

Recibido: 18 de Febrero 2015 Aceptado: 19 de Marzo 2015

PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*

Resumen

Los telómeros son estructuras complejas de ADN y proteína localizadas en el extremo de los cromosomas eucariotes. Su principal función es proteger el extremo cromosomal de ser reconocido y procesado como ADNs fracturado, evitando así eventos de recombinación y fusión que conducen a inestabilidad cromosomal. El ADN telomérico consta de secuencias cortas, repetidas una tras otra, ricas en guanina; la cadena rica en guanina se extiende formando una región de cadena sencilla denominada extremo 3' protuberante. Las proteínas por su parte, se pueden clasificar en: dsBPs, o proteínas de unión a la cadena doble, GBPs aquellas que reconocen específicamente el extremo protuberante y, proteínas que las interconectan mediante interacciones proteína-proteína. El gen PF3D7_1006800 de *Plasmodium falciparum* codifica para una proteína putativa similar a una GBP de *Cryptosporidium parvum*, con el fin de establecer si esta proteína de *P. falciparum* presenta la capacidad de unión al ADN telomérico del parásito, se produjo una proteína recombinante a partir de la región codificante del gen, se purificó y se utilizó en ensayos de unión a ADN, y en la generación de anticuerpos policlonales específicos contra PfGBP. Nuestros resultados indican que la proteína de *P. falciparum* es una proteína nuclear con capacidad de unión al ADN telomérico *in vitro*, por lo que podría ser parte del complejo proteico encargado de proteger y/o mantener el telómero *in vivo*.

Palabras clave: telómero, proteínas de unión al telómero, telomerasa, hnRNPs, RRM, extremo protuberante 3', proteína recombinante, clonación.

PfGBP: A *Plasmodium falciparum* telomere binding protein

Abstract

Telomeres are specialized structures at the end of chromosomes that consist of repetitive DNA sequences and associated proteins. The primary role of telomeres is to protect the end of linear chromosomes from recombination, fusion, and recognition as broken DNA ends. This protective function can be achieved through association with specific telomere binding proteins. Telomeric DNA consists of G-rich double-stranded arrays followed by a single-stranded G-rich overhang. The telomeric proteins can be classified in dsBPs, which bind double-stranded DNA, GBPs those that bind specifically to G-rich overhang, and proteins that interact with telomeric factors. *Plasmodium falciparum* gene PF3D7_1006800 codifies for a protein highly similar to *Cryptosporidium parvum* GBP. In order to investigate whether the *P. falciparum* protein binds telomeric DNA, a recombinant protein was produced, purified and DNA binding assays were performed. Polyclonal antibodies against rPfGBP were produced and tested in western blot. Our results indicate that PfGBP is a nuclear protein that binds telomeric DNA *in vitro*, which could be part of the protein complex responsible for protecting and/or maintaining the telomere *in vivo*.

Keywords: telomere, Telomere binding protein, telomerase, hnRNPs, RRM, 3' overhang, recombinant protein, cloning.

PfGBP: uma proteína de ligação o telômero em *Plasmodium falciparum*

Resumo

Os telómeros são estruturas complexas de DNA e proteína localizadas no extremo dos cromossomas dos eucariotas. Sua principal função é proteger o extremo dos cromossomas para que não sejam reconhecidos e processados como DNAs fraturados. O anterior evita eventos de recombinação e fusão que conduzem à instabilidade nos cromossomas. O DNA telomérico tem sequências curtas e repetidas, ricas em guanina. A cadeia rica em guanina estende-se para formar uma região de cadeia simples chamada extremo 3' protuberante. As proteínas podem-se classificar em: dsBPs ou proteínas de união à cadeia dupla, GBPs que são as que reconhecem especificamente o extremo protuberante e, as proteínas que interligam mediante interações proteína-proteína. O gene PF3D7_1006800 de *Plasmodium falciparum* codifica para uma proteína similar a uma GBP de *Cryptosporidium parvum*. Com o objetivo de estabelecer se a proteína de *P. falciparum* apresenta a capacidade de união ao DNA telomérico, foi produzida uma proteína recombinante partindo da região codificante do gene, purificou-se e utilizou-se nos ensaios de união ao DNA e na geração de anticorpos policlonais específicos contra PfGBP. Os nossos resultados indicam que a proteína de *P. falciparum* é uma proteína nuclear com capacidade de união ao DNA telomérico *in vitro*, pelo que poderia fazer parte do complexo proteico encarregado de proteger e/ou manter o telómero *in vivo*.

Palavras-chave: telomerase, telómeros, hnRNPs, RRM, proteína recombinante, extremidade 3', clonagem.

