proteínas variables de superficie (VSP) son proteínas ricas en cisteína. Las VSP pueden ser reemplazadas espontáneamente durante cultivos de rutina por otras VSP antigénicamente distintas. Las VSP presentan peso molecular de 35 a 200 kDa, contienen entre 11 y 12% de cisteína, la cual comúnmente aparece como motivos CXXC. El extremo C-terminal presenta una secuencia conservada de 33 aminoácidos de los cuales 28 son hidrofóbicos y el pentapeptido final es hidrofílico. La región N-terminal generalmente es hidrofóbica y con diferencias entre las VSP y probablemente sirve como péptido señal. Algunas VSPs contienen unidades repetitivas que explican la variación de secuencia y los altos pesos moleculares. (Nash, 1995)

En el proyecto genoma de *G. lamblia* la secuenciación azarosa de aproximadamente 9% del genoma identificó a 55 de 236 genes codificantes para VSPs (2300 secuencias de aproximadamente 400 pb cada una), sugiriendo que ellas ocupan una gran proporción de este pequeño genoma. (Gillin, 1996)

La importancia biológica de la variación antigénica se desconoce. Sin embargo, asumiendo que las VSPs son un blanco esencial para el sistema inmunológico, la habilidad del parásito para modificar las proteínas de superficie podría proporcionarle la oportunidad para escapar a la respuesta inmune del hospedero. (Davids, 2006)

ANTECEDENTES

Transporte de proteínas

Los trofozoitos presentan un mecanismo sofisticado de reconocimiento, clasificación y tráfico proteínico. Durante el enquistamiento una nueva clase de vesículas secretorias aparecen rodeadas de membrana, ellas contienen antígenos del quiste que son transportados a la pared en formación, estas son llamadas vesículas específicas de enquistamiento (ESV) y parecen ser importantes en la secreción regulada de proteínas específicas y antígenos glicoproteínicos propios del quiste, conformando así una primer ruta de transporte de proteínas. La teoría de la existencia de un transporte lisosomal independiente conforma la segunda ruta de transporte de proteínas en apoyo a esta teoría se ha detectado fosfatasa ácida en las vacuolas periféricas (PV). Una tercera ruta fue definida recientemente la cual fue descrita como un transporte constitutivo de proteína a la membrana plasmática, este es el caso de TSA417, que es un antígeno mayor de superficie del trofozoito del aislado WB y cubre la superficie externa del parásito. *G. lamblia* es capaz de una sofisticada división de proteínas de la pared del quiste y TSA417 a sus rutas secretorias regulada y constitutiva, respectivamente, mientras que dirige fosfatasa ácida a una ruta lisosomal distinta, presentandose un aparato de Golgi funcional que puede separar proteínas para dirigir las a diferentes sitios dentro de la célula. Estos estudios sugieren que los organelos membranosos de transporte de proteínas aparecieron tempranamente en la evolución de la célula eucariota. (Gillin, 1991)

Proteasas de Cisteína

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas. Se encuentran en una gran variedad de especies desde virus hasta humanos. Las proteasas que degradan a partir del extremo de una cadena polipeptídica son llamadas peptidasas, mientras que aquellas que catalizan el corte de una unión peptídica interna son llamadas endopeptidasas o proteinasas. Basándose en los grupos químicos importantes en sus sitios activos, las proteasas están separadas dentro de cuatro clases mayores: serina, metalo, tiol (cistein) y aspartil proteasas. (McKerrow, 1989)

En el caso de las proteasas de cisteína, estas poseen un sitio activo nucleofílico en el cual se encuentra un residuo Cys en la posición 25 que ataca la unión peptídica escindible. Las enzimas de esta superfamilia tienen un rango en tamaño de 212 (papaina 23.4 KDa) a 252 residuos aminoácidos (catepsina B 29.0 KDa). (Berti, 1995)

Todas las proteasas de cisteína parecen ser sintetizadas como preproteínas. Las prerregiones representan péptidos señal típicamente hidrofóbicos. Las prerregiones tienen extensiones N-terminal de entre 62 residuos (catepsina B) y 123 residuos (aleuraina, una proteínasa de la cebada) de longitud y son relativamente hidrofílicas (McKerrow, 1989). Al alinear secuencias de proteasas de cisteína maduras se observa en segunda posición al aminoácido prolina. Las proteasas de cisteína se han identificado en protozoarios parásitos y se encuentran involucradas en la interacción parásito-hospedero. (Marti, 2003).

En el caso de *Giardia lamblia* las proteasas están relacionadas con su patogenicidad, por lo que es de gran interés conocer sus vías de producción y probables rutas de distribución y/o secreción. Para ello, proponemos el desarrollo de dos vectores de transfección estable que incluya la región promotora del gen CP1 de *G. lamblia* y el segundo donde además se incluya parte de la secuencia codificante, ambos fusionados a la proteína reportera GFP como marcador de expresión donde, la unión de cada uno estos fragmentos del gen CP1 a la GFP corresponde al objetivo del presente trabajo.

Transfección

El procedimiento para la introducción de ADN exógeno dentro de células eucariotas receptoras es llamado transfección. La transfección con ADN produce líneas estables e inestables, con las segundas relativamente predominantes. Las transfectantes inestables (también llamadas transfectantes transitorias) reflejan la sobrevivencia del ADN transfectado en forma extracromosomal; las líneas estables resultan de la integración dentro del genoma. La primera etapa es el establecimiento de una unidad extracromosomal inestable, seguida por la adquisición de estabilidad por medio de la integración. El ADN transfectado puede ser expresado en ambos casos, sin embargo, las bajas frecuencias de transfección hacen necesario el uso de marcadores cuya presencia en las células receptoras

las vuelve seleccionables. Una vez dentro de la célula la secuencia transfectada es expresada. Esto permite estudiar el efecto biológico del gen o genes transfectados así como la ubicación celular de la proteína originada a partir del mismo. La mayoría de las células transfectadas pueden ser seleccionadas por adquisición del fenotipo transformado. En el caso de un organismo que adquiere nueva información genética de la adición de ADN externo se le denomina transgénico. La cotransfección ha permitido que genes de interés sean introducidos rutinariamente al mismo tiempo que un marcador de selección. (Lewin, 2008)

Por otra parte la hibridización *in situ* puede ser usada para mostrar que las células transfectadas tienen material donador integrado dentro de los cromosomas residentes. El evento de integración involucra una recombinación no homóloga entre la masa del ADN adicionado y un sitio azaroso en el genoma. El evento de recombinación puede ser provocado por una ruptura en la doble cadena dentro del ADN cromosomal, posiblemente por la acción de enzimas de reparación de ADN que se inducen por los extremos libres del ADN exógeno. Los genes son generalmente transfectados en las células apropiadas para su expresión. (Lewin, 2008)

Gen Reportero

Algunas veces se desea caracterizar un promotor, pero la proteína generada a partir de su gen es difícil de analizar, por lo que un gen cuyo producto pueda ser evaluado fácilmente es ligado a dicho promotor. Un gen cuyo producto es usado por esta vía para evaluar otros promotores es llamado un gen reportero. Dos tipos de genes reporteros se usan comúnmente. Uno es la secuencia codificante del gen bacteriano chloramfenicol acetyl transferasa (CAT), que permite la cuantificación correcta de la expresión genética. Este es particularmente útil en sistemas eucarióticos debido a que no existe contraparte del gen CAT en eucariotas. Esto permite que la actividad pueda ser analizada directamente en un extracto celular. Otro reportero útil es el gen lac-Z, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa, en el cual el corte de un substrato apropiado genera un componente que da un color azul. Esto ha sido utilizado con frecuencia, ya que permite un rápido escaneo de colonias bacterianas color azul. También ha sido útil en eucariotas, donde el patrón de expresión de la enzima puede ser visualizado tiñendo secciones de tejido. Cuando un gen

lac-Z bajo el control de un promotor apropiado es introducido dentro de células eucariotas, los tejidos apropiados o tipos celulares pueden ser examinados por la aparición de color azul, revelando así la especificidad del promotor. (Lewin, 2008)

Por su parte la proteína verde fluorescente (GFP) ha sido bien establecida como un marcador de expresión genética en células eucariotas intactas así como en organismos. El gen de la GFP contiene toda la información necesaria para la síntesis posttraduccional del cromóforo que produce la señal característica de este reportero. El plásmido conteniendo este gen (pGreen Lantern-1) es usado como un control positivo para monitorear la expresión en células eucariotas. La secuencia de codones está adaptada para hacer más eficiente la traducción en células de mamífero y mutada para contener treonina en la posición 65 para incrementar el pico de fluorescencia a 510 nm con un pico de excitación a 490 nm con luz azul. Es posible subclonar la GFP fuera de pGreen Lantern-1 dentro de un vector de fusión con una proteína de interés. Entre las ventajas con las que cuenta este sistema de expresión, se encuentran: que no son necesarios substratos adicionales para su visualización (en contraste con otras proteínas reporteras tales como β -galactosidasa); puede ser detectada en células vivas o fijadas; no tiene efectos tóxicos observados (sin importar el nivel de expresión) y la señal es detectada muy rápidamente (tan pronto como 5 horas posttransfección). (Tsien, 1998)

Transfección en *Giardia lamblia*

Con el fin de obtener mayor conocimiento acerca de la expresión de proteínas en *Giardia*, se han llevado a cabo estudios de transfección en este parásito, empleando construcciones plasmídicas que contienen dos genes. La construcción usualmente incluye un gen marcador de selección y un gen reportero, mediados por dos promotores separados. Este método permite la expresión estable del gen reportero bajo selección de algún antibiótico, demostrando así la expresión regulada del segundo gen si un promotor interno específico es incluido. El uso de un sitio interno de acceso para el ribosoma IRES (por sus siglas en inglés) insertado entre dos genes de interés representa otra aproximación para la expresión de genes dobles, los cuales son expresados como un ARNm bisistrónico, ambos productos genéticos son traducidos independientemente. (Yu, 1996)

En los últimos años dos sistemas de transfección fueron desarrollados y usados para la manipulación genética de *G. lamblia*. Ambos sistemas permiten transfección transitoria o estable de genes de *Giardia* y/o externos. Los sistemas de transfección basados en ADN permiten la electroporación de ADN plasmídico circular o linear dentro de trofozoitos. Los sistemas de transfección basados en virus de ARN requiere electroporación del ARN transcrito *in vitro* dentro de trofozoitos infectados con GLV, un virus de ARN de doble cadena específico de *Giardia lamblia*. Algunos de los promotores de genes de *Giardia*, empleados en estos sistemas que incluyen construcciones temporales o estables para experimentos de transfección, son: el del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*), el del gen *ran* y el del giardiavirus. (Nash, 2002)

En los primeros ensayos, el gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) se empleó en una construcción plasmídica temporal para conducir la expresión del gen reportero luciferasa de luciérnaga *luc*. La construcción óptima consistió de una fusión genética GDH/luciferasa en la cual los primeros 18 codones de la GDH preceden al gen de la luciferasa; esta fusión genética fue flanqueada por las secuencias río arriba y río abajo del gen GDH. En este estudio, la electroporación de trofozoitos de *Giardia* con la construcción génica *gdh/luc* produjo actividad de luciferasa que fue 3000 a 50,000 veces mayor que el nivel basal (Yee, 1995).

Yu y colaboradores (1995) desarrollaron un vector de transfección estable para *G. lamblia* a partir del ADNc genómico del giardiavirus (GLV). Valiéndose de una construcción plasmídica, pC670-luc, conteniendo el gen *luc* flanqueado por los 670 nt del 5' y los 2022 nt del 3' del ADNc de GLV, los autores obtuvieron un transcrito *in vitro* y este ARN sintético fue introducido dentro de los trofozoitos de *Giardia* por electroporación. La actividad de luciferasa en las células transfectadas alcanzó en el día 2 un nivel de cinco órdenes de magnitud arriba del nivel basal y permaneció relativamente estable en un 80% del nivel máximo después de 30 días de cultivo. El ARN quimérico fue replicado en forma de ARN de doble cadena y se almacenó dentro de partículas parecidas a virus (virus like particles) VLPs, las cuales fueron capaces de infectar y conferir actividad de luciferasa para trofozoitos de *G. lamblia*. (Yu, 1996).

En un estudio posterior, Yu y cols. (1996) reportaron una coexpresión estable del gen *luc* y del gen fosfotransferasa de neomicina (*neo^r*) en *G. lamblia*, empleando un solo vector, este plásmido (pNeo/GDH/Luc) fue construido insertando el gen *luc* río abajo del gen *neo^r* y de la porción 5' de 193 nt del gen *gdh* en el plásmido pC670-Neo y su transcrito bisistrónico fue introducido dentro de *G. lamblia* por electroporación. Los trofozoitos de *Giardia* resistentes a G418 fueron clonados y el ARNm del *neo^r* se incrementó en estas clonas al incrementar la presión con G418. Esta resistencia a la droga permaneció estable en ausencia de G418, durante 15 días. Los transfectantes demostraron resistencia al G418 y una persistente actividad de luciferasa a niveles paralelos a la cantidad de G418 utilizada para la selección, alcanzando un nivel de varios miles de veces arriba del nivel basal. (Yu, 1996).

Una quimera de ADNc de GLV y proteína verde fluorescente (GFP) fue construida y su transcrito *in vitro* fue electroporado dentro de trofozoitos infectados con GLV, la GFP fue expresada transitoriamente. El pGDH5/NEO/GLV fue construido combinando el casete de resistencia a neomicina en el cual el gen fosfotransferasa de neomicina fue flanqueado por las regiones no codificantes de la glutamato deshidrogenasa de *Giardia* (GDH) y el casete de transcripción en el cual la quimera de ADNc y GFP se ubicó río abajo del promotor del gen GDH en un plásmido que fue electroporado dentro de *G. lamblia* y las transfectantes persistentemente expresan GFP bajo selección con G418. (Liu, 2005)

En otro ensayo una transfección episomal estable fue llevada a cabo usando el gen *pac* de resistencia a puromicina (Singer, 1998) o el gen *neo* de resistencia a neomicina (Sun, 1998) como marcadores seleccionables.

