

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Análisis funcional de la proteína tumoral controlada
traduccionalmente (TCTP) de *Plasmodium falciparum***

Tesis que presenta

M. en C. Berenice Calderón Pérez

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dr. Roberto Ruiz Medrano**

México, D.F.

Marzo 2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV bajo la dirección del Dr. Roberto Ruiz Medrano y la asesoría de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, el Dr. Jaime Ortega López de este mismo departamento, la Dra. Rosaura Hernández Rivas del Departamento de Biomedicina Molecular y la Dra. Rosalía Lira Carmona del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano por su valiosa guía y confianza brindada, así como por el constante contagio de entusiasmo, superación y dedicación a la investigación.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por su dedicación, interés y su valiosa calidad humana.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas, la Dra. Rosalía Lira Carmona y el Dr. Jaime Ortega López por formar parte del comité tutorial, por su interés, apoyo y orientación para la realización del presente trabajo.

A la Q.B.P. Lidia Gómez Silva, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico para el desarrollo experimental del trabajo.

A la Q.A. Silvia Beatriz Altamirano Morales, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico para el desarrollo experimental del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A José Luis Sánchez Figueroa, auxiliar técnico del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico para el desarrollo del trabajo.

A la M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico para la expresión, producción y purificación de proteínas recombinantes.

Al I.B.Q. Jesús Vega Estrada, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico para la producción de proteínas recombinantes y su escalamiento.

Al Técnico en Química Industrial José Trinidad Higareda Chávez por el apoyo técnico en el cultivo celular y la consecución de líneas celulares.

AGRADECIMIENTOS

Al Biol. Jesús pablo Gómez Islas, auxiliar de investigación del Departamento de Genética y Biología Molecular por el apoyo técnico para el mantenimiento, conservación y transfección de cultivos celulares.

A la Dra. Dulce María Delgadillo Álvarez del Departamento de Biomedicina Molecular por el apoyo técnico para la inmunolocalización de proteínas.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales García de la Unidad de Citometría del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV, por su apoyo técnico y experta colaboración para la citometría de flujo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (no. becario 172814) para la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
Índice de figuras	i
Índice de cuadros	iii
Abreviaturas	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Malaria	4
1.1.1 Mecanismos de infección de la malaria	5
1.1.2 Respuesta inmune contra malaria	8
1.1.3 Control y tratamiento de la malaria	9
1.2 Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	10
1.2.1 Gen de TCTP	11
1.2.1.1 Estructura del gen y pseudogenes	11
1.2.1.2 Características del mRNA de TCTP	12
1.2.2 Estructura de TCTP	12
1.2.2.1 Semejanza estructural de TCTP con otras proteínas	13
1.2.2.2 Dominios conservados en TCTP	15
1.2.3 Síntesis y recambio de TCTP	16
1.2.3.1 Niveles de expresión de TCTP	16
1.2.3.2 Regulación transcripcional y traduccional de TCTP	17
1.2.4 Función biológica de TCTP	18
1.2.4.1 Interacciones moleculares	18
1.2.4.2 Importancia celular	18
1.2.4.3 Secreción de TCTP	20
1.2.4.4 Actividades extracelulares	21
1.3 TCTP de parásitos	22
1.3.1 TCTP de <i>P. knowlesi</i>	22
1.3.2 TCTP de <i>P. falciparum</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	26

3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo particular	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 ETAPA: Análisis estructural <i>in silico</i> de PftTCTP y HstTCTP	29
5.1.1 Análisis de la estructura primaria	29
5.1.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria	29
5.1.3 Predicción de interacciones proteína-proteína	30
5.2 ETAPA: Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	30
5.2.1 Extracción de RNA total de humano	30
5.2.2 Síntesis de cDNA	31
5.2.3 Material genético de <i>P. falciparum</i>	32
5.2.4 Amplificación del gen de PftTCTP y HstTCTP	32
5.2.5 Clonación de PftTCTP y HstTCTP	34
5.2.5.1 Purificación de productos de PCR	34
5.2.5.2 Obtención de plásmidos recombinantes	35
5.2.5.3 Preparación de células competentes	35
5.2.5.4 Transformación de células competentes	36
5.2.5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	37
5.2.6 Subclonación de PftTCTP y HstTCTP en el vector de expresión	38
5.2.7 Inducción de proteínas recombinantes de TCTP	39
5.2.7.1 Obtención de fracción soluble, insoluble y aislamiento de cuerpos de inclusión	40
5.2.7.2 Estandarización de las condiciones de inducción	41
5.2.7.3 Identificación de proteínas recombinantes por Western Blot	42
5.1.8 Purificación de proteínas recombinantes de TCTP	42
5.2.9 Marcaje de las proteínas recombinantes	43
5.3 ETAPA: Análisis funcional <i>in vitro</i> de TCTP recombinante	44
5.3.1 Aislamiento de linfocitos B de bazo de ratón	44
5.3.1.1 Material biológico	44
5.3.1.2 Obtención de esplenocitos totales	44
5.3.1.3 Aislamiento de linfocitos B	45
5.3.1.4 Estimulación de linfocitos B con un mitógeno	46

5.3.2	Ensayos de proliferación celular	46
5.3.3	Localización de TCTP recombinante en linfocitos B	47
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	48
6.1	ETAPA: Análisis estructural in silico de PfTCTP y HsTCTP	49
6.1.1	Análisis de la estructura primaria	49
6.1.2	Análisis de la estructura secundaria y terciaria	50
6.1.3	Predicción de interacciones proteína-proteína	54
6.2	ETAPA: Expresión y purificación de TCTP recombinantes	57
6.2.1	Extracción de RNA total de sangre periférica humana y síntesis de cDNA	57
6.2.2	Amplificación del gen de PfTCTP y HsTCTP	57
6.2.3	Clonación del gen de HsTCTP y PfTCTP	59
6.2.4	Subclonación de PfTCTP y HsTCTP en el vector de expresión	63
6.2.5	Ensayo de inducción e identificación de las proteínas recombinantes	64
6.2.5.1	Estandarización de las condiciones de inducción	65
6.2.6	Purificación de las proteínas recombinantes	67
6.2.7	Marcaje de las proteínas recombinantes	70
6.3	Análisis funcional in vitro de TCTP recombinante	71
6.3.1	Aislamiento de linfocitos B de bazo de ratón	72
6.3.1.1	Obtención de esplenocitos totales	72
6.3.1.2	Aislamiento de linfocitos B	72
6.3.1.3	Estimulación de linfocitos B con un mitógeno	73
6.3.2	Ensayos de proliferación celular	74
6.3.3	Localización de TCTP recombinantes en linfocitos B de ratón	79
7.	CONCLUSIONES	81
8.	BIBLIOGRAFIA	83
	ANEXOS	90

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .	7
Figura 2. Estructura de TCTP de <i>S. pombe</i> .	13
Figura 3. Topología de TCTP en comparación con Mss4.	14
Figura 4. Comparación de estructura secundaria y terciaria de TCTP de <i>S. pombe</i> y <i>P. knowlesi</i> .	23
Figura 5. Estrategia experimental del proyecto.	28
Figura 6. Análisis de la estructura primaria de HsTCTP y PftCTP	50
Figura 7. Alineamiento de la estructura terciaria de HsTCTP (PDB 1yz1) y PftCTP (PDB 3p3k).	53
Figura 8. Predicción de las interacciones proteína-proteína de HsTCTP.	55
Figura 9. Predicción de las interacciones proteína-proteína de PftCTP.	56
Figura 10. RNA total de sangre periférica humana.	57
Figura 11. Efecto de la temperatura de alineamiento en la amplificación del gen de <i>HsTCTP</i>	58
Figura 12. Efecto de la temperatura de extensión en la amplificación del gen de <i>PftCTP</i>	59
Figura 13. Verificación de la presencia de inserto (ORF) de HsTCTP y PftCTP en pDrive.	60
Figura 14. Verificación de la presencia de inserto (ORF) de HsTCTP y PftCTP en pProEXHTb.	64

Figura 15. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot	65
Figura 16. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot	66
Figura 17. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot	67
Figura 18. Identificación de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad por medio de ensayos Western Blot empleando anticuerpos anti-His.	69
Figura 19. Identificación de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad.	70
Figura 20. Perfil electroforético de las proteínas recombinantes marcadas con fluorocromo.	71
Figura 21. Efecto de la concentración de LPS sobre linfocitos B.	74
Figura 22. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre la densidad celular viable de linfocitos B	75
Figura 23. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre el porcentaje de distribución de las etapas del ciclo celular en linfocitos B.	76
Figura 24. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre la incorporación en linfocitos B.	77
Figura 25. Localización de TCTP recombinante en linfocitos B.	79

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de TCTP humana y de <i>P. falciparum</i> .	33
Cuadro 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de HsTCTP y PFTCTP.	51
Cuadro 3. Alineamiento de la estructura secundaria de HsTCTP y PFTCTP.	52
Cuadro 4. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos de clonas del ORF de TCTP humano.	61
Cuadro 5. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos de clonas del ORF de TCTP de <i>P. falciparum</i> .	62
Cuadro 6. Composición de las soluciones de equilibrio, lavado y elución empleadas para la purificación de las proteínas recombinantes con afinidad a níquel.	68
Cuadro 7. Composición de las soluciones de equilibrio, lavado y elución empleadas para la purificación de las proteínas recombinantes con afinidad a níquel.	69

Abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dss4	Supresor dominante de Sec4
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
HRF	Factor de liberación de histamina
HsTCTP	TCTP de humano
IL	Interleucina
mRNP	Partícula de ribonucleoproteína
Mss4	Supresor de Sec4 en mamíferos
ORF	Marco de lectura abierto
PfTCTP	TCTP de <i>Plasmodium falciparum</i>
PKR	Proteína cinasa R
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro
RNAi	Ácido ribonucleico de interferente
rpm	Revoluciones por minuto
TCTP	Proteína tumoral controlada traduccionalmente
UTR	Región no traducible

RESUMEN

La proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés) ha sido caracterizada parcialmente con respecto a su actividad bioquímica, patrones de interacción, función fisiológica y localización subcelular o extracelular. TCTP humana (HsTCTP) ha sido descrita como una proteína que causa la liberación de histamina en basófilos; además, se ha demostrado que la proteína recombinante de TCTP induce la producción de interleucina (IL) 8 de eosinófilos y de IL-4 e IL-13 de basófilos humanos, y actúa como factor de crecimiento para células B.

Por otro lado, la proteína recombinante de TCTP de *Plasmodium falciparum* (PftTCTP) causa *in vitro* la liberación de histamina de basófilos y la secreción de IL-8 de eosinófilos. En pacientes infectados con el parásito, se ha demostrado que la proteína está presente en el plasma ($\approx 7 \mu\text{g/mL}$), lo que podría afectar la respuesta inmune humana. Por lo anterior, en el presente trabajo se plantó el análisis funcional de TCTP de *P. falciparum*. Básicamente, se clonó y expresó TCTP de este parásito para ver posibles diferencias en relación a la estimulación de proliferación celular basados en que existe una alteración estructural de PftTCTP con respecto a HsTCTP en los aminoácidos 22 a 30 (ausencia de lámina β) lo que podría afectar las funciones descritas para esta proteína.

Se marcaron las proteínas recombinantes HsTCTP y PftTCTP con distintos fluorocromos para ver el efecto de la presencia de las mismas sobre un cultivo primario de linfocitos B. Se encontró que ambas presentan un efecto de inducción de la proliferación de células B; sin embargo, cuando se incubaba con HsTCTP se alcanzó el doble de concentración celular viable en comparación con PftTCTP al final de la cinética.

El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular es diferente para cada una de ellas, medido por citometría de flujo. Además, se observó que la acumulación de la proteína PftCTP es más rápida que la de HstCTP y que el porcentaje de incorporación al final de la cinética es mayor para PftCTP (96%) que para HstCTP (54%).

Mediante microscopia confocal se observó que la localización de HstCTP y PftCTP en linfocitos B difiere ya que los puntos de mayor acumulación de las proteínas no son los mismos.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum secretes a homologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) into serum of infected individuals, although its role in pathogenesis or virulence is unknown. To determine the effect of *P. falciparum* TCTP on B cells as compared to human TCTP, fluorescently labeled proteins were incubated on primary cultures of mouse splenic B cells and analyzed by flow cytometry and confocal microscopy.

Our results indicate that both recombinant proteins are incorporated into B cells, but differ significantly in their rate and percentage of incorporation, being significantly higher for *P. falciparum* TCTP. Furthermore, *P. falciparum* TCTP showed a lower B cell proliferative effect than human TCTP, suggesting a mechanism through which the former could interfere in the host's immune response.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Malaria

La malaria o paludismo es un problema de salud pública mundial que cada año ocasiona de 250 a 500 millones de enfermos y de 1 a 3 millones de muertes; de éstas, 90% ocurre en menores de 5 años de edad, la mayoría en África (89%) donde también se concentra 59% de los casos clínicos. En el mundo, cerca de 3 mil millones de habitantes se encuentran en riesgo de contraer malaria con mayor afectación en regiones tropicales y de escasos recursos económicos (WHO, 2012). En el continente americano, un tercio de la población reside en áreas con algún riesgo para la transmisión de la malaria. De los 293 millones de habitantes que viven en dichas áreas, 70% corresponden a 21 países con riesgo de transmisión y el resto, en lugares endémicos (WHO, 2007).

La malaria es causada por la infección del parásito unicelular del género *Plasmodium* a través de la picadura del mosquito hembra *Anopheles*, transmisor de la malaria humana. La enfermedad causada por esta infección se caracteriza por paroxismos febriles intermitentes, anemia y crecimiento del bazo o esplenomegalia. Asimismo, es causa importante de anemia infantil y muerte en embarazadas, bajo peso de los infantes al nacer, partos prematuros y mortalidad infantil (Rodríguez et al., 2008).

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* (Mouatcho y Goldring, 2013).

De éstas, la mayor carga de la enfermedad la ocasionan *P. falciparum* que es la especie más letal, con predominio en África, y *P. vivax* que predomina en Asia y América (Mouatcho y Goldring, 2013). Sin embargo, se ha reportado que *P. knowlesi*, una especie que infecta simios, también ha provocado la enfermedad en humanos en el sudeste de Asia (Lee et al., 2011).

En México, el principal agente etiológico es *P. vivax*; algunos casos aislados de *P. falciparum* se notifican en estados de la frontera sur, los cuales se asocian a movimientos migratorios provenientes de Centroamérica y otras con resistencia a medicamentos antimaláricos (Hernández-Avila et al., 2006). México concentró el 0.5 % de los casos de malaria registrados en América Latina durante el año 2009. Se estima que 16.7 % de su población se encuentra con algún nivel de riesgo de adquirir la enfermedad (Betanzos-Reyes, 2011).

1.1.1 Mecanismos de infección de la malaria

La transmisión de la malaria se lleva a cabo en ambientes donde las condiciones microclimáticas favorecen el desarrollo y supervivencia de los mosquitos anofelinos. Para la transmisión, los mosquitos vectores obtienen los parásitos mediante la picadura de personas infectadas y luego los transmiten a personas susceptibles (Rodríguez et al., 2008).

Plasmodium, el parásito que ocasiona esta enfermedad, es un organismo que desarrolla su ciclo vida en dos hospederos: en el humano se llevan a cabo dos ciclos asexuales denominados desarrollo esquizogónico exoeritrocítico y el intraeritrocítico, y en el mosquito *Anopheles* se realiza el ciclo esporogónico (Figura 1). Estas dos fases son consecutivas y necesarias para que el parásito complete su ciclo (revisado en Su et al., 2007; Ménard et al., 2013).

El mosquito infectado inyecta parásitos móviles o esporozoitos al torrente sanguíneo del hospedero humano mientras se alimenta de sangre. Posteriormente, el parásito invade las células hepáticas en pocos minutos e inicia su multiplicación formando el esquizonte hepático. Dos semanas después, las células del hígado infectadas se rompen y se produce la liberación de miles de parásitos denominados merozoitos que invaden los glóbulos rojos o eritrocitos del torrente sanguíneo. En esta etapa eritrocítica, los parásitos se multiplican formando esquizontes hemáticos que terminan por hacer estallar el eritrocito que los contiene 48 horas después (o 72 horas en el caso de infección por *P. malariae*) y liberan un nuevo grupo de merozoitos. La mayoría de los merozoitos continúan con este ciclo de desarrollo asexual infectando nuevos eritrocitos. Las manifestaciones clínicas se presentan después que se completan varios de estos ciclos replicativos. La infección hepática cesa de manera espontánea en menos de cuatro semanas (excepto *P. vivax* y *P. ovale*) y la infección parasitaria se limita a los eritrocitos (revisado en Rodríguez et al., 2008; Betanzos-Reyes, 2011).

Una menor proporción de merozoitos, producto del desarrollo del ciclo esquizogónico sanguíneo del parásito, libera formas sexuales (gametocitos): masculina (microgametocitos) y femenina (macrogametocitos). Estas formas ingresan al mosquito mientras éste se alimenta de la sangre de la persona portadora de la enfermedad. Los gametocitos sexuales se fusionan y los cigotos se transforman a oocinetos móviles (Su et al., 2007).

Este parásito cruza la pared del intestino para implantarse en la pared externa del mismo, dando lugar al ciclo esporogónico, del que resultan los esporozoitos que migran a las glándulas salivales a través de las cuales se inicia nuevamente la transmisión al picar a otro hospedero humano (Su et al., 2007).

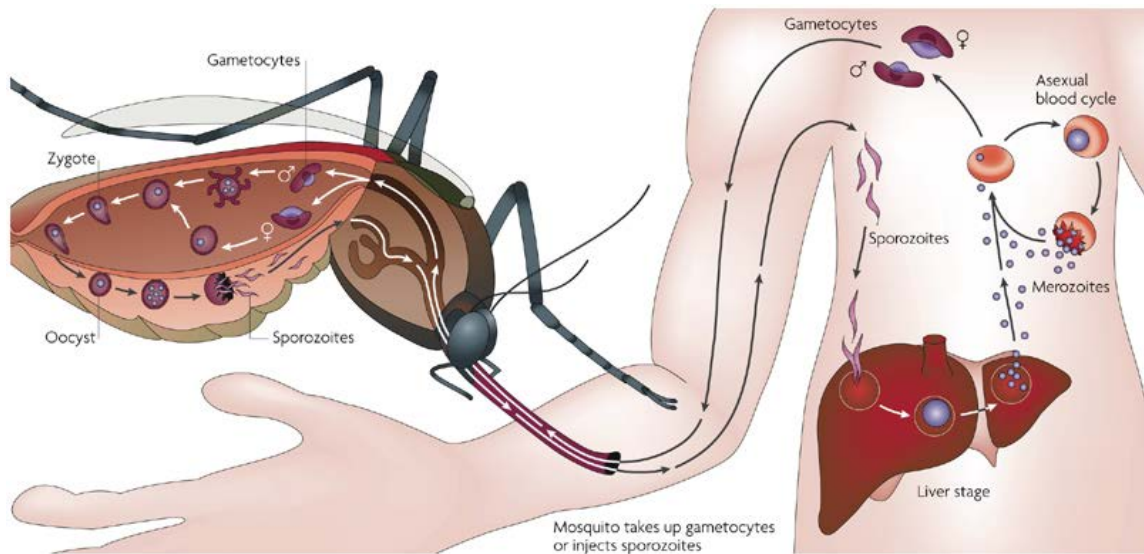


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Los gametocitos, las etapas sexuales del parásito, son ingeridos por el mosquito mientras se alimenta de sangre humana infectada y dan lugar a gametos que emergen y fecundan el intestino medio del insecto. Los cigotos resultantes se convierten en oocistos que atraviesan y se alojan debajo de la pared del intestino medio como ooquistes. El crecimiento y la división de cada uno de los ooquistes produce miles de formas haploides activas del parásito (esporozoitos) que invaden las glándulas salivales. Los esporozoitos son inyectados durante la picadura del mosquito a un individuo y son llevados al hígado, donde invaden a los hepatocitos. Los parásitos crecen y se dividen dentro de cada uno de los hepatocitos para producir decenas de miles de formas haploides. Los parásitos salen de los hepatocitos como merozoitos y entran al torrente sanguíneo. La multiplicación del parásito se lleva a cabo en los eritrocitos con ciclos repetidos de invasión, crecimiento y división. Esta multiplicación puede dar lugar a 10^{12} o más eritrocitos parasitados en el torrente sanguíneo, provocando los síntomas de la enfermedad y las complicaciones de la malaria. En el curso de esta parasitación, algunas etapas eritrocíticas cambian a desarrollar gametocitos masculinos y femeninos maduros. El ciclo de vida del parásito se completa cuando estos gametocitos son tomados por otro mosquito, perpetuando la transmisión de la enfermedad (Tomado de Su et al., 2007).

Los parásitos de las especies *P. vivax* y *P. ovale* tienen la particular característica de permanecer en formas latentes (hipnozoitos) en las células del hígado durante periodos que pueden durar semanas, meses o años y reiniciar nuevos episodios de la enfermedad, recaídas o ser fuente de transmisión (Betanzos-Reyes, 2011).

1.1.2 Respuesta inmune contra malaria

Los esporozoitos inyectados en la piel por la picadura del mosquito drenan a los ganglios linfáticos donde se inicia la activación de células T y B, o al hígado donde invaden a los hepatocitos. Los anticuerpos son el primer grupo de moléculas efectoras que retienen a los esporozoitos en la piel para prevenir la invasión de las células del hígado. El interferón gamma (IFN- γ) es una citosina producida por los linfocitos CD4+ y CD8+ activados, ésta interviene en activar a los macrófagos para intervenir en la infección de los merozoitos en el hígado. Sin embargo, esta respuesta inmune a menudo es insuficiente debido al número de parásitos que infectan al hepatocito y los merozoitos emergentes del hígado invaden las células rojas de la sangre, donde se replican y provocan la lisis del eritrocito infectado para invadir nuevos eritrocitos (Riley y Stewart, 2013).

Los anticuerpos específicos producidos por la respuesta celular opsonizan a las células del parásito y además aglutinan a los eritrocitos infectados. Los anticuerpos contra las proteínas variantes de superficie también opsonizan y aglutinan eritrocitos infectados y previenen su secuestro (citoaderencia) en los vasos sanguíneos. Los linfocitos productores de IFN- γ activan a los macrófagos y aumentan la fagocitosis de merozoitos y eritrocitos opsonizados. Los anticuerpos fijadores de complemento contra gametocitos lisan a los parásitos en el interior del intestino del mosquito o impiden la fertilización y el desarrollo del cigoto, evitando así el ciclo sexual del protozooario (Langhorne et al., 2008).

Los esporozoitos, esquizontes hepáticos y los gametocitos, así como los antígenos expresados en los gametos, son ligeramente polimórficos; mientras que los antígenos de merozoitos y los antígenos variantes de superficie son altamente polimórficos (Langhorne et al., 2008; Riley y Stewart, 2013).

1.1.3 Control y tratamiento de la malaria

El control de la malaria se enfoca en reducir las oportunidades para los participantes en la transmisión de la enfermedad: los vectores, los parásitos y los reservorios de la infección en humanos. De estos componentes principales derivan las acciones de los programas de control: el manejo de casos, la prevención y la vigilancia. El manejo de los casos se orienta hacia la detección oportuna así como el tratamiento rápido y efectivo de los pacientes sintomáticos. La prevención comprende desde la educación sobre la salud preventiva de la malaria hasta las medidas de control antivectorial, como el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas de acción residual y el rociado de paredes en el interior de las viviendas. La vigilancia comprende la red de búsqueda de casos febriles, el control de brotes, el monitoreo y la evaluación del programa antimalárico (Betanzos-Reyes, 2011).

La mejor opción terapéutica disponible, especialmente en el caso de infección por *P. falciparum*, es el tratamiento combinado basado en la artemisinina (lactona sesquiterpénica que contiene un puente peróxido). Los pacientes con infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* requieren un segundo medicamento, la primaquina, para eliminar los parásitos latentes en el hígado (Cui y Su, 2009; WHO, 2010).

Actualmente, no hay ninguna vacuna autorizada contra la malaria. Una vacuna propuesta contra la malaria ocasionada por *P. falciparum*, conocida como RTS,S/AS01, es objeto de evaluación mediante ensayos clínicos que se llevan a cabo en siete países africanos. La OMS recomendará su uso en función de los resultados finales obtenidos en los ensayos clínicos, hasta ahora con una eficacia reportada del 40-50 % (Riley y Stewart, 2013).

1.2 Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)

La proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés) fue descubierta a mediados de los años 80 por tres grupos de investigación interesados en genes regulados traduccionalmente (Bommer y Thiele, 2004). Al inicio, se nombró a esta proteína como P21, Q23 y P23; posteriormente, Gross y colaboradores (1989) denominaron a esta proteína "TCTP" basados en que el DNA complementario (cDNA) fue clonado de una línea de eritroleucemia humana y que la proteína, en este caso en particular, es regulada a nivel traduccional. La estructura primaria de TCTP no revela similitud con alguna familia de proteínas (Gross et al., 1989); sin embargo, con la determinación de la estructura terciaria de TCTP de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, se ha podido relacionar a esta proteína con la familia de pequeñas chaperonas Mss4/Dss4 (Thaw et al., 2001).