Introducción

El telómero es una estructura compleja de ADN y proteína presente en los extremos de los cromosomas lineales eucariotes, cuya función principal es mantener la estabilidad del cromosoma protegiéndolo de degradación, fusión y recombinación, permitiendo así la replicación completa del ADN (1). El ADN telomérico consta de secuencias cortas, ricas en guaninas (G) que se repiten una tras otra. En la mayoría de organismos la cadena rica en G se extiende hacia el extremo 3' generando una región de ADN de cadena sencilla denominada extremo protuberante 3' u overhang (2). En cuanto a las proteínas teloméricas, éstas se pueden clasificar en tres grupos: aquellas que se unen al ADN de cadena doble o dsBPs (double strand binding proteins), las que se unen al extremo protuberante o ssGBPs (single strand G rich binding proteins) y proteínas que las interconectan mediante interacciones proteína-proteína (3). Este complejo multiproteico cubre y protege el ADN de ser reconocido y procesado como ADN fracturado, por la maquinaria de reparación celular (4).

En células eucariotas, por cada división celular se presenta una pérdida de 50 a 200 bases de ADN telomérico, fenómeno conocido como el problema de la replicación final (5). En ausencia de mecanismos que compensen esta pérdida, se observa que luego de un número determinado de divisiones celulares los telómeros alcanzan una longitud crítica, lo cual interrumpe el crecimiento y lleva a un estado de senescencia y muerte celular (6). Este acortamiento telomérico es un mecanismo natural que limita la capacidad de proliferación de las células somáticas, contrario a lo que ocurre en células tumorales y en aquellas con alta tasa de replicación, en las que el problema de la replicación final es solucionado por la adición *de novo* de secuencias teloméricas llevada a cabo por un complejo de ARN y proteína denominado telomerasa (7). En presencia de telomerasa activa, los telómeros se extienden o mantienen, la senescencia replicativa es evitada, y las células alcanzan un estado de crecimiento indefinido o "inmortalización" (8).

En células que tienen telomerasa activa, la longitud del ADN telomérico es normalmente regulada y mantenida dentro de límites definidos (9). La telomerasa es activada cuando los telómeros llegan a ser muy cortos, e inactivada cuando se alcanza la longitud promedio; esta activación-inactivación del complejo enzimático es altamente regulada, siendo el acceso al sustrato telomérico, uno de los principales puntos de control. En este punto, las proteínas asociadas al telómero cumplen un rol fundamental, previniendo o por el contrario, promoviendo el acceso de la enzima al extremo protuberante 3' y por tanto permitiendo en el primer caso el acortamiento y en el segundo, la extensión (4,10).

Las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares o hnRNPs son una gran familia de proteínas de unión a ácidos nucleicos caracterizadas por dos motivos de reconocimiento de ARNs (RRMs) altamente conservados (11), están involucradas en la maduración del ARN mensajero y en el mantenimiento del telómero (12). En este aspecto, pueden actuar como ssGBPs las hnRNPs A1, A2/B1, A3, D, y E y proteínas homólogas de otros organismos (13, 14, 15, 16, 17), como proteínas que despliegan la estructura en G-cuádruplex las hnRNPs D, UP1 y A*2 (18, 19, 20), conformación adoptada por la cadena sencilla rica en guanina que secuestra el extremo telomérico e impide el acceso de telomerasa (21) y como proteínas que interactúan y regulan la actividad del complejo telomerasa, las A1, C1/C2 y D (22, 17). Se ha postulado que los motivos de unión a ácidos nucleicos les permitirían actuar como un adaptador molecular entre el telómero y la telomerasa; un sitio reconocería el sustrato telomérico (cadena sencilla rica en guanina), mientras que el otro reconocería la subunidad ARN del complejo telomerasa (23,15).

Se han descrito ssGBPs similares a las hnRNPs encontradas en *Chlamydomonas reinhardtii* CrGBP1, *Saccharomyces cerevisiae* ScGBP2 o RFL6 y NPL3 y *Cryptosporidium parvum* CpGBP (24, 25, 26, 27, 28);

organismos unicelulares que presentan alta tasa de multiplicación y que podrían mantener la longitud de sus telómeros vía telomerasa. *Plasmodium falciparum*, agente causante de la forma más severa de malaria humana, es un parásito protozoario que presenta un complejo ciclo de vida en el que la replicación del ADN, fundamental para la proliferación del parásito, tiene lugar en varios puntos del ciclo celular (29). Sólo en el huésped humano, cada parásito puede generar entre 16 a 32 células hijas en un periodo de tan solo 48 h. Esta gran capacidad de proliferación sugiere la existencia de un mecanismo para el mantenimiento de los telómeros que le permita compensar la pérdida de secuencias asociada a cada ronda de replicación y evitar la senescencia replicativa. Aunque la actividad telomerasa en este parásito fue reportada desde el año 1998 (30, 31, 32), aun no se han identificado las proteínas que regulan esa actividad enzimática.