Interesantemente, los plásmidos bacterianos que se han utilizado para generar las construcciones con las que se ha transfectado a *Giardia*, contienen secuencias que funcionan como orígenes de replicación en *G. lamblia*. (Adam, 2001)

Por su parte, Sun y cols. (1998) desarrollaron un vector de transfección estable que incluyó por un lado, el promotor del gen *ran* de *G. lamblia* y el gen bacteriano fosfotransferasa de

neomicina (*pran/neo*^r). El vector se electroporó en trofozoítos de *G. lamblia* donde se replicó de manera episomal en 80 copias aproximadamente. (Sun, 1998)

Otras investigaciones realizadas en *Giardia* se relacionan con la producción de proteasas y su relación con patogenicidad. De los estudios realizados a la fecha, destaca el hecho de que el parásito produce actividad proteolítica tipo serino, metalo, aspartil y cisteín proteasas. De estas proteasas, las de cisteína son las que el parásito produce en mayor cantidad (Alvarado y cols, 1992, 1993; Williams y Coombs, 1995). También ha sido identificada la participación de la cisteín-proteasa (CP2) de la familia de la catepsina B en el desenquistamiento de *Giardia*. Así mismo se han secuenciado 2 genes más que codifican para las proteasas de cisteína (CP1 y CP3), de los cuales, el gen CP1 es inducible mediante hierro exógeno. (Ward, 1997)

Esta actividad proteolítica también ha sido identificada en el medio de cultivo de trofozoítos de *Giardia lamblia*, siendo principalmente de tipo cisteína. La actividad proteolítica secretada por el parásito se incrementa tanto cualitativa como cuantitativamente cuando los trofozoítos se encuentran en co-cultivos *in vitro* con células epiteliales MDCK o con las fracciones de citosol o de membranas de las mismas. (Alvarado, 1994)

OBJETIVOS

GENERAL

-Generar dos construcciones genéticas que comprendan, cada una de ellas, un fragmento de ADN del gen *cpl* de *Giardia lamblia* fusionado al gen que codifica para la proteína reportera GFP.

PARTICULARES

-Amplificar por PCR el marco de lectura abierto de 722 pb del gen que codifica para la proteína reportera GFP y clonarlo en el vector pBlue Script KS +.

-Amplificar por PCR un segmento de 355 pb que comprende el promotor y una corta región codificante del gen *cpl* a partir de ADN genómico de *Giardia lamblia* y clonarlo en el vector pBlue Script KS +.

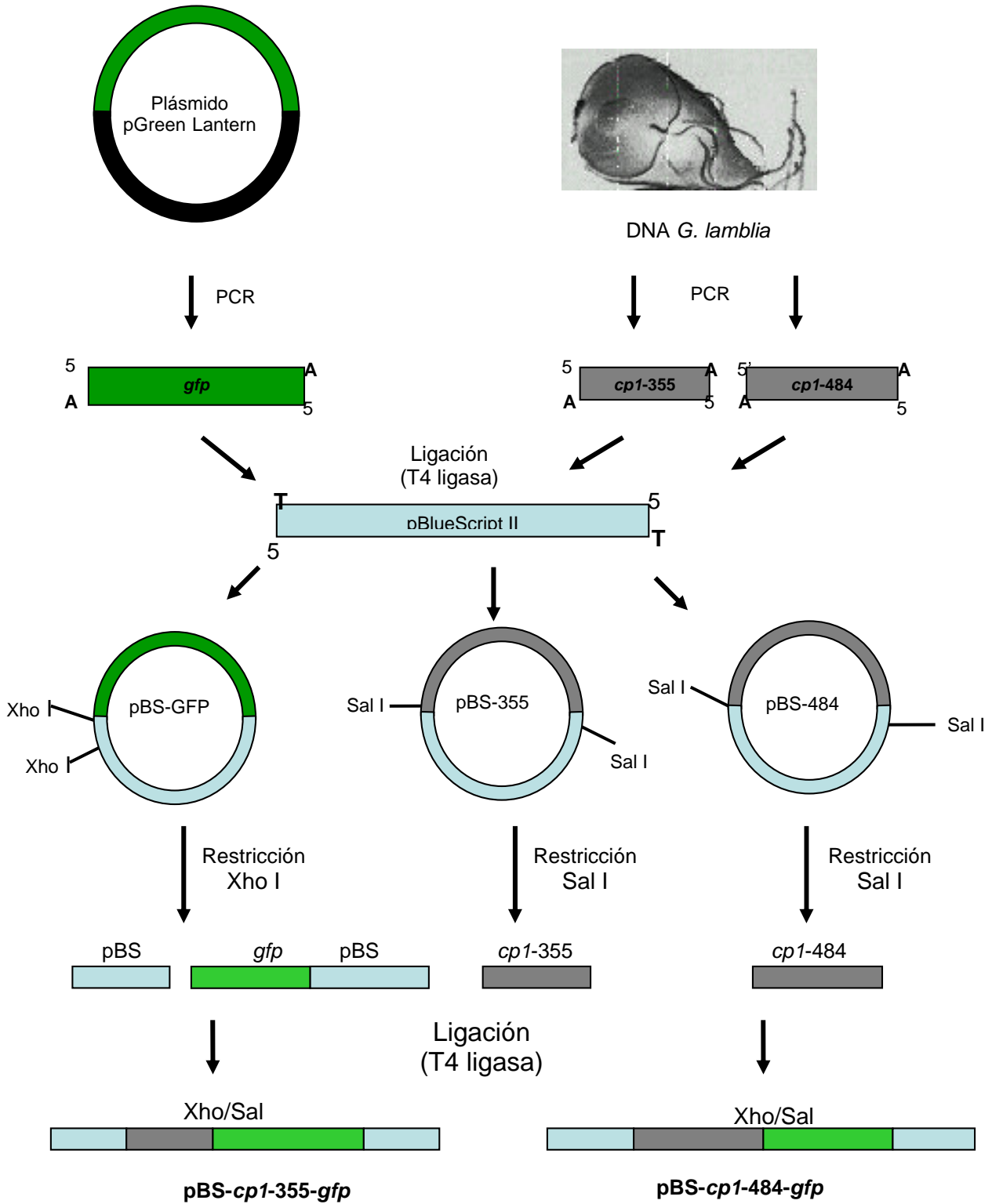
-Amplificar por PCR un segmento de 484 pb que comprende el promotor y región amino del gen *cpl* a partir de ADN genómico de *Giardia lamblia* y clonarlo en el vector pBlue Script KS +.

-Fusionar el fragmento de 355 pb del gen *cpl* con el gen que codifica para la proteína verde fluorescente, previamente clonado, en el vector pBlue Script KS+.

-Fusionar el fragmento de 484 pb del gen *cpl*, en fusión con el gen que codifica para la proteína verde fluorescente, previamente clonado, en el vector pBlue Script KS+.

-Verificar por restricción enzimática, PCR y secuenciación las dos construcciones obtenidas.

Estrategia Experimental



MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la expresión *in vivo* de un gen determinado, en *Giardia* o algún otro modelo biológico, comprende el diseño y la construcción de vectores que contengan la información deseada así como la transfección de los mismos en el microorganismo, para que el aparato de transcripción y traducción de éste se encarguen de llevar a cabo la expresión del gen de interés. La inclusión de un gen reportero en el vector es de gran utilidad, ya que facilita el monitoreo del nivel de expresión y la ubicación celular del producto del gen. En el presente trabajo se realizó la construcción de dos vectores que comprenden la región promotora del gen *cpl* de *G. lamblia* y el gen que codifica para la proteína reportera GFP, los cuales se emplearán posteriormente en un estudio de transfección para *Giardia lamblia*.

1. Preparación del vector T

Previo a la amplificación de los productos de PCR se procedió a la preparación del vector T para dar al vector pBluescript II KS+ (Apéndice I) (Estratagene) la capacidad de unirse a los productos provenientes de la PCR, para esto 2 µg de pBluescript digerido con 20 unidades de la enzima Eco RV (ROCHE) se expuso a la actividad transferasa terminal de 5 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogene) en presencia de 0.2 mM de dTTP (ROCHE) y amortiguador de reacción de PCR 1X (Invitrogene), en un volumen total de 100 µl, lo que originó extremos cohesivos de timina, permitiendo el apareamiento con las adeninas de los extremos 3' de los fragmentos amplificados por PCR. Almacenándose en alícuotas de 50 ng a -20 °C, hasta el momento de sus uso.

2. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se tomo una asada de la cepa XL1-Blue de *E. coli* para sembrarse en una caja de petri con medio Luria-Agar en presencia de tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml, se incubó a 37 °C toda la noche, al siguiente día se tomó una colonia bacteriana para sembrarla nuevamente en una caja de petri conteniendo medio Luria-agar con tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml, se dejó a 37 °C toda la noche, al día siguiente se tomó una colonia bacteriana y se sembró en 2 ml de medio Luria liquido adicionado con tetraciclina a 50 µg/ml toda la noche a 37°C con agitación constante, se tomo 1 ml del cultivo crecido y se adicionó a 250 ml de medio Luria con tetraciclina a 50

$\mu\text{g/ml}$, se mantuvo en agitación por el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm en luz visible del espectro, en este momento se dividió el cultivo en cuatro tubos en volúmenes de 50 ml y se cosecharon las células por centrifugación a 2,500 rpm por 10 minutos a 4 °C, el medio fue desechado y cada paquete bacteriano fue resuspendido en 4 ml del amortiguador TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KAc 30 mM y glicerol al 15 % a pH 5.8) y los tubos fueron colocados en hielo por 55 minutos, esta suspensión se centrifugó por 5 minutos a 2,500 a 4°C y la solución fue desechada, cada precipitado bacteriano fue resuspendió en 1.25 ml del amortiguador TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75mM a pH 8.0) y así se dividió en alícuotas de 100 μl en tubos de 1.5 ml que se congelaron al contacto con un baño de hielo seco en etanol y se almacenaron a 80 °C.

3.- Construcción pBS-*gfp*

a) Amplificación del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP)

El gen que codifica para la proteína reportera GFP, se clonó en el vector procariótico pBluescript II KS+ (Stratagene). Primeramente, se amplificó el gen mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizándose como templado el plásmido pGreen Lantern-1 (Life Technologies) Apéndice II, que contiene este gen y como iniciadores los oligonucleótidos: GFPXHO: 5'-ctc gag GCC ACC ATG AGC AAG GGC G-3' ("oligo sentido") y el GFPXBA: 5'-tct aga TCA CTT GTA CAG CTC GTC C-3' ("oligo antisentido"). Estos oligonucleótidos contienen en los extremos 5' secuencias de corte para las enzimas Xho I y Xba I respectivamente. En el caso del templado se utilizaron 10 ng y los oligonucleotidos a una concentración de reacción final de 0.2 μM , así mismo se incluyó en la mezcla de reacción dNTPs a 0.25mM (ROCHE), buffer de reacción a 1X, MgCl₂ a 2.0 mM y Taq DNA polimerasa a 0.02 u/ μl (Invitrogen). La reacción de PCR se llevo a cabo durante 45 ciclos, cada uno de los cuales consta de una temperatura de desnaturalización a 92°C (20seg) una de alineamiento de 45°C (20 seg) y una temperatura de extensión a 72°C (1 min). Previa a esta serie de ciclos se inició con una temperatura de desnaturalización mas rigurosa a 94°C (5 min), después de los ciclos se finalizó con una temperatura de extensión 72 °C (7min). Para identificar el producto de reacción amplificado (720 pb) las muestras de PCR se mezclaron con amortiguador de corrimiento (glicerol, azul de bromofenol, xilencianol y H₂O) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con un

corrimiento a 70 Volts, durante 1 hora en presencia de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 2 µg/ml incluyéndose una alícuota de marcador de peso molecular conocido como 1 Kb Plus (Invitrogen).

b) Ligación del producto de PCR en el vector pBluescript

En un tubo de 1.5 ml se colocaron los 50 ng de vector, así como 5µl del producto de PCR además del amortiguador apropiado para la enzima T4 ligasa (Invitrogen) a una concentración final 1X y se utilizó una unidad de dicha enzima con la finalidad de obtener una unión covalente entre vector e inserto, que fusiona los extremos complementarios del vector pBs y el inserto. La reacción se efectuó a una temperatura de 22 °C, toda la noche.

c) Transformación de células competentes

Para la transformación de las células competentes de la reacción de ligación se tomaron 5µl y se mezclaron con 100 µl de células competentes de la cepa XL1-B de *E. coli*, y se incubó a 42°C durante 45 segundos, inmediatamente después se colocó en baño de hielo por 2 minutos y se le agregó 900 µl de medio líquido Luria-Broth (USB), el tubo con las células se incubó a 37 °C por 1 h, para permitir la estabilización de las células. Posteriormente el medio se sembró en placas de medio Luria-Broth con agar más ampicilina (100 ng/µl) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactozida) (32 µg/ml) (Boheriger Mannheim), la presencia del antibiótico permitió solo el crecimiento de aquellas células bacterianas que poseían el gen de resistencia al mismo y que está presente en el vector pBs-KS+. Por su parte el X-gal es el sustrato de la enzima β-galactosidasa, la cual al clonarse el fragmento dentro del vector interrumpe su expresión, por lo que las células positivas, presentaron una coloración blanca, mientras que aquellas células que no contenían el inserto (negativas), mostraron una coloración azul.

d) Selección de colonias y verificación de la construcción pBS-*gfp*

Se seleccionaron 10 colonias blancas y de cada una se sembró la mitad en placas de agar Luria-Broth con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C por toda la noche, por otra parte la otra mitad se sembró en 3 ml de medio Luria con 100 µg/ml de ampicilina y se

incubaron a 37 °C toda la noche con agitación. Al siguiente día se cosecharon los cultivos y se les hizo extracción de ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina. Para confirmar la presencia del inserto se llevó a cabo una reacción de PCR empleando como templado el ADN plasmídico y los oligonucleótidos específicos para el fragmento de interés. El producto de PCR amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.0% con un corrimiento de 70 volts por 60 minutos. Para visualizar el ADN, el gel se tiñó con EtBr a 2 µg/ml. También se llevó a cabo una reacción de digestión enzimática al ADN plasmídico, empleando las enzimas de restricción, XhoI y XbaI. Para obtener mayor cantidad de plasmido se llevó a cabo una extracción con el Kit Quantum Prep (Bio-Rad). El ADN plasmídico se guardó a -20 °C, para su uso posterior.