TCTP ha sido caracterizada parcialmente con respecto a su actividad bioquímica, patrones de interacción, función fisiológica y localización subcelular o extracelular (Feng et al., 2007). TCTP se expresa en diversos tipos celulares y los niveles de proteína son regulados en respuesta a diferentes condiciones internas y señales extracelulares (Bommer, 2012). Con base en algunas de las funciones que se han encontrado para esta proteína, también se le ha denominado factor de liberación de histamina (HRF) y fortilina (MacDonald et al., 1995; Li et al., 2001).

TCTP es una proteína multifuncional que está relacionada con diversas actividades fisiológicas como proliferación y ciclo celular, crecimiento, desarrollo embrionario, respuestas a estrés, tumorigénesis y muerte celular, incluyendo apoptosis. En mamíferos, TCTP actúa de manera celular no autónoma ya que es secretada por diversos tipos celulares y modula respuestas inmunes; asimismo, actúa como factor de crecimiento para células B y provoca la liberación de histamina en células cebadas y basófilos, por lo que es de gran importancia médica (Bommer, 2012).

1.2.1 Gen de TCTP

1.2.1.1 Estructura del gen y pseudogenes

TCTP ha sido identificada en organismos eucarióticos, incluyendo levaduras. Actualmente, se conoce la estructura del gen TCTP de diversas especies y se han encontrado similitudes en la organización genética de organismos filogenéticamente relacionados. En algunos mamíferos como humano, ratón y conejo, el gen de TCTP está conformado por 6 exones y 5 intrones. En el exón 6 se encuentra la región 3' no traducible (UTR 3') del mRNA. El gen de TCTP contiene una secuencia promotora TATA consenso (5' TATAAA 3') y diversos elementos regulatorios altamente conservados en los promotores de mamíferos (Thiele et al., 2000).

El promotor del gen de TCTP contiene potenciales sitios de unión para diversos factores de transcripción como son la proteína estimuladora 1 (Sp1), el factor nuclear 1 (NF1), la proteína activadora 1 (AP1), el elemento de respuesta a AMP cíclico (CP2) y la proteína específica de mieloides con dedos de zinc 1 (MZF1), entre otros (Chan et al., 2012).

La mayoría de las especies contienen en su genoma una sola copia del gen de TCTP; sin embargo, en general, los mamíferos presentan un mayor número de genes para esta proteína. Por medio de análisis *in silico* mediante el uso de herramientas que realizan alineamientos locales, se han encontrado diversos pseudogenes en este mismo taxón. Así, se han detectado 8 pseudogenes en humano, 11 en chimpancé, 18 en perro, 12 en rata y 15 en ratón, entre otros (Hinojosa-Moya et al., 2008).

1.2.1.2 Características del mRNA de TCTP

En mamíferos, la transcripción del gen TCTP genera dos mRNAs que difieren en la extensión del 3'UTR y en la secuencia de poliadenilación, siendo el mRNA de menor extensión el más abundante (Thiele et al., 2000).

Los mRNAs de TCTP presentan una secuencia de oligopirimidina en el extremo 5' terminal, la cual es característica de mRNAs controlados traduccionalmente; además, el 5'UTR presenta elementos ricos en CG ($\approx 80\%$) y la formación de estructura secundaria (Chan et al., 2012).

El 3' UTR presenta regiones ricas en A y U (ARE, por sus siglas en inglés), estas secuencias se caracterizan por presentar repeticiones continuas o dispersas del pentanucleótido "AUUUA" y actúan como elementos en *Cis* a los cuales se unen proteínas específicas (denominadas ARE-BP) regulando la estabilidad y la degradación del mRNA (Thiele et al., 2000, Chan et al., 2012).

1.2.2 Estructura de TCTP

TCTP es una proteína de 20-25 kDa cuya estructura comprende 4 hojas β plegadas designadas A-D y 3 hélices α designadas H1-H3 (Figura 2). Las cuatro láminas de la hoja A se acomodan frente a tres láminas de la hoja B y la hélice H1. La hélice H3 se localiza de lado opuesto a la hoja A exponiendo la región hidrofílica de la molécula. La hélice H2 se encuentra frente a la hélice H3 (formando una estructura de hairpin de hélices α), los residuos Ile 8 – Asp 11 y Lys 60 – Leu 163, así como la región de Ser 135 – Val 142. La hoja C, constituida por 2 láminas β , forma una protuberancia que sale de la estructura globular de la molécula y en cuya parte distal se encuentra un asa flexible de Gly 40 – Gly 61. El conjunto de elementos estructurales localizados frente a la hoja A genera dos regiones hidrofóbicas denominadas núcleo 1 y 2, respectivamente (Thaw et al., 2001).

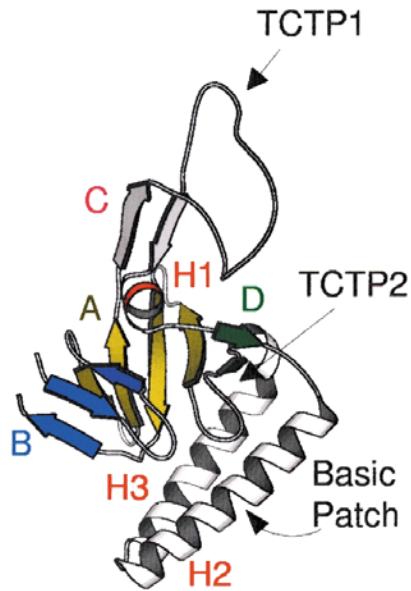


Figura 2. Estructura de TCTP de *S. pombe*. TCTP presenta 4 hojas β plegadas (designadas A-D) y 3 hélices α (designadas H1-H3.) Tomado de Thaw et al., 2001.

Las mutaciones que generan inserciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de esta proteína para diferentes organismos, se localizan dentro de las estructuras de asas conservando la hidrofobicidad de la molécula. TCTP presenta dos regiones con alta homología en la secuencia denominadas TCTP1 y TCTP 2 (Figura 2). La región TCTP1 es predominantemente hidrófila y constituye la parte flexible de la molécula, mientras que TCTP2 está conformada por un asa irregular y está flanqueada por dos láminas de hojas β (Thaw wt al., 2001; Hinojosa-Moya et al., 2008).

1.2.2.1 Semejanza estructural de TCTP con otras proteínas

La estructura tridimensional del dominio de láminas β de TCTP presenta similitud con la proteína humana Mss4 (supresor de Sec4 en mamíferos) y su homólogo en levadura Dss4 (supresor dominante de Sec4), las cuales son pequeñas chaperonas que se unen a las proteínas Rab en su forma libre de nucleótidos (revisado en Bommer, 2012).

Mss4 ha sido identificada como factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, por sus siglas en inglés) para proteínas Rab, miembros de la superfamilia Ras (De Gunzburg, 2006).

La topología de TCTP difiere en comparación con la estructura de Mss4 (Figura 3). Las hélices H2 y H3 de TCTP no se encuentran en Mss4, en su lugar, se presenta un asa corta que une las láminas de la hoja D; por otro lado, Mss4 contiene un dominio de unión a zinc el cual no presenta TCTP. La región adicional que incluye dos láminas de hojas β unidas a través de una asa flexible, de 22 residuos para TCTP y 13 para Mss4, se encuentra en posiciones distintas para ambas moléculas (Thaw et al., 2001).

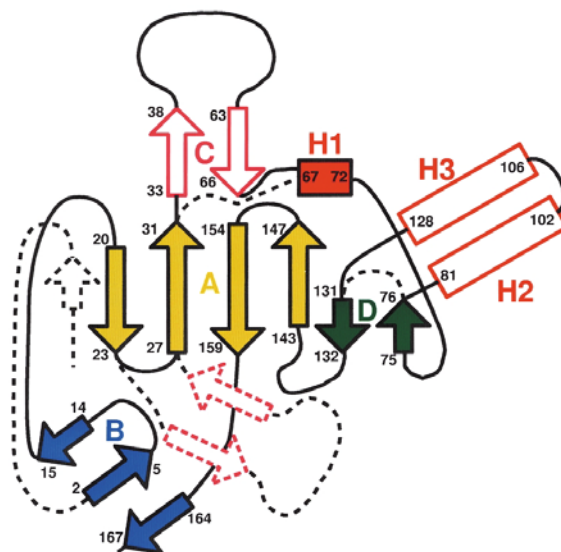


Figura 3. Topología de TCTP en comparación con Mss4. Las hojas β (designadas A-D) están representadas con flechas y las hélices α (designadas H1-H3) con rectángulos. Los elementos que se encuentran rellenos de color son comunes para ambas moléculas, TCTP y Mss4. Los elementos no rellenos de color pero con contorno en línea continua, son únicos para TCTP. Los elementos con contorno en línea punteada son únicos para Mss4. La numeración corresponde a la posición de los residuos en TCTP. Tomado de Thaw et al., 2001.

En la familia de TCTP hay 9 residuos que se encuentran totalmente conservados, entre los cuales están los aminoácidos Glu 12, Leu 74 y Glu 134.

La región que contiene esta triada corresponde a la superficie de unión de Mss4 con la proteína Rab denominada Sec4 (De Gunzburg, 2006). Existe una gran similitud entre la posición de las cadenas laterales en esta región entre ambas moléculas. Dos residuos en este sitio (Val 69 y Met 136), se encuentran muy conservados en TCTP. Sin embargo, el residuo Met 136 es una excepción en la equivalencia fisicoquímica general de las cadenas laterales de esta superficie de unión (Glu 98 para Mss4) lo que implica posibles diferencias en la especificidad de las interacciones proteína-proteína para ambas moléculas. La hélice H1 se encuentra conservada en Mss4 y TCTP, y ésta comprende parte de la región de unión a GTPasas (Thaw et al., 2001).

1.2.2.2 Dominios conservados en TCTP

El alineamiento múltiple de las secuencias consenso de distintos taxones revela un alto grado de homología de TCTP aún entre taxones evolutivamente alejados (Hinojosa-Moya et al., 2008). Cerca del 9 % de los aminoácidos de esta proteína se encuentran conservados en distintas especies, estos residuos están principalmente agrupados en el dominio de láminas β , lo que indica que esta región de TCTP es importante para interacciones moleculares (Bommer y Thiele, 2004).

Por otro lado, TCTP presenta otras dos regiones conservadas (Thaw et al., 2001):

- 1) El dominio de TCTP1 que se encuentra adyacente a la región de unión propuesta para interactuar con GTPasas. En medio del asa hay un residuo de Ser que puede actuar como sitio de fosforilación.
- 2) Un dominio que incluye a las hélices H2 y H3, que corresponden a la parte básica de la molécula y que contiene un posible sitio de unión a tubulina.

Se ha descrito un dominio adicional conservado presente en los primeros 16 aminoácidos del extremo N-terminal. El residuo en la posición 15 generalmente es una serina y puede ser un sitio de fosforilación (Venugopal, 2005).

1.2.3 Síntesis y recambio de TCTP

1.2.3.1 Niveles de expresión de TCTP

TCTP es una proteína ubicua que se expresa en organismos eucarióticos, se ha identificado en más de 500 tipos celulares y los niveles de expresión varían ampliamente dependiendo del tejido y la etapa de desarrollo (revisado en Bommer, 2012).

Por ejemplo, TCTP se expresa de forma abundante en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en fase exponencial, constituyendo una de las 20 proteínas mayormente expresadas (Norbeck y Blomberg, 1997). Los niveles de expresión de TCTP son regulados en respuesta a diferentes condiciones celulares internas y externas. Diversas citocinas y factores de crecimiento inducen rápidamente la síntesis de TCTP; mientras que en condiciones de estrés como el choque térmico, falta de nutrientes, presencia de metales pesados o señales citotóxicas/proapoptóticas, regulan positiva o negativamente los niveles de expresión de esta proteína (revisado en Bommer y Thiele, 2004).

En mamíferos, se ha descrito una tasa de síntesis baja de TCTP en tejidos postmitóticos como cerebro; sin embargo, en tejidos con alta actividad de división celular y en líneas tumorales se han encontrado altos niveles de TCTP (Thiele et al., 2000). Se han reportado diversas sustancias químicas que inducen la síntesis de TCTP como ésteres de forbol, lipopolisacáridos, metales pesados, compuestos citotóxicos, Ca^{+2} y dioxinas (Schmidt et al., 2007).

1.2.3.2 Regulación transcripcional y traduccional de TCTP

En mamíferos, las secuencias de las regiones promotoras de TCTP son altamente conservadas y en éstas se predicen *in silico* sitios de unión a factores de transcripción (Chan et al., 2012). Andree y colaboradores en 2006, demostraron que la transcripción de TCTP es regulada por la señalización de cAMP vía la interacción CRE/CREB por activación dependiente de fosforilación. Asimismo, TCTP presenta 2 regiones de unión CHD1L (C/A-C-A/T-T-T-T) en -748 pb y -851 pb de la región que flaquea el extremo 5'. La unión de CH1DL a la región promotora de TCTP activa la transcripción del gen (Chen et al., 2010). Otro factor que participa directamente en la regulación de la transcripción de TCTP es la proteína supresora de tumores p53 (Amson et al., 2011).

Los mecanismos de regulación traduccional de TCTP incluyen la activación del factor de iniciación eIF4E y de la proteína cinasa ribosomal S6, esta última implicada en la activación de la traducción de los mRNAs con secuencia de oligopirimidina en la región 5' terminal. Debido a la formación de estructura secundaria, el mRNA de TCTP se une y activa a la proteína cinasa R (PKR), la cual es regulada por RNA de doble cadena (Bommer et al., 2002). Asimismo, se ha descrito que el mRNA de TCTP se encuentra como partículas ribonucleoproteicas (mRNP) y estos complejos participan en la regulación traduccional del mRNA (Bommer y Thiele, 2004).

Kubiak y colaboradores en 2008, identificaron a TCTP como una proteína que puede ser ubiquitinada y potencialmente degradada por medio del proteosoma durante la mitosis. Adicionalmente, la proteína antiapoptótica MCL1 ("myeloid cell leukemia-1") sirve como chaperona molecular al unirse y estabilizar a TCTP *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células musculares lisas vasculares (Zhang et al., 2002).

1.2.4 Función biológica de TCTP

1.2.4.1 Interacciones moleculares

Para ejercer las diversas funciones fisiológicas que se han descrito, TCTP interactúa con diversas proteínas, incluyendo los factores de elongación eEF1A y eEF-B-β, actina, Bcl-xL, p53 y la Na, K-ATPasa (revisado en Nagano e Ichikawa, 2012). En TCTP se ha identificado una región de unión a calcio y de unión a tubulina, mapeadas en la misma posición de la secuencia (Bommer y Thiele, 2004). En mamíferos, se ha demostrado que TCTP se une a microtúbulos durante el ciclo celular y se separa del huso mitótico al término de la metafase tras ser fosforilada por la proteína cinasa Plk ("Polo-like kinase") (Gachet et al., 1999). Otras interacciones moleculares de TCTP incluyen la unión a la proteína de leucemia de células mieloides o MCL1 (Zhang et al., 2002).

En ratas, se ha reportado que TCTP también puede unirse a sí misma formando homodímeros y se demostró que los residuos 126-172 de la región carbono terminal de la proteína participan en esta auto-interacción (Yoon et al., 2000). La dimerización de TCTP es importante para algunas de sus actividades tipo citocina, como la estimulación de la secreción de interleucina (IL)-8 en células epiteliales bronquiales humanas; sin embargo, se desconoce si la dimerización es necesaria para que ejerza las diversas funciones descritas para TCTP (Kim et al., 2009).

1.2.4.2 Importancia celular

TCTP ha sido descrita como una proteína citoplasmática; sin embargo, también se ha reportado su localización nuclear (Li et al., 2001).

Los niveles de TCTP son regulados en respuesta a varias condiciones de estrés y el incremento en la expresión de esta proteína se ha relacionado con un aumento en la quimiorresistencia celular (Sinha et al., 2000). La sobreexpresión de TCTP en mamíferos resulta en estabilización de microtúbulos y alteración de la morfología celular (Gachet et al., 1999). La caracterización de TCTP como una proteína antiapoptótica y su semejanza con proteínas chaperonas, sugieren que TCTP está relacionada con funciones citoprotectoras (Li et al., 2001; Thaw et al., 2001).

En la línea celular epitelial de riñón de mono Cos-7, se describió que la expresión de TCTP es regulada a dos niveles distintos en respuesta a la concentración de calcio en diferentes compartimentos celulares. Cuando disminuyen las concentraciones de calcio en el retículo endoplásmico (ER), aumenta la expresión del mRNA de TCTP; mientras que, el aumento de las concentraciones de calcio citosólicas regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Xu et al., 1999).

TCTP ha sido relacionada con funciones de crecimiento celular y diferenciación. Por ejemplo, en el pólipo de agua dulce *Hydra vulgaris*, se encontraron altos niveles de mRNA y proteína de TCTP en tejidos en proliferación celular activa; sin embargo, en tejidos con diferenciación terminal, disminuye la tasa de síntesis para esta proteína (Yan et al., 2000). Por otro lado, TCTP participa en la inducción de la floración en violetas (Sage-Ono et al., 1998).

TCTP regula proliferación celular y tamaño de órganos en *Drosophila*. TCTP de *Drosophila* presenta interacción con la GTPasa denominada Rheb ("Ras homolog enriched in brain") y presenta actividad de GEF *in vitro* e *in vivo*. Además, TCTP se requiere para el crecimiento y proliferación. Una mutación en el residuo Glu 12 de TCTP de *Drosophila* evita la interacción y altera la función biológica de la proteína (Hsu et al., 2007).

Adicionalmente, TCTP ha sido asociada en varios tipos de cáncer como prostático, mamario y de colon. El papel en el desarrollo de tumores podría estar asociado con su actividad antiapoptótica; se ha reportado que TCTP antagoniza la función de Bax y controla la estabilidad de la proteína supresora de tumores p53. TCTP promueve la degradación de p53 y ésta reprime la transcripción de TCTP (revisado en MacDonald, 2012).

1.2.4.3 Secreción de TCTP

La mayoría de los artículos publicados sobre TCTP describen las funciones o actividades bioquímicas intracelulares de esta proteína. Sin embargo, un creciente número de reportes científicos se centran en la secreción y funciones extracelulares de TCTP.

La secreción de TCTP se lleva a cabo mediante una vía no clásica independiente del ER/aparato de Golgi, probablemente, por medio de exosomas. Se ha descrito que la proteína transmembranal TSAP6 participa en la secreción de TCTP. Por medio del sistema de doble híbrido se demostró la interacción de TSAP6 con TCTP; asimismo, por medio de análisis de inmunofluorescencia se observó que TCTP colocaliza parcialmente con TSAP6 en estructuras vesiculares en la membrana plasmática y nuclear (Amzallag et al., 2004).

El análisis de la estructura de TCTP realizado por nuestro grupo de trabajo sugiere que pueden existir isoformas de la proteína, una de éstas podría ser secretada mientras que otra podría llevar a cabo funciones intracelulares (Hinojosa-Moya et al., 2008)

1.2.4.4 Actividades extracelulares

TCTP ha sido descrita en diversos organismos incluyendo levaduras, plantas y animales, sugiriendo su distante historia evolutiva. Sin embargo, dado que el sistema inmunológico se restringe a los animales, las actividades relacionadas con éste han sido adquiridas recientemente en la evolución (revisado en Nagano e Ichikawa, 2012).

TCTP humana (HsTCTP) ha sido descrita como una proteína que causa la liberación de histamina en basófilos, por lo que también se denomina factor de liberación de histamina o HRF (MacDonald et al., 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína recombinante de TCTP de humano induce la producción de IL-8 en eosinófilos y de IL-4 e IL-13 en basófilos, y actúa como factor de crecimiento para células B (Bheekha-Escura et al., 2000; Kang et al., 2001). TCTP inhibe la producción de IL-2 e IL-3 en cultivos primarios de células T primarias y en la línea celular Jurkat T a nivel de transcripción de genes (Vonakis et al., 2003). Asimismo, TCTP estimula la producción de IL-8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en células epiteliales bronquiales (Yoneda et al., 2004).

Recientemente, se describió que TCTP está implicada en el proceso inflamatorio en modelos murinos de asma y alergia donde TCTP se encontró como dímero unido a anticuerpos IgE e IgG por la interacción del extremo N-terminal y las regiones internas Fab de las inmunoglobulinas (Kashiwakura et al., 2012).

En invertebrados, también se ha relacionado a TCTP con la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la inoculación con virus o bacterias en el langostino jumbo *Penaeus monodon*, la langosta roja *Parribacus japonicus* y la paloimmla dorso diamante *Plutella xylostella*, resulta en el incremento de la expresión de TCTP (revisado en Wang et al., 2013).

Asimismo, la inyección de TCTP purificada en *P. monodon* infectado con el virus del síndrome de manchas blancas (WSSV), incrementa la sobrevivencia del langostino y evita la proliferación del virus (Tonganunt et al., 2008). Sin embargo, no se tiene un panorama completamente elucidado del papel inmunológico de TCTP en invertebrados.

1.3 TCTP de parásitos

TCTP ha sido caracterizada en diversos parásitos, desde distintos tipos de helmintos hasta algunos protozoarios, incluyendo diferentes subespecies de *Plasmodium* (Bommer y Thiele, 2004). En general, se presenta una sola copia del gen de TCTP y la proteína codificada se secreta, aunque aún se desconocen los mecanismos de secreción (Hinojosa-Moya et al., 2008). Parte de la relevancia médica de esta molécula radica en que TCTP es secretada por diversos parásitos que colonizan sangre y artrópodos hematófagos al organismo huésped y es capaz de producir infiltración de eosinófilos y/o liberación de histamina de basófilos (revisado en Bommer y Thiele, 2004).

1.3.1 TCTP de *P.knowlesi*

La estructura molecular de TCTP de *P. knowlesi* (Vedadi et al., 2007) presenta los aminoácidos (Glu 12, Leu 74 y Glu 134) que forman la triada de la superficie de unión a proteínas G; sin embargo, presenta una diferencia estructural en comparación con TCTP de *S. pombe* que consiste en una hélice α en los residuos 22 a 30 en lugar de hoja β (Figura 4A). Esta hélice α queda próxima al dominio de unión a la GTPasa y produce una distorsión en esta región (Figura 4B) provocando que las dos láminas que constituyen la hoja D formen una protuberancia (Hinojosa-Moya et al., 2008).

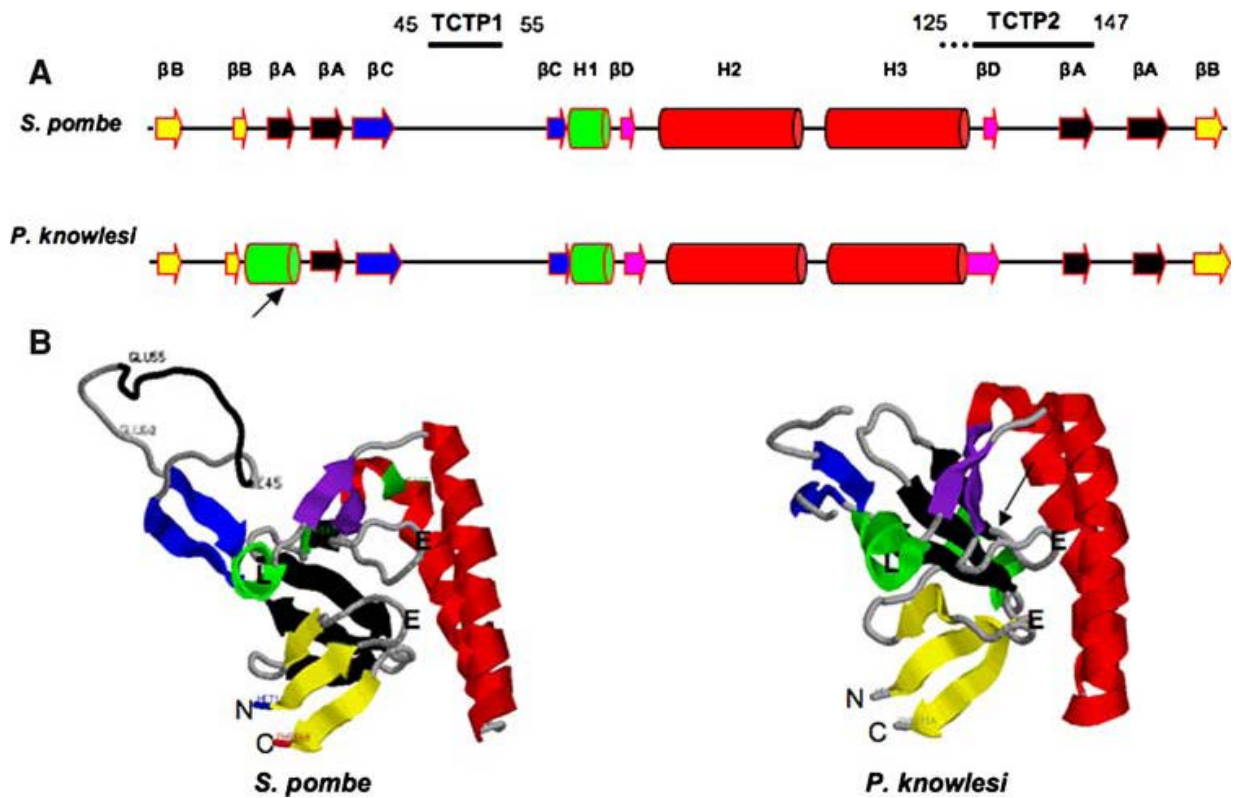


Figura 4. Comparación de estructura secundaria y terciaria de TCTP de *S. pombe* y *P. knowlesi*. Las flechas indican la presencia de la hélice α en los residuos 22 a 30 de TCTP de *P. knowlesi*, en lugar de la lámina β en la región ortóloga de *S. pombe*. **A.** Comparación de estructura secundaria de TCTP de *S. pombe* y *P. knowlesi*. **B.** Comparación de estructura terciaria de TCTP de *S. pombe* y *P. knowlesi*. Debido a la presencia de la hélice α en TCTP de *Plasmodium*, las láminas D1 y D2 de la hoja β forman una protuberancia. Los residuos Glu 12 y 134 en esta misma estructura están perpendicularmente, en lugar de estar en forma paralela como en TCTP de *S. pombe*. Tomado de Hinojosa-Moya et al., 2008.