Dado que el genoma de *Plasmodium* codifica para una proteína similar a CrGBP y que proteínas humanas pertenecientes a la misma familia, no solo se unen al ADN telomérico sino que regulan la actividad telomerasa, quisimos establecer si la proteína de *P. falciparum* puede reconocer y unirse a oligos de cadena sencilla que simulan el ADN telomérico. Para esto, se produjo y se purificó una proteína recombinante, con la cual se realizaron ensayos de retardación de ADN en gel. Además se produjeron anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína recombinante que fueron usados en ensayos de western blot.

Materiales y métodos

Alineamiento múltiple de secuencias

Se seleccionaron las secuencias de aquellas GBPs de organismos unicelulares (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Cryptosporidium parvum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Eimeria tenella*) de las que se tuviera alguna evidencia de su capacidad de unión a ADN telomérico, se descargaron de la base de datos del GenBank y se realizó el alineamiento con el programa MEGA 6 (33). Los números de acceso son: Cr GBP1: XP_001690066.1; CpGBP: AAO39067.1; ScGBP2: P25555.1; EtGBP: CDJ37022.

Amplificación de la región codificante de PF3D7_1006800

Se realizó un RT-PCR con RNA obtenido de trofozoitos de *P. falciparum* cepa 3D7, como plantilla y oligos específicos que permiten amplificar toda la región codificante del gen. La transcripción reversa y la amplificación se llevó a cabo en un solo tubo, bajo las siguientes condiciones: Buffer 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 50 ng de ARN, oligo antisentido BamHI-ATGTCGATG-GAAAATAATAG 0,5 μM, dNTPs 0,5 mM y 2 U de enzima M-MLV (PROMEGA) en un volumen final de 18 μL. Se incubó por una hora a 42 °C se adicionó el oligo sentido NotI-TTATTCGTTATTTTCATA-ATTAAC 0,5 mM y 2,5 U de Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo con el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de: denaturalización (94 °C por 30 s), anillaje (53 °C por 30 s) y extensión (72 °C por 30 s); finalmente una extensión a 72 °C por 7 min. La generación del producto específico de 741pb, se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Clonación, expresión y purificación de PfgBP

El producto de PCR obtenido fue insertado en los sitios BamHI y NotI del vector de expresión pGEX4T2, el cual permite la generación de la proteína de interés fusionada a glutatión S transferasa (GST). El

plásmido recombinante denominado pGEX-PfGBP fue utilizado para transformar bacterias *Escherichia coli* de la cepa Codon Plus e inducir la producción de la proteína de fusión por adición de IPTG (Isopropil- β -D-thiogalactopyranoside), a una concentración final de 0,1 mM. Se permitió el crecimiento por 16 h a 37 °C, las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6000xg por 10 min a 4 °C, se resuspendieron en buffer Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, glicerol 5% y se lisaron por tratamiento con lisozima 1 mg/mL y choque térmico; cinco ciclos de enfriamiento en nitrógeno líquido y calentamiento a 37 °C. Luego de centrifugación a 12000xg por 15 min a 4 °C se recuperó el sobrenadante y se llevó a cabo la purificación por cromatografía de afinidad con una resina de glutatión sefarosa. Se permitió la interacción resina-ligando por 4 horas a 4 °C, la resina se lavó con diez volúmenes de buffer de lisis y finalmente las proteínas unidas de manera específica se eluyeron por adición de glutatión reducido a una concentración de 10 mM. Todas las fracciones de la cromatografía se analizaron por SDS-PAGE y western blot; como anticuerpo primario se utilizó un anti GST comercial 1:2000 (Abcam) y como secundario un anti IgG de conejo conjugado a biotina 1:2000 (SIGMA).

Ensayos de unión ADN-proteína: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Las reacciones fueron realizadas en buffer de unión 1X (Tris 10 mM pH 7,5, KCl 50 mM, DTT 0,1 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5%) con 200 fmol de oligo biotinilado y 2-10 mg de GST-GBP en un volumen final de 20 μ L, por 60 min a 20 °C. Los complejos proteína – sonda fueron corridos en geles no denaturantes de poliacrilamida al 8%, transferidos a membranas de nylon y entrecruzados a la membrana por radiación con luz UV por 5 min. La detección se realizó por quimioluminiscencia con el kit LightShift EMSA (Thermo) según el protocolo sugerido por el fabricante. Los oligos utilizados se denominaron: Tel G Biotin: (GGGTT(T/C)A)₄ para el oligo que simula la cadena sencilla rica en guanina, Tel C Biotin: (T(G/A)AACCC)₄ para el oligo complementario y TSR₈ Biotin: (GGGTT(T/C)A)₈ para el oligo que simula ADN telomérico de cadena doble.

Producción de anticuerpos específicos contra PfGBP

Cuatro ratones Balb/c de seis semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con 50 mg de proteína emulsificada en adyuvante completo de Freund. Al día 14 y 28 se realizaron refuerzos con 25 mg de proteína en adyuvante incompleto de Freund. El día 35 los animales fueron sacrificados, la sangre fue recolectada y el suero recuperado por centrifugación a 2500xg por 10 min. El suero fue suplementado con glicerol al 10% y almacenado a -80 °C.