4. Construcción del vector pBS-*cp1*-355

a) Amplificación de la región promotora del gen *cp1* de *G. lamblia* de 355 pb y ligación en el vector pBlueScript II KS+

A partir de ADN genómico de *G. lamblia* se amplificó por PCR un fragmento de 355 pb que comprende la secuencia de la región promotora del gen *cp1* que codifica para una proteasa de cisteína de *G. lamblia*. (Apéndice III) Se utilizaron los oligonucleótidos CP61ER1: 5'-gaa ttc GGG GTA CTA GGC TGG GTA C-3' (sentido) y CPGIRIS: 5'-gtc gac TTC AAA CCT TTT TGG CAT CCC-3' (antisentido). La reacción de PCR se efectuó bajo valores de temperatura y tiempo favorables para la desnaturalización (92 °C por 20 segundos), apareamiento (50 °C por 20 segundos) y extensión (72 °C por 40 segundos) durante 45 ciclos, iniciando con una temperatura de desnaturalización de 92 °C por 5 minutos y terminando con una temperatura de extensión a 72 °C por 7 minutos, para este juego de oligonucleótidos, al tubo conteniendo la mezcla de reacción se adicionó como molde 100 ng de ADN genómico de *G. lamblia*. También se incluyó un tubo sin ADN molde (control negativo) y un tercero como control positivo con un juego de oligos apropiados para amplificar un fragmento de ADN clonado en el vector pBluescript, donde se esperaba un producto que se amplifica bajo las mismas condiciones que el fragmento de interés. Al término de la PCR, cada muestra se analizó por electroforesis en agarosa 2.0 % con bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml para observar el producto amplificado al exponerlo a la luz UV. El tamaño del fragmento amplificado se determinó

en base a marcadores de ADN de 1 Kb (Invitrogen). La región amplificada se ligó al vector T (pBlueScript KS+) empleando la enzima T4 ligasa (Invitrogen) en presencia del buffer respectivo, incubando a 22 °C toda la noche.

b) Transformación de células competentes *E. coli* de la cepa XL1-B

Se tomaron 5 µl de la reacción de ligación y se mezclaron con 100 µl de células *E. coli* competentes de la cepa XLI-Blue y se incubó a 42°C durante 45 segundos, inmediatamente después se colocó en baño de hielo por 2 minutos y se le agregó 900 µl de medio líquido Luria-Broth (USB), el tubo con las células se incubó a 37 °C por 1 h, para permitir la estabilización de las células. Posteriormente el medio se sembró en placas de agar Luria-Broth con ampicilina (100 ng/µl) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactozida) (32 µg/ml) (Boheriger Mannheim).

c) Selección de colonias y verificación de la construcción pBS-*cpI*-355

El sustrato X-gal permitió la selección de aquellas clonas que contenían el inserto buscado, indicado por la coloración de las colonias bacterianas, seleccionando colonias blancas, de las que se tomaron 10 colonias y cada una se cultivó en medio Terrific-Broth adicionado con ampicilina a 100 ng/µl e incubado a 37 °C toda la noche en agitación continua, así como en medio sólido agar-LB con ampicilina a la misma concentración. Para identificar las clonas que contenían el inserto de 355 pb de cada cultivo, se obtuvo el ADN plásmidico mediante lisis alcalina, se hizo PCR a partir de estos ADNs, además de someterse a digestión con las enzimas de restricción Eco RI y Sal I. Una vez confirmada la presencia del inserto, se obtuvo una mayor cantidad de ADN plásmido para tres clonas seleccionadas, la extracción se realizó con el Kit Quantum Prep (BIO-RAD). El ADN plasmidico se almacenó a 20 °C para ensayos posteriores.

5. Construcción del vector pBS-*cpI*-484

a) Amplificación de una región del gen *cpI* de *G. lamblia* de 484 pb y ligación en el vector pBlueScript II KS+

Otro fragmento amplificado de 484 pb comprende la región promotora y un segmento de la secuencia del marco de lectura abierta (ORF) de la proteína codificada por el gen *cpI*

(Apendice III), este fragmento se amplificó empleando los oligos CP61ER1: 5'-gaa ttc GGG GTA CTA GGC TGG GTA C-3' (sentido) y GP51R2S: 5'-gtc gac GTC GAA CTG AGG CGG AAT A-3' (antisentido), que incluyen en su extremo 5' los sitios de restricción para las endonucleasas Eco RI y Sal I, respectivamente.

La reacción de PCR se efectuó bajo valores de temperatura y tiempo favorables para la desnaturalización (92 °C por 20 segundos), apareamiento (50 °C por 20 segundos) y extensión (72 °C por 45 segundos) durante 45 ciclos, iniciando con una temperatura de desnaturalización de 92 °C por 5 minutos y terminando con una temperatura de extensión a 72 °C por 7 minutos, para este juego de oligonucleótidos, además del tubo conteniendo como molde 100 ng de ADN genómico de *G. lamblia*, se incluyó un tubo sin ADN molde (control negativo) y un tercero como control positivo con un juego de oligos apropiados para amplificar un fragmento de ADN clonado en el vector pBluescript, donde se esperaba un producto que se amplifica bajo las mismas condiciones que el fragmento de interés. Al término de la PCR, cada muestra se analizó por electroforesis en agarosa 2% con bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml para observar el producto amplificado al exponerlo a la luz UV. El tamaño del fragmento amplificado se determinó en base a marcadores de ADN de 1 Kb (Invitrogen). La región amplificada se ligó al vector T (pBlueScript KS+) empleando la enzima T4 ligasa (Invitrogen) en presencia del buffer respectivo, incubando a 22 °C toda la noche.

b) Transformación de células competentes *E. coli* de la cepa XL1-B

Se tomaron 5 µl de la reacción de ligación y se mezclaron con 100 µl de células *E. coli* competentes de la cepa XL1-Blue y se incubó a 42°C durante 45 segundos, inmediatamente después se colocó en baño de hielo por 2 minutos y se le agregó 900 µl de medio líquido Luria-Broth (USB), el tubo con las células se incubó a 37 °C por 1 h, para permitir la estabilización de las células. Posteriormente el medio se sembró en placas con medio agar Luria-Broth con ampicilina (100 ng/µl) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactozida) (32 µg/ml) (Boehringer Mannheim).

c) Selección de colonias y verificación de la construcción pBS-*cpl*-484

El sustrato X-gal permitió la selección de aquellas clonas que contenían el inserto buscado, indicado por la coloración de las colonias bacterianas, seleccionando colonias blancas, de las que se tomaron 10 colonias y cada una se cultivó en medio Terrific-Broth adicionado con ampicilina a 100 ng/μl e incubando a 37 °C toda la noche en agitación continua, así como en medio sólido agar-LB con ampicilina a la misma concentración. Para identificar las clonas que contenían el inserto de 484 pb de cada cultivo en líquido, se obtuvo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina, se hizo una PCR a partir de estos ADNs, además de someterse a digestión con las enzimas de restricción Eco RI y Sal I. Una vez confirmada la presencia del inserto, se obtuvo una mayor cantidad de ADN plasmídico para tres clonas seleccionadas, la extracción se realizó con el Kit Quantum Prep (BIO-RAD). El ADN plasmídico se almacenó a 20 °C para ensayos posteriores.

6. Fusión de los fragmentos de 355 pb y 484 pb con el vector pBS- *gfp*.

a) Preparación del vector aceptor pBS-*gfp*

A partir de 5 μg del plásmido pBS-*gfp* digeridos con la enzima Xho I para linearizar el ADN plasmídico. Para verificar la digestión total del ADN se sometió una alícuota de la restricción enzimática a electroforesis en gel de agarosa 1%. Posteriormente el ADN fue defosforilado para evitar una posible religación, con 10 unidades de la enzima fosfatasa alcalina (CIP) (Biolabs) a 37 °C por 45 min. La actividad de la fosfatasa se inactivó incubando la mezcla con SDS y EDTA a 70 °C, durante 2 horas.

b) Preparación de los insertos de 355 pb y 484 pb

Por su parte, los fragmentos de 355 pb y 484 pb se liberaron de los vectores pBS-*cpl*-355 y pBS-*cpl*-484 mediante restricción con la enzima Sal I, los fragmentos liberados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% se cortaron directamente del gel y se purificaron con el Kit Prep-A-Gene (Bio-Rad).

c) Ligación de los fragmentos 355 pb y 484 pb en el vector aceptor pBS-*gfp* y transformación de células competentes.

Cada fragmento se subclonó por separado en el plásmido pBS-*gfp* mediante una reacción de ligación con la enzima T4 ligasa colocando 20 ng de cada fragmento más 50 ng del

ADN plasmídico y se incubaron a 22 °C toda la noche. Se tomaron 5µl de cada ligación que se mezclaron con 100 µl de células *E. coli* competentes de la cepa XL1-B a 42 °C por 45 segundos para permitir su transformación. Después se incubaron en baño de hielo por 2 minutos. Posteriormente las células transformadas se incubaron con 900 µl de medio Luria-Broth a 37 °C por 1 hora y la mezcla se sembró en placas de agar-LB con ampicilina a 100 µg/ml. A partir de 10 colonias obtenidas se purificó ADN plasmídico para verificar la incorporación y la orientación de los insertos al someterlos a restricción enzimática con las enzimas Eco RI y Xba I, cuyas secuencias blanco se encuentran en los extremos de la fusión *cpl-355-gfp*, así como de la *cpl-484-gfp*, además por PCR con los oligonucleotidos sentido de los fragmentos de 355 y 484 y el oligonucleotido antisentido del gen *gfp*.

Resultados y Discusión

1.- Clonación del marco de lectura abierta del gen *gfp* en el vector pBlueScript

Para la construcción pBS-*gfp* se realizó una PCR para amplificar el marco de lectura abierto del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando los oligonucleotidos GFPXHO y GFPXBA, el producto de esta amplificación se observó por electroforesis en gel de agarosa, en el cual se encontró una banda de ~720 pb que corresponde al peso de la región codificante de la proteína GFP como se observa en el carril 2 de la figura 1, donde se aprecia del mismo modo el marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen) en el carril 1. El resultado indica que la amplificación es específica para el ADN del plásmido pGreen Lantern-1 y no es producto de contaminación con otro ADN ya que en el carril 3 correspondiente al control (-) no se encontró producto de amplificación.

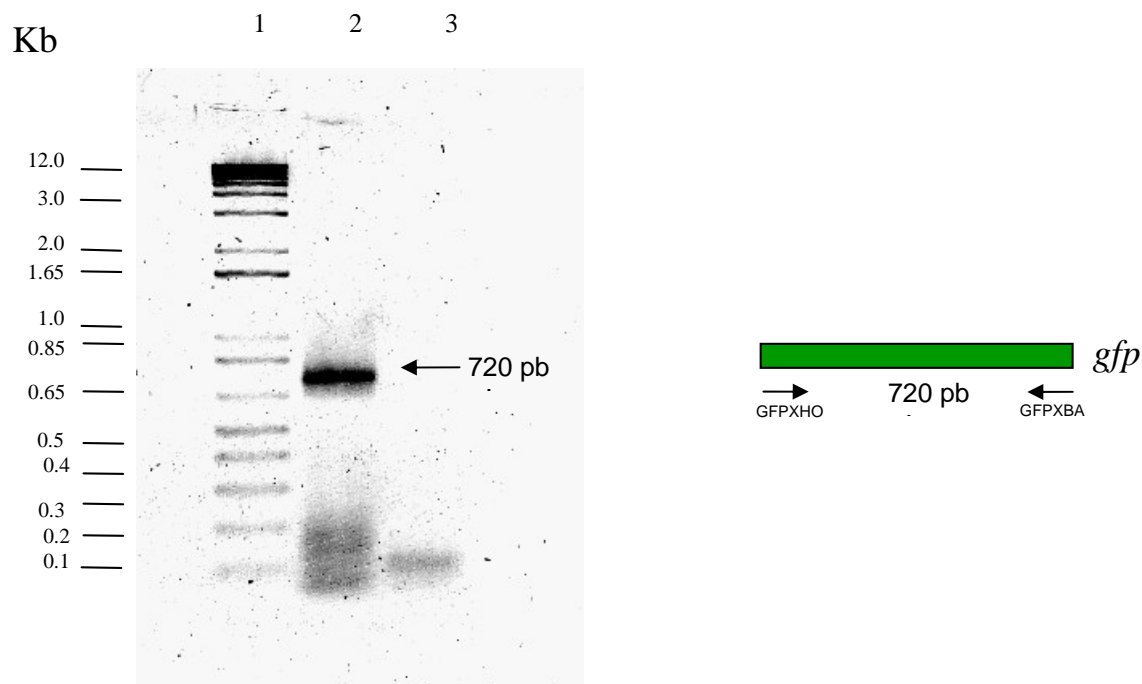


Figura 1. Gel de agarosa al 1.5% utilizado para la electroforesis del fragmento de 720 pb amplificado por PCR correspondiente a la región codificante del gen para la GFP, además se observa de manera esquemática el amplificado de 720 pb correspondiente y los oligonucleotidos empleados.