Los extremos amino y carboxilo terminales de ambas proteínas están en el mismo plano; sin embargo, el asa que forma el dominio de unión a proteínas G presenta ángulos relativos diferentes con respecto a la hélice α en TCTP de *P. knowlesi*, cerca del residuo de Leu 74. Esto podría interferir en la unión de TCTP con la proteína G sustrato (Hinojosa-Moya et al., 2008).

1.2.3 TCTP de *P. falciparum*

La proteína recombinante de TCTP de *P. falciparum* (PfTCTP) causa *in vitro* la liberación de histamina de basófilos y la secreción de IL-8 de eosinófilos (revisado en MacDonald, 2012).

En pacientes infectados con el parásito, se ha demostrado que PfTCTP está presente en el plasma (≈ 7 ug/mL), lo que podría modificar la respuesta inmune (MacDonald et al., 2001). Recientemente, se ha descrito que pacientes con malaria severa muestran una reactividad incrementada en basófilos, posiblemente asociada con una incapacidad de control de la excesiva activación y PfTCTP podría tener un papel importante en la modulación de esta respuesta (Pelleau et al., 2012).

En pacientes con malaria tratados con artemisinina, PfTCTP se une covalentemente a este fármaco y evita su acción tóxica contra el parásito. Se ha encontrado una correlación directa entre el nivel de expresión de TCTP y la resistencia del parásito a la droga (Bhisutthibhan et al., 1998; Walker et al., 2000). La resolución de la estructura tridimensional de PfTCTP permitió identificar tres regiones en TCTP que se modifican tras la unión a la artemisinina. Estas regiones se localizan en las posiciones 19 a 46, 108 a 134 y 140 a 163 de los residuos de la proteína. Estos sitios incluyen 7 lisinas, 7 aspartatos, 11 glutamatos y 1 histidina; la modificación de algunos de estos aminoácidos podría resultar en la disminución de la unión a la artemisinina (Eichhorn et al., 2012)

La comparación de la estructura de PfTCTP con HsTCTP resulta de particular interés para comprender cómo es que PfTCTP podría actuar como homólogo de mediador inmune. TCTP humana y parasítica presentan una identidad del 35 % y las estructuras terciarias, a pesar de ser parecidas, presentan algunas diferencias.

En ambas proteínas, la triada catalítica que corresponde al posible sitio de unión a proteínas Rab en TCTP de la levadura de fisión, se encuentra conservada. Sin embargo, el sitio equivalente a la firma TCTP1 no pudo ser resuelto en la estructura de PfTCTP. La región de TCTP2, que corresponde a los aminoácidos 130-147 en la levadura de fisión, se encuentra localizada y plegada de la misma forma tanto en HsTCTP como en PfTCTP. A pesar de la similitud en la estructura secundaria y el plegamiento de esta firma característica de la proteína, la secuencia primaria difiere sustancialmente: únicamente se presentan 4 aminoácidos idénticos de los 18 que forman dicha región. Asimismo, la estructura de PfTCTP revela que la única cisteína presente en la molécula se encuentra inaccesible (Eichhorn et al., 2012).

Según el análisis estructural (Hinojosa-Moya et al., 2008), TCTP de *P. knowlesi* podría no interactuar con GTPasas y, por consiguiente, no llevar a cabo las funciones descritas para esta proteína. La secuencia de TCTP de *P. falciparum* presenta mayor semejanza con TCTP de *P. knowlesi* (94 %) que con TCTP de *S. pombe* (59 %). La estructura secundaria de TCTP de *P. falciparum* predice una alteración estructural con respecto a la proteína de *S. pombe* en los aminoácidos 22 a 30 (ausencia de lámina β), lo que podría impedir la unión a proteínas G.

TCTP de *P. falciparum* podría actuar como mutante dominante negativa ya que induce la liberación de histamina, pero al no interactuar con proteínas G, sería incapaz de llevar a cabo la activación de células B modificando la respuesta inmune del huésped durante la infección.

2 JUSTIFICACIÓN

TCTP ha sido caracterizada parcialmente con respecto a su actividad bioquímica, patrones de interacción y localización celular; sin embargo, aún no se esclarecen los mecanismos moleculares mediante los cuales realiza su función biológica.

A nivel de estructura terciaria, TCTP presenta semejanzas con la familia de pequeñas chaperonas Mss4/Dss4 que se unen a GTPasas. Sin embargo, el análisis de la estructura de TCTP de *P. knowlesi* indica sutiles diferencias en el potencial dominio que interactúa con proteínas G en comparación de TCTP de *S. pombe*. Estas diferencias apoyan la hipótesis que TCTP de *Plasmodium* podría modificar la respuesta inmune normal del huésped al actuar como mutante dominante negativa (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha encontrado diferencias estructurales en la secuencia de *P. falciparum*, la cual no presenta la lámina β en los residuos 22 a 30 lo que podría interferir en la interacción con proteínas G y/o modificar las funciones propuestas para la TCTP parasítica.

TCTP de *P. falciparum* está implicada en el proceso patológico del huésped y el desarrollo de resistencia del parásito contra uno de los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de la enfermedad, por lo que resulta de gran interés e importancia el estudio de esta proteína.

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó el análisis funcional de TCTP de *P. falciparum* en un sistema *in vitro* para seguir aportando información que permita posteriormente elucidar y comprender los mecanismos mediante los cuales participa esta proteína durante la infección del parásito.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del proyecto fue el análisis funcional de la proteína tumoral controlada traduccionalmente de *P. falciparum* en un sistema *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Análisis estructural *in silico* de TCTP de *P. falciparum* con respecto a TCTP humana.
- Expresión de TCTP de *P. falciparum* y TCTP humana en un sistema procariótico.
- Análisis funcional de TCTP de *P. falciparum* y TCTP humana en un cultivo primario de linfocitos B.

4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental comprendió 3 etapas (Figura 5) correspondientes al análisis estructural *in silico* de TCTP de *P. falciparum* y humana, la expresión y purificación de las proteínas recombinantes (rTCTP), así como al análisis funcional de PfTCTP y HsTCTP en un sistema *in vitro*.

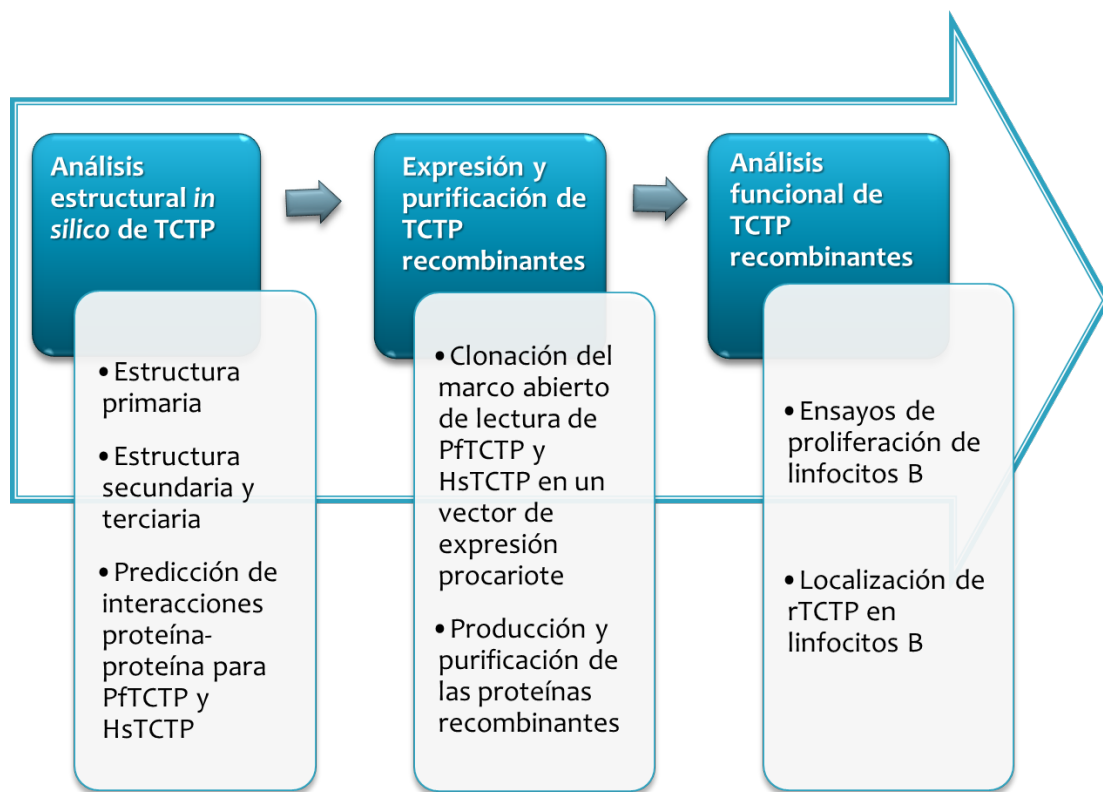


Figura 5. Estrategia experimental del proyecto.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ETAPA: Análisis estructural *in silico* de PftCTP y HstCTP

5.1.1 Análisis de la estructura primaria

El análisis de la estructura primaria de PftCTP (No. Acceso en GenBank XP_001351667) y HstCTP (No. Acceso en GenBank NP_003286) se realizó empleando herramientas bioinformáticas. Para la búsqueda de regiones conservadas y/o dominios característicos de las proteínas se utilizaron los servidores en línea InterPro (Quevillon et al., 2005) y ScanProsite (De Castro et al., 2006). Para el alineamiento de la secuencia primaria de HstCTP y PftCTP se utilizó el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) con los parámetros de alineamiento establecidos por default.

5.1.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria

El análisis estructural de PftCTP (código de identificación en PDB: 3p3k) y HstCTP (código de identificación en PDB: 1yz1) se realizó por medio del servidor en línea Matras (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/matras/>) a través del cual se obtuvo el alineamiento de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Para la visualización de las moléculas se utilizó el programa Jmol 13.0 (<http://jmol.sourceforge.net/>).

Adicionalmente, se realizó la predicción de la estructura secundaria de TCTP de las siguientes especies de *Plasmodium*: *P. knowlesi* (No. Acceso en GenBank P84152), *P. chabaudi* (CAH84320), *P. berghei* (CAH96616), *P. vivax* (EDL44118) y *P. yoelii* (EAA16837), mediante el servidor en línea Psi-pred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/index.html>).

Finalmente, para la comparación de las estructuras secundarias de TCTP de las diferentes especies de *Plasmodium* con respecto a TCTP de *S. pombe* (Q10344), se realizó un alineamiento múltiple con el servidor en línea PROMALS3D (Pei y Grishin, 2007).

5.1.3 Predicción de interacciones proteína-proteína

El análisis de las posibles moléculas que interactúan con PFTCTP y HsTCTP se realizó por medio del servidor en línea STRING 9.1 (Jensen et al., 2009). Adicionalmente, se comparó la información generada por el servidor anterior con los datos de PlasmoDB 11.0 (<http://plasmodb.org/plasmo/>) para PFTCTP.

5.2 ETAPA: Expresión y purificación de TCTP recombinantes

5.2.1 Extracción de RNA total de humano

Se obtuvo el RNA total a partir de sangre periférica humana utilizando el reactivo TRIzol de Invitrogen (Carlsbad, CA) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se partió de 5 mL de sangre colectada en tubos BD Vacutainer SST, se centrifugó a 3,000 rpm a 4 °C por 10 min y se retiró el suero. Se tomó una muestra de 350 µL de la porción de elementos formes en un microtubo de 1.5 mL y se incubó a 4 °C con 1 mL de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM; KHCO₃ 10 mM; EDTA 0.1 mM, pH 8.0; se ajustó a pH 7.3 con HCl 1N). Posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm a 4 °C durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de TRIzol y se incubó a 25 °C durante 5 min. Se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó a 25 °C por 5 min. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C durante 15 min y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el RNA de la fase acuosa con 500 µL de alcohol isopropílico y una incubación a -20 °C por 16 h.

Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 750 µL de etanol al 70 % centrifugando a 10,000 rpm a 4 °C durante 5 min. El RNA se secó a 25 °C y se resuspendió en 40 µL de agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). El RNA se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La integridad de las muestras de RNA se determinó mediante separación electroforética en gel de agarosa en condiciones desnaturizantes (Sambrook y Russell, 2001). Se mezcló la suspensión de RNA (≥ 400 ng) en proporción 1:3 con solución amortiguadora desnaturizante (MOPS 0.1M : formaldehído : formamida en proporción 2:3.5:10). Las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 min y se enfriaron rápidamente en hielo. Se agregó 1 µL de solución de carga (10x: glicerol 50 %; EDTA 2.5 mM, pH 8.0; azul de bromofenol 0.4 %; xilencianol 0.4 %) y 1 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL). Posteriormente, las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con formaldehído 2.2 M, empleando solución amortiguadora (MOPS 0.02 M, pH 7.0; acetato de sodio 8 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0). El material se visualizó con luz ultravioleta (254 nm), se capturó y analizó la imagen con el sistema de documentación electroforética EDAS (cámara Kodak Digital Science DC40 y el programa Image Analysis Software v3.0, EUA). La concentración y pureza de las muestras de RNA total se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington), siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.2.2 Síntesis de cDNA

A partir del RNA total de sangre periférica humana se sintetizó el cDNA empleando la enzima reverso transcriptasa SuperScript III (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del proveedor.

Se utilizaron 800 ng de RNA total, se adicionaron 150 ng de oligonucleótidos adaptadores SMART y oligo(dT), una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración final de 0.5 mM cada uno y agua bidestilada estéril hasta completar 6.5 μ L de volumen de reacción. La mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C; al cabo de este tiempo, se transfirió inmediatamente a hielo y se mantuvo por 5 min.

Posteriormente, se agregaron 2 μ L de solución amortiguadora para la síntesis de primera cadena de cDNA (5X: Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 0.5 μ L de DTT 0.1 M, 0.5 μ L del inhibidor de RNAsas RNaseOUT™ de Invitrogen (40 U/ μ L) y 0.5 μ L de la enzima SuperScript III (200 U/ μ L). La mezcla se homogenizó y se incubó a 50 °C durante 60 min. Para inactivar la reacción, ésta se incubó durante 15 min a 70 °C.

5.2.3 Material genético de *P. falciparum*

La muestra de DNA complementario (cDNA) de *P. falciparum* fue donada por la Dra. Rosaura Hernández Rivas del Departamento de Biomedicina Molecular (CINVESTAV), la cual fue obtenida a partir del RNA de parásitos en estadio de esquizontes de 40-48h cultivados *in vitro*.

5.2.4 Amplificación del gen de PftCTP y HstCTP

Para la amplificación del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) del gen de PftCTP y HstCTP se utilizó la DNA polimerasa TaKaRa ExHS (Takara Bio Inc), siguiendo las especificaciones del proveedor. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos genes (Cuadro1).

Gen / No. Acceso*	Secuencia (5' - 3')		Tamaño** (pb)
PftTCTP XM_001351631	Directo	ATGAAAGTATTTAAAGACGTTTTTACA	515
	Reverso	TTAATATTTTTCTTCAAAAAGTCCATC	
HsTCTP NM_003295	Directo	ATGATTATCTACCGGGACCTCATCAGC	520
	Reverso	TTAACATTTTTCCATTTCTAAACCATC	

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de TCTP de *P. falciparum* y TCTP humana.

***No. Acceso:** número de acceso del GenBank.

****Tamaño (pb):** tamaño esperado del fragmento por amplificar en pares de bases.

Para la reacción de PCR se utilizaron 0.5 µL del producto de la reacción de reverso transcripción, 2.5 µL de solución amortiguadora 10x ExTaq de Takara (concentración de Mg⁺² 20mM), 2 µL de mezcla de dNTPs 2.5 mM, 1 µL de oligonucleótidos específicos (10 µM) directo y reverso, 0.2 µL de TaKaRa ExTaq DNA polimerasa (5 U/µL) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen de 25 µL. Las reacciones se incubaron en un termociclador Biometra (Goettingen, Alemania) y se estandarizaron las condiciones de reacción de PCR para la amplificación de TCTP de ambos organismos.

Para PftTCTP se probaron las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C durante 10 seg, 50 °C por 10 seg y un gradiente en la temperatura de extensión de 60-70 °C por un min; finalmente, un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Para HsTCTP se llevó a cabo un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, un gradiente en la temperatura de alineamiento de 55-65 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 1 min; finalmente, un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min.

Los productos de las reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1.0 % y solución amortiguadora TBE (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0). Posterior a la separación electroforética, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) y visualizados con luz ultravioleta. Se capturó y analizó cada imagen con el sistema de documentación electroforética EDAS (Sambrook y Russell, 2001).

5.2.5 Clonación de PftTCTP y HstTCTP

5.2.5.1 Purificación de productos de PCR

El producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos específicos se purificó utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN (Santa Clarita, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Básicamente, después de la amplificación por PCR, se realizó el perfil electroforético del producto amplificado y se escindió el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda deseada.

Posteriormente se adicionaron 3 volúmenes de solución de solubilización (QG, contiene tiocianato de guanidina), se incubó a 50 °C por 10 min, agitando vigorosamente cada 2 a 3 min de incubación, hasta que la agarosa se licuó en la solución. Se adicionó 1 volumen de isopropanol por volumen de gel, la mezcla homogenizada se depositó en una columna plástica con membrana de sílica gel. La columna se colocó en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 13,000 rpm durante 60 s. Se eliminó el eluato y se colocó la columna en el tubo colector de 2 mL. Se añadieron 700 µL de solución de lavado (PE, contiene etanol) y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. Se eliminó el eluato y se centrifugó nuevamente durante 1 min para eliminar los restos de alcohol.

Para eluir el DNA, se añadieron 40 μL de agua bidestilada estéril en el centro de la columna y, después de esperar 1 min, se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. El eluato, que contiene el DNA, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.2.5.2 Obtención de plásmidos recombinantes

El producto de PCR purificado se ligó a un vector de clonación comercial pDrive de QIAGEN (Valencia, CA) atendiendo las indicaciones del proveedor. Básicamente, se utilizaron de 3 μL del producto de PCR purificado, se agregó 1 μL de vector (50 ng/ μL), 1 μL de agua bidestilada estéril y 5 μL de mezcla de reacción de ligación 2x (contiene cofactores y reactivos necesarios para la reacción).

Se agitó suavemente y se incubó a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h. Posteriormente, se utilizó el producto de la reacción para transformar células competentes de *Escherichia coli*.

5.2.5.3 Preparación de células competentes

Colonias aisladas de *E. coli* TOP 10F' de Invitrogen (Carlsbad, CA), fueron cultivadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB; triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 200 mM, pH 7.0) en agitación constante a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h. Se tomaron 5 mL del cultivo anterior para inocular 30 mL de medio LB y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que alcanzó una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.3. Posteriormente, se emplearon 5 mL de este segundo cultivo para inocular 200 mL de medio LB y se incubó en las mismas condiciones hasta que alcanzó una OD de 0.3 a 600 nm. Se transfirió el cultivo a tubos estériles de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La pastilla se resuspendió en 16 mL de solución 1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15 % w/v, pH 5.8) y se incubó en hielo durante 45 min. Al cabo de este tiempo, las células fueron nuevamente compactadas centrifugando a 4,000 rpm a 4 °C durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 5 mL de solución 2 (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15 % w/v, pH 6.8) y se incubó en hielo por 10 min. Finalmente, se hicieron alícuotas de 50 µL de las células en suspensión en viales estériles y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

5.2.5.4 Transformación de células competentes

Los viales con células competentes se descongelaron en hielo y se les agregó la suspensión del plásmido recombinante (≈20 ng de DNA), se agitó suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 min; posteriormente, las células fueron sometidas a un choque térmico incubándolas a 42 °C durante 30 seg y se pasaron a hielo inmediatamente después, donde se les mantuvo durante 3 min.

Transcurrido el tiempo, se adicionaron 400 µL de medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación (140 rpm). Posteriormente, las células se compactaron centrifugando los viales a 4,000 rpm por 5 min, se desecharon dos tercios del sobrenadante y el botón celular se resuspendió en el medio remanente.

La suspensión se distribuyó uniformemente en medio LB sólido suplementado con ampicilina 100 µg/mL, IPTG 50 µM y X-gal 80 µg/mL. Las cajas fueron incubadas a 37 °C por 18 h. Posteriormente, se seleccionaron las colonias candidatas a contener plásmidos recombinantes (Sambrook y Russell, 2001).

5.2.5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

Las colonias positivas fueron cultivadas en 3 mL de medio "Terrific" (TB; triptona 1.2 %, extracto de levadura 2.4 %, glicerol 4 mL/L, KH_2PO_4 17 mM, K_2HPO_4 72 mM) con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina durante 12 h a 37 °C en agitación constante (150 rpm). El cultivo se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 5,000 rpm a 4 °C durante 4 min. Se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla se resuspendió en 100 μL de solución I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0). A esa suspensión se añadieron 200 μL de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y la mezcla se incubó en hielo durante 5 min para permitir la lisis celular. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 150 μL de solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 11 %), se mezcló por inversión y se incubó la mezcla en hielo por 5 min. Después, se centrifugó la suspensión a 13,000 rpm a 4 °C durante 5 min y se transfirió el sobrenadante, sin restos celulares, a un microtubo limpio. Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada dos veces con 250 μL de etanol 70 %. El material genético se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μL de agua bidestilada estéril. Se agregó 1 μL de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 1h. El material se almacenó a -20 °C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

Se procedió a determinar la presencia del inserto mediante la caracterización con la endonucleasa EcoRI (New England Biolabs) siguiendo las especificaciones del proveedor y también mediante reacciones de PCR con las condiciones estandarizadas anteriormente.

Los plásmidos seleccionados fueron sometidos a reacciones de secuenciación en un secuenciador de capilar Genetic Analyzer ABI Prism (modelo 3100) y las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa Gene Doc v2.7.

Las secuencias se compararon por medio de los programas BLASTN y BLASTP con las bases de datos del banco de genes disponibles en Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

5.2.6 Subclonación de PftCTP y HstCTP en el vector de expresión

Las construcciones de PftCTP y HstCTP en pDrive se utilizaron para subclonar estos genes en el vector de expresión para sistemas procarióticos pProEX HTb (GIBCO, BRL). Se utilizó la DNA polimerasa TaKaRa ExHS (Takara Bio Inc), siguiendo las especificaciones del proveedor.

Se emplearon los siguientes oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos: directos, PftCTP Dir 5'-CGGGATCC**ATG**AAAGTATTTAAAGAC-3' y HstCTP Dir 5'-CGGGATCC**ATG**ATTATCTACCGGGAC-3' (el sitio de restricción BamHI está subrayado y el codón de inicio se indica con negritas); oligonucleótidos reversos, PftCTP Rev 5'-GGAATTC**TA**AATATTTTCTTCAA-3' y HstCTP Rev 5'-GGAATTC**TA**ACATTTTCCATTTC-3' (el sitio de restricción EcoRI está subrayado y el codón de inicio se indica con negritas). Se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 20 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min; finalmente, un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas BamHI y EcoRI (New England Biolabs) y clonados en el vector pProEX HTb empleando la DNA ligasa T4 de NEB (400 U/μL). Para ello, se empleó la solución amortiguadora de ligación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 μg/mL, pH 7.5), una proporción 1:4 de vector con relación al inserto y 200 U de ligasa T4 en un volumen final de 10 μL. La reacción se incubó a 12 °C durante 16 h.

El producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α como se describió anteriormente.

Las clonas con la construcción fueron cultivadas en 3 mL de medio TB con 100 µg/mL de ampicilina durante 12 h a 37 °C en agitación constante (160 rpm). El cultivo se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se realizó la extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.

Se procedió a determinar la presencia del inserto en el DNA plasmídico de las clonas candidatas mediante la caracterización con las enzimas de restricción EcoRI y NotI (New England Biolabs) y mediante amplificación por PCR.

Los plásmidos seleccionados fueron sometidos a reacciones de secuenciación y los electroferogramas fueron editados. Las secuencias se compararon por medio de un alineamiento múltiple con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>) con las secuencias de la base de datos del banco de genes disponibles en el NCBI. Se verificó que las secuencias se encontraran en fase para proceder con la expresión de las proteínas.

5.2.7 Inducción de proteínas recombinantes de TCTP

A partir de un cultivo en placa por estría de las cepas con las construcciones en el vector pProEH HTb, se utilizó una colonia para inocular 2 mL de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Se incubó a 37 °C por 18 h en agitación (140 rpm). Se emplearon 100 µL de este cultivo para inocular 10 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37 °C en agitación constante hasta que la OD a 600 nm alcanzó un valor de 0.7.

Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100 µL de PBS 1x (10x: NaCl 1.3 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.0). Esto constituyó la muestra no inducida.

Al cultivo restante, se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó con la incubación del mismo durante 18 h a 37 °C y 140 rpm. Las células se centrifugaron y resuspendieron como se describió anteriormente. Un volumen correspondiente a 0.2 del valor de OD del cultivo se colocó en un microtubo y se mezcló con un volumen igual de solución de muestra SDS 2x (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; SDS 4 % w/v; glicerol 20 % v/v; azul de bromofenol 0.01 % w/v). Las muestras se incubaron a 95°C por 5 min y se analizaron en gel de poliacrilamida al 15 % (SDS-PAGE).

Como control positivo de inducción se empleó una clona de TCTP de *Cucurbita maxima* (CmTCTP) en pProEX HTb donada por el Dr. Jesús Hinojosa Moya del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV. Las proteínas recombinantes fueron identificadas por Western Blot.

5.2.7.1 Obtención de fracción soluble, insoluble y aislamiento de cuerpos de inclusión

Para la obtención de las diferentes fracciones en los cultivos inducidos, una vez que se tiene el botón celular, se empleó solución de lisis (Tris-HCl 50mM, pH 8.5 a 4 °C; β -mercaptoetanol 5 mM; PMSF 1mM; lisozima 0.2 mg/mL; NaCl 400 mM) en una relación 1:20 con respecto al volumen inicial del cultivo y se incubó 40 min a 4 °C. Posteriormente, la muestra se sometió a sonicación (3 pulsos de 20 seg a 40 grados de amplitud). La muestra se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 45 min para la separación de la fracción soluble (que corresponde al sobrenadante) y la fracción insoluble (que corresponde al botón) y de esta última, se realizó el aislamiento de los cuerpos de inclusión.

Para el aislamiento de los cuerpos de inclusión se resuspendió el botón resultante en 200 μ L de la solución de lavado 1 (Tritón X100 0.5 %, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100mM).

Se homogenizó la solución con los restos celulares y se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min. Se repitieron los lavados 3 veces.

Posteriormente, se utilizó la solución de lavado 2 (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 100 mM) para eliminar el resto de tritón presente en los restos celulares. El lavado se realizó dos veces más centrifugando a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min. Ulteriormente, se conservaron los restos celulares con la solución de resolubilización de cuerpos de inclusión (NaHCO₃ 10 mM, Urea 2 M) a 4 °C y bajo condiciones de agitación. Después de 24 h se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 10 min, se tomó el sobrenadante y se resuspendió en 30 uL de una solución de fosfato de sodio 20 mM (pH 8.0), NaCl 0.5 M y Urea 1 mM.

Las fracción soluble, insoluble y los cuerpos de inclusión fueron desnaturalizados a 95 °C durante 5 min en la solución de muestra SDS 2x, analizados mediante SDS-PAGE al 15 % y visualizados por Western Blot.

5.2.7.2 Estandarización de las condiciones de inducción

Para las cepas con las construcciones en el vector pProEH HTb, se probaron distintas condiciones de operación para la obtención de una mayor cantidad de proteína soluble. Así, se probaron 3 diferentes medios de cultivo que corresponden a LB, "terrific broth" o TB (extracto de levadura 24 g/L, triptona 12 g/L, glicerol 4 mL/L, KH₂PO₄ 0.17 M, K₂HPO₄ 0.72 M.) y 2TY (peptona de caseína 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0). Las cepas de *E. coli* probadas fueron DH5 α , BL21, Rosseta y Rosseta2. Se probó el efecto de diferentes concentraciones de inductor que correspondieron a 1 mM, 0.5 mM y 0.06 mM de IPTG. El tiempo de inducción se probó a 1h, 2h, 3h, 4h y 18h y una temperatura de inducción de 37 °C y 28 °C. Finalmente, se probaron 2 diferentes velocidades de agitación que correspondieron a 140 rpm y 180 rpm.

5.2.7.3 Identificación de proteínas recombinantes por Western Blot

Las proteínas recombinantes fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15 % con marcador de peso molecular preteñido (Prestained Standard Broad Range, Bio-Rad); una vez normalizadas, se transferirán a membranas PVDF (difluoruro de polivinilideno). Terminada la transferencia, las membranas fueron tratadas con solución de bloqueo (PBS 1x; leche descremada 5 %, tween 20 0.1 %) y solución de lavado (PBS 1x, tween 20 0.1 %). Se empleó como primer anticuerpo un policlonal de conejo anti-IgG His-probe (H15) diluido 1:7500 para las construcciones en el vector pProEX HTb. Después de realizar los lavados correspondientes, el segundo anticuerpo fue anti-IgG de conejo (obtenido en cabra) conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:4000. El sustrato que se utilizó para el desarrollo de color es NBT/BCIP (azul de nitro tetrazoilo/5-bromo, 4-cloro, 3- indolil fosfato), atendiendo a las indicaciones del fabricante.

5.1.8 Purificación de proteínas recombinantes de TCTP

Una vez demostrada la inducción de las proteínas recombinantes en el vector pProEX HTb, se utilizaron las mejores condiciones encontradas para la producción de las proteínas recombinantes. El proceso se escaló a un volumen final de 3L de cultivo inducido.

Se probaron distintas condiciones para la lisis de los cultivos que correspondieron a 2 concentraciones diferentes de lisozima 1mg/mL y 0.2 mg/mL; dos diferentes tiempos de incubación de 20 min y 40 min, respectivamente; dos condiciones diferentes para la lisis celular que correspondieron a el uso de sonicación (como se describió anteriormente) o choque térmico, que consistió en incubación de la muestra a -20 °C por 10 min y posterior incubación a 25 °C por 10 min (repetido dos veces).

Finalmente, se probaron dos sistemas de soluciones reguladoras basadas en Tris-HCl o fosfatos según la compatibilidad con la columna. El sistema de purificación empleado fue columna de afinidad HisTrap FF (Amersham) utilizando condiciones no desnaturizantes siguiendo las indicaciones del proveedor.

Básicamente, las columnas fueron equilibradas inicialmente con solución de equilibrio (fosfato de sodio 20 mM, pH 8.0; NaCl 0.5 M; imidazol 10 mM; PMSF 1 mM) y los extractos proteicos fueron cargados dos veces en las columnas. Las proteínas unidas a la columna fueron tratadas con 5 volúmenes de solución de lavado (fosfato de sodio 20 mM, pH 8.0; NaCl 0.5 M; imidazol 20 mM; PMSF 1 mM) y se realizó un gradiente de concentración lineal de imidazol de 20 a 500 mM para la elución de las proteínas. Las fracciones eluidas fueron desnaturizadas a 95 °C durante 5 min en la solución de muestra SDS 2x, analizadas mediante SDS-PAGE al 15 % y visualizadas por Western Blot. Las fracciones con las proteínas recombinantes fueron almacenadas a corto plazo a 4 °C. La endotoxina fue removida empleando columnas de PMB-agarosa (Sigma-Aldrich) siguiendo el método indicado por el fabricante.

5.2.9 Marcaje de las proteínas recombinantes

Se realizó el marcaje de las proteínas recombinantes para su uso en los ensayos de proliferación celular con el fluorocromo Oregon Green 488 de Molecular Probes (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Básicamente, se realiza una dilución de la proteína para obtener un volumen de 0.5 mL a concentración final de 1 mg/mL en bicarbonato de sodio 0.1 M y se adiciona al vial con el fluorocromo reactivo y se incuba la reacción a 22 °C por 1 h.

Posteriormente, se realiza una purificación en columna para retirar el exceso del colorante y se eluye la proteína en la solución de fosfatos 20 mM. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Adicionalmente, para los ensayos de localización en linfocitos B, PFTCTP fue marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 594 de Molecular Probes (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor como se describió anteriormente.

5.3 ETAPA: Análisis funcional *in vitro* de TCTP recombinante

5.3.1 Aislamiento de linfocitos B de bazo de ratón

5.3.1.1 Material biológico

Todos los procedimientos realizados con animales fueron realizados bajo los lineamientos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales del Laboratorio (UPEAL). El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV, que corresponde al protocolo número 063-12 (<http://cicual.cinvestav.mx>). Se emplearon hembras de la cepa de ratón BALB/c de 7 a 8 semanas.

5.3.1.2 Obtención de esplenocitos totales

Se emplearon hembras de ratón BALB/c de 7 a 8 semanas y se sacrificaron para la extracción del bazo. Posteriormente, se disgregó dicho órgano con solución salina al 0.9 % utilizando un colador celular. Las células obtenidas se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min a 4 °C.

Para la obtención de esplenocitos totales se realizó la lisis celular con 2 mL de una solución de ruptura de membrana de eritrocitos (SIGMA) que contiene cloruro de amonio 8.3 g/L en buffer Tris-HCl 0.01 M. Se incubó por 2 min y se realizó el lavado de los esplenocitos totales por dilución con 40 mL de solución salina al 0.9 % y centrifugación de la muestra a 1,500 rpm a 4 °C por 3 min. Se resuspendieron las células en medio RPMI 1640 y se realizó el conteo de células con el Contador Celular Automático Countess (Invitrogen).

5.3.1.3 Aislamiento de linfocitos B

Se realizó la selección negativa de linfocitos B empleando el sistema MACS del Kit de Aislamiento de Células B (Milteny Biotec) de columnas magnéticas y una mezcla de anticuerpos monoclonales. Básicamente, se prepara la suspensión celular eliminando el medio por centrifugación a 1,200 rpm a 4 °C por 10 min. Se resuspendió el botón celular en 40 µL de solución amortiguadora (PBS 1x, pH 7.2; albúmina de suero bovino 0.5%; EDTA 2mM) por cada 10^7 células totales.

Se añadieron 10 µL del cocktail de anticuerpos unidos a biotina (vs CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4) y Ter-119) por cada 10^7 células y se incubó por 15 min a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 20 µL de micro perlas anti-biotina por cada 10^7 células, se mezcló e incubó por 15 min a 4 °C. Se adicionaron 1.5 mL de solución amortiguadora y se centrifugó a 1,200 rpm por 10 min a 4 °C. Se resuspendió el botón celular en 0.5 mL de buffer y se procedió a la separación magnética. Las fracciones que eluyen de la columna corresponden a los linfocitos B. Posteriormente, se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min a 4 °C para eliminar la solución amortiguadora y se resuspendieron en medio RPMI 1640.

5.3.1.4 Estimulación de linfocitos B con un mitógeno

A partir del cultivo primario de linfocitos B aislados por selección negativa, se colocaron 2.6×10^6 células B/mL en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen). Se incubaron con diferentes concentraciones de LPS que correspondieron a 0 (control negativo), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 240 h. Se midió la densidad celular viable (cél/mL) con el Contador Celular Automático Countess (Invitrogen).

5.3.2 Ensayos de proliferación celular

A partir del cultivo primario de linfocitos B aislados por selección negativa, se colocaron 2×10^6 células B/mL en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 % en micro placas de 6 pozos. Se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína recombinante HsTCTP o PftTCTP marcadas con el fluorocromo Oregon Green 488 (verde) y se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 120 h. EL LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue usado como control negativo, mientras que células B sin tratamiento y las incubadas con solución de fosfatos 20 mM fueron usados como controles negativos. Se realizaron dos experimentos independientes por duplicado. Después de cada tiempo de incubación se midió la densidad celular viable (cél/mL) con el Contador Celular Automático Countess (Invitrogen).

La incorporación de proteína marcada de HsTCTP o PftTCTP en los linfocitos B fue analizada por citometría de flujo (FACS). Un total de 20,000 eventos/pozo fueron adquiridos en un equipo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) empleando el programa Cell Quest Pro.

La distribución del ciclo celular de los linfocitos B positivos a la fluorescencia fue dividida en 4 áreas diferentes que corresponden a las células en apoptosis y en las fases G1, S y G2M del ciclo con base en el contenido de DNA. Las células en cada área fueron contadas y se expresó el porcentaje correspondiente del total de linfocitos B marcados.

5.3.3 Localización de TCTP recombinante en linfocitos B

A partir del cultivo primario de linfocitos B aislados por selección negativa, se colocaron 2×10^5 células B/mL en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% en micro placas de 96 pozos. Se incubaron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 24 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1x e incubadas por 30 min a 4 °C con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.5) como control negativo, o 50 ng/mL de proteína recombinante HsTCTP marcada con el fluorocromo Oregon Green 488 (verde) y/o 50 ng/mL de PftTCTP marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (rojo). Tras dicho tiempo de incubación, las células fueron fijadas empleando una solución de paraformaldehído 4% en PBS por 20 min a 4 °C. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal multifotónico modelo SP5 (Leica) con un aumento de 60x. Las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa de LAS AF (Leica). Para cada tratamiento se analizaron al menos 100 células.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium* que se transmite por la picadura de hembras infectadas de mosquitos *Anopheles*. En la actualidad constituye un problema de salud pública mundial que afecta el bienestar y desarrollo económico de las comunidades con mayor índice de marginalidad (Tusting et al., 2013).

P. falciparum es el parásito productor del 80% de las infecciones y 90% de las muertes por la enfermedad (Tuteja, 2007). Se sabe que una de las proteínas de este parásito, TCTP, es secretada al torrente sanguíneo del huésped ante una infección, lo que puede afectar la respuesta inmune (MacDonald et al., 2001). Además, TCTP de *P. falciparum* está implicada en el proceso patológico del huésped y el desarrollo de resistencia del protozoario contra la artemisinina, fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la malaria (Bommer y Theile, 2004). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por medio de los cuales participa esta proteína en la mediación de la respuesta inmune del huésped.

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó el análisis funcional de la proteína TCTP recombinante de *P. falciparum*. Se comenzó con el análisis estructural de PfTCTP y HsTCTP, ya que este organismo es el huésped de interés para el proyecto y esta última se encuentra mejor estudiada y caracterizada en comparación con PfTCTP.

6.1 ETAPA: Análisis estructural *in silico* de PfTCTP y HsTCTP

6.1.1 Análisis de la estructura primaria

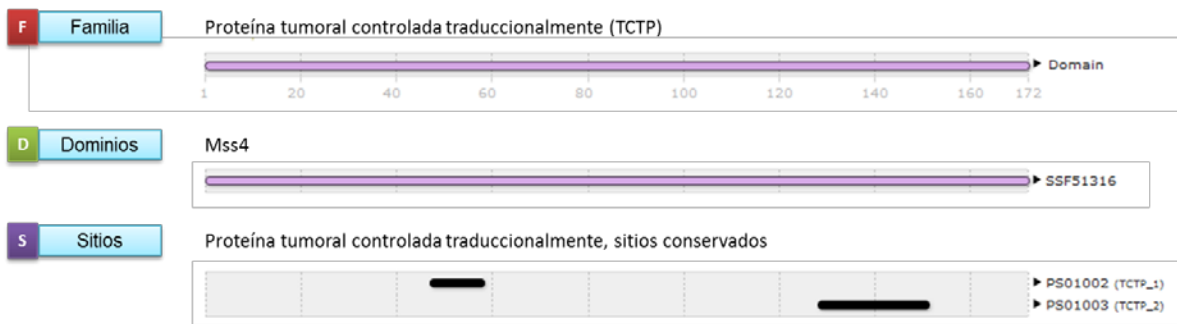
La secuencia primaria de PfTCTP y HsTCTP (Figura 6) revela que ambas corresponden a la familia de TCTP y presentan dominio parecido a la proteína Mss4, como ya ha sido reportado (Thaw et al., 2001). Sin embargo, HsTCTP presenta las 2 firmas características que corresponden a TCTP 1 (posición 48 a 58) y TCTP 2 (posición 129 a 151), en comparación con PfTCTP en la que únicamente se puede reconocer *in silico* la firma TCTP 2 en la posición 128 a 150.

Es importante destacar que con los programas utilizados no se predicen sitios que tiendan a formar puentes de hidrógeno, posibles sitios de glicosilación o sitios activos en las proteínas; lo anterior corresponde con la ausencia de evidencias experimentales que describan dichas regiones en HsTCTP y PfTCTP buscadas en la bibliografía disponible.

Asimismo, se realizó la comparación de la secuencia primaria de HsTCTP y PfTCTP por medio del programa ClustalW2 (Cuadro 2). De acuerdo con el alineamiento obtenido, las secuencias analizadas contienen 59 aminoácidos idénticos que representan el 34.3%, 45 residuos (26.2%) con sustitución conservativa, 16 sustituciones semi-conservativas (9.3%) y 52 posiciones con aminoácidos diferentes que corresponden al 30.2%.

Si bien TCTP es una proteína conservada, con los resultados anteriores se observa que PfTCTP presenta diferencias importantes a nivel de estructura primaria, como es la ausencia de la firma TCTP1 característica de dicha familia. El dominio TCTP1 se encuentra adyacente a la superficie de unión propuesta para interaccionar con GTPasas (Thaw et al., 2001), lo que podría afectar la función de la proteína.

A) HsTCTP



B) PFTCTP

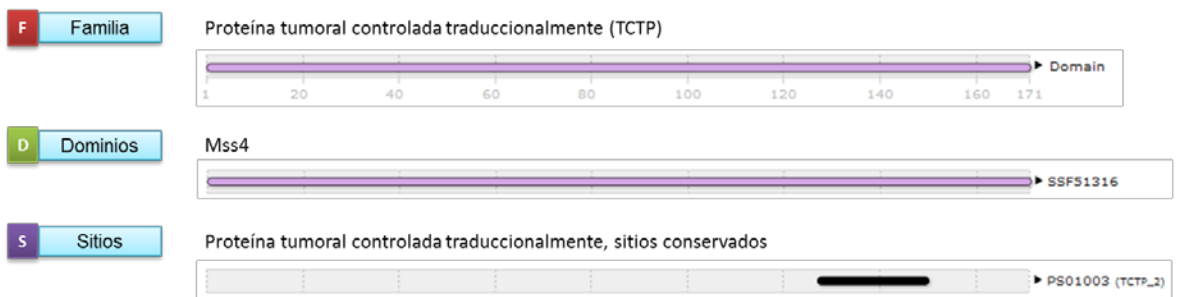


Figura 6. Análisis de la estructura primaria de HsTCTP y PFTCTP. Se utilizó el programa en línea InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) para el análisis *in silico* de la secuencia primaria de HsTCTP, No. Acceso NP_003286; y PFTCTP, No. Acceso XP_001351667. Se esquematiza la secuencia o el fragmento de la misma que corresponde a la familia, los dominios y los sitios conservados para cada proteína. Mss4, supresor de Sec4 en mamíferos.

6.1.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria

De acuerdo con el alineamiento de la estructura secundaria de PFTCTP y HsTCTP (Cuadro 3), se compararon 144 aminoácidos y 12 elementos de estructura secundaria para HsTCTP; mientras que para PFTCTP se alinearon 159 aminoácidos y 13 elementos de estructura secundaria.

HsTCTP	MIYRDLISHDEMFSDIYKIR---EIADGLCLEVEGKMVSRTEGNIDDSLIGGNASAEGP	57
PfTCTP	MKVFKDVFNTNDEVCSDSYVQQDPFEVPEFREIAFEVKSNKRIKGNEDYGIADN--SEDAV	58
	* : : * : : : * : * * * : * : : : * * * . * * . * : * * * . : . . * : .	
HsTCTP	EGEGTESTVITGVDIVMNHHLQETSFTKEAYKKYIKDYMKSIKGLLEEQRPERVKPFMTG	117
PfTCTP	EGMG--ADVEHVIDIVDSFQLTSTAFSKKEYSAYIKNYMQKVAKYLEEKKPDRVEIFKTK	116
	** * : * : * * . . : * . * : * * : * . * * * : * * : . : * * * : * * * : * *	
HsTCTP	AAEQIKHILANFKNYQFFIGENMNPDGMVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEKC	172
PfTCTP	AQPFIKHILTNFDDFEFYMGESLDMEAGIIYSYKGEETPRFVYISDGLFEEKY	171
	* * * * * : * * . : : * : * * . : : : * : : : * * : : : . * * * * *	

Cuadro 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de HsTCTP y PfTCTP. El alineamiento se realizó con el programa en línea ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) utilizando la matriz Gonnet, la penalización por la apertura, separación y extensión de los gaps se mantuvo con los valores asignados por default. Se marca (sombreado) los residuos conservados de la triada que corresponde a la superficie de Mss4 que se une a la proteína Rab (Sec4), según Thaw et al., 2001. (*): aminoácidos idénticos, (:): sustitución conservativa de aminoácidos, (.): sustitución semi-conservativa, (): aminoácidos diferentes.

Las secuencias presentan un porcentaje de identidad de estructura secundaria del 89.6% y un valor de CRMS (desviación cuadrática media de distancias de los carbonos alfa de los residuos alineados) de la superposición óptima de 1.48 Å. Como se observa, a nivel de estructura secundaria PfTCTP presenta diferencias respecto a HsTCTP.

En general, PfTCTP cuenta con mayor cantidad de elementos que forman láminas β ; sin embargo, en la región de los aminoácidos 20-30 en lugar de presentar una lámina β , como es el caso de HsTCTP, en PfTCTP se presenta la formación de una hélice tipo 3_{10} (Cuadro 2). Esto corresponde con las observaciones realizadas por Hinojosa-Moya et al., 2008 en donde se compara TCTP de *Plasmodium knowlesi* con TCTP de *S. pombe* describiendo la distorsión que causa la presencia de la hélice α en la región 22-30 a nivel de estructura terciaria en la molécula.

Esto podría sugerir una estrategia evolutiva con que cuenta el parásito para modificar la respuesta inmune del huésped.

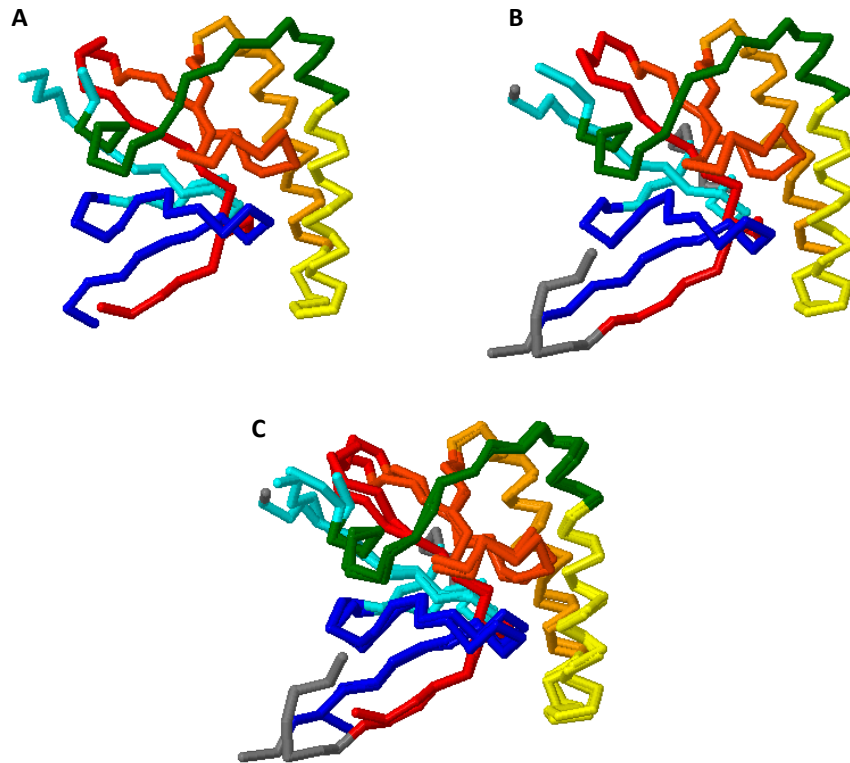


Figura 7. Alineamiento de la estructura terciaria de HsTCTP (PDB 1yz1) y PfTCTP (PDB 3p3k). El alineamiento se realizó con el programa en línea Matras (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/matras/>) y las imágenes se obtuvieron con el visor Jmol 13.0 (<http://jmol.sourceforge.net/>). A: Esquema de HsTCTP; B: Esquema de PfTCTP; C: superposición de ambas proteínas.