Obtención de extractos proteicos del parásito y detección de PfGBP por western blot

Dos mil millones de parásitos (2x10⁹) en el estadio de trofozoito maduro fueron resuspendidos en 1 mL de buffer TMG (Tris 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1,5 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 10 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma) e inhibidor de RNAsas (RNase OUT, Invitrogen) y lisados por incubación con NP40 al 0,5% a 4 °C por 30 minutos. Luego de centrifugación a 15.000xg por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó, alicuotó y almacenó a -70 °C; esta fracción se denominó fracción citosólica. Para obtener extractos nucleares, el sedimento se resuspendió en buffer de extracción (TMG-NaCl 420 mM) y se incubó a 4 °C por 30 min en agitación constante. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 12.000xg por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante denominado fracción nuclear, se alicuotó y almacenó a -70 °C. La calidad de los extractos se verificó por SDS-PAGE y la concentración se determinó por el método de Bradford (34).

Para la detección de PfGBP por western-Blot, 50 mg de extracto proteico fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBST-L (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween al 0,1%, leche descremada al 5%), por 2h a temperatura ambiente y probadas con el suero anti-GBP dilución 1:1000 por 1 h; como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgG de ratón biotinilado (SIGMA) dilución 1:2000 y para la detección un conjugado de estreptavidina – fosfatasa alcalina (PROMEGA) dilución 1:3000.

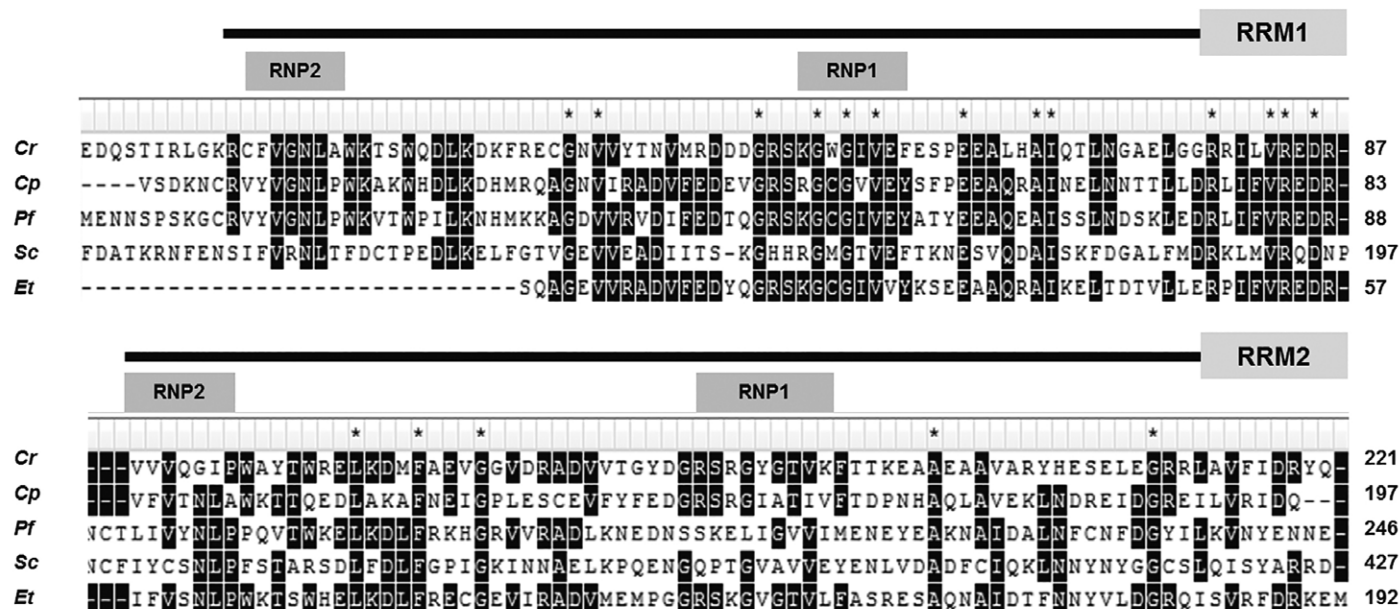


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de GBPs. Las secuencias correspondientes a *Chlamydomonas reinhardtii* Cr: XP_001690066.1; *Cryptosporidium parvum* Cp: AA039067.1; *Saccharomyces cerevisiae* Sc: P25555.1; *Eimeria tenella* Et: CDJ37022, fueron alineadas con el programa MEGA 6. Se muestran solo los motivos de reconocimiento de ARN (RRM) y se localizan los submotivos de unión a ARN (RNP). Los aminoácidos conservados se resaltan en negro y los residuos idénticos están marcados con un asterisco.