El fragmento de 720 pb del *gfp* se fusionó al vector pBluescript KS+ por medio de una reacción de ligación para lo cual se mezclaron 50 ng del fragmento con 50 ng del vector en una reacción de ligación. Posteriormente con 5 µl de la reacción de ligación se transformaron 100 µl de células competentes XL1-Blue, que fueron incubadas a 42 °C por 45 segundos. Posteriormente se sembraron en 900 µl de medio Luria y se encubaron a 37 °C por 1 hora en agitación, la mezcla se vertió en cajas petri con medio Luria-agar con ampicilina y X-gal y se mantuvo a 37 °C toda la noche, de las colonias obtenidas se seleccionaron 10 colonias blancas con una parte de cada colonia se sembró en medio sólido Luria/agar con ampicilina y Xgal 100µg/ml y X-gal a 32 µg/ml respectivamente y el resto de la colonia en 3 ml de medio líquido Luria con ampicilina, se cultivaron a 37 °C toda la noche en agitación. A partir de estos cultivos se llevó a cabo una purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreps) por el método de lisis alcalina. El ADN extraído se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% por un periodo de 1 hr a 70 volts con la finalidad de analizar la migración del ADN plasmídico (figura 2). En esta figura se puede observar que la mayoría de las muestras (carriles 2 a 11) presentan un corrimiento superior al que se observa en el carril 10, lo cual sugiere la presencia de inserto en las clonas que muestran un retraso.

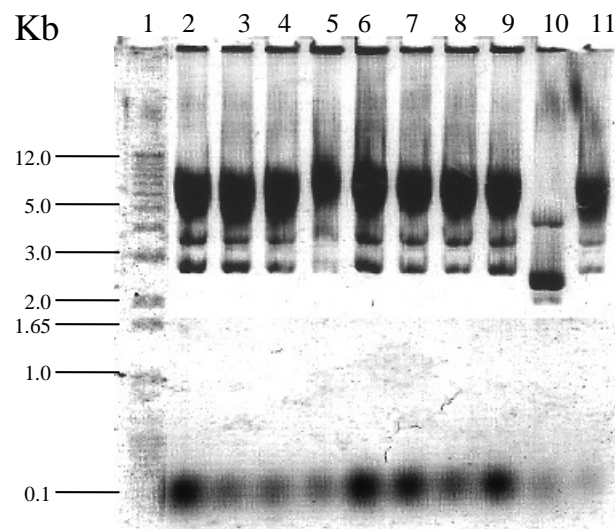


Figura 2. Migración del ADN plasmídico de la construcción pBS-*gfp*.

Para verificar la presencia del inserto se seleccionaron las clonas 2, 7 y 10 (carriles 3, 8 y 11) los cuales se digirieron con la enzima de restricción Xho I a 37 °C toda la noche, una vez transcurrido el tiempo de digestión las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en presencia de EtBr 2 µg/ml a 70 volts por 1 hora. En la figura 3 se puede observar que la clona 7 (carril 3) al ser digerida por Xho I, presenta una sola banda de un peso aproximado de 3700 pb, en tanto que las otras dos clonas (clona 2 y 10, carriles 2 y 4 respectivamente) liberan el inserto correspondiente al gen *gfp* de 720 pb aproximadamente.

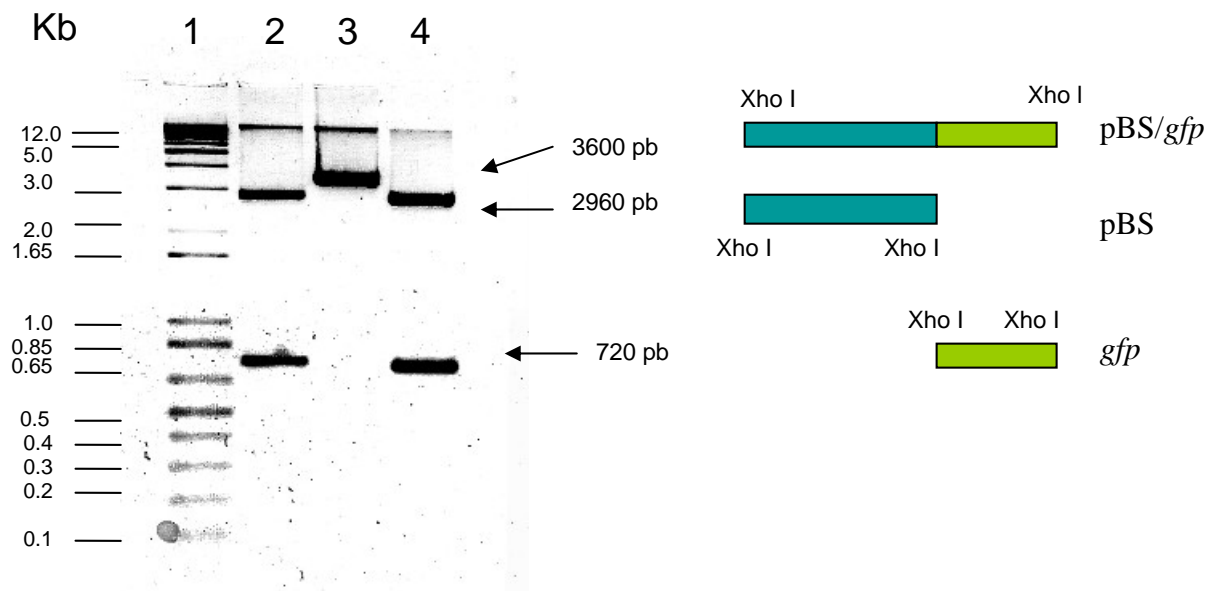


Figura 3. Electroforesis del ADN plasmídico de las clonas 2, 7 y 10 (carriles 2, 3 y 4 respectivamente), digerido con la enzima Xho I. En las clonas 2 y 4 se observa una banda de 720 pb que corresponde al inserto *gfp*. En el caso del carril 3 no liberó el inserto, solo se aprecia una banda de peso molecular de aproximadamente 3.6 Kb lo que sugiere la presencia del inserto, que debido a su orientación no es liberado por Xho I. De manera esquemática se muestran las dos versiones de la construcción obtenida para el inserto de la región codificante del gen *gfp* en el plásmido pBlueScript KS+, así como las posiciones de los sitios de corte para la enzima Xho I.

Para verificar la presencia del inserto las clonas fueron sometidas a una segunda digestión con la enzima Xba I que se encuentra en el otro extremo del inserto. Al finalizar la reacción de digestión se procedió a correr un gel de agarosa al 2 %, donde fue posible observar la liberación del inserto en la clona 7, carril 3 de la figura 4.

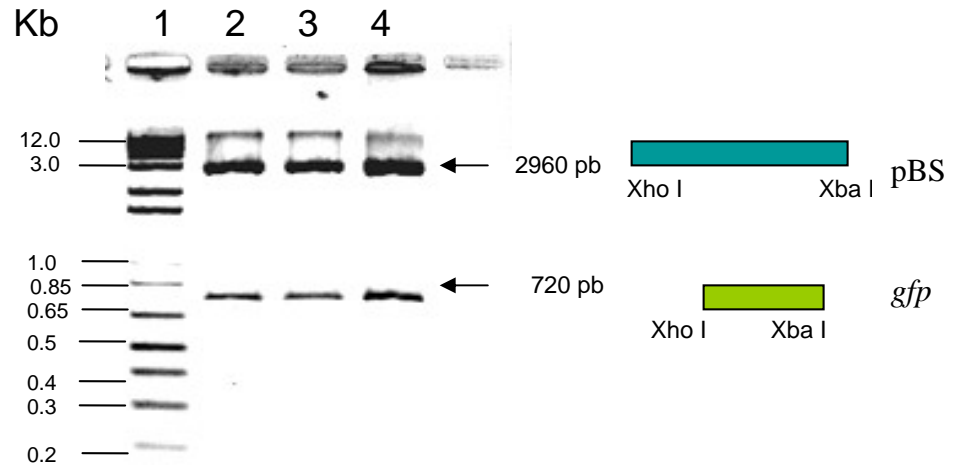


Figura 4. Digestión doble con las enzimas Xho I y Xba I de las clonas 2, 7 y 10, carriles 2, 3, y 4 respectivamente. De manera esquemática se muestran la liberación del inserto correspondiente al gen *gfp* liberado del vector pBS.

2. Clonación de los fragmentos de 355 pb y 484 pb obtenidos a partir del gen *cpl*

A través del método de PCR se amplificaron los dos fragmentos que contienen la región promotora del gen *cpl* de *G. lamblia*. El primer producto se amplificó utilizando los oligonucleotidos CP61ER1 y CPGIRIS, siendo el tamaño esperado de 355 pb, en el caso del segundo se emplearon los oligonucleotidos CP61ER1 y GP51R2S, esperando un tamaño de 484 pb para este amplificado. Los productos se sometieron a electroforesis encontrándose las dos bandas con los pesos de 355 pb y 484 pb respectivamente (figura 5). A partir de los productos de PCR se llevó a cabo una reacción de ligación para cada fragmento utilizándose como vector aceptor el pBS-KS+. Con estas ligaciones se transformaron células competentes XL1-Blue, creciéndose en medio sólido Luria/Agar en presencia de ampicilina a 100µg/ml y X-gal a 32 µg/ml. Después de 20 horas de cultivo se seleccionaron 10 colonias blancas resembrándose cada construcción en medio líquido y sólido. A partir del cultivo en líquido se extrajo ADN plásmido, que fue sometido a electroforesis (figura 6). Se encontraron diferencias en la migración de las clonas tanto para el fragmento de 355 pb como el de 484 pb, es decir que varias de las clonas mostraron un retraso en su migración, infiriendo así la posible presencia del fragmento ligado al vector.

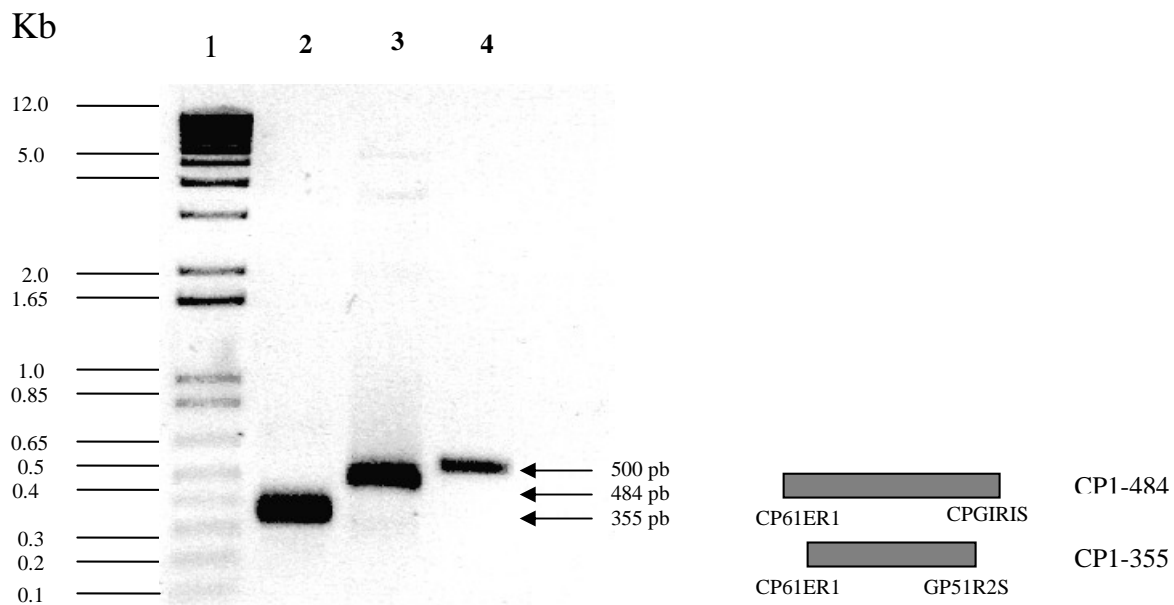


Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir de ADN geonómico de *Giardia lamblia*. En el carril 2 se observa el producto amplificado de 355 pb, en el carril 3 se observa el producto de 484 pb, en el carril 4 se aprecia como control positivo un producto de 500 pb. En el carril 1 se encuentran los marcadores de PM de 1 Kb. De manera esquemática se muestran los dos productos de PCR así como los oligonucleótidos utilizados para su amplificación.

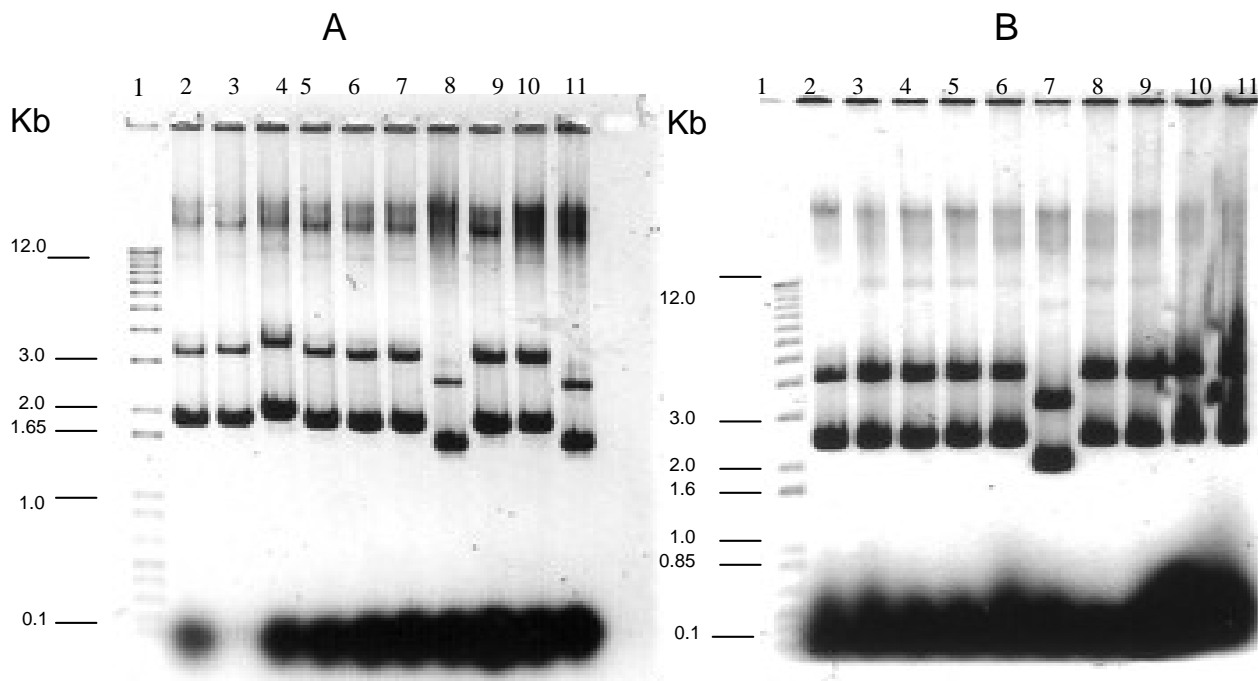


Figura 6. Plásmidos purificados a partir de colonias blancas transformadas con la fusión del producto de PCR de 355 pb de ADN de *Giardia lamblia* en el vector pBlueScript II (A). Así como del fragmento de 484 pb fusionado en el pBlueScript II (B).