De acuerdo con estudios previos en el grupo de trabajo, la variación estructural entre PfTCTP y HsTCTP del resto de los organismos causa un cambio conformacional en la molécula que podría estar ligado al sitio de unión o interacción con proteínas G (Hinojosa-Moya et al., 2008).

Si bien existe polémica de dicha interacción y posible actividad de TCTP como GEF, hay evidencia suficiente que sugiere que esta región es importante para la función de TCTP aunque no sea por la actividad de intercambio de GTP de proteínas G.

6.1.3 Predicción de interacciones proteína-proteína

La predicción *in silico* de las moléculas que pueden interactuar difieren entre HsTCTP (Figura 8) y PftTCTP (Figura 9) a pesar de tratarse de la misma proteína, aunque proceden de organismos diferentes.

Para HsTCTP se identifica que interactúa con la cinasa tipo polo 1 (PLK1), la cual es una serín/treonín cinasa que realiza diversas funciones durante la fase M del ciclo celular incluyendo la regulación de la maduración del centrosoma, eliminación de cohesinas de los extremos de los cromosomas, inactivación de los inhibidores APC/C y regulación de la salida de la mitosis (Yarm, 2002). Dicha interacción fue descrita por Yarm en 2002 empleando el sistema de doble híbrido. Otra proteína identificada que interactúa con HsTCTP es STEAP3, la cual es una ferredoxina endosomal que se encuentra implicada en la secreción exosómica de TCTP (Amzallag et al., 2004). Otras proteínas blanco descritas ampliamente en diferentes trabajos es la proteína tumoral p53 (revisado en Chen et al., 2013) y la proteína de leucemia de células mieloides o MCL1 (Zhang et al., 2002; Liu et al., 2005), para las cuales ya hay evidencia experimental de su interacción con HsTCTP.

Es importante destacar que se identifica *in silico* una posible interacción de HsTCTP con la proteína G denominada Rheb, aunque con un valor de score de 0.551.

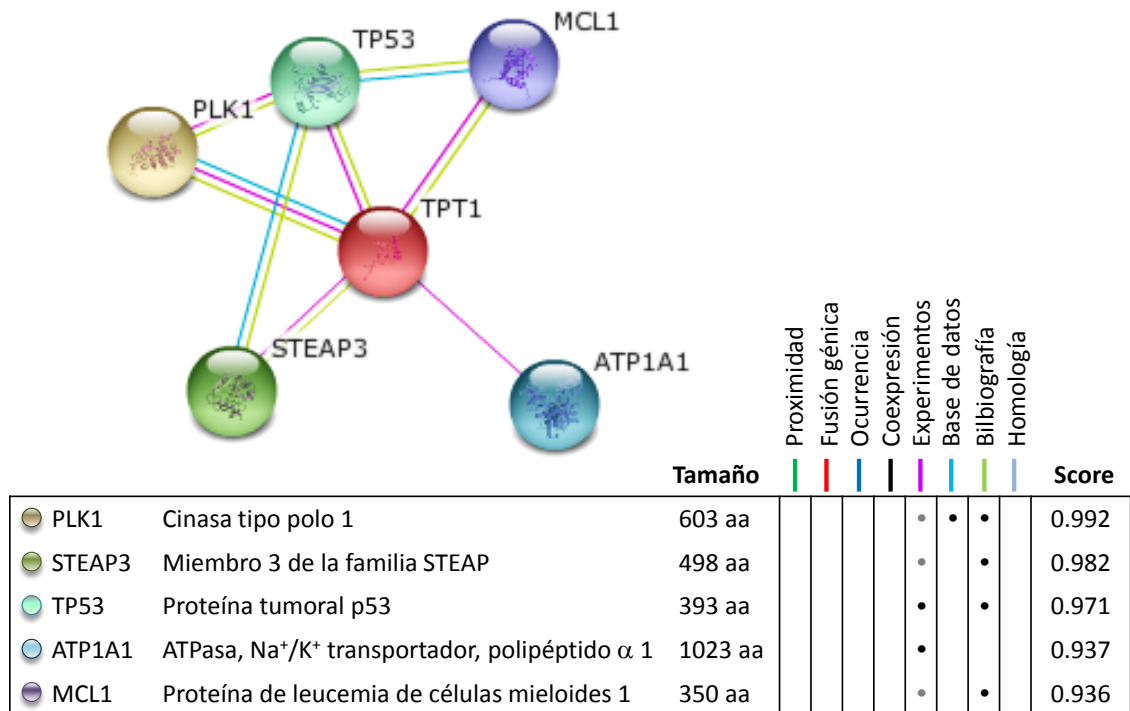


Figura 8. Predicción de las interacciones proteína-proteína de HsTCTP. Esquema de las posibles proteínas que presentan interacción con HsTCTP obtenido mediante el servidor en línea STRING 9.1 (http://stringdb.org/newstring.cgi/show_input_page.pl?UserId=_x7UmzSKYV). La tabla enlista las siglas, el nombre de la proteína, el tamaño (en número de amino ácidos), el código de colores según las evidencias de dichas interacciones que corresponden a proximidad, fusión génica, ocurrencia, experimentos, base de datos, bibliografía y/o homología; así como el score evaluado para cada interacción.

Sin embargo, para PfTCTP se identifican como posibles moléculas que interactúan proteínas ribosomales y una ATPasa transportadora de calcio (Figura 9). Esto nos indica que a nivel de estructura y posibles interacciones que se predicen con base en ésta, HsTCTP y PfTCTP pueden presentar diferentes blancos y/o diferente efecto sobre dichas moléculas.

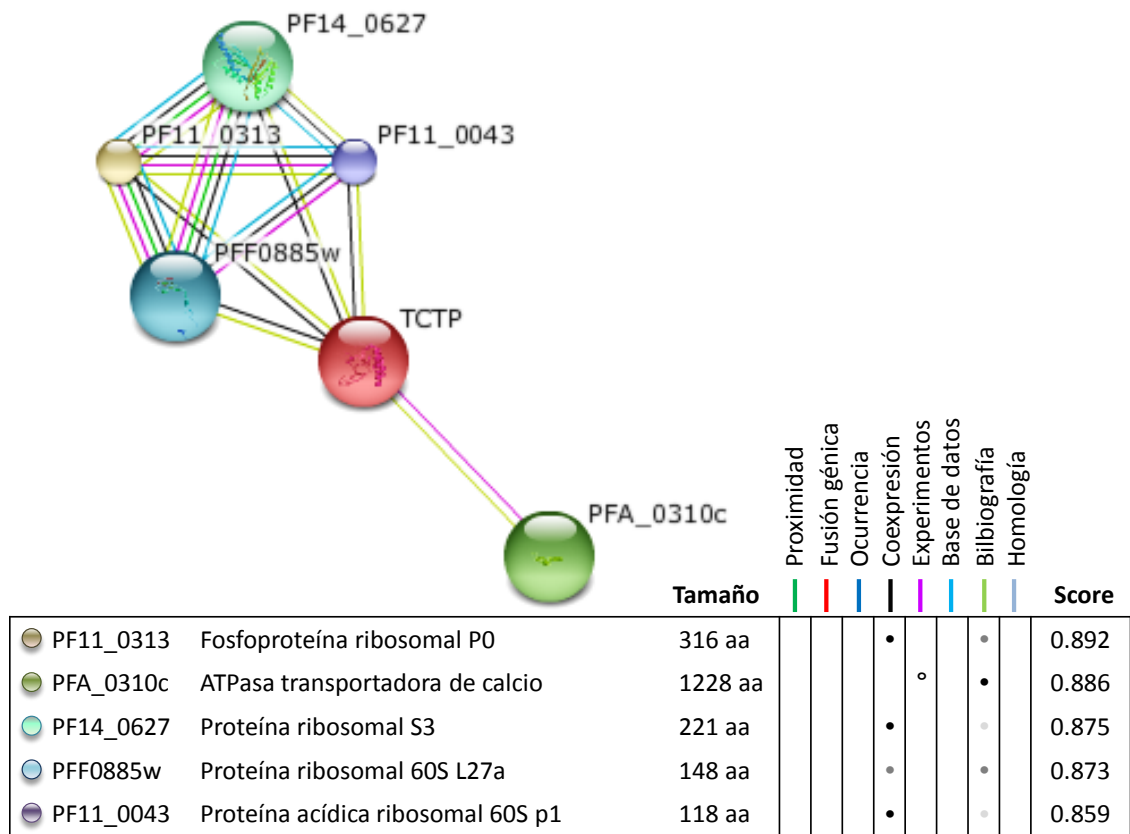


Figura 9. Predicción de las interacciones proteína-proteína de PFTCTP. Esquema de las posibles proteínas que presentan interacción con PFTCTP obtenido mediante el servidor en línea STRING 9.1 (http://stringdb.org/newstring.cgi/show_input_page.pl?UserId=_x7UmzSKYV). La tabla enlista las siglas, el nombre de la proteína, el tamaño (en número de amino ácidos), el código de colores según las evidencias de dichas interacciones que corresponden a proximidad, fusión génica, ocurrencia, experimentos, base de datos, bibliografía y/o homología; así como el score evaluado para cada interacción.

Con base en la premisa teórica de las diferencias estructurales de PFTCTP con respecto a HsTCTP y sus posibles moléculas con las cuales interactúa, se planteó la hipótesis de que TCTP de *P. falciparum* podría actuar como mutante dominante negativa ya que induce la liberación de histamina, pero al no interactuar con proteínas G, sería incapaz de llevar a cabo la activación de células B bloqueando la respuesta inmune del huésped durante la infección (Hinojosa-Mota et al., 2008).

Para determinar si PftTCTP presenta efecto semejante a HsTCTP, se clonaron y expresaron ambas proteínas y se probaron en un cultivo primario de linfocitos B como se describe posteriormente.

6.2 ETAPA: Expresión y purificación de TCTP recombinantes

6.2.1 Extracción de RNA total de sangre periférica humana y síntesis de cDNA

Se obtuvo el RNA total a partir de sangre periférica humana y se comprobó la integridad del RNA extraído (Figura 10).

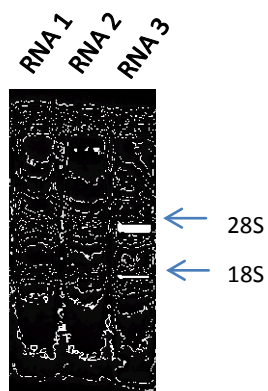


Figura 10. RNA total de sangre periférica humana. Gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%. Las flechas indican las bandas correspondientes a los rRNA 28S y 18S. RNA 1, 2 y 3: muestras independientes de RNA total de sangre periférica humana.

6.2.2 Amplificación del gen de PftTCTP y HsTCTP

Se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de reacción para la detección de HsTCTP y PftTCTP con los oligonucleótidos específicos diseñados.

Para el caso de HsTCTP se probó el efecto de distintas temperaturas de alineamiento (Figura 11) sobre la amplificación de la región codificante y se estableció 55°C como la temperatura óptima para la reacción.

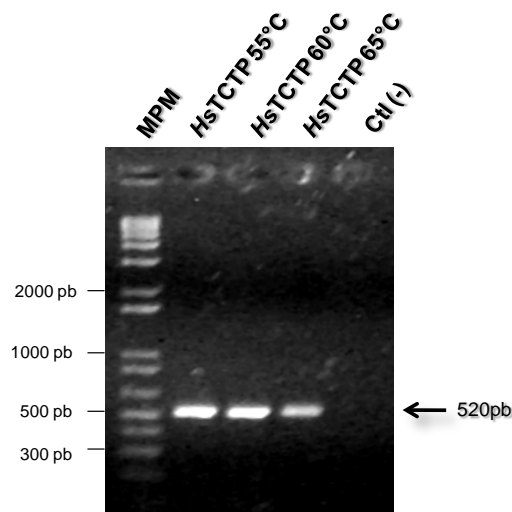


Figura 11. Efecto de la temperatura de alineamiento en la amplificación del gen de HsTCTP. Producto de amplificación del fragmento de 520 pb que corresponde a la región codificante del gen de HsTCTP en gel de agarosa al 1%. Se indica la temperatura de alineamiento que corresponde a 55°C, 60°C y 65°C, respectivamente. MPM: marcador de peso molecular (escala de 1 Kb Plus, New England Biolabs); Ctl (-): control negativo de la reacción de amplificación.

Para el caso de PftTCTP se probaron distintas temperaturas de extensión (Figura 12) por tratarse de secuencias ricas en A+T, de acuerdo con lo reportado por Su et al., 1996. Una reacción típica de PCR incluye una temperatura de extensión de 72°C después de la desnaturalización de la doble cadena de DNA y el alineamiento de los oligonucleótidos. A esta temperatura, la polimerasa termoestable replica el DNA a una velocidad óptima que depende de la solución amortiguadora y de la naturaleza del DNA molde (Innis y Gelfand, 1990). Sin embargo, se ha encontrado que diversas secuencias de DNA de *P. falciparum* pueden ser difíciles o imposibles de amplificar bajo condiciones estándar de PCR por tratarse de secuencias ricas en A-T (Su et al., 1996).

Se demostró que una disminución de la temperatura de extensión permite la amplificación de estas secuencias refractarias de DNA (Su et al., 1996). Por lo anterior, se realizó un gradiente en la temperatura de extensión de 60-70°C para la amplificación de PftCTP (Figura 12). Se estableció la temperatura de extensión de 60°C como la óptima para la reacción.

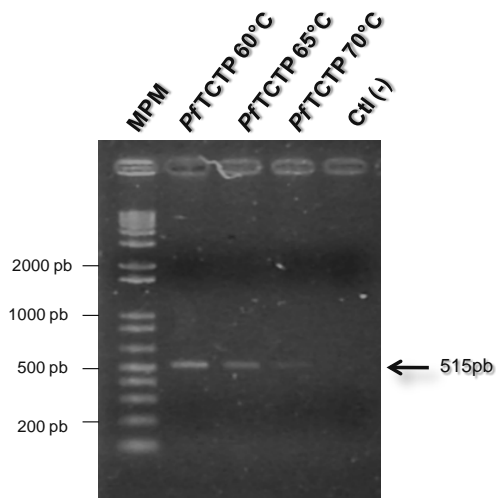


Figura 12. Efecto de la temperatura de extensión en la amplificación del gen de PftCTP. Producto de amplificación del fragmento de 515 pb que corresponde a la región codificante del gen de PftCTP en gel de agarosa al 1%. Se indica la temperatura de extensión que corresponde a 60°C, 65°C y 70°C, respectivamente. MPM: marcador de peso molecular (escalera de 1 Kb Plus); Ctl (-): control negativo de la reacción de amplificación.

6.2.3 Clonación del gen de *HsTCTP* y *PftCTP*

Los fragmentos amplificados correspondientes a la región codificante del gen de TCTP se purificaron y clonaron en el vector pDrive, con lo cual se transformaron células competentes de *E. coli* Top10F'.

Posteriormente, se realizó la extracción del DNA plasmídico y la verificación de la presencia del inserto por medio de reacciones de digestión con la endonucleasa EcoRI que liberó un fragmento de ≈ 530 pb como se esperaba (Figura 13a) y por PCR (Figura 13b).

Los plásmidos recombinantes fueron sometidos a reacciones de secuenciación y se verificó que las secuencias obtenidas para 2 de los plásmidos de HsTCTP corresponden completamente con la reportada en la base de datos, número de acceso NM_003295 (Cuadro 4).

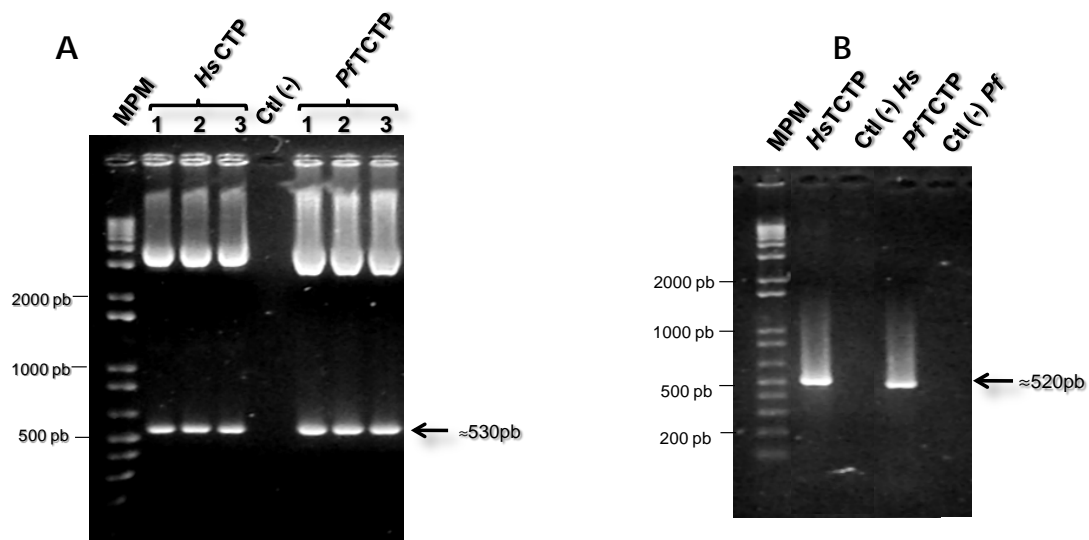


Figura 13. Verificación de la presencia de inserto (ORF) de HsTCTP y PfTCTP en pDrive. A: Liberación del inserto (≈ 530 pb) por reacciones de restricción con la endonucleasa EcoRI. Muestras de colonias independientes de TCTP humana (HsTCTP 1-3) y TCTP de *P. falciparum* (PfTCTP 1-3). B: Producto de amplificación del fragmento (≈ 520 pb). Geles de agarosa al 1%. MPM: marcador de peso molecular (escalera de 1 Kb Plus); Ctl (-): control negativo de cada reacción, respectivamente.

Los plásmidos de PfTCTP presentaron algunos cambios con respecto a la secuencia de referencia, número de acceso XM_001351631 (Cuadro 5).


```

                *           20           *           40           *           60
HsT1   : ATGATTATCTACCGGGACCTCATCAGCCACGATGAGATGTTCTCCGACATCTACAAGATC
HsT5   : ATGATTATCTACCGGGACCTCATCAGCCACGATGAGATGTTCTCCGACATCTACAAGATC
HsTCTP : ATGATTATCTACCGGGACCTCATCAGCCACGATGAGATGTTCTCCGACATCTACAAGATC

                *           80           *           100          *           120
HsT1   : CGGGAGATCGCGGACGGGTTGTGCCTGGAGGTGGAGGGGAAGATGGTCAGTAGGACAGAA
HsT5   : CGGGAGATCGCGGACGGGTTGTGCCTGGAGGTGGAGGGGAAGATGGTCAGTAGGACAGAA
HsTCTP : CGGGAGATCGCGGACGGGTTGTGCCTGGAGGTGGAGGGGAAGATGGTCAGTAGGACAGAA

                *           140          *           160          *           180
HsT1   : GGTAACATTGATGACTCGCTCATTGGTGGAAATGCCTCCGCTGAAGGCCCGAGGGCGAA
HsT5   : GGTAACATTGATGACTCGCTCATTGGTGGAAATGCCTCCGCTGAAGGCCCGAGGGCGAA
HsTCTP : GGTAACATTGATGACTCGCTCATTGGTGGAAATGCCTCCGCTGAAGGCCCGAGGGCGAA

                *           200          *           220          *           240
HsT1   : GGTACCGAAAGCACAGTAATCACTGGTGTGATATTGTGATGAACCATCACCTGCAGGAA
HsT5   : GGTACCGAAAGCACAGTAATCACTGGTGTGATATTGTGATGAACCATCACCTGCAGGAA
HsTCTP : GGTACCGAAAGCACAGTAATCACTGGTGTGATATTGTGATGAACCATCACCTGCAGGAA

                *           260          *           280          *           300
HsT1   : ACAAGTTTCACAAAAGAAGCCTACAAGAAGTACATCAAAGATTACATGAAATCAATCAAA
HsT5   : ACAAGTTTCACAAAAGAAGCCTACAAGAAGTACATCAAAGATTACATGAAATCAATCAAA
HsTCTP : ACAAGTTTCACAAAAGAAGCCTACAAGAAGTACATCAAAGATTACATGAAATCAATCAAA

                *           320          *           340          *           360
HsT1   : GGGAAACTTGAAGAACAGAGACCAGAAAGAGTAAAACCTTTTATGACAGGGGCTGCAGAA
HsT5   : GGGAAACTTGAAGAACAGAGACCAGAAAGAGTAAAACCTTTTATGACAGGGGCTGCAGAA
HsTCTP : GGGAAACTTGAAGAACAGAGACCAGAAAGAGTAAAACCTTTTATGACAGGGGCTGCAGAA

                *           380          *           400          *           420
HsT1   : CAAATCAAGCACATCCTTGCTAATTTCAAAAACCTACCAGTTCTTTATTGGTGAAAAATG
HsT5   : CAAATCAAGCACATCCTTGCTAATTTCAAAAACCTACCAGTTCTTTATTGGTGAAAAATG
HsTCTP : CAAATCAAGCACATCCTTGCTAATTTCAAAAACCTACCAGTTCTTTATTGGTGAAAAATG

                *           440          *           460          *           480
HsT1   : AATCCAGATGGCATGGTTGCTCTATTGGACTACCGTGAGGATGGTGTGACCCCATATATG
HsT5   : AATCCAGATGGCATGGTTGCTCTATTGGACTACCGTGAGGATGGTGTGACCCCATATATG
HsTCTP : AATCCAGATGGCATGGTTGCTCTATTGGACTACCGTGAGGATGGTGTGACCCCATATATG

                *           500          *
HsT1   : ATTTTCTTTAAGGATGGTTTAGAAATGGAAAAATGTTAA : 519
HsT5   : ATTTTCTTTAAGGATGGTTTAGAAATGGAAAAATGTTAA : 519
HsTCTP : ATTTTCTTTAAGGATGGTTTAGAAATGGAAAAATGTTAA : 519

```

Cuadro 4. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos de clonas del ORF de HsTCTP. El alineamiento se realizó con el programa en línea MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Las secuencias de los plásmidos analizados no presentaron ningún cambio con respecto a la secuencia de referencia. HsT1 y 5: clonas independientes del gen TCTP en pDrive. HsTCTP: secuencia reportada en la base de datos, No. referencia NM_003295.

```

*          20          *          40          *          60
Pft2  : ATGAAAGTATTTAAAGACGTTTTTACAAATGATGAAGTATGTTCCGATTCTTATGTTCAA
Pft3  : ATGAAAGTATTTAAAGACGTTTTTACAAATGATGAAGTATGTTCCGATTCTTATGTTCAA
PftCTP : ATGAAAGTATTTAAAGACGTTTTTACAAATGATGAAGTATGTTCCGATTCTTATGTTCAA

*          80          *          100         *          120
Pft2  : CAAGATCCATTGGAAGTACCAGAATTTAGAGAAATAGCTTTTGAAGTAAAATCAAATAAA
Pft3  : CAAGATCCATTGGAAGTACCAGAATTTAGAGAAATAGCTTTTGAAGTAAAATCAAATAAA
PftCTP : CAAGATCCATTGGAAGTACCAGAATTTAGAGAAATAGCTTTTGAAGTAAAATCAAATAAA

*          140         *          160         *          180
Pft2  : AGAATAAAGGGAAATGAAGATTATGGTATTGCTGATAATAGCGAAGATGCTGTAGAAGGT
Pft3  : AGAATAAAGGGAAATGAAGATTATGGTATTGCTGATCATAGCGAAGATGCTGTAGAAGGT
PftCTP : AGAATAAAGGGAAATGAAGATTATGGTATTGCTGATAATAGCGAAGATGCTGTAGAAGGT

*          200         *          220         *          240
Pft2  : ATGGGAGCAGATGTTGAACATGTTATTGATATTGTTGATTCTTTCAATGACCTCCACT
Pft3  : ATGGGAGCAGATGTTGAACATGTTATTGATATTGTTGATTCTTTCAATGACCTCCACT
PftCTP : ATGGGAGCAGATGTTGAACATGTTATTGATATTGTTGATTCTTTCAATGACCTCCACT

*          260         *          280         *          300
Pft2  : GCTTTTAGTAAAGAAAGAATATAGTGCTTATATTTAAAAATTATATGCAAAAAGGTTGCCAAA
Pft3  : GCTTTTAGTAAAAAAGAATATAGTGCTTATATTTAAAAATTATATGCAAAAAGGTTGCCAAA
PftCTP : GCTTTTAGTAAAAAAGAATATAGTGCTTATATTTAAAAATTATATGCAAAAAGGTTGCCAAA

*          320         *          340         *          360
Pft2  : TATTTAGAAGAGAAAAAACAGATCGTGTGAAATTTTTAAAACATAAGCCCAACCATTT
Pft3  : TATTTAGAAGAGAAAAAACAGATCGTGTGAAATTTTTAAAACATAAGCCCAACCATTT
PftCTP : TATTTAGAAGAGAAAAAACAGATCGTGTGAAATTTTTAAAACATAAGCCCAACCATTT

*          380         *          400         *          420
Pft2  : ATTAACACATTTTAAACAAACTTTGACGATTTTGAATTTTATATGGGAGAATCACTTGAT
Pft3  : ATTAACACATTTTAAACAAACTTTGACGATTTTGAATTTTATATGGGAGAATCACTTGAT
PftCTP : ATTAACACATTTTAAACAAACTTTGACGATTTTGAATTTTATATGGGAGAATCACTTGAT

*          440         *          460         *          480
Pft2  : ATGGAAGCAGGTATTATTTATTCTTATTATAAAGGAGAAGAAATAACACCACGTTTTTGT
Pft3  : ATGGAAGCAGGTATTATTTATTCTTATTATAAAGGAGAAGAAATAACACCACGTTTTTGT
PftCTP : ATGGAAGCAGGTATTATTTATTCTTATTATAAAGGAGAAGAAATAACACCACGTTTTTGT

*          500         *
Pft2  : TATATATCTGATGGACTTTTTGAAGAAAAATATTAA : 516
Pft3  : TATATATCTGATGGACTTTTTGAAGAAAAATATTAA : 516
PftCTP : TATATATCTGATGGACTTTTTGAAGAAAAATATTAA : 516

```

Cuadro 5. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos de clones del ORF de PftCTP. El alineamiento se realizó con el programa en línea MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Se marca (sombreado) cuando alguna de las secuencias presenta algún cambio respecto a la secuencia de referencia. Pft2 y 3: clones independientes del gen TCTP en pDrive. PftCTP: secuencia reportada en la base de datos no. referencia XM_001351631.