Resultados

La búsqueda de proteínas similares a las GBPs en la base de datos de *Plasmodium* disponible en www.plasmodb.org se realizó por BLAST P (Basic Local alignment Search Tool), utilizando la secuencia AAO39067.1 de *C. parvum* como secuencia blanco. Como resultado se obtuvo la secuencia PF3D7_1006800 con un E value de $6e^{-35}$, una proteína putativa de unión a ARN de 246 aminoácidos la cual presenta dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM) localizados en los extremos de la proteína, conectados por una región central o bisagra. El RRM1 se ubica entre los aminoácidos 10 a 90 y el RRM2 entre el aa 170 y el 240. El motivo RRM1 de PF3D7_1006800 presenta una identidad del 62% y una similitud del 78% con el RRM1 de *Cp* AAO39067.1, mientras que el RRM2 es menos conservado, con una identidad del 39% y una similitud del 56%. Los RRMs contienen dos submotivos denominados RBDs (RNA binding domains) o RNPs (11); en estos dos submotivos

del RRM1 (VYVGNLP y RGCGVVEY), la similaridad entre las dos secuencias llega a ser de 100% (Figura 1). Aunque la búsqueda arrojó otras proteínas de unión a ARN, el E value estuvo alrededor de 10^{-6} a 10^{-3} , razón por la cual se escogió la secuencia PF3D7_1006800 como la homóloga de *Cp* AAO39067 o *Cp*GBP1. Para establecer el grado de conservación de esta proteína con las GBPs reportadas hasta el momento, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los motivos de unión a ARN de cada proteína, mediante la herramienta CLUSTALW (Figura1). Dado que la secuencia presentó un alto grado de conservación tanto con la proteína de *C. parvum* como con las otras GBPs, específicamente en los RRMs, se denominó PfGBP.

Para establecer si esta proteína podía reconocer y unirse a secuencias teloméricas, fue necesario producir una proteína recombinante en *E. coli*. La región codificante del gen se clonó en el vector de expresión pGEX 4T2 y se expresó como una proteína de fusión con GST. La proteína de 55 KDa fue purificada por cromatografía de afinidad (Figura 2A) y utilizada en ensayos de EMSA (Figura 2B-C). Estos ensayos mostraron que la pro-

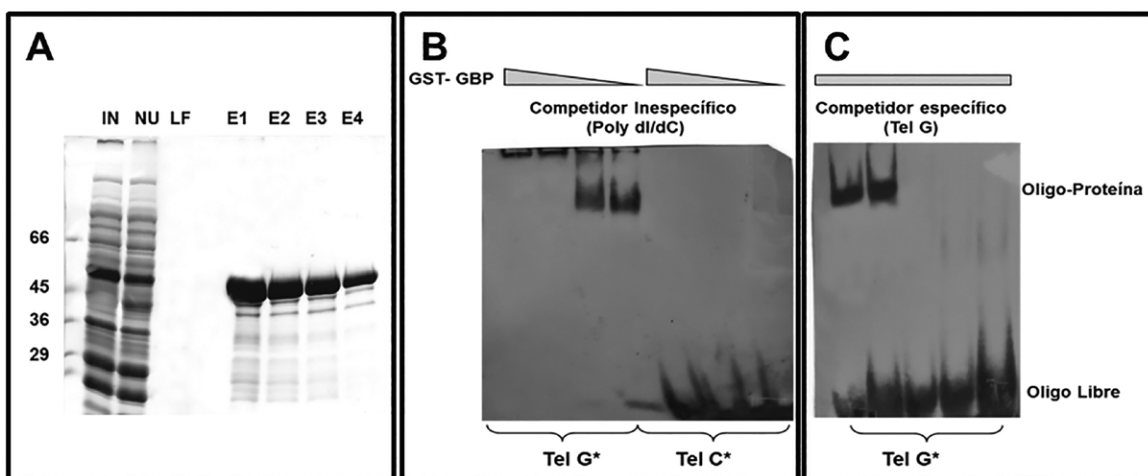


Figura 2. Purificación de GST-GBP y ensayos de movilidad electroforética (EMSA). A. Purificación de la proteína recombinante GST-PfGBP por cromatografía de afinidad. 15 mL de las fracciones de la cromatografía se analizaron por SDS-PAGE. IN: Extracto Inicial; NU: Proteínas no unidas; LF: Lavado final; E: Eluidos. B. EMSA: Se utilizaron 200 fmol de oligo biotinilado (TelG* o TelC*) y cantidades crecientes de GST-GBP (2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 mg). La reacción de unión se realizó en presencia de un exceso poli dl/dC, como competidor inespecífico. C. EMSA. Se utilizaron 2,5 mg of GST-GBP, 200 fmol de oligo TelG biotinilado (TelG*) y cantidades crecientes de oligo no marcado TelG (0,0; 1,0; 5,0 y 10,0 pmol).