Los ADN plasmídicos se sometieron a digestión con las enzimas de restricción Eco RI y Sal I y la introducción del inserto fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa al 2% (figura 7).

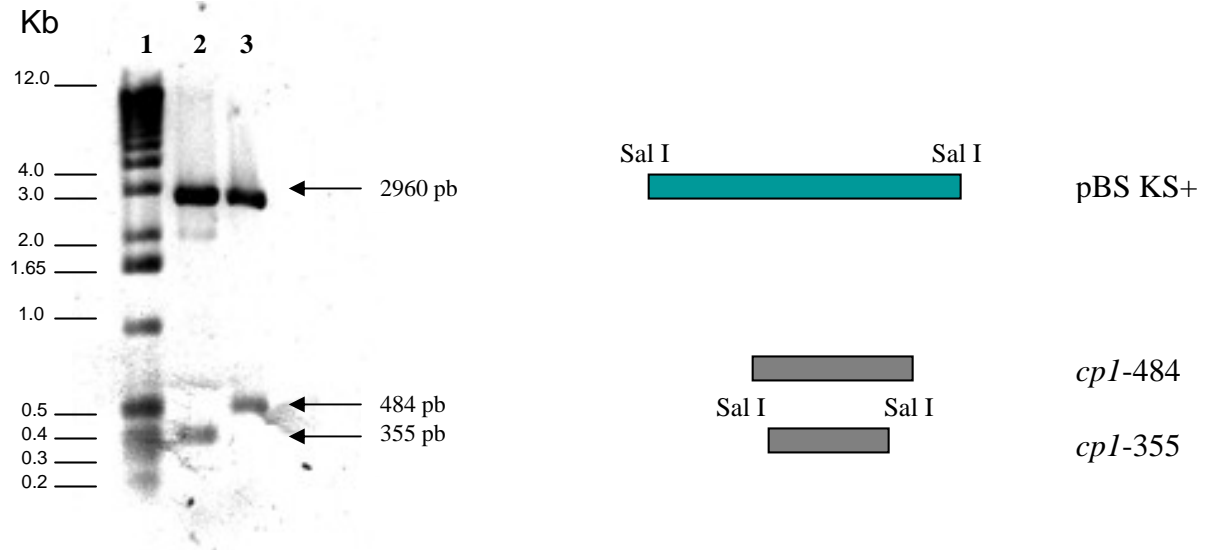


Figura 7. Electroforesis de la digestión enzimática llevada a cabo con la enzima Sal I, la cual evidencio la presencia de los dos insertos esperados: en el carril 2 el fragmento de 355 pb y en el carril 3 el de 484 pb, el carril 1 corresponde a los marcadores de PM. Asimismo se ilustra de manera esquemática la liberación de ambos insertos.

La inserción de los productos de 355 pb y 484 pb provenientes del gen *cp1* de *G lamblia* también se verificaron por PCR con oligos específicos para el vector pBluescript KS+ que se unen a la región del sitio de clonación múltiple (MCS por sus siglas en ingles) flanqueando al inserto, por lo que los productos de PCR se aprecian de un tamaño superior (aproximadamente 200 pb) de su tamaño original. De esta forma se encontró que los pesos para estos amplificados fueron de 550 pb y 680 pb aproximadamente. (figura 8)

Los resultados indican la presencia de los fragmentos del gen *cp1* de *Giardia lamblia*, al igual que el gen que codifica para la GFP clonados en el plasmido pBS-KS+ con el tamaño esperado para cada uno de ellos (355, 484 y 720 pb respectivamente). En el caso de la clona 7 del pBlueScript conteniendo el gen *gfp* (Figura 3) los dos sitios Xho I se encuentran muy próximos, por lo cual al cortar con la enzima Xho I el inserto es retenido, así al ser sometido a electroforesis en un gel de agarosa se aprecia una sola banda de aproximadamente 3600 pb, por lo que se decidió utilizar este vector como aceptor de los dos fragmentos de ADN genómico de *G. lamblia* previamente clonados, que a su vez serán

liberados por medio de digestión con la enzima Sal I. Es necesario mencionar que Sal I y Xho I reconocen la misma secuencia, una vez hecha la unión, ninguna de las enzimas es capaz de cortar en la nueva secuencia generada, ya que el sitio creado no corresponde a una secuencia palindrómica que pueda reconocer la enzima Xho I o Sal I.

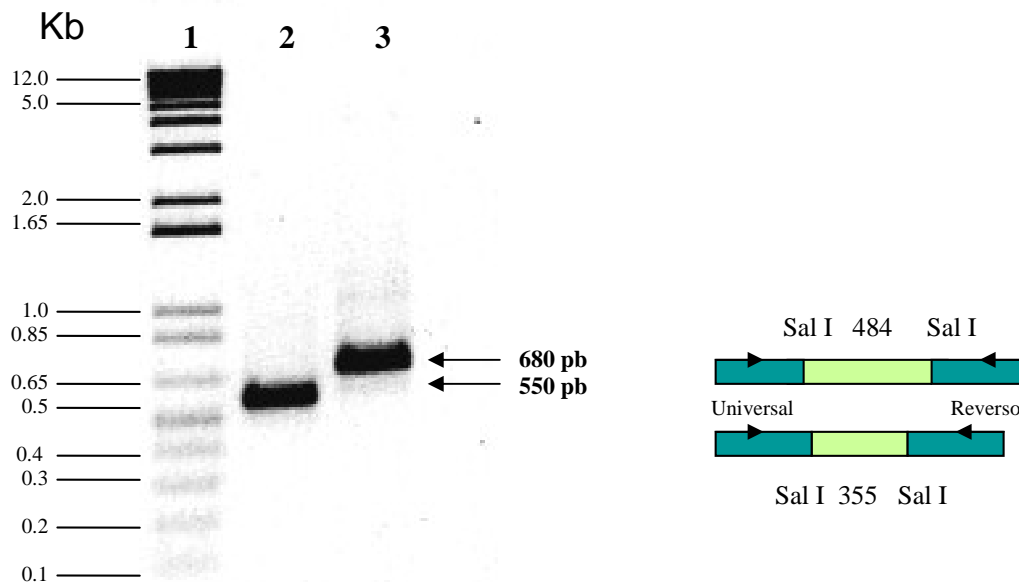


Figura 8. Productos de PCR amplificados a partir del ADN plásmido pBlueScript que contiene el fragmento de 355 pb (carril 2) y el de 484 pb (carril 3), en donde se utilizaron los oligonucleotidos específicos para el vector pBluescript KS+ (Universal y Reverso), cuya posición es señalada en el esquema adjunto. El carril 1 se observan los MPM de 1 Kb.

Para llevar a cabo esta parte del trabajo experimental se procedió a realizar tres digestiones enzimáticas por separado: las primeras dos con la enzima Sal I, con los vectores llamados pBS-*cpI*-355 y el pBS-*cpI*-484 cortando una cantidad de 5 μ g, de cada uno, encontrándose como se esperaba en cada caso la liberación de su inserto respectivo. Cada muestra se colocó en su totalidad en un gel de agarosa al 2 %. Se realizó la electroforesis a 70 volts por 1 hora. Posteriormente las bandas se cortaron del gel y el DNA se purificó empleando el Kit Prep-A-Gene (BioRad). Para verificar la eficiencia de esta purificación se corrieron alícuotas de cada purificado (10% de cada uno) y fueron cuantificadas. El vector pBS-*gfp* fue preparado de modo similar al de los dos fragmentos del gen *cpI*. En este caso se digirió con la enzima Xho I, generándose así una banda de un peso aproximado de 3600 pb, que se

verificó por electroforesis. Este ADN se sometió a una reacción de defosforilación lo que reduce la posibilidad de religación y favorece la integración de los fragmentos en dicho vector. Terminada la defosforilación, el ADN se colocó en su totalidad en un gel de agarosa al 0.7 % de donde se cortó la banda y se purificó de igual forma con ayuda del Kit Prep-A-Gene (Bio-Rad). Se procedió a realizar dos reacciones de ligación colocando 25 ng de inserto y 50 ng de vector, para tener al menos tres copias de inserto por una de vector, adicionándose 1 unidad de la enzima T4 ligasa, así como su amortiguador correspondiente. Las dos ligaciones se incubaron a 22 °C toda la noche. Al siguiente día con las ligaciones se transformaron células competentes *E. coli* de la cepa XL1-Blue (Stratagene). Se obtuvieron colonias en presencia de ampicilina (100 µg/ml). De cada transformación se tomaron 10 colonias que fueron sembradas en 3 ml de medio Terrific con ampicilina a 100 µg/ml, así como en medio LB/agar también con ampicilina. Se llevó a cabo extracción de ADN plásmido a partir de los cultivos sembrados en medio Terrific por el método de lisis alcalina, los plásmidos fueron analizados por electroforesis y se seleccionaron las clonas que mostraron un mayor retraso en su corrimiento. El ADN plasmídico se digirió con las enzimas Eco RI y Xba I. (Figura 9) De manera adicional para confirmar la presencia del inserto se llevó a cabo una reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleotidos CP61ER1 (sentido) y GFPXBA (antisentido), el primero se une al extremo 5' del gen *cp1* y el segundo al extremo 3' del gen *gfp*, por lo que en la reacción de PCR se amplificó un producto correspondiente a los fragmentos provenientes de *Giardia* fusionados a la secuencia codificante del gen GFP, generando un amplificado de 1075 pb en el caso del *cp1*-355 fusionado a la GFP o bien un producto de 1204 pb cuando se trató del *cp1*-484 unido al gen *gfp*. (Figura 10)

Los resultados mostraron que tanto el fragmento de 355 pb que corresponde al promotor y el extremo amino terminal, así como el de 484 pb que comprende el promotor y una parte del marco de lectura abierto que codifica para la región amino del gen *cp1*, obtenidos por PCR a partir del protozoario *Giardia lamblia*, están fusionados al marco de lectura abierto del gen que codifica para la Proteína Verde Fluorescente (GFP). En el caso del fragmento *cp1*-355 unido al gen *gfp* contiene el promotor del gen *cp1* y 120 bases correspondientes a 40 aminoácidos del marco de lectura abierto de este gen, por lo que se procura que esta

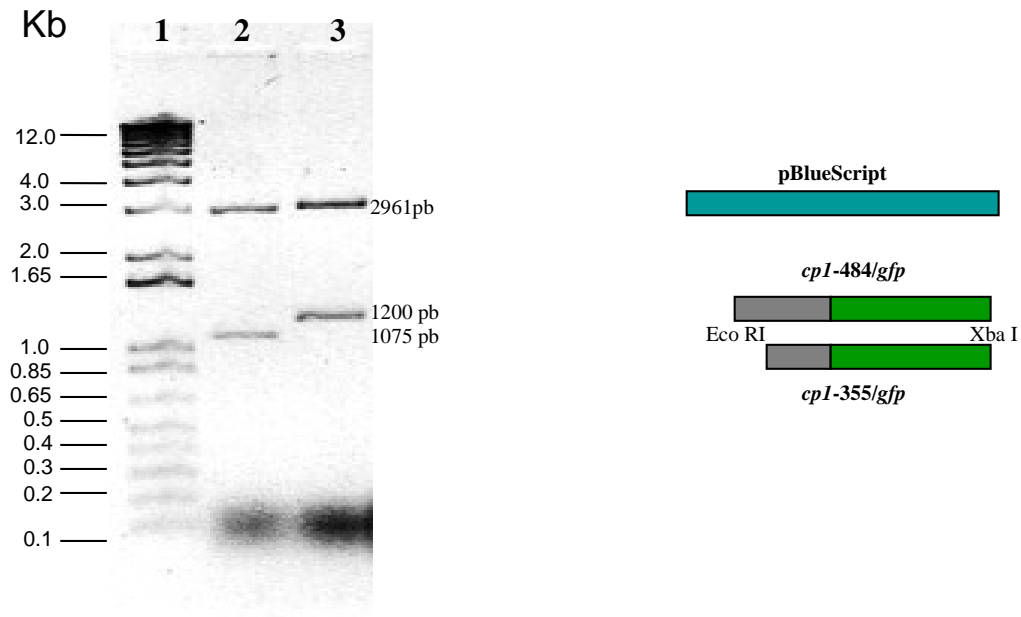


Figura 9. Electroforesis de las construcciones genéticas: Se observa la digestión con las enzimas Eco RI y Xba I, que cortan a los extremos de las construcciones elaboradas. En el caso de la construcción pBS-*cp1-355-gfp* el peso molecular aproximado del inserto *cp1-355-gfp* liberado es de 1075 pb (carril 2) y para la construcción pBS-*cp1-484-gfp* el peso molecular aproximado para el inserto *cp1-484-gfp* fué de 1200 pb (carril 3).