La secuencia de la clona denominada PFT2 presentó un cambio en la posición 252 de una A por una G. A nivel de aminoácidos, esta modificación representaría la presencia de arginina en la posición 88 en lugar de una lisina ($K^{88} \rightarrow R^{88}$). Ambos son aminoácidos con residuos cargados positivamente. Así mismo, la secuencia de la clona denominada PFT3 presentó un cambio en la posición 157 de una A por una G. A nivel de aminoácidos, esta modificación no representaría un cambio de aminoácido ya que ambos codones corresponden a valina en la posición 56 (Cuadro 5). Por este motivo, se continuó trabajando con esta clona para posteriores procedimientos experimentales.

6.2.4 Subclonación de PFTCTP y HsTCTP en el vector de expresión

Las construcciones de PFTCTP y HsTCTP en pDrive se utilizaron para subclonar estos genes en el vector de expresión para sistemas procarióticos pProEX HTb. Ambas construcciones se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente, se realizó la extracción del DNA plasmídico y la verificación del inserto por medio de reacciones de digestión con la endonucleasa EcoRI y NotI (Figura 14a), ambas enzimas cortan el vector flanqueando al inserto en la posición 352 y 387, respectivamente; así como la verificación por medio de PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Figura 14b).

Los plásmidos recombinantes fueron sometidos a reacciones de secuenciación encontrando que las clonas correspondían a la secuencia de referencia para ambos organismos.

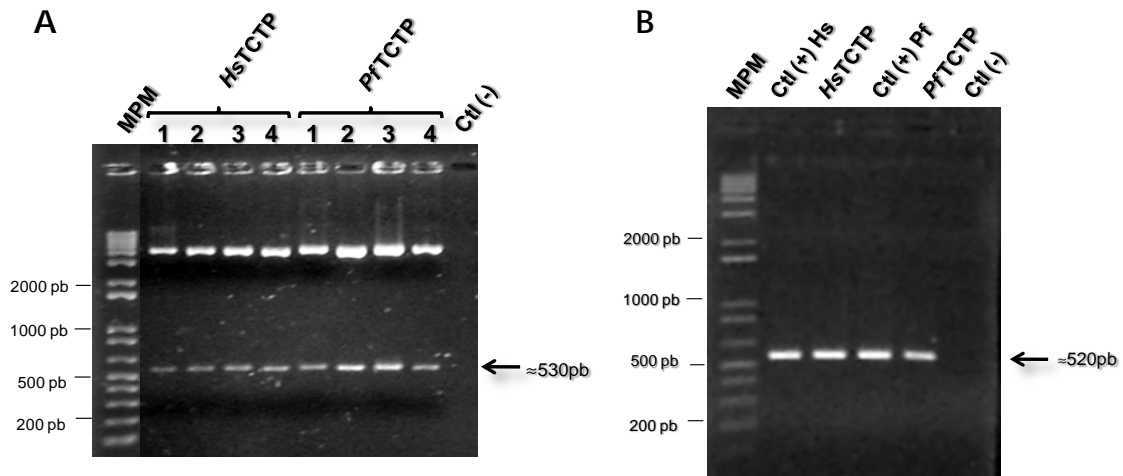


Figura 14. Verificación de la presencia de inserto (ORF) de HsTCTP y PftTCTP en pProEXHTb. A: Análisis de la liberación de inserto (≈ 530 pb) por reacción de restricción con la endonucleasa EcoRI y NotI. Muestras de colonias independientes de TCTP humana (HsTCTP 1-4) y TCTP de *P. falciparum* (PftTCTP 1-4). B: Producto de amplificación del gen (≈ 520 pb). Geles de agarosa al 1%. MPM: marcador de peso molecular (escala de 1 Kb Plus); Ctl (+): control positivo de reacción; Ctl (-): control negativo de reacción.

6.2.5 Ensayo de inducción e identificación de las proteínas recombinantes

Con las construcciones obtenidas se llevó a cabo un ensayo de inducción con 1 mM de IPTG para la producción de las proteínas recombinantes. La inducción se llevó a cabo en medio LB durante 18h a 37 °C y se analizó la fracción total proteica para cada cultivo. Las proteínas se resolvieron en SDS-PAGE al 15 % y se identificaron los productos recombinantes mediante Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra la bandera de histidina (Figura 15).

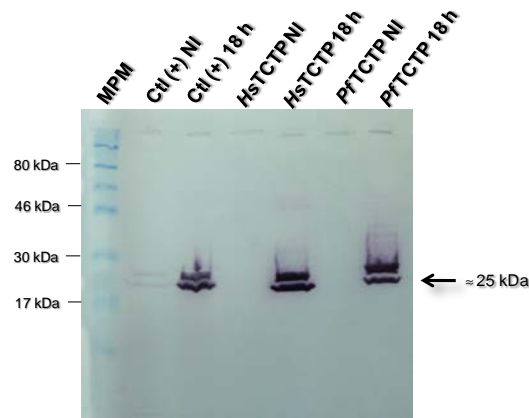


Figura 15. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot. Detección de las proteínas HsTCTP y PFTCTP mediante anticuerpos anti-His. Las muestras corresponden a extracciones de proteína total de cultivos de *E. coli* DH5 α no inducidos (NI) y cultivos inducidos en medio LB durante 18 h a 37°C y 140 rpm para HsTCTP y PFTCTP. MPM: marcador de peso molecular de proteínas preteñido (Broad Range, New England Biolabs). Ctl (+): control positivo del ensayo correspondiente a TCTP de *C. maxima* en pProEX HTb, donado por el Dr. Jesús Hinojosa Moya.

6.2.5.1 Estandarización de las condiciones de inducción

Para las construcciones de HsTCTP y PFTCTP en el vector de expresión para sistemas procarióticos pProEX HTb, se probaron distintas condiciones para la inducción de las proteínas y la obtención de las mismas en forma soluble.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos del Western Blot del extracto proteico de un cultivo en LB inducido con 0.5 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes se detectaron tanto en la fracción soluble como en la insoluble, encontrándose mayormente en los cuerpos de inclusión.

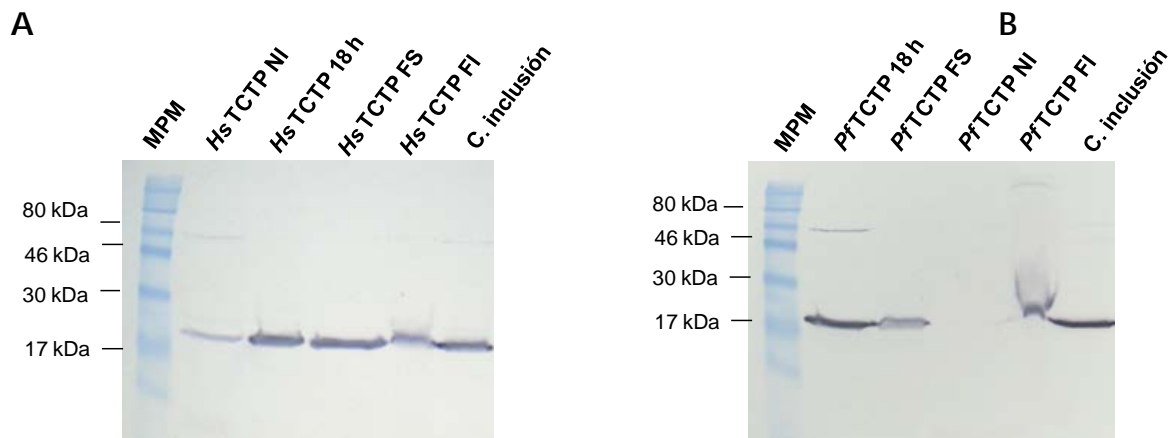


Figura 16. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot. Detección de las proteínas **A:** HsTCTP y **B:** PftTCTP mediante anticuerpos anti-His. Las muestras corresponden a extracciones de proteína total de cultivos de *E. coli* DH5 α en medio LB no inducidos (NI) y cultivos inducidos con 0.5 mM IPTG durante 18 h a 37°C y 140 rpm, así como las extracciones correspondientes a la fracción soluble (FS), la fracción insoluble (FI) y los cuerpos de inclusión (C. inclusión). MPM: marcador de peso molecular de proteínas preteñido (Broad Range, New England Biolabs).

Con la finalidad de favorecer la producción de las proteínas recombinantes de forma soluble se probaron distintas condiciones de inducción como fue el medio de cultivo, la cepa de *E. coli*, la concentración del inductor, así como la temperatura y tiempo de inducción. Así, se obtuvo que empleando la cepa *E. coli* Rosseta2 en el medio 2TY, induciendo con 60 μ M de IPTG por 4 horas a 28°C en agitación (180rpm), se obtiene la mayor cantidad de proteína recombinante de forma soluble (Figura 17).

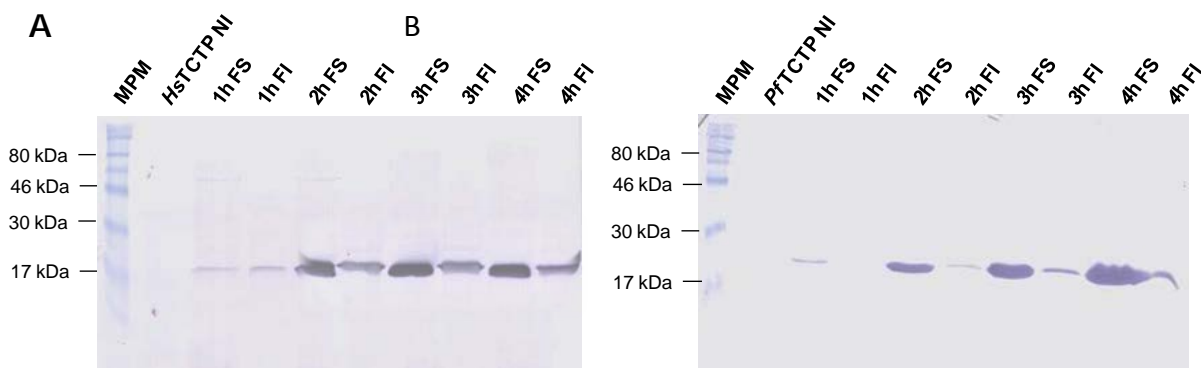


Figura 17. Identificación de las proteínas recombinantes mediante Western Blot. Detección de las proteínas **A:** HsTCTP y **B:** PftTCTP mediante anticuerpos anti-His. Las muestras corresponden a extracciones de proteína total de cultivos de *E. coli* Rosseta2 en medio 2TY no inducidos (NI) y cultivos inducidos con 60 μ M IPTG durante 1 a 4h a 28 $^{\circ}$ C y 180 rpm, correspondientes a la fracción soluble (FS) y a la fracción insoluble (FI). MPM: marcador de peso molecular de proteínas preteñido (Broad Range, New England Biolabs).

6.2.6 Purificación de las proteínas recombinantes

Se realizaron distintas pruebas para la determinación de las mejores condiciones de lisis de los cultivos (variando la concentración de lisozima, tiempo de incubación, proceso de sonicación y/o choque térmico) y la composición del buffer de extracción de la proteína buscando la compatibilidad con las soluciones reguladoras empleadas para la posterior purificación en las columnas de afinidad.

Una vez establecidas las condiciones de inducción se comenzó con la purificación de las proteínas recombinantes empleando cromatografía de afinidad por medio de columnas con níquel HisTrap FF de la marca Amersham, cuyas características principales es que están pre empacadas con sefarosa, precargadas con níquel y presentan mayor capacidad de retención puesto que contiene más ligandos por mL de superficie.

Primeramente, se realizó un gradiente lineal para identificar la concentración de imidazol para la elución de las proteínas recombinantes (Cuadro 6).

	Equilibrio	Lavado	Elución
Fostato de sodio pH 8.0	20 mM	20mM	20mM
NaCl	500mM	500mM	500mM
Imidazol	10mM	20mM	20-500mM
PMSF	1mM	1mM	1mM

Cuadro 6. Composición de las soluciones de equilibrio, lavado y elución empleadas para la purificación de las proteínas recombinantes con afinidad a níquel.

La purificación se realizó bajo condiciones no desnaturizantes ya que se trabajó con la fracción soluble de los cultivos inducidos como se indicó anteriormente.

Ulterior a esto, se identificó la concentración de imidazol a la cual eluyen las proteínas recombinantes, que corresponden a 100 y 200mM de imidazol tanto para *HsTCTP* (Figura 18a) como para *PfTCTP* (Figura 18b). Como se observa, *PfTCTP* comienza a eluir desde 50mM de imidazol.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se realizó a mayor escala la purificación de las proteínas recombinantes empleando las soluciones estandarizadas para el uso de la columna (Cuadro 7) en condiciones no desnaturizantes ya que sólo se empleó la fracción soluble.

La purificación se realizó bajo condiciones no desnaturizantes ya que se trabajó con la fracción soluble de los cultivos inducidos como se indicó anteriormente (Figura 19).

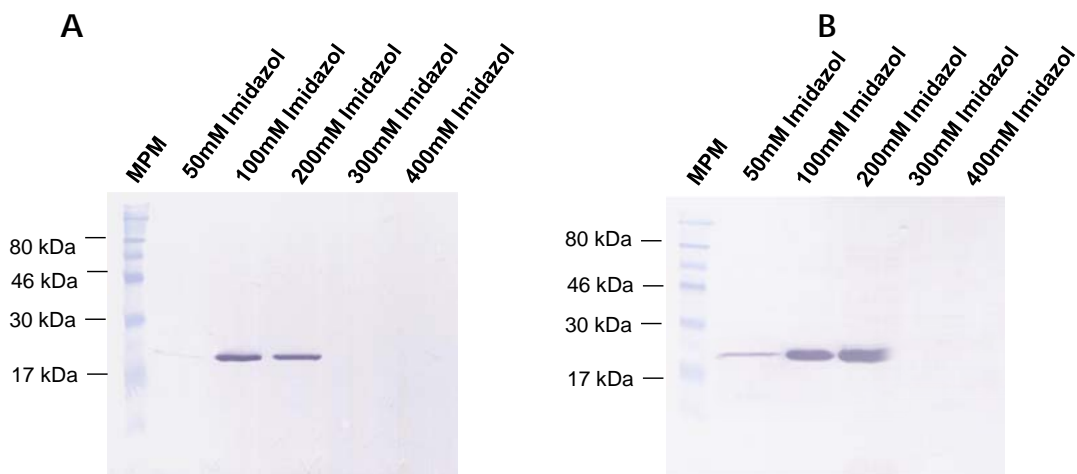


Figura 18. Identificación de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad por medio de ensayos Western Blot empleando anticuerpos anti-His. Detección de las proteínas recombinantes correspondientes al eluato de las fracciones de 50 a 400 mM de imidazol. **A:** HsTCTP; **B:** PftCTP. MPM: marcador de peso molecular de proteínas preteñido (Broad Range, New England Biolabs).

	Equilibrio	Lavado	Elución
Fostato de sodio pH 8.0	20 mM	20mM	20mM
NaCl	500mM	500mM	500mM
Imidazol	20mM	80mM	200mM
PMSF	1mM	1mM	1mM
Lisozima	0.2mg/mL	-	-
Glicerol	10%	10%	10%

Cuadro 7. Composición de las soluciones de equilibrio, lavado y elución empleadas para la purificación de las proteínas recombinantes con afinidad a níquel.

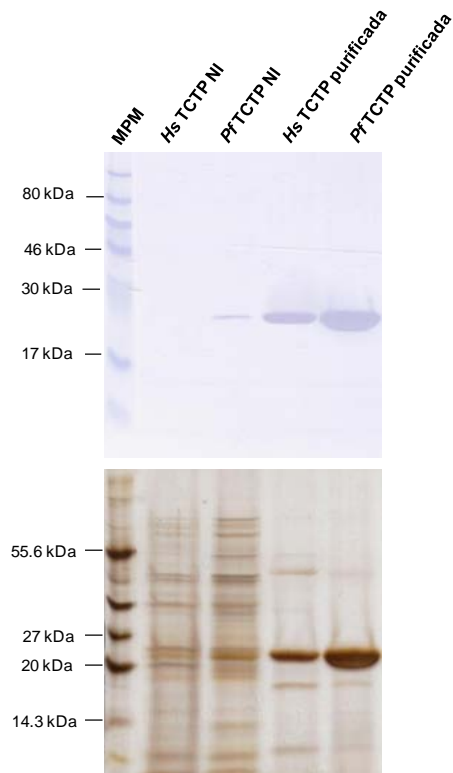


Figura 19. Identificación de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad (His-Trap FF, Amersham). Las muestras corresponden a extracciones de proteína total de cultivos no inducidos (NI) y al eluato de las fracciones con 150 mM de imidazol. Parte superior: ensayo Western Blot empleando anticuerpos anti-His; parte inferior: gel de poliacrilamida al 15% revelado por tinción con plata. MPM: marcador de peso molecular de proteínas preteñido o no, respectivamente (Broad Range, NEB).

6.2.7 Marcaje de las proteínas recombinantes

Se realizó el marcaje de las proteínas recombinantes con los fluorocromos Oregon Green 488 (verde) y Alexa Fluor 584 (rojo). La Figura 20 muestra las bandas correspondientes a las proteínas marcadas vistas con luz UV.

Estas proteínas marcadas fueron empleadas para los ensayos de proliferación celular con linfocitos B y localización celular en los mismos, como se describe posteriormente.

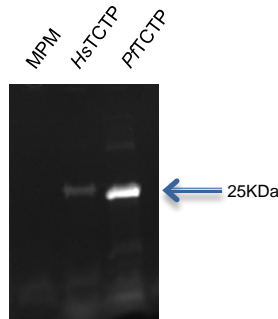


Figura 20. Perfil electroforético de las proteínas recombinantes marcadas con fluorocromo. Gel desnaturizante de acrilamida al 15%. Proteína recombinante Hs TCTP y PFTCTP marcadas con el fluorocromo Oregon Green 488 y Alexa Fluor 584, respectivamente. Para la imagen que se muestra se empleó el transiluminador con luz UV.

6.3 Análisis funcional *in vitro* de TCTP recombinante

TCTP es una molécula altamente conservada de organismos eucariotas. TCTP está implicada en diversas funciones y actividades celulares en diferentes organismos; asimismo presenta diferentes tipos de regulación (Bommer, 2012). Sin embargo, se desconoce la función de las formas secretadas de esta proteína y si en eucariotas multicelulares ésta es secretada de una manera tejido-específica, como es probable en el caso de vertebrados.

PFTCTP, así como varias otras formas de TCTP pertenecientes a parásitos transmitidos por sangre, es secretada en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado; por ello, es razonable suponer que puede tener un papel en la patogenicidad y la virulencia (Gnanasekar et al., 2002). Sin embargo, aún no se ha identificado un papel directo en tales procesos. Recientemente, se ha descrito la capacidad de PFTCTP para provocar la liberación de histamina y el aumento de la reactividad de los basófilos en pacientes con malaria, lo que sugiere que TCTP puede estar implicada en el proceso de inflamación (MacDonald et al., 2001; Pelleau et al., 2012).

Esto podría contribuir a la supervivencia del patógeno y/o su propagación en el huésped.

Para determinar si PftCTP presenta la capacidad de actuar como factor de crecimiento de células B como lo hace HstCTP, se realizaron ensayos de proliferación celular en cultivos primarios de linfocitos B como se describe a continuación.

6.3.1 Aislamiento de linfocitos B de bazo de ratón

Los ensayos de proliferación celular se realizaron en un cultivo primario de células B como el sistema empleado por Kang et al., 2001. Para ello, se realizó la estandarización del método de obtención de linfocitos B de bazo de murinos.

6.3.1.1 Obtención de esplenocitos totales

Después de la obtención de esplenocitos totales se realizó el conteo de células (por duplicado) para un ensayo típico con 2 ratones hembras:

- o Concentración total de células: 2.1×10^8 cél/mL
- o Concentración de células viables: 1.8×10^8 cél/mL
- o Viabilidad: 86%

6.3.1.2 Aislamiento de linfocitos B

Se realizó la selección negativa de linfocitos B para evitar la activación de los mismos y poder llevar a cabo los posteriores ensayos de proliferación.

Posteriormente, se realizó el conteo de células B (por duplicado), obteniendo:

- o Concentración total de células: 7.4×10^7 cél/mL
- o Concentración de células viables: 6.9×10^7 cél/mL
- o Viabilidad: 93%

6.3.1.3 Estimulación de linfocitos B con un mitógeno

Para contar con un control positivo de inducción de proliferación de linfocitos B, se emplearon distintas concentraciones del mitógeno liposolisacárido o LPS (0-2 μ g/mL) para ver el efecto de éste sobre linfocitos B (Figura 21). La activación de los linfocitos B por los LPS de *E. coli* y otras enterobacterias, induce a las células B a proliferar y a sintetizar inmunoglobulinas (Parekh et al., 2003); en este caso el LPS funciona como ligando de ciertas moléculas como los receptores TLR (del inglés, toll like receptors) presentes en las superficies de las células (Rojas-Espinoza, 2006).

El LPS fue utilizado como control positivo de proliferación de células B en los ensayos posteriores a una concentración de 1 μ g/mL. Esto concuerda con los datos de estudios similares reportados en literatura donde se emplean concentraciones de 0.5 μ g/mL y mayores para su uso como mitógeno para células B.

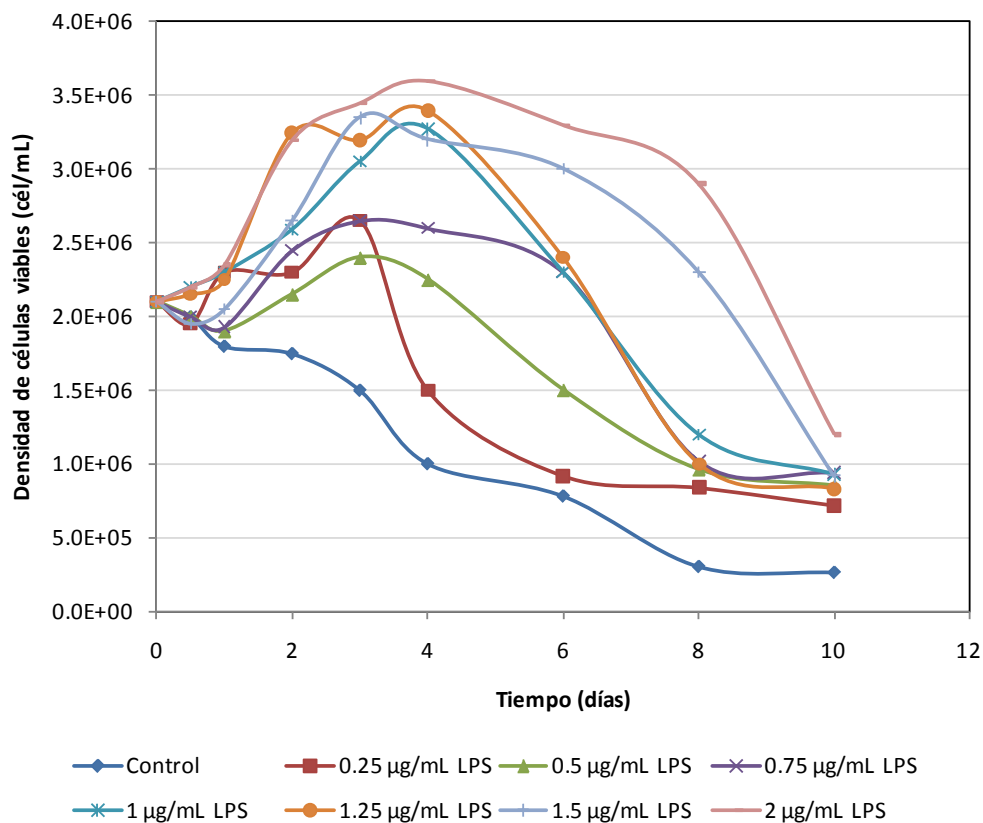


Figura 21. Efecto de la concentración de LPS sobre linfocitos B. Estimulación de células B con distintas concentraciones de LPS (0-2 µg/mL).