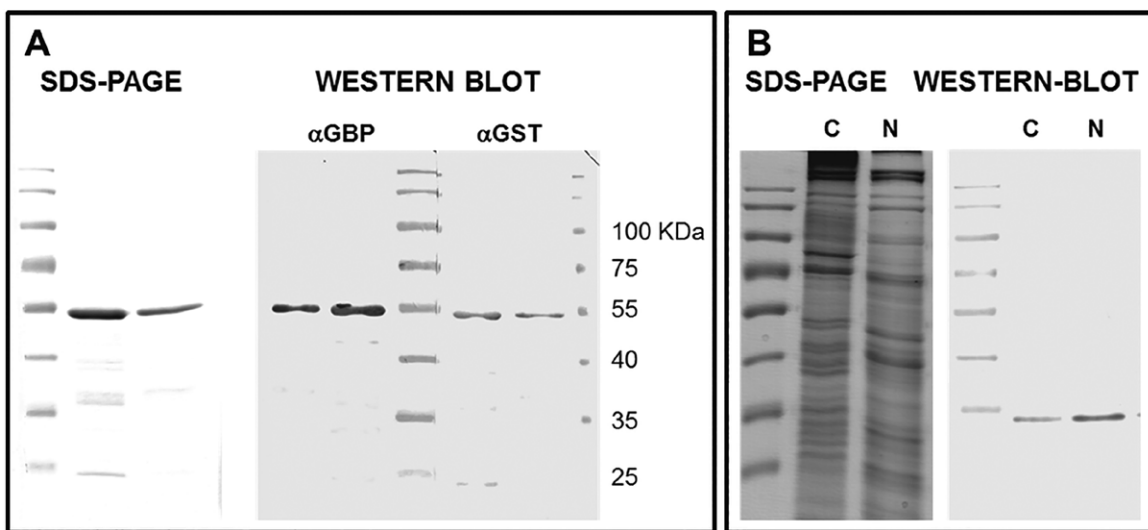


Figura 3. Detección de GST-GBP y Pf-GBP por Western Blot. A. Detección de GST-GBP. Como antígeno se utilizó la proteína GST-GBP purificada y como anticuerpo primario un anti GST comercial y el anti PfGBP obtenido; como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón biotinilado y para la detección un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina. B. Detección de PfGBP. Como antígeno se utilizaron 50 mg de extractos citoplasmáticos (C) y nucleares (N), como anticuerpo primario el anti PfGBP obtenido; como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón biotinilado y para la detección un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina.

teína recombinante es capaz de seleccionar el oligo que simula el ADN telomérico de cadena sencilla de *P. falciparum* [GGGTT(T/C)A]₄, unirse a este y causar un cambio en su movilidad (Figura 2B), aun en presencia de un exceso de oligo competidor poli dI/dC que no la contiene. La proteína no se unió al oligo que simula la cadena complementaria [T(G/A)AACCC]₄ cadena sencilla rica en citosina, el oligo permanece libre, aun en presencia de 10 mg de la proteína (Figura 2B). Los ensayos de unión entre la proteína y el oligo biotinilado TelG* en presencia de un exceso del oligo no biotinilado demostraron que la unión es específica, pues la señal oligo-proteína va desapareciendo a medida que la cantidad de competidor aumenta, lo que indica que el oligo biotinilado es desplazado del complejo TelG*-proteína por el oligo no marcado (Figura 2C).

Para poder reconocer la proteína del parásito, se generaron anticuerpos específicos, utilizando como inmunógeno la recombinante producida. El anticuerpo generado detectó la proteína de fusión con GST en 55 kDa, como lo hace el anti GST comercial (Figura 3A) y una banda por debajo de los 35 kDa, en extractos del parásito que podría corresponder a PfGBP, cuyo peso molecular se estima en 30 kDa (Figura 3B). La proteína fue detectada tanto en extractos citosólicos como en nucleares, obtenidos a partir de parásitos en el estadio de trofos maduros y esquizontes tempranos, estadios en los que hay una replicación activa del ADN (29).

Discusión

La proteína codificada por el gen PF3D7_1006800 podría ser considerada como la GBP de *Plasmodium falciparum*, dado que presenta una similaridad de secuencia considerable (50-66%) con las GBPs reportadas hasta el momento, cuya capacidad de unión al ADN telomérico de cadena sencilla reside en los motivos RRM. El análisis de su secuencia mostró alto grado de conservación en estos motivos, específicamente en los RBDs del RRM1. Al igual que la proteína de *C. parvum* (28), PfGBP se une de manera específica a oligos de cadena sencilla que simulan el ADN telomérico *in vitro* y se puede detectar en extractos nucleares del parásito. En CpGBP la capacidad de unión al ADN telomérico reside en el RRM1, proteínas truncadas que pierden este motivo y conservan el RRM2 pierden la habilidad para unirse al sustrato telomérico (28); cabe señalar aquí que los dos RBDs presentes en el motivo RRM1 son casi idénticos en las dos secuencias, por lo cual es posible que este motivo sea el responsable de la unión al sustrato telomérico en PfGBP. *C. parvum* al igual que *P. falciparum* es un parásito intracelular obligado, perteneciente a *phylum* apicomplexa, con un complejo ciclo de vida y con una alta tasa de proliferación (35), en el que el mantenimiento de los telómeros podría realizarse vía telomerasa, de aquí que sea de gran relevancia haber identificado proteínas de unión al telómero homólogas en estos dos organismos.