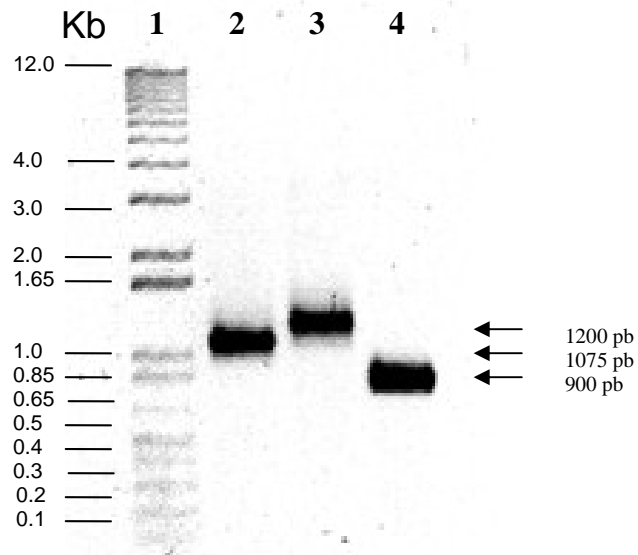


Figura 10. Amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos complementarios a las secuencias de los extremos de estas mismas construcciones: GFPXHO-CPGIRIS para el inserto *cp1-355-gfp* (carril 2) y GFPXHO-GP51R2S para el *cp1-484-gfp* (carril 3), así mismo se incluyó un control positivo de un tamaño de 900 pb (carril 4). En el carril 1 se observan los MPM de 1 Kb.

corta región codificante del *cp1* quedara en fase con el marco de lectura abierto del gen *gfp* al diseñarse la construcción, confirmandose por secuenciación (figura 11). Así, al utilizar esta construcción en un ensayo de transfección posterior, se espera que se exprese una corta región del extremo amino fusionado a la proteína reportera GFP, permitiendo tener una idea de que tan eficiente es el promotor de esta cisteín proteasa, y así conocer el nivel de expresión, midiendo la señal verde fluorescente, lo cual sería el primer paso en la caracterización del promotor del gen *cp1*. En el caso de la construcción pBS-*cp1*-484-*gfp*, una parte de secuencia codificante que corresponde a 84 aminoácidos de la región amino de la proteína CP1 está fusionada a la proteína GFP, por lo que es importante que los dos fragmentos queden en fase de tal manera que no se altere el marco de lectura abierto de la GFP, lo que produciría un corrimiento de dicho marco de lectura o que se generen codones de terminación prematuros, lo cual fue considerado durante el diseño experimental, y confirmado por secuenciación (figura 12) para la fusión *cp1*-484-*gfp*. La secuenciación fue llevada a cabo en un secuenciador modelo 3100 Genetic analyzer de 16 capilares (Applied Biosystems). Los electroferogramas obtenidos a partir de las construcciones generadas son mostrados (Apendice VI y VII), así como una comparación entre la secuencia teórica y la secuencia obtenida para la construcción pBS-*cp1*-355-*gfp* y para la construcción pBS-*cp1*-484-*gfp* (Apendice VIII y IX).

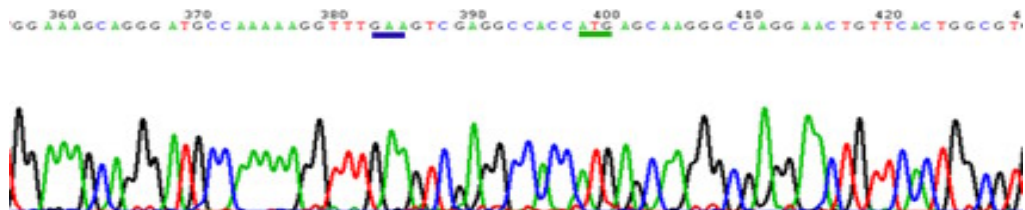


Figura 11. Secuencia de la construcción pBS-*cp1*-355-*gfp* que comprende el último codon del fragmento de 355 pb del ADN del gen *cp1* (barra en color azul) y el codon de inicio del gen *gfp* (barra en color verde), mostrando que el marco de lectura abierto del *gfp* permanece inalterado. En la región intermedia se encuentra la secuencia GTCGAG que corresponde a la fusión de los sitios Xho I y Sal I.

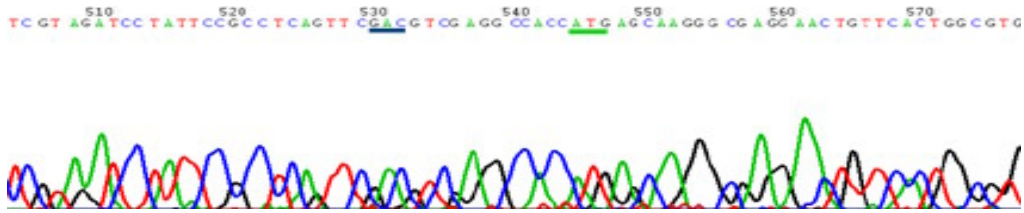


Figura 12. Secuencia de la construcción pBS-cp1-484-gfp que comprende el último codon del fragmento de 484 pb del ADN del gen *cp1* (barra en color azul) y el codon de inicio del gen *gfp* (barra en color verde), mostrando que la fusión quedó en fase y el marco de lectura abierto del *gfp* no se altera. En la región intermedia se encuentra la secuencia GTCGAG que corresponde a la fusión de los sitios Xho I y Sal I.

Se espera que la fusión *cp1-484-gfp* al ser transfectada se transcriba como un solo mensajero y al traducirse de igual forma se exprese como una proteína de fusión que incluya el extremo amino de la cisteín proteasa CP1 y la proteína GFP completa y sea dirigida a la ubicación dentro de la célula propia de la proteína endógena. Cabe mencionar que esta superfamilia de proteasas normalmente se expresa como precursores: preproteínas o zimogenos, los cuales no son activos, su actividad la adquieren al momento de experimentar una ruptura que puede ser catalizada por otras enzimas o bien por ellas mismas. Otra consideración importante es que el fragmento liberado muchas veces cumple con una función de señal de transporte y dependiendo de su naturaleza química y gracias a un complicado sistema de clasificación y tráfico de proteínas, presente en las células eucariotas, tales como *Giardia*, la proteasa es dirigida al compartimiento donde la enzima lleva a cabo su función, por lo tanto, cuando se utilice esta construcción en un ensayo de transfección, se espera que la localización de la proteasa CP1 se evidencie gracias a la Proteína Verde Fluorescente, que al ser excitada muestra una coloración verde, cuando se observa por microscopía de fluorescencia.

Las construcciones obtenidas en este trabajo, se utilizarán en próximos proyectos para investigar la ubicación y nivel de expresión de la cisteín proteasa CP1 dentro de los trofozoítos de *Giardia lamblia*. Para lo que estas construcciones deben ser subclonadas a un vector apropiado para este eucariota, aunque existen reportes de que plásmidos que funcionan en procariotas podrían funcionar de igual forma en *Giardia*. De acuerdo a la literatura se sabe que estas construcciones son mas eficientes si se les adiciona un extremo 3' a las mismas, por lo que nosotros sugerimos amplificar regiones UTR 3' de genes que han sido probados y que han mostrado una alta eficiencia en otros vectores y fusionarlas a

nuestras construcciones y por otra parte amplificar el extremo UTR 3' del propio gen *cp1* y clonarla río abajo del gen *gfp*, para así evaluar si esta región es importante en la expresión de la proteína y así comparar con otros UTR 3' conocidos.

CONCLUSIONES

-Se clonó la región del gen *gfp* que codifica para la proteína reportera GFP, en el vector procariotico pBlueScript II KS+, denominándose a esta construcción pBS-*gfp*.

-Se clonó un fragmento de 355 pb amplificado del gen *cp1* de *Giardia lamblia*, que comprende la región promotora y una corta región amino (40 aminoácidos) del gen *cp1* en el vector procariota pBluescript, denominándose a esta construcción pBS-*cp1*-355.

- Se clonó un fragmento de 484 pb amplificado del gen *cp1* de *Giardia lamblia*, que comprende la región promotora y 84 aminoácidos de la región amino del gen *cp1*, en el vector procariota pBluescript, denominándose a esta construcción pBS-*cp1*-484.

-Se subclonó el inserto *cp1*-355 de *Giardia* en el vector denominado pBS-*gfp*, denominándose esta construcción como pBS-*cp1*-355-*gfp*.

- Se subclonó el inserto *cp1*-484 de *Giardia* en el vector denominado pBS-*gfp*, denominándose esta construcción como pBS-*cp1*-484-*gfp*.

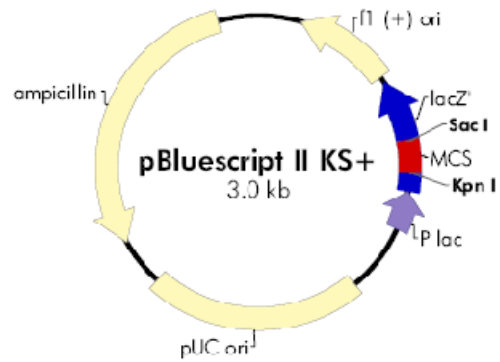
-Se demostró la fusión del fragmento *cp1*-355 con el gen *gfp* por PCR y digestión enzimática.

-Se demostró la fusión del fragmento *cp1*-484 con el gen *gfp* por PCR y digestión enzimática.

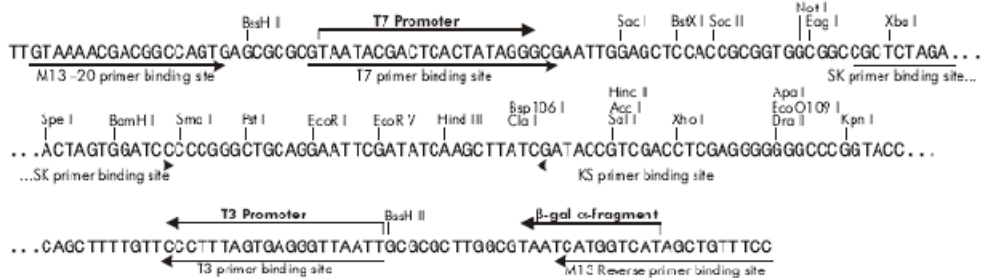
-Se confirmó por medio de secuenciación que los dos insertos del gen *cp1* quedaron en fase con el gen de la Proteína Verde Fluorescente *gfp*.

Apendice I: Mapas de los plasmidos pBluEscript II KS+ y pBluescript II SK+

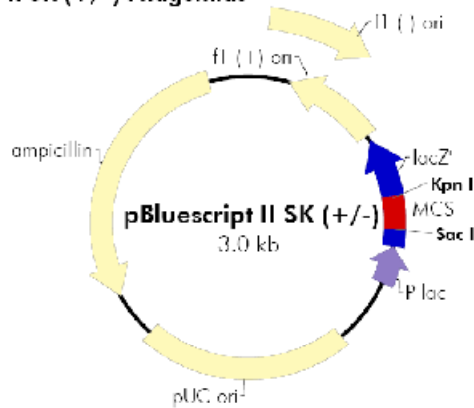
f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-816
multiple cloning site 653-760
lac promoter 817-938
pUC origin 1158-1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976-2833



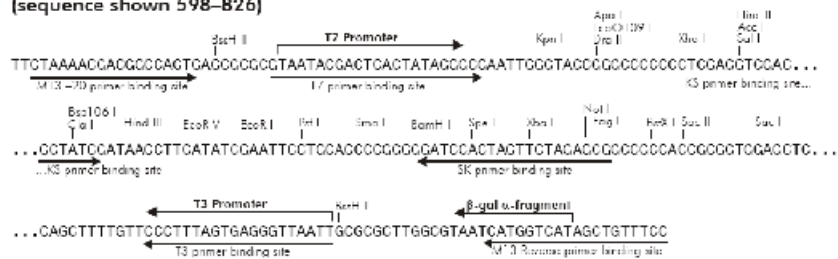
pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



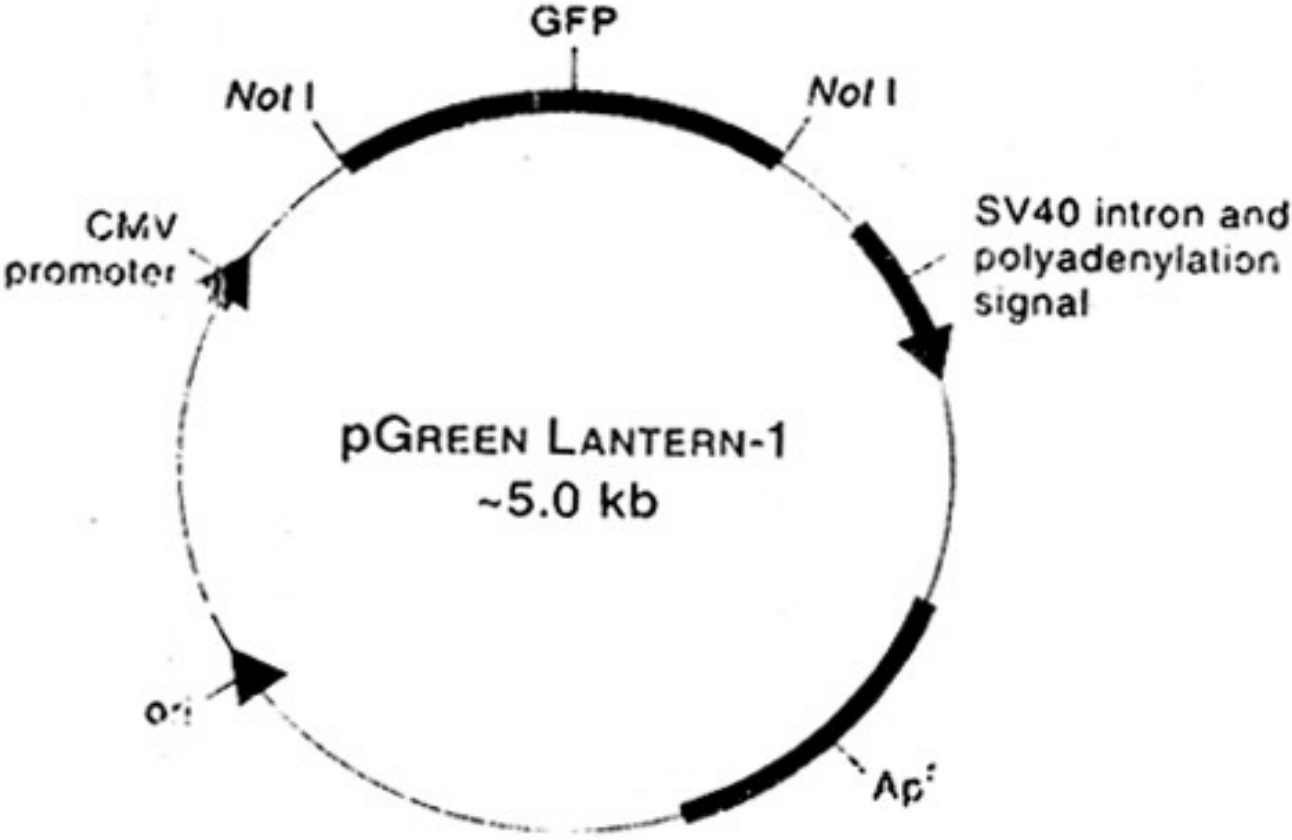
pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