6.3.2 Ensayos de proliferación celular

Se evaluó el efecto en la proliferación celular de la presencia de TCTP recombinantes sobre un cultivo primario de linfocitos B de ratón (Figura 22). El control negativo que corresponde a las células B sin estímulo, así como las células B incubadas con la solución de fosfatos 20mM, no presentan proliferación como se esperaba. El LPS se utilizó a 1 µg/mL dado que a esta concentración se encontró que tiene un efecto en la proliferación de células B bajo las condiciones empleadas, por ello se empleó como control positivo. Para el caso de las proteínas recombinantes marcadas con el fluorocromo, se observa que ambas presentan un efecto de inducción de la proliferación de linfocitos B (Figura 22).

Sin embargo, hay una diferencia significativa en la densidad celular viable de las 72 h a las 120 h entre HsTCTP y PftTCTP. Al final de la cinética (120 h), hubo una diferencia significativa de la densidad celular viable que presentó el cultivo incubado con HsTCTP (4.3×10^6 cél/mL $\pm 4.5\%$) a comparación de densidad alcanzada cuando se incubaron con PftTCTP (2.4×10^6 cél/mL $\pm 4.2\%$) bajo las condiciones empleadas [$t(1.47)=8.49$, $p=0.03166$].

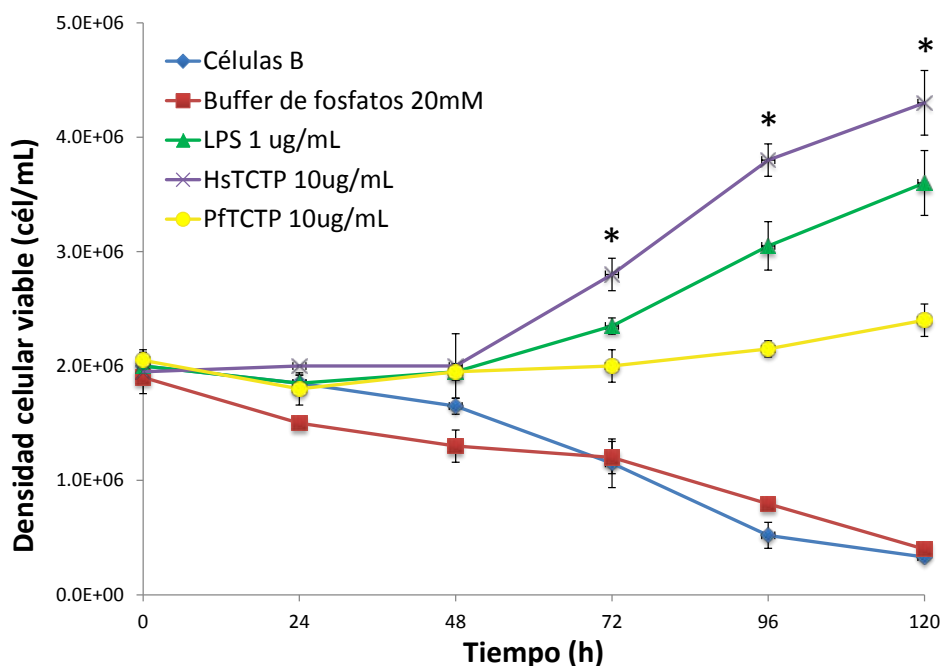


Figura 22. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre la densidad celular viable de linfocitos B. Cultivo primario de linfocitos B obtenidos por selección negativa (2×10^6 cél/mL) incubado en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y $10 \mu\text{g/mL}$ de proteína recombinante HsTCTP o PftTCTP marcada con el fluorocromo Oregon Green 488 (verde) por 24-120 h a 37°C y $5\% \text{CO}_2$. El LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) fue empleado como control positivo. Las células B sin tratamiento y las tratadas con la solución de fosfatos 20mM fueron empleadas como control negativo. La densidad celular viable fue medida con el Contador Celular Automático Countess. Los resultados son promedios representativos de uno de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestra la barra que representa la desviación estándar. * $p < 0.05$ vs células B tratadas con $10 \mu\text{g/mL}$ de PftTCTP.

Esto puede deberse a que, como PftTCTP presenta diferencias estructurales a comparación de HstTCTP, si bien esta función de actuar como factor de proliferación de células B no se pierde completamente, sí se ve atenuada.

Para verificar el efecto que tiene esta incubación de proteínas recombinantes en el ciclo celular del cultivo primario de linfocitos, se realizó el seguimiento de cada punto de la cinética mediante análisis por citometría de flujo (Figura 23).

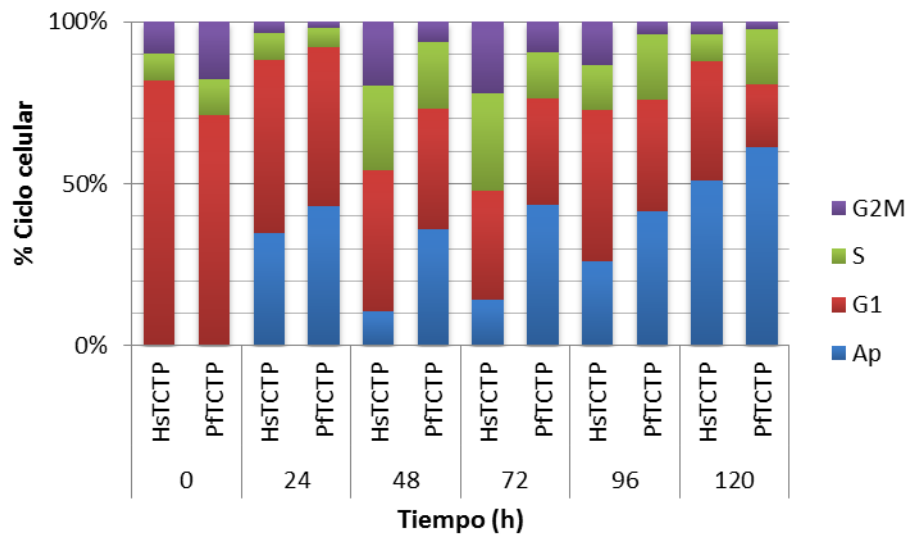


Figura 23. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre el porcentaje de distribución de las etapas del ciclo celular en linfocitos B. Cultivo primario de linfocitos B obtenidos por selección negativa (2×10^6 cél/mL) incubado en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína recombinante HstTCTP o PftTCTP marcada con el fluorocromo Oregon Green 488 (verde) por 24-120 h a 37 °C y 5% CO_2 . El porcentaje de distribución del ciclo celular de los cultivos incubados con las proteínas HstTCTP y PftTCTP marcadas fue analizado por citometría de flujo (FACS). Se presentan los promedios (%) de un experimento representativo de dos realizados independientemente por duplicado. Ap: apoptosis.

El análisis del porcentaje de células en las diversas fases del ciclo celular se realizó en la población marcada mediante las proteínas recombinantes unidas al fluorocromo. Así, se observa que el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular es diferente para cada una de ellas (Figura 23). Para la incubación con PftCTP el porcentaje que se obtiene de células en apoptosis es mayor en todos los casos a comparación de HstCTP. En general, las células B tratadas con HstCTP muestran un mayor porcentaje de las mismas en la fase G1 para los intervalos de tiempo empleados.

Además, el porcentaje de incorporación de la proteína marcada en las células también difiere (Figura 24).

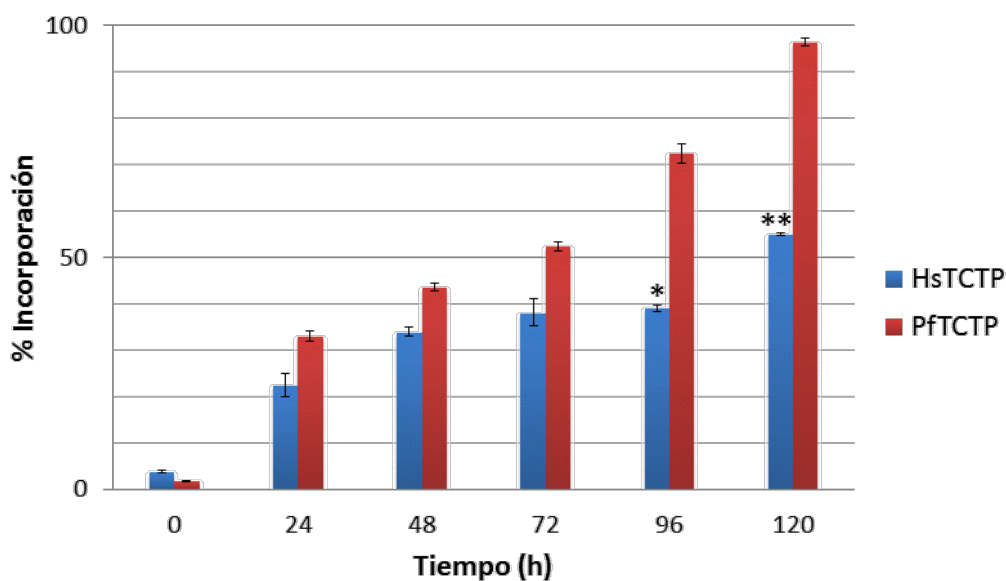


Figura 24. Efecto de la presencia de TCTP recombinante sobre la incorporación en linfocitos B. Cultivo primario de linfocitos B obtenidos por selección negativa (2×10^6 cél/mL) incubado en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y $10 \mu\text{g/mL}$ de proteína recombinante HsTCTP o PftTCTP marcada con el fluorocromo Oregon Green 488 (verde) por 24-120 h a 37°C y 5% CO_2 . El porcentaje de incorporación de las proteínas HsTCTP y PftTCTP marcadas fue analizado por citometría de flujo (FACS). Se presentan los promedios (%) de un experimento representativo de dos realizados independientemente por duplicado. Se muestran las barras correspondientes a las desviaciones estándar. *, $p < 0.05$ vs células B tratadas con $10 \mu\text{g/mL}$ de PftTCTP; **, $p < 0.001$ vs células B tratadas con $10 \mu\text{g/mL}$ de PftTCTP.

La incorporación de la proteína PFTCTP se realiza más rápidamente a comparación de HsTCTP. Al tiempo de 24 h, la incorporación de PFTCTP fue alrededor del 30% mayor a comparación de HsTCTP. De hecho, existe diferencia significativa en la incorporación de PFTCTP y HsTCTP a 72 h y 96 h con $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente. El porcentaje de incorporación de HsTCTP presenta un discreto incremento de las 72 h a las 120 h (de $38.1\% \pm 3.0$ to $54.9\% \pm 0.3$ del total de proteína marcada), en comparación con PFTCTP que al final de la cinética presentó una incorporación del $96.4\% \pm 0.9$ del total de la proteína marcada (Figura 24).

Con los ensayos de incorporación de proteína marcada y los que corresponden a la microscopía confocal (Figura 25), se pone en evidencia que las proteínas recombinantes de HsTCTP y PFTCTP son capaces de ser introducidas al interior de los linfocitos B, aunque se sugiere que hay una diferente velocidad de incorporación de ambas proteínas recombinantes en el cultivo primario de células B.

Hasta ahora, no se ha reportado cómo se lleva a cabo la incorporación de esta proteína en basófilos o linfocitos B, es decir, no se encuentran reportes del posible receptor para esta proteína; sin embargo, se sabe que TCTP contiene un dominio de transducción de proteína (PTD) que permite su internalización (Kim et al., 2011). Este dominio está localizado en el extremo amino de la misma (probablemente entre los aminoácidos 1 a 10). En la comparación de estructura de PFTCTP y HsTCTP (Cuadro 2) se observa que en este dominio hay 2 aminoácidos idénticos, 7 posiciones con sustitución conservativa y un aminoácido que difiere. Esta alteración podría resultar en una mayor incorporación de PFTCTP en los linfocitos B o en el menor efecto de proliferación que ésta presenta.

6.3.3 Localización de TCTP recombinantes en linfocitos B de ratón

En las imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de la localización de TCTP recombinantes en linfocitos B (Figura 23), se observa que tanto HsTCTP como PftTCTP son incorporadas a las células B, dado que los cortes a distintas profundidades realizadas mediante el microscopio confocal así lo indican.

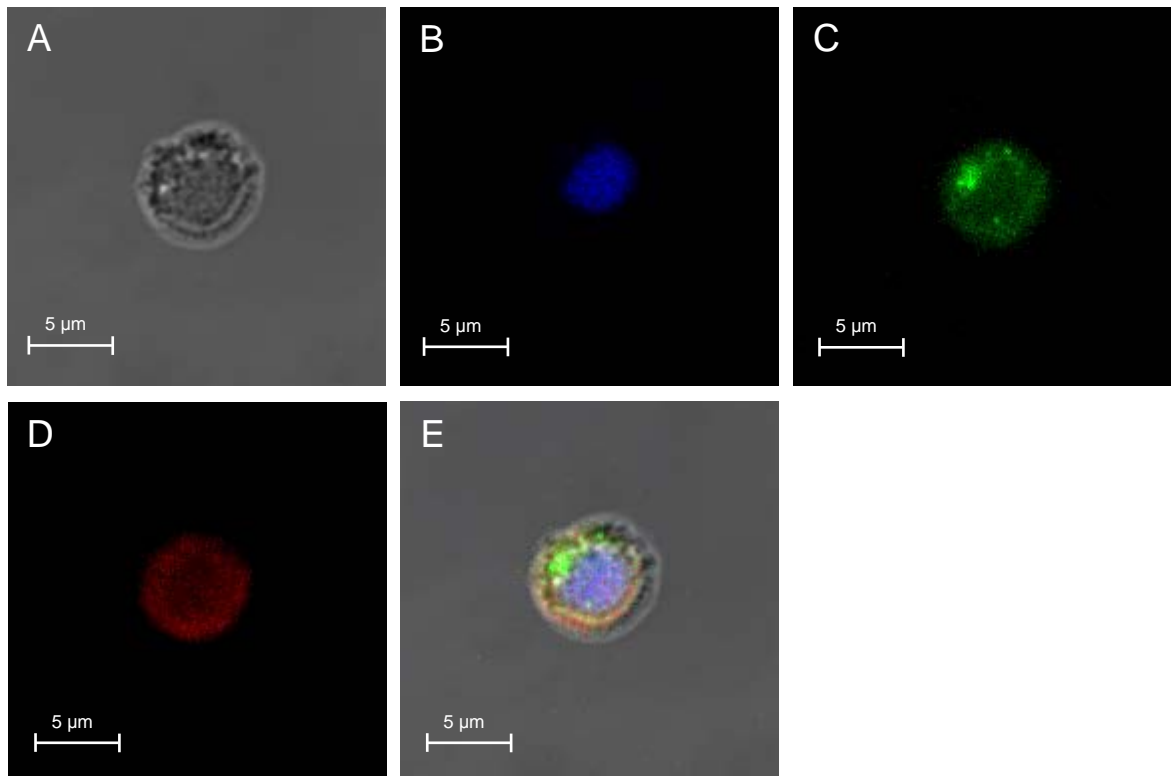


Figura 25. Localización de TCTP recombinante en linfocitos B. Análisis por microscopía confocal de linfocitos B (2×10^5 células/mL) aislados negativamente e incubados con 50 ng/mL de HsTCTP marcada con fluorocromo Oregon Green 488 (verde) y PftTCTP marcada con Alexa Fluor 584 (rojo). Se muestra una imagen representativa. A. Campo claro, B. Tinción con DAPI, C. Verde, D. Rojo, E. Sobrelapamiento

Por otro lado, PftTCTP y HsTCTP no se concentran en forma evidente en el núcleo celular puesto que al realizar la tinción de DAPI para evidenciar esta estructura celular, las señales no convergen.

La señal de fluorescencia de PftTCTP y HstTCTP difiere cuando se incuban simultáneamente. En general, PftTCTP muestra un patrón de distribución más difuso en el citoplasma a comparación de HstTCTP. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa de LAS AF (Leica) y se encontró una correlación de solapamiento que va de 0.5 a 0.6 en los ensayos de incubación simultánea de las proteínas.

Así, con los datos obtenidos en este proyecto se sugiere que, dado el distinto patrón de acumulación de las proteínas recombinantes, la mayor velocidad y mejor incorporación de PftTCTP a comparación de HstTCTP, así como el menor efecto de la proteína del parásito sobre la proliferación de linfocitos B, lo anterior podría tener un efecto *in vivo* afectando el sistema inmune del huésped ante una infección con *P. falciparum*. Se detalla a continuación.

Durante la infección con *P. falciparum*, la TCTP del parásito se encuentra en la sangre de pacientes con malaria a una concentración de 7ug/mL (MacDonald et al., 2001), por lo que ésta puede actuar como mediador de la respuesta inmunitaria induciendo la liberación de histamina. Sin embargo, según los resultados obtenidos en este proyecto, PftTCTP presenta un menor efecto de proliferación de linfocitos B murinos comparado con HstTCTP. Asimismo, el cultivo de células B mostró *in vitro* una mayor y más rápida incorporación de PftTCTP en comparación con HstTCTP en las condiciones empleadas. Considerando que la similitud entre TCTP humana y la de ratón es cerca del 96%, es probable que esta última muestre un efecto similar, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son biológicamente relevantes. Sin embargo, se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para verificar que PftTCTP esté implicada en la alteración de la respuesta inmune ante una infección vía efecto sobre los linfocitos B.

Se ha sugerido que PftTCTP podría actuar como mutante dominante negativa de HstTCTP (Hinojosa-Moya et al., 2008); nuestros resultados apoyan la hipótesis que PftTCTP podría interferir con la función de HstTCTP sobre los linfocitos B.

Sin embargo, se requieren más estudios para elucidar si PFTCTP podría bloquear los posibles receptores para HsTCTP o si PFTCTP citosólica podría alterar la actividad de HsTCTP por interferir con las proteínas con las que ésta interactúa.

En el presente estudio se describieron algunas diferencias del efecto de las proteínas recombinantes de HsTCTP y PFTCTP sobre cultivos primarios de linfocitos B. Considerando que durante una infección (malaria) disminuyen las células B (Asito et al., 2011; Scholzen et al., 2013) es posible que PFTCTP esté relacionada con este proceso.

Adicionalmente, con posteriores y diversos estudios, PFTCTP podría ser útil en el control de algunos de los efectos de la malaria sobre el sistema inmune del huésped.

7 CONCLUSIONES

1. HsTCTP presenta las 2 firmas características (TCTP 1 y TCTP 2) en comparación con PftTCTP en la que únicamente se presenta TCTP 2.
2. A nivel de estructura secundaria PftTCTP presenta un porcentaje de identidad del 89% respecto a HsTCTP; sin embargo, en la región de los aminoácidos 20-30 en lugar de presentar una lámina β , como es el caso de HsTCTP, en PftTCTP se presenta la formación de una hélice tipo 3_{10} . La estructura tridimensional de PftTCTP se encuentra más compactada en la región que se ha hipotetizado como sitio de unión o interacción con proteínas G.
3. El efecto de la presencia de PftTCTP recombinante sobre un cultivo primario de linfocitos B de ratón difiere a comparación de HsTCTP. A pesar de que ambas presentan un efecto de inducción de la proliferación de linfocitos B, se encontró una diferencia significativa de la densidad celular viable que presentó el cultivo incubado con HsTCTP (4.3×10^6 cél/mL) a comparación de densidad alcanzada cuando se incubó con PftTCTP (2.4×10^6 cél/mL) bajo las condiciones empleadas.
4. El porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular es diferente para el cultivo de linfocitos B incubado con PftTCTP en comparación con HsTCTP.
5. La incorporación de la proteína PftTCTP se realiza más rápidamente y de forma más eficiente a comparación de HsTCTP.

6. Con los ensayos de incorporación de proteína marcada y los que corresponden a la microscopía confocal, se observó que las proteínas recombinantes de HsTCTP y PftTCTP son capaces de ser introducidas al interior de los linfocitos B, aunque se sugiere que la acumulación de HsTCTP y PftTCTP difiere ya que los puntos de mayor concentración de las proteínas no son los mismos.

8 BIBLIOGRAFÍA

Amzallag N., Passer B.J., Allanic D., Segura E., They C., Goud B., Amson R., Telerman A. (2004) TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 46104-46112.

Asito A.S., Piriou E., Jura W.G., Ouma C., Odada P.S., Ogola S., Fiore N., Rochford R. (2011) Suppression of circulating IgD+CD27+ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya. *Malaria Journal* 10: 362.

Bheekha-Escura R., MacGlashan D.W., Langdon J.M., MacDonald S.M. (2000) Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. *Blood* 96: 2191–2198.

Bhisutthibhan J., Pan X.Q., Hossler P.A., Walker D.J., Yowell C.A., Carlton J., Dame J.B., Meshnick S.R. (1998) The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *The Journal of Biological Chemistry* 273:16192-16198.

Bommer U., Thiele B. (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 379–385.

Bommer U.A. (2012) Cellular function and regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP. *The Open Allergy Journal* 5: 19-32.

Bommer U.A., Borovjagin A.V., Greagg M.A., Jeffrey I.W., Russell P., Laing K.G., Lee M., Clemens M.J. (2002) The mRNA of the translationally controlled tumour protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 8: 478–496.

Chen W., Wang H., Tao S., Zheng Y., Wu W., Lian F., Jaramillo M., Fang D., Zhang D.D. (2013) Tumor protein translationally controlled 1 is a p53 target gene that promotes cell survival. *Cell Cycle* 12: 2321-2328.

De Castro E., Sigrist C.J.A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A., Hulo N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server issue): W362-W365.

De Gunzburg J. (2006) Ras family proteins. Springer Press.

Feng Y., Liu D., Yao H., Wang J. (2007) Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 467: 48–57.

Gachet Y., Tournier S., Lee M., Lazaris-Karatzas A., Poulton T., Bommer U.A. (1999) The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of Cell Science* 112: 1257–1271.

Gachet Y., Tournier S., Millar J.B., Hyams J.S. (2004) Mechanism controlling perpendicular alignment of the spindle to the axis of cell division in fission yeast. *The EMBO Journal* 23: 1289-300.

Gross B., Gaestel M., Boehm H., Bielka H. (1989) cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumour protein. *Nucleic Acids Research* 17: 8367.

Hinojosa-Moya J., Xoconostle-Cázares G.B., Piedra-Ibarra E., Méndez-Tenorio A., Lucas W.J. Ruiz-Medrano R. (2008) Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins. *Journal of Molecular Evolution* 66: 472–483.

Hsu Y., Chern J.J., Cai Y., Liu M., Choi K. (2007) Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445: 775-788.

Innis M.A., Gelfand D.H. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. San Diego.

Jensen L.J., Kuhn M., Stark M., Chaffron S., Creevey C., Muller J., Doerks T., Julien P., Roth A., Simonovic M., Bork P., von Mering C. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D412-416.

Kamath R.S., Fraser A.G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D.P., Zipperlen P., Ahringer J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231–237.

Kang H.S., Lee M.J., Song H., Han S.H., Kim Y.M., Im J.Y., Choi I. (2001) Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. *Journal of Immunology* 166: 6545–6554.

Kawabata T. (2003) MATRAS: a program for protein 3D structure comparison. *Nucleic Acids Research* 31: 3367-3369.

Kim M., Kim M., Kim H.Y., Kim S., Jung J., Maeng J., Chang J., Lee K. (2011) A protein transduction domain located at the NH₂-terminus of human translationally controlled tumor protein for delivery of active molecules to cells. *Biomaterials* 32: 222-230.

Li F., Zhang D., Fujise K. (2001) Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47542–47549.

Liu H., Peng H.W., Cheng Y.S. (2005) Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of MCL-1 by TCTP. *Molecular and Cellular Biology* 25: 3117–3126.

MacDonald S.M., Bhisutthibhan J., Shapiro T.A., Rogerson S.J., Taylor T.E., Tembo M., Langdon J.M., Meshnick S.R. (2001) Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homologue *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10829–10832.