De otro lado, PfGBP presenta una similaridad significativa con GBPs que han demostrado tener la capacidad de asociarse al telómero no solo *in vitro* sino *in vivo*, entre ellas EtGBP y NtGBP1. La proteína de *Eimeria tenella* (otro parásito apicomplexa) fue identificada recientemente siguiendo la misma estrategia presentada en este estudio. En este caso, los autores a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, con un anticuerpo específico anti EtGBP demostraron que se da la unión de esta GBP al ADN telomérico en el parásito (36). La proteína de *Nicotiana tabacum*, la cual presenta una similaridad del 46% con la proteína de *Plasmodium*, fue identificada en extractos nucleares utilizando un oligo que simula su ADN telomérico como oligo de afinidad, luego de purificarla y secuenciarla se identificaron los dos motivos RRM característicos de las hnRNPs, familia a la que pertenecen las GBPs (37). Más adelante se estableció que NtGBP es fundamental para mantener la estabilidad del genoma, pues células en las que los niveles de proteína fueron

disminuidos por ARN interferentes exhibieron telómeros más largos, círculos extracromosomales de ADN telomérico y puentes anormales durante la anafase (38), señales que indican que hubo una alteración en los telómeros y la maquinaria de reparación de ADN fue activada (4, 10). La asociación directa entre NtGbp, la actividad telomerasa y el mantenimiento del telómero fue establecida recientemente (39); células con actividad telomerasa y GBP disminuida presentaron un 3' overhang más corto, lo que llevó a una pobre unión de GBP dejando desprotegido y susceptible al ADN telomérico, lo que condujo a la activación de vías de reparación y a eventos de recombinación. Lee y Kim sugirieron que se debe mantener cierta longitud de la cadena sencilla por acción de la telomerasa, de manera que GBP se pueda unir y proteger al telómero de ser reconocido y procesado por la maquina celular (39).

Conclusión

La proteína denominada PfGBP se identificó por bioinformática, basándose en la presencia de motivos de RRM. Esta proteína se detectó en extractos nucleares del parásito y mostró tener capacidad de unión a oligos de cadena sencilla que simulan el telómero; esto sugiere que PfGBP podría formar parte del complejo proteico encargado de proteger y/o mantener el telómero en *P. falciparum*, sin embargo esta asociación con el ADN telomérico se debe demostrar *in vivo*.

Referencias

1. Blackburn, E. Structure and function of telomeres. *Nature*. **1991**, 350 (6319), 569-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/350569a0>.
2. Henderson, E.; Blackburn, E. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9(1), 345-348.
3. De Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **2005**, 19(18), 2100-2110.
4. Palm, W.; de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **2008**, 42, 301-334.
5. Levy, M.; Allsopp, R.; Futcher, A.; Greider, C.; Harley, C. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **1992**, 225, 951-60. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90096-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90096-3).
6. Prescott, J.; Blackburn, E. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Curr. Opin. Gen. Develop.* **1999**, 9, 368-373. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80055-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80055-0).
7. Greider, C.; Blackburn, E. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. **1985**, 43, 405-413. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9).
8. Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K. Specific association on human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **1994**, 266, 2011-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.7605428>.
9. Shampay, J.; Blackburn, E. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1988**, 85, 534-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.2.534>.
10. Bianchi, A.; Shore, D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol. Cell*. **2008**, 31, 153-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.013>.
11. Birney, E.; Kumar, S.; Krainer, A. Analysis of the RNA-recognition motif RS and RGG domains: Conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic. Acids. Res.* **1993**, 21, 5803-5816. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/21.25.5803>.
12. He, Y.; Smith, R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, 66, 1239-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8532-1>.