Apendice II: Vector pGreen Lantern-1



Apendice III: Secuencia del gen CP1 (# de acceso en GenBank U83275)

```
1 CCGGGCACCG TCCCCGGGG TACTAGGCTG GGTACCACAC GTGGCGCAGC TGCATAGCTT
61 TCTGCTAAGT TTATCGTCTA CGTGTGGTAC ATAGTTTAAA CAGTCCAACC AAAGTGATTT
121 TTTGAAGTTC ATTCACCACA GTGATAGCAA GCTGGTGCAG TCCCTTGCTA TGAAGTGACC
181 AATTAATGTG CCCTTCTCAT AATACACGAG TCATGTAATT ACGAATCAAA TATATATGGC
241 TTTATCTTTG CTCTTGCTG TAGTTTGTGC AAAGCCCCTG GTGAGCCGCG CCGAGCTAAG
301 GCGGATTCAG GCTCTCAATC CTCCATGGAA AGCAGGGATG CCAAAAAGGT TTGAAAACGT
361 CACAGAAGAT GAATTTGTA GCATGCTGAT CCGTCCCGAC CGTCTTAGAG CAAGATCTGG
421 CTCTCTACCG CCAATTTGTA TAACAGAAGT CCAGGAACTC GTAGATCCTA TTCCGCCTCA
481 GTTCGACTTC CGTGATGAGT ACCCTCAGTG CGTGAAACCA GCGCTGGACC AAGGAAGTTG
541 CGGGGAATGT TGGGCATTCT CAGCTATAGG AGTGTTGCGG GACAGGCGCT GTGCGATGGG
601 CATCGATAAG GAGGCCGTCT CCTACTCGCA GCAACACCTC ATATCCTGCT CACTAGAGAA
661 CTTTGGCTGT GATGGAGGCG ATTTTCAACC GACATGGAGC TTTCTAACTT TCACAGGAGC
721 AACCACAGCT GAATGCGTTA AGTACGTTGA CTATGGTCAC ACCGTAGCGT CTCCGTGCCC
781 TGCGGTCTGT GACGACGGAT CTCCGATACA GCTCTACAAG GCACATGGAT ATGGACAGGT
841 GAGCAAGAGT GTTCCGGCCA TAATGGGAAT GCTCGTCGCT GCGGACCGC TGCAGACCAT
901 GATCGTCGTG TACGCTGACC TGTCGTAATA TGAAAGCGGT GTCTATAAAC ACACCTATGG
961 AACCATCAAT CTTGGGTTCC ATGCTTTGGA AATAGTTGGC TACGGGACCA CTGATGACGG
1021 GACGGACTAC TGGATTATAA AGAACTCCTG GGGCCCCGAT TGGGGCGAAA ACGGGTACTT
1081 CCGGATTGTC CGCGGAGTCA ATGAGTGCAG GATAGAGGAT GAAATCTATG CTGTATATCT
1141 TGA TAGCGC CTGTCTTCAT ACATAGCTAC CATTGCCCTA ATGGGTAGAA GTAAACGTTT
1201 TTCTGGTCCA TGCATTAAAA ATGGAAGATT GGCTGCCGGT TCCTCCATCT CGTGGAATAT
1261 CTGAACCGGG CATCTGAACG ATTGGCGTCA GTGCTCCTTG GAGGCGATTT CGCCGCACAG
1321 CTTGCCCCAG AACAGGT
```

Sitio de unión del oligonucleotido CP61ER1 (Sentido) 




Sitio de unión del oligonucleotido CPGIRIS (Antisentido) 

Sitio de unión del oligonucleotido GP51R2S (Antisentido) 

Apendice IV: Secuencia teórica de la construcción *cp1-355-gfp*

GAATTGGGGTACTAGGCTGGGTACCACACGTGGCGCAGCTGCATAGCTTTCT
GCTAAGTTTATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAACCAAAGTGA
TTTTTTGAAGTTCATTCACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGCAGTCCCTTGCTAT
GAACTGACCAATTAATGTGCCCTTCTCATAATACACGAGTCATGTAATTACGAA
TCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCTTGGCTGTAGTTTGTGCAAAGCCCCTG
GTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTCAGGCTCTCAATCCTCCATGGAAAGC
AGGGATGCCAAAAGGTTTGAAGTCGAGGCCACCATGAGCAAGGGCGAGGAA
CTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATTCTCGTGGAAGTGGATGGCGATGTGAATGGG
CACAAATTTTCTGTCAGCGGAGAGGGTGAAGGTGATGCCACATACGGAAAGCT
CACCTGAAATTCATCTGCACCACTGGAAAGCTCCCTGTGCCATGGCCAACACT
GGTCACTACCTTCACCTATGGCGTGCAGTGCTTTTCCAGATACCCAGACCATAT
GAAGCAGCATGACTTTTTCAAGAGCGCCATGCCCGAGGGCTATGTGCAGGAGA
GAACCATCTTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACCCGCGCTGAAGTCAAG
TTCGAAGGTGACACCCTGGTGAATAGAATCGAGTTGAAGGGCATTGACTTTAA
GGAAGATGGAAACATTCTCGGCCACAAGCTGGAATACAACATAACTCCCACA
ATGTGTACATCATGGCCGACAAGCAAAAAGAATGGCATCAAGGTCAACTTCAAG
ATCAGACACAACATTCAGGATGGATCCGTGCAGCTGGCCGACCATTATCAACA
GAACTCCAATCGGCGACGGCCCTGTGCTCCTCCCAGACAACCATTACCTGTC
CACCCAGTCTGCCCTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCC
TGCTGGAGTTTGTGACCGCTGCTGGGATCACACATGGCATGGACGAGCTGTAC

AAGTGA

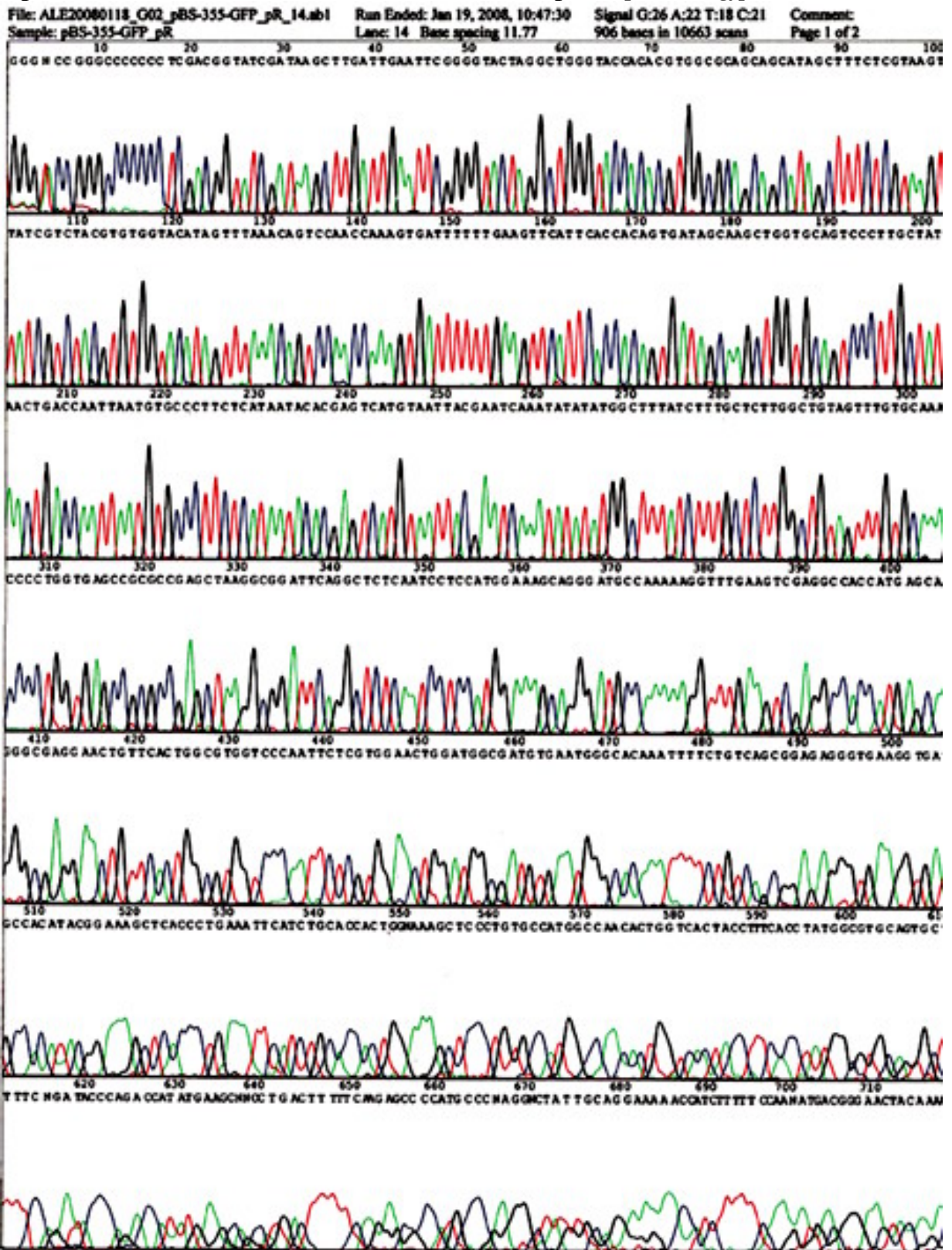
- Sitios de unión de los oligonucleotidos que flanquean a la construcción. 
- Codon de inicio de la cisteín proteasa CP1 de *G. lamblia*. 
- Fusión del fragmento 355 y el *gfp*, incluyendo el codon de inicio de la GFP 

Apéndice V: Secuencia teórica de la construcción *cp1-484-gfp*

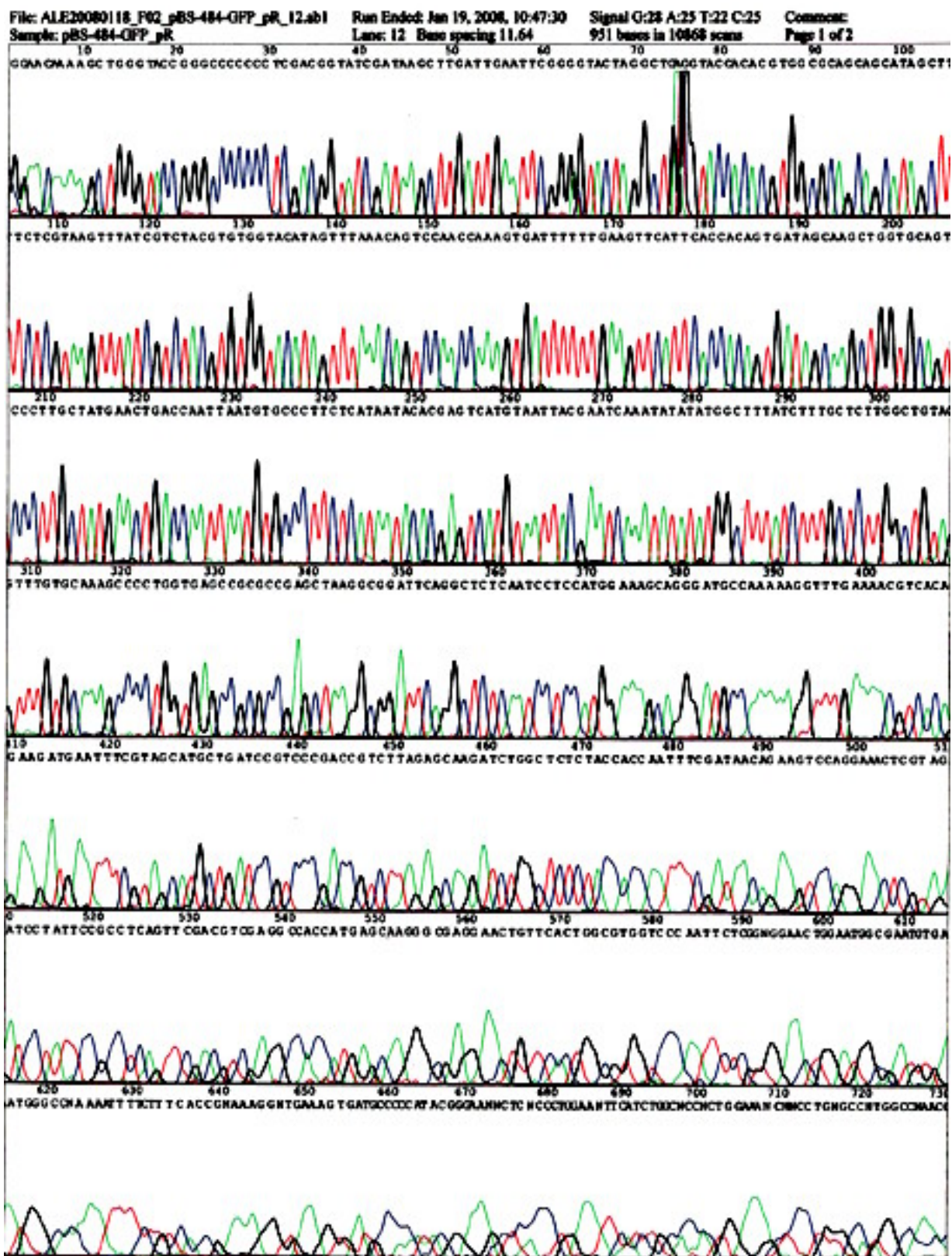
GAATTCGGGGTACTAGGCTGGGTACCCACACGTGGCGCAGCTGCATAGCTTTCTGCTAAGTT
TATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAACCAAAGTGATTTTTTTGAAGTTCAT
TCACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGCAGTCCCTTGCTATGAACTGACCAATTAATGTGCC
TTCTCATAATACACGAGTCATGTAATTACGAATCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCT
TGGCTGTAGTTTGTGCAAAGCCCCTGGTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTCAGGCTCT
CAATCCTCCATGGAAAGCAGGGATGCCAAAAGGTTTGAAAACGTCACAGAAGATGAATTT
CGTAGCATGCTGATCCGTCCCGACCGTCTTAGAGCAAGATCTGGCTCTCTACCGCCAATTT
CGATAACAGAAGTCCAGGAACTCGTAGATCCTATTCCGCCTCAGTTCGACGTCGACGCCAC
CATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATTCTCGTGGAACTGGATGCC
GATGTGAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGCGGAGAGGGTGAAGGTGATGCCACATACGGAA
AGCTCACCTGAAATTCATCTGCACCACTGGAAAGCTCCCTGTGCCATGGCCAACACTGGT
CACTACCTTACCTATGGCGTGCAGTGCTTTTCCAGATACCCAGACCATATGAAGCAGCAT
GACTTTTTCAAGAGCGCCATGCCCGAGGGCTATGTGCAGGAGAGAACCATCTTTTTCAAG
ATGACGGGAACTACAAGACCCGCGCTGAAGTCAAGTTCGAAGGTGACACCCTGGTGAATAG
AATCGAGTTGAAGGGCATTGACTTTAAGGAAGATGGAAACATTCTCGGCCACAAGCTGGAA
TACAACTATAACTCCCACAATGTGTACATCATGGCCGACAAGCAAAGAATGGCATCAAGG
TCAACTTCAAGATCAGACACAACATTCAGGATGGATCCGTGCAGCTGGCCGACCATTATCA
ACAGAACACTCCAATCGGCGACGGCCCTGTGCTCCTCCCAGACAACCATTACCTGTCCACC
CAGTCTGCCCTGTCTAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTGCTGGAGTTTG
TGACCGCTGCTGGGATCACACATGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA

- Sitios de unión de los oligonucleótidos que flanquean a la construcción. ■
- Codón de inicio de la cistein proteasa CP1 de *G. lamblia*. ■
- Fusión del fragmento 484 y el *gfp*, incluyendo el codón de inicio de GFP. ■

Apéndice VI: Secuenciación de la construcción pBS-*cp1-355-gfp*



Apendice VII: Secuenciación de la construcción pBS-*cpI*-484-*gfp*



Apendice VIII: Comparación de la secuencia obtenida (renglón superior) para la construcción pBS-*cpI-355-gfp* con la secuencia teórica (renglón inferior).

41	GAATTCGGGGTACTAGGCTGGGTACCACACGTGGCGCAGCAGCATAGCTT	90
1	GAATTCGGGGTACTAGGCTGGGTACCACACGTGGCGCAGCTGCATAGCTT	50
91	TCTCG-TAAGTTTATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAAC	140
51	TCT-GCTAAGTTTATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAAC	100
141	CAAAGTGATTTTTTGAAGTTCATTACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGCA	190
101	CAAAGTGATTTTTTGAAGTTCATTACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGCA	150
191	GTCCCTTGCTATGAACTGACCAATTAATGTGCCCTTCTCATAATACACGA	240
151	GTCCCTTGCTATGAACTGACCAATTAATGTGCCCTTCTCATAATACACGA	200
241	GTCATGTAATTACGAATCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCTTGGCT	290
201	GTCATGTAATTACGAATCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCTTGGCT	250
291	GTAGTTTGTGCAAAGCCCCTGGTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTCA	340
251	GTAGTTTGTGCAAAGCCCCTGGTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTCA	300
341	GGCTCTCAATCCTCCATGGAAAGCAGGGATGCCAAAAAGGTTTGAAGTCG	390
301	GGCTCTCAATCCTCCATGGAAAGCAGGGATGCCAAAAAGGTTTGAAGTCG	350
391	AGGCCACCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATT	440
351	AGGCCACCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATT	400
441	CTCGTGGAAGTGGATGGCGATGTGAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGCGG	490
401	CTCGTGGAAGTGGATGGCGATGTGAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGCGG	450
491	AGAGGGTGAAGGTGATGCCACATACGGAAAGCTCACCTGAAATTCATCT	540
451	AGAGGGTGAAGGTGATGCCACATACGGAAAGCTCACCTGAAATTCATCT	500

Apendice IX: Comparación de la secuencia obtenida (renglón superior) para la construcción pBS-*cp1-484-gfp* con la secuencia teórica (renglón inferior).

104	TTCTCG-TAAGTTTATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAA	153
51	TTCT-GCTAAGTTTATCGTCTACGTGTGGTACATAGTTTAAACAGTCCAA	100
154	CCAAAGTGATTTTTTGAAGTTCATTCAACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGC	203
101	CCAAAGTGATTTTTTGAAGTTCATTCAACCACAGTGATAGCAAGCTGGTGC	150
204	AGTCCCTTGCTATGAACTGACCAATTAATGTGCCCTTCTCATAATACACG	253
151	AGTCCCTTGCTATGAACTGACCAATTAATGTGCCCTTCTCATAATACACG	200
254	AGTCATGTAATTACGAATCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCTTGGC	303
201	AGTCATGTAATTACGAATCAAATATATATGGCTTTATCTTTGCTCTTGGC	250
304	TGTAGTTTGTGCAAAGCCCCTGGTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTC	353
251	TGTAGTTTGTGCAAAGCCCCTGGTGAGCCGCGCCGAGCTAAGGCGGATTC	300
354	AGGCTCTCAATCCTCCATGGAAAGCAGGGATGCCAAAAGGTTTAAAAC	403
301	AGGCTCTCAATCCTCCATGGAAAGCAGGGATGCCAAAAGGTTTAAAAC	350
404	GTCACAGAAGATGAATTTTCGTAGCATGCTGATCCGTCCCGACCGTCTTAG	453
351	GTCACAGAAGATGAATTTTCGTAGCATGCTGATCCGTCCCGACCGTCTTAG	400
454	AGCAAGATCTGGCTCTCTACCACCAATTTGATAACAGAAGTCCAGGAAA	503
401	AGCAAGATCTGGCTCTCTACCACCAATTTGATAACAGAAGTCCAGGAA-	450
504	CTCGTAGATCCTATTCCGCCTCAGTTCGACGTCGAGGCCACCATGAGCAA	553
451	CTCGTAGATCCTATTCCGCCTCAGTTCGACGTCGAGGCCACCATGAGCAA	500
554	GGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATTCTCG.....	603
501	GGGCGAGGAACTGTTCACTGGCGTGGTCCCAATTCTCG.....	550

Bibliografía

Adam, R. D., The *Giardia lamblia* genome, 2000. *International Journal for Parasitology*. 30: 475-484.

Adam, R. D., The biology of *Giardia lamblia*, 2001. *Clinical Microbiological Reviews*. 14(3): 447-475.

Alvarado L.A., Cedillo-Rivera R. y Muñoz O., Analysis of protease activity in axenic isolates of *Giardia lamblia*, 1992. *Archives of Medical Research*. 23: 247.

Alvarado L.A., Cedillo-Rivera R., Muñoz O. y Ortega-Pierres G., Proteinase secretion by *Giardia lamblia* clones, 1994^a. *Archives of Medical Research*. 25:83.

Alvarado L.A., Cedillo-Rivera R., Muñoz O. y Ortega-Pierres G., Production and Secretion of proteases by clones of *Giardia lamblia* with deficient Adherence Capacity, 1994b. *Archives of Medical Research*. 25:88.

Berti P. J., Storer C. A., Alignment/Phylogeny of papain superfamily of cystein proteases, 1995. *J. Mol. Biol*. 246: 273-283.

Chin-Hung S., Chun-Fen C., Jung-Hsiang T., Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen *Giardia lamblia*, 1998. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 92:123-132.

Chung Y.B., Kong Y., Joo I.J., Cho S.Y. y Kang S.Y., Excystment of *Paragonimus westermani* metacercariae by endogenous cysteine protease, 1995. *J. Parasitol*. 81: 137-142.

Davids B.J., Reiner D. S., Birkeland S. R., Preheim S. P., Cipriano M. J., McArthur A. G., Gillin F. D., A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein, 2006. PLoS ONE. 1: 1-12

Feely D.E., Gardner M.D, Hardin E.L., Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: Localization of acid phosphatase, 1991. J. Parasitol. 77: 441-448.

Feely D. E., Dyer J. K., Localization of Acid Phosphatase Activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* Trophozoites, 1987. J. Protozool. 34(1) 80-83.

Garcia L. S., Brockner D. A., 1993, Intestinal Protozoa: Flagellates and Ciliates, Diagnostic Medical Parasitology, Second Edition, American Society for Microbiology, Washington DC., pp 31-48

Gillin F. D., Reiner D. S., McCaffery M., Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*, 1991. Parasitology today. 7(5): 113-116.

Gillin F. D., Reiner D. S., Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*, 1996. Annu. Rev. Microbiol. 50: 679-705.

Hare D.F., Jarrol E.L., Lindmark D.G., *Giardia lamblia*: Characterization of proteinase activity in trophozoites, 1989. Exp. Parasitol. 68: 168-175.

Keene W.E., Hidalgo M.E., Orozco E, McKerrow J.H., *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase, 1990. Exp. Parasitol. 71: 199-206.

Lewin B., Genes IX, 2008. United States, Oxford University Press, 1091-1092.

Liu Q., Zhang X., Li J., Ying J., Chen L., Zhao Y., Wei F., Wu T., *Giardia lamblia*: stable expression of green fluorescent protein mediated by giardavirus, 2005. *Exp. Parasitology*. 109(3): 181-187.

Marti M., Regös A., Li Y., Schraner E. M., Wild P., Müller N., Knopf L. G., Hehl A. B., An Ancestral Secretory Apparatus in the Protozoan Parasite *Giardia intestinalis*, 2003. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(27): 24837-24848.

Martínez J. A., Elias M., 1985 (reimp. 1995). *Introducción a la Protozoología*, México, Trillas, 59-80.

McCaffery J., Gillin F. D., *Giardia lamblia*: Ultrastructural Basis of Protein Transport during Growth and Encystation, 1994. *Experimental parasitology*. 79: 220-235.

McKerrow J. H., *Parasite Proteases*, 1989. *Experimental parasitology*. 68: 111-115.

McKerrow J.H., *Cysteine proteases of parasites: A remarkable diversity of function*, 1995. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. 2: 437-444.

Meirelles M.N.L., Juliano L., Carmona E., Silva S:G., Costa E.M., Murta A.C.M. y Scharfstein J., Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi in vitro*, 1992. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52: 175-184.

Nash T. E., *Molecular Approaches to Parasitology: Antigenic variation in Giardia lamblia*, 1995. Wiley-Liss, Inc. 31-42.

North M.J., *Proteinases of parasitic protozoa: an overview*, 1991. *Biochemical Protozoology*. 180-185.

Parenti D.M., *Characterization of a thiol proteinase in Giardia lamblia* 1989. *J. Infect. Dis.* 160:1076-1080.

Piras M.M., Henriquez D. y Piras R., The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction Trypanosoma cruzi-fibroblastos, 1985. Mol. Biochem. Parasitol. 14:151-163.

Rawlings N., Barrett A., Families of Cysteine Peptidases, 1994. Methods Enzymol. 244: 461-486.

Reed S.L., Keene W.E. y McKerrow J.H., Thiol proteinase expression and pathogenicity of Entamoeba histolytica, 1989. J. Clin. Immunol. 27:2772-2777.

Reed S., Bouvier J., Pollack A.S., Engel J.C., Brown M., Hirata K., Que X., Eakin A., Hagblom P., Gillin F. y McKerrow J.H., Cloning of a virulence factor of Entamoeba histolytica: Pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene, 1993. J. Clin. Invest. 91:1532.

Rosenthal P.J., Lee G.K. y Smith R.E., Inhibition of a Plasmodium vinckei cysteine proteinase cures murine malaria, 1993. J. Clin. Invest. 91:1052.

Sara R, Davis-Hayman, Theodore E. Nash, Genetic manipulation of Giardia lamblia, 2002. Mol and Biochem. Parasitology. 122: 1-7.

Singer S.M., Yee J., Nash T. E., Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in Giardia lamblia, 1998. Molecular and Biochemical Parasitology. 92: 59-69.

Sun C., Chou C., Tai J., Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen Giardia lamblia, 1998. Molecular and Biochemical Parasitology 92: 123-132.

Tsien R. Y., The green fluorescent protein, 1998. Annu. Rev. Biochem. 67: 509-544.

Wang A. L., Wang C. C., The Double-Stranded RNA genome of Giardavirus, 1995. Molecular Approaches to Parasitology. Wiley-Liss, Inc. 179-189.

Ward W., Alvarado L., Rawlings N.D., Engel J. C., Franklin C., McKerrow J. H., A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*, 1997. *Cell*. 89: 437-444.

Williams A.G. y Coombs G.H., Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites, 1995. *International Journal of Parasitology*. 25: 771-778.

Yee J., Nash T. E., Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*, 1995. 92: 5615-5619.

Yu D., Wang A. L., Wang C. C., Stable coexpression of a drug-resistance gene and a heterologous gene in an ancient parasitic protozoan *Giardia lamblia*, 1996. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 83: 81-91.