13. Fiset, S.; Chabot, B. hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic Acids. Res.* **2001**, *29*, 2268-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.11.2268>.
14. Zhang, Q.; Manche, L.; Xu, R.; Krainer, A. hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA*. **2006**, *12*, 1116-1128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1261/rna.58806>.
15. Moran-Jones, K.; Wayman, L.; Kennedy, D.; Reddel, R.; Snee, M.; Smith, R. hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere. *Nucleic Acids. Res.* **2005**, *19*, 486-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki203>.
16. Huang, P.; Hung, S.; Wang, T. Telomeric DNA-binding activities of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1803*, 1164-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.003>.
17. Chen, L.; Lingner, J. AUF1/HnRNP D RNA binding protein functions in telomere maintenance. *J. Mol. Cell.* **2012**, *47*, 1-2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.031>.
18. Enokizono, Y.; Konishi, Y.; Nagata, K.; Ouhashi, K.; Uesugi, S.; Ishikawa, F.; Katahira, M. Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18862-18870. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411822200>.
19. Nagata, T.; Takada, Y.; Ono, A.; Nagata, K.; Konishi, Y.; Nukina, T.; Ono, M.; Matsugami, A.; Furukawa, A.; Fujimoto, N.; Fukuda, H.; Nakagama, H.; Katahira, M. Elucidation of the mode of interaction in the UP1-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity. *Nucleic Acids. Res.* **2008**, *36*, 6816-6824. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn767>.
20. Wang, F.; Tang, M.; Zeng, Z.; Wu, R.; Xue, Y.; Hao, Y.; Pang, D.; Zhao, Y.; Tan, Z. Telomere- and telomerase-interacting protein that unfolds telomere G-quadruplex and promotes telomere extension in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 20413-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200232109>.
21. Wang, Q.; Liu, J.; Chen, Z.; Zheng, K.; Chen, C.; Hao, Y.; Tan Z. G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. *Nucleic Acids. Res.* **2011**, *39*, 6229-6237. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr164>.
22. Ford, L.; Suh, J.; Wright, W.; Shay, J. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 9084-9091. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.23.9084-9091.2000>.
23. Ford, L.; Wright, W.; Shay, J. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene.* **2002**, *21*, 580-583. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1205086>.
24. Petracek, M.; Konkel, L.; Kable, M.; Berman J. A Chlamydomonas protein that binds single-stranded G-strand telomere DNA. *EMBO J.* **1994**, *13*, 3648-58.
25. Johnston, S.; Lew, J.; Berman, J. Gbp1p, a protein with RNA recognition motifs, binds single-stranded telomeric DNA and changes its binding specificity upon dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 923-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.19.1.923>.
26. Konkel, L.; Enomoto, S.; Chamberlai, E.; McCune-Zierath, P.; Iyadura, S.; Berman J. A class of single-stranded telomeric DNA binding proteins required for Rap1p localization in yeast nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 5558-5562. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.12.5558>.
27. Lee-Soety, J.; Jones, J.; MacGibeny, M.; Remaly, E.; Daniels, L.; Ito, A.; Jean, J.; Radecki, H.; Spencer, S. Yeast hnRNP-related proteins contribute to the maintenance of telomeres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *426*, 12-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.144>.
28. Liu, C.; Wang, L.; Lancto, C.; Abrahamsen, M. Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *165*, 132-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.01.013>.
29. Janse, C.; van der Klooster, P.; van der Kaay, H.; van der Ploeg, M.; Overdulve, J. Mitomycin-C is an unreliable inhibitor for study of DNA synthesis in *Plasmodium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1986**, *21*, 33-6. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90076-9](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90076-9).
30. Aldous, W.; Martin, R.; and Kyle, D. Stage specific detection and inhibition studies of plasmodium falciparum telomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *95*, 281-285. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00111-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00111-X).
31. Bottius, E.; Bakhsis, N.; and Sherf, A. *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 919-925. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.18.2.919>.
32. Raj, D.; Das, B.; Dash, A.; Supakar, P. Identification of telomerase activity in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 685-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.056>.
33. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; and Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evolution.* **2013**, *30*, 2725-2729. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
34. Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-54. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
35. Fayer, R.; Xiao, L. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2ª Edición. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 2007; pp 11-20.
36. Zhao, N.; Gong, P.; Li, Z.; Cheng, B.; Li, J.; Yang, Z.; Li, H.; Yang, J.; Zhang, G.; Zhang, X. Identification of a telomeric DNA-binding protein in *Eimeria tenella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *451*, 599-602. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.030>.
37. Hirata, Y.; Suzuki, C.; Sakai, S. Characterization and gene cloning of telomere-binding protein from tobacco BY-2 cells. *Plant. Physiol. Biochem.* **2004**, *42*, 7-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.10.002>.
38. Lee, Y.; Kim, W. Tobacco GTBP1, a homolog of human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, protects telomeres from aberrant homologous recombination. *Plant. Cell.* **2010**, *22*, 2781-2795. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.076778>.
39. Lee, Y.; Kim, W. Telomerase-dependent 3' G-strand overhang maintenance facilitates GTBP1-mediated telomere protection from misplaced homologous recombination. *Plant. Cell.* **2013**, *25*, 1329-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.107573>.

Article citation:

Calvo, E. T.; Wasserman, M. L. PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*. *Rev Colomb Quim.* **2015**, *44*(1), 5-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.53977>