MacDonald S.M., Rafnar T., Langdon J., Lichtenstein L.M. (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269: 688–690.

Norbeck J., Blomberg A. (1997) Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast* 13: 1519-1534.

Parekh V.V., Prasad D.V., Banerjee P.P., Joshi B.N., Kumar A., Mishra G.C. (2003) B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *The Journal of Immunology* 170: 5897-5911.

Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R. (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue): W116-W120.

Rojas-Espinosa O. (2006) *Inmunología (de memoria)*. Editorial Médica Panamericana, 3ª edición.

Sambrook J., Russell D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd Ed. New York, USA.

Schmidt I., Fahling M., Nafz B., Skalweit A., Thiele B.J. (2007) Induction of translationally controlled tumor protein (TCTP) by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *FEBS Journal* 274: 5416-5424.

Scholzen A., Sauerwein R.W. (2013) How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends in Parasitology* 29: 252-262.

Sinha P., Kohl S., Fischer J., Hutter G., Kern M., Kottgen E., Dietel M., Lage H., Schnolzer M., Schadendorf D. (2000) Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 3048–3057.

Su X., Wu Y., Sifri C.D., Wellems T.E. (1996) Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Research* 24: 1574–1575.

- Thaw P., Baxter N.J., Hounslow A.M., Price C., Waltho J.P., Craven C.J. (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nature Structural Biology* 8: 701–704.
- Thiele H., Berger M., Skalweit A., Thiele B. J. (2000) Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *European Journal of Biochemistry* 267: 5473–5481.
- Tusting L.S., Willey B., Lucas H., Thompson J., Kafy H.T., Smith R., Lindsay S.W. (2013) Socioeconomic development as an intervention against malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 382: 963–972.
- Tuteja R. (2007) Malaria - an overview. *FEBS Journal* 274: 4670–4679.
- Tuynder M., Susini L., Prieur S., Besse S., Fiucci G., Amson R., Telerman A. (2002) Biological models and genes of tumour reversion: Cellular reprogramming through *tpt1/TCTP* and *SIAH-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14976–14981.
- Vedadi M., Lew J., Artz J., Amani M., Zhao Y., Dong A., Wasney G.A., Gao M., Hills T., Brox S., Qiu W., Sharma S., Diassiti A., Alam Z., Melone M., Mulichak A., Wernimont A., Bray J., Loppnau P., Plotnikova O., Newberry K., Sundararajan E., Houston S., Walker J., Tempel W., Bochkarev A., Koziaradzki I., Edwards A., Arrowsmith C., Roos D., Kain K., Hui R. (2007) Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Molecular Biochemistry and Parasitology* 151:100–110.
- Walker D. J., Pitsch J. L., Peng M. M., Robinson B. L., Peters W., Bhisutthibhan J., Meshnick S. R. (2000) Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrobiology Agents and Chemotherapy*. 44: 344–347.
- Yarm F.R. (2002) Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and Cellular Biology* 22: 6209–6221.

Zhang D., Li F., Weidner D., Mnjoyan Z.H., Fujise K. (2002) Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37430–37438.

Anexos

Anexo 1. Predicción y alineamiento de la estructura secundaria de TCTP de diferentes especies de plasmodium en comparación con *S. pombe*.

```

Conservation:          955599555599559959 5 5555 559959559555555555 9
TCTPspombe           1  MLLYKDVISGDELVSDAYDLKEVD-----DIVYEADCQMVTVKQGGDVD 44
TCTPpchabaudi        1  MKVYKDIFTNDEVCSDSYAQEDPFGNPEFREIAFEVKS NKRIKGN D---D 47
TCTPpberghei         1  MKVYKDIFTNDEVCSDSYIQEDPFGNAEFREIAFEVKS NKRIKGN D---D 47
TCTPpyoelii          1  MKVYKDIFTNDEVCSDSYIQEDPFGNPEFREIAFEVKS NKRIKGN D---D 47
TCTPpfalci parum     1  MKVFKDVF TNDEVCSDSYVQQDPFEVPEFREIAFEVKS NKRIKGN E---D 47
TCTPpknowlesi        1  MKVYKDVF TNDEVCSDSYNQEDPFGIADFREIAFEVKS NKRIKGN D---D 47
TCTPpvivax           1  MKVYKDVF TNDEVCSDSYNQEDPFGIADFREIAFEVKS NKRIKGN D---D 47
Consensus_aa:        MbLYKDLhosDElhSDtYsbc-s...s-FR-Ih@Ehctpb.h..ps...D
Consensus_ss:        eeeee     eeee     eee     eeeeeeeeeeee
  
```

```

Conservation:          595555595955555559 955595995955955599595 9595595
TCTPspombe           45  IGANPSAEDAEENAEETETVNNLVYSFRLSPTSFDKKSYSYIKGYMKA 94
TCTPpchabaudi        48  YGIADNSEDAVEGMGADVEHVIDIVDSFQLTSTLSKKEYSAYVKNFMQR 97
TCTPpberghei         48  YGIADNSEDAVEGMGADVEHVIDIVDSFQLTSTLSKKEYSAYVKNFMQR 97
TCTPpyoelii          48  YGIADNSEDAVEGMGADVEHVIDIVDSFQLTSTLSKKEYSAYVKNFMQR 97
TCTPpfalci parum     48  YGIADNSEDAVEGMGADVEHVIDIVDSFQLTSTAFSKKEYSAYIKNYMQK 97
TCTPpknowlesi        48  YGIADNSEEAVDGMGADVEQVIDIVDSFQLTSTLSKKEYSVYIKNYMQK 97
TCTPpvivax           48  YGIADNSEEAVDGMGADVEQVIDIVDSFQLTSTLSKKEYSVYIKNYMQK 97
Consensus_aa:        hGhssstEDA.-sh..shEhV.sIv.SFpLosTshsKKpY.tYlKs@Mp.
Consensus_ss:        hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh eee hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
  
```

```

Conservation:          5 5 959559 99 59555955559599599595995999595595 5
TCTPspombe           95  IKARLQESNPERVPVFEKNAIGFVKILANFKDYDFYIGESMDPDAMVVL 144
TCTPpchabaudi        98  ILKHLEEKKPDRVEIFKTKAQPLIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMEAGLIY 147
TCTPpberghei         98  ILKHLEEKKPDRVNIFKTKAQPLIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMEAGLIY 147
TCTPpyoelii          98  ILKHLEEKKPDRVDIFKTKAQPLIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMEAGLIY 147
TCTPpfalci parum     98  VAKYLEEKKPDRVEIFKTKAQPFIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMEAGIY 147
TCTPpknowlesi        98  ILKYLEEKKPDRVDVFKTKAQPLIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMDAGLTY 147
TCTPpvivax           98  ILKYLEEKKPNRVEVFKTKAQPLIKHILTNFDDDFEFYMGESLDMDAGLTY 147
Consensus_aa:        Ib..LpEppP-RV.lFcppAbshIK+ILhNFCD@-FYhGEShd.-A.llh
Consensus_ss:        hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh eee hheeee
  
```

```

Conservation:          5595555599555555999 5995
TCTPspombe           145 MNYREDGITPYMIFFKDGLVSEKF 168
TCTPpchabaudi        148 SYKGEETPRFVYISDGLFEEKY 171
TCTPpberghei         148 SYKGEETPRFVYISDGLFEEKY 171
TCTPpyoelii          148 SYKGEETPRFVYISDGLFEEKY 171
TCTPpfalci parum     148 SYKGEETPRFVYISDGLFEEKY 171
TCTPpknowlesi        148 SYKGEETPRFVYISDGLYEEKY 171
TCTPpvivax           148 SYKGEETPRFVYISDGLYEEKY 171
Consensus_aa:        ..Y+.-.ITP.hl@hpDGLhpEK@
Consensus_ss:        ee eeeeeee eee
  
```

The *Plasmodium falciparum* Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Is Incorporated More Efficiently into B Cells than Its Human Homologue

Berenice Calderón-Pérez¹, Beatriz Xoconostle-Cázares¹, Rosalía Lira-Carmona², Rosaura Hernández-Rivas³, Jaime Ortega-López¹, Roberto Ruiz-Medrano^{1*}

1 Department of Biotechnology and Bioengineering CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico, **2** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, CMN Siglo XXI IMSS, México City, Mexico, **3** Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

Abstract

Plasmodium falciparum secretes a homologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) into serum of infected individuals, although its role in pathogenesis or virulence is unknown. To determine the effect of *P. falciparum* TCTP on B cells as compared to human TCTP, fluorescently labeled proteins were incubated on primary cultures of mouse splenic B cells and analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. Our results indicate that both recombinant proteins are incorporated into B cells, but differ significantly in their rate and percentage of incorporation, being significantly higher for *P. falciparum* TCTP. Furthermore, *P. falciparum* TCTP showed a lower B cell proliferative effect than human TCTP, suggesting a mechanism through which the former could interfere in the host's immune response.

Citation: Calderón-Pérez B, Xoconostle-Cázares B, Lira-Carmona R, Hernández-Rivas R, Ortega-López J, et al. (2014) The *Plasmodium falciparum* Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Is Incorporated More Efficiently into B Cells than Its Human Homologue. PLoS ONE 9(1): e85514. doi:10.1371/journal.pone.0085514

Editor: Georges Snounou, Université Pierre et Marie Curie, France

Received: September 23, 2013; **Accepted:** November 27, 2013; **Published:** January 17, 2014

Copyright: © 2014 Calderón-Pérez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by CONACyT México grants Nos. 50769 to RR-M and 105985 to BX-C. BC-P was supported by a CONACyT doctoral fellowship and an ICyT-DF grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rmedrano@cinvestav.mx

Introduction

The translationally controlled tumor protein (TCTP) is a ubiquitous protein in eukaryotes involved in several biologically relevant processes such as cell growth and reprogramming, cell cycle progression, malignant transformation, inhibition of apoptosis, cell shape and protection against stress conditions [1,2]. Recent evidence indicates that TCTP is a central mitotic regulator in plants and animals, which underlines the functional conservation of this protein family [3].

Cytokine-like functions have been established for TCTP. Human TCTP (HsTCTP) displays an IgE-dependent histamine releasing activity in basophil cells and thus may be an important factor in triggering allergies [4]. TCTP induces the production of IL-4 and IL-13 in basophils, causing chemotaxis and IL-8 secretion from eosinophils [5,6]. Additionally, this protein enhances B cell proliferation and increases synthesis of mainly IgM from murine splenic B cells [7]. TCTP also stimulates the secretion of IL-8 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in primary cultures of human bronchial epithelial cells [8]. A homologue of TCTP with mast cell/basophil histamine-releasing activity has been described in *Plasmodium falciparum*, the causal agent of malaria. It can be found in serum of infected individuals at concentrations as high as 7 µg/mL, although its role in disease is not clear and is not always detected in such instances [9,10]. Additionally, it has been demonstrated that recombinant *P. falciparum* TCTP (PfTCTP) *in vitro* stimulates histamine release from basophils and IL-8 secretion from eosinophils [9].

PfTCTP (Genbank Accession No. XP_001351667, PDB Accession No. 3P3K) shares 34% identity and 59% similarity with HsTCTP (Genbank Accession No. NP_003286, PDB Accession No. 1YZ1), although the structure of these proteins is quite conserved. However, a closer inspection of their structures reveals subtle differences between them. Indeed, PfTCTP three-dimensional structure revealed the presence of an extra α -helix in the segment encompassing amino acid residues 22–30, close to the proposed GTPase binding pocket [11–13]. These differences support the notion that PfTCTP displays an altered activity relative to its host's TCTP. Malarial TCTP could have a role in blocking the normal immune response if it displays a null or decreased B-cell activation, thus functioning as dominant negative mutant [12].

In the present study, we report the effect of recombinant PfTCTP on splenic B cell proliferation compared to HsTCTP. Our results suggest that PfTCTP induces B cell proliferation to lower levels than its human counterpart. Furthermore, B cells show an enhanced affinity for PfTCTP, thus indicating that this would effectively block the action of host TCTP. Thus, this protein could be used to further understand the mechanisms through which *Plasmodium* causes disease, as well as for the development of new strategies to control malaria.

Materials and Methods

All animal procedures were conducted according to Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee Guidelines. The

protocol was analyzed and approved by the Bioethics Committee of the Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnical Institute (Protocol No. 063-12). <http://picual.cinvestav.mx> (Integral Administration System for the Use and Care of Laboratory Animals). Anesthesia was applied using inhaled isoflurane, 100 µg/Kg. Animals were euthanized through the use of a CO₂ chamber, inhaled for 10 minutes and all efforts were made to minimize suffering.

Cloning of *Plasmodium falciparum* TCTP (PfTCTP) and human TCTP (HsTCTP)

P. falciparum blood stage parasites from the 3D7 strain were cultured essentially as previously described [14]. Poly A+ RNA was obtained from these parasites using Oligotex Direct mRNA Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. 50 ng of poly A+ RNA was reverse transcribed to cDNA with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) using random primers. For HsTCTP, total RNA was extracted from human peripheral blood using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 100 ng of total RNA was reverse transcribed to cDNA with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with random primers.

The coding regions of PfTCTP (GenBank Accession No. XM_001351631) and HsTCTP (GenBank Accession No. NM_003295) were obtained from the *Plasmodium* cDNA and human cDNA and by PCR using the following gene-specific primers, respectively: forward primers, PfTCTP FOR 5'-CGGGATCCATGAAAGTATTTAAAGAC-3' and HsTCTP FOR 5'-CGGGATCCATGATTATCTACCGGGAC-3' (the BamHI restriction site is underlined and the initiation codon is in bold); reverse primers, PfTCTP REV 5'-GGAATTCCTTAATTTTTCTTCAAAA-3' and HsTCTP REV 5'-GGAATTCCTAACATTTTTCCATTTTC-3' (the EcoRI restriction site is underlined and the termination codon in bold). The amplified products were digested with BamHI and EcoRI enzymes (Fermentas) and cloned in frame in the pProEX HTb vector (Invitrogen) in order to be expressed fused to a 6 histidine sequence (His)₆ for affinity purification. The correct construction was confirmed by DNA sequencing.

Protein expression and purification

E. coli strain DH5α containing PfTCTP or HsTCTP in pProEX HTb was grown in 2TY medium (16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl) with 100 µg/L ampicillin at 37°C. Protein expression was induced by the addition of 60 µM IPTG (Gold Biotechnology) at 0.7 of optical density (OD) at 600 nm and the culture was incubated for 18 h at 30°C. The cells were centrifuged, lysed by thaw-freeze cycles and disrupted by 3 cycles of sonication in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) based buffer. The supernatants were filtered with a 0.45-µm pore size filter, and the (His)₆-PfTCTP and (His)₆-HsTCTP recombinant fusion proteins were isolated using the HIS-Select Nickel Affinity Column (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. Endotoxin was removed using a PMB-agarose column (Sigma-Aldrich) according to the method recommended by the manufacturer.

Labeling recombinant TCTP

PfTCTP and HsTCTP recombinant purified proteins were labeled for the cell proliferation assay using an Oregon Green 488 protein labeling kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. After the labeling reaction of 1 mg of each recombinant protein, the conjugates were purified using a

purification column and the degree of labeling was determined for each protein. Additionally, 1 mg of recombinant PfTCTP was also labeled with Alexa Fluor 594 protein labeling kit (Molecular Probes) for the confocal microscopy analysis following the manufacturer's instructions.

Isolation of splenic B cells

Splenic B cells were isolated from 4 seven-week-old BALB/c mice using the B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) by negative selection according the method suggested by the manufacturer. Red blood cells were removed by treatment with RBC lysis buffer (Sigma). Non B-cells were indirectly magnetically labeled with a cocktail of antibodies against CD43 (Ly-48), CD4 (L3T4) and Ter-119. Isolation of B cells was achieved by depletion of magnetically labeled cells. The purity of B cells (CD45R B220-positive population) was ≈95%.

Splenic B cell proliferation assay

Isolated splenic B cells (2×10^6 cells/well) were plated on 6-well flat-bottom microtiter plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and incubated with 10 µg/mL of fluorescently labeled PfTCTP or HsTCTP with Oregon Green 488 for 24–120 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. LPS (Sigma) at a final concentration of 1 µg/mL was used as positive control, while untreated and phosphate buffer-treated B cells were used as negative controls. Two independent experiments performed in duplicate were carried out. After each incubation time, viable B cell density was measured with an Automated Cell Counter (Invitrogen) and the incorporation of fluorescently-labeled of PfTCTP and HsTCTP into splenic B cells was analyzed by flow cytometry (FACS). A total of 20000 events/well were acquired on a FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) using Cell Quest Pro software. Cell cycle distributions of fluorescent-positive cells were analyzed using Cell Quest Pro software; the FACS fluorescence signal was divided into four different areas corresponding to apoptosis, G1, S and G2/M phases with respect to the DNA content, and the cells in each area were counted and expressed as the percentage of total fluorescent-positive population.

Localization of HsTCTP and PfTCTP in B cells

To determine the localization of the recombinant proteins, isolated splenic B cells (2×10^5 cells/well) were plated on 96-well flat bottom microtiter plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Cells were incubated with 1 µg/mL of LPS (Sigma) for 24 h at 37°C and 5% CO₂. After incubation, B cells were washed with PBS1x and incubated for 30 min on ice with 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer, as negative control, or 50 ng/mL of recombinant protein HsTCTP labeled with Oregon Green 488 (green) fluorochrome and/or 50 ng/mL of PfTCTP labeled with Alexa Fluor 594 (red) dye. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS solution for 20 min at 4°C. These were observed with a multiphotonic confocal microscope model SP5 (Leica) at 60× magnification. Images were processed and analyzed using the LAS AF software (Leica). At least 100 cells were visualized for each treatment.

Statistical analysis

For statistical analysis of data, *p* value was analyzed using the paired Student's *t* test program (R Statistical Software 3.0.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [15]. Results were considered statistically significant when *p*<0.05.

Results

Effect of *P. falciparum* and human TCTP on splenic B cell proliferation

The effect of PfTCTP or HsTCTP on B cells was determined by incubation of Oregon Green 488-labeled recombinant proteins on a primary culture of negatively-selected mouse splenic B cells and measurement of viable cell density with an automated cell counter. As shown in Figure 1, there is a statistical significant difference between cell density of splenic B cells treated with HsTCTP and PfTCTP from 72 h to 120 h. HsTCTP elicits the highest level of B cell proliferation after a 120 h interval. Indeed, PfTCTP, while capable of inducing proliferation, showed almost 45% lower B cell stimulatory effect than HsTCTP at 120 h. There was a significant difference between the viable B cell density elicited by HsTCTP (4.3×10^6 cells/mL $\pm 4.5\%$) and PfTCTP (2.4×10^6 cells/mL $\pm 4.2\%$) recombinant proteins under the conditions tested at 120 h [$t(1.47) = 8.49$, $p = 0.03166$]. The viable cell density of untreated splenic B cells or those incubated with 20 mM phosphate buffer underwent a steady decline throughout the same period.

Incorporation of fluorescently-labeled of PfTCTP and HsTCTP into splenic B cells

Mouse splenic B cells incubated with HsTCTP or PfTCTP fluorescently-labeled protein, as previously described, were subjected to flow cytometry to assess the incorporation of the recombinant proteins into these cells and the proportion of labeled cells in each cell cycle phase (Table 1). At 24 h, incorporation of PfTCTP into splenic B cells was already 32% higher than HsTCTP. Indeed, at 72 h and 96 h, the percentage of PfTCTP incorporated into B cells was statistically significantly different

compared with the incorporation percentage of HsTCTP with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. On the other hand, from 72 h to 120 h a very small increase in the percentage of incorporation of HsTCTP was observed (from 38.1% ± 3.0 to 54.9% ± 0.3 of total protein input). In contrast, incubated B cells with PfTCTP reached 96.4% ± 0.9 of incorporation of total recombinant protein input. Regarding cell cycle progression, the percentage of fluorescently labeled B cells in each cellular phase was different during the 120 h interval. B cells labeled with HsTCTP showed a higher proportion of cells in the G1 phase at almost all time intervals assessed. In contrast, the percentage of labeled apoptotic B cells containing PfTCTP recombinant protein was higher compared to HsTCTP.

Localization of HsTCTP and PfTCTP in B cells

Splenic B cells were incubated with HsTCTP labeled with Oregon Green and/or PfTCTP labeled with Alexa Fluor (red) and analyzed through confocal and bright field microscopy.

The results shown in Figure 2 indicate that both proteins indeed attached to B cells after 30 min incubation with either of the labeled proteins. Interestingly, both are internalized into these cells quite efficiently; however, the localization of both does not overlap completely.

As can be observed in Figure 2B, fluorescent signal from HsTCTP was different compared with PfTCTP fluorescent signal when incubated simultaneously. PfTCTP showed a diffuse distribution throughout the whole cytoplasm. The images obtained were analyzed with LAS AF software (Leica) and found that the overlap correlation for both proteins range from 0.5 to 0.6 when recombinant proteins were incubated simultaneously.

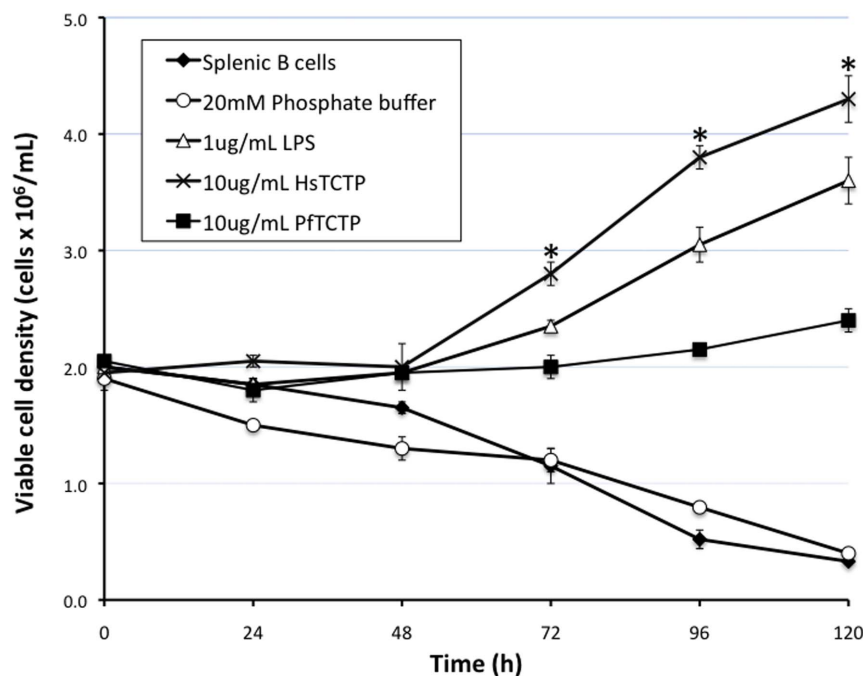


Figure 1. Effect of recombinant TCTP on B cell proliferation. Splenic B cells (2×10^6 cells/well) were plated with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and incubated with 10 μ g/mL of recombinant HsTCTP or PfTCTP labeled with Oregon Green 488 (green) fluorochrome for 24–120 h at 37°C and 5% CO₂. LPS (1 μ g/mL) was used as positive control. Untreated and 20 mM phosphate buffer-treated B cells were used as negative controls. Viable B cell density was measured with a Countess Automated Cell Counter. Results are representative of two independent experiments and are expressed as the mean \pm SD of duplicate cultures. *, $p < 0.05$ vs 10 μ g/mL labeled PfTCTP treated B cells. doi:10.1371/journal.pone.0085514.g001

Table 1. Effect of recombinant TCTP in the progression of cell cycle from B cells.

Time (h)	Ap	G1	S	G2M	Incorporation	
0	HsTCTP	0.0±0.0	81.7±3.5	8.5±1.1	9.7±2.4	3.7±0.3
	PfTCTP	0.0±0.0	71.3±5.3	10.9±3.3	17.8±2.1	1.7±0.1
24	HsTCTP	34.7±2.4	53.5±3.4	8.4±1.2	3.4±0.2	22.5±2.5
	PfTCTP	43.3±3.4	48.8±1.2	6.0±1.8	2.0±0.4	33.0±1.2
48	HsTCTP	10.8±3.3	43.5±4.8	26.1±1.5	19.6±0.1	33.9±1.0
	PfTCTP	35.9±4.0	37.2±3.7	20.7±1.6	6.3±1.9	43.6±0.8
72	HsTCTP	14.1±1.5	33.8±1.5	29.8±1.3	22.3±1.3	38.1±3.0
	PfTCTP	43.6±0.5	32.8±0.2	14.0±0.4	9.6±0.2	52.4±0.9
96	HsTCTP	26.0±2.3	46.5±2.7	13.9±0.6	13.5±1.1	39.0±0.7
	PfTCTP	41.4±3.4	34.6±0.3	20.1±3.7	3.8±0.1	72.4±2.1*
120	HsTCTP	50.8±4.3	37.1±3.3	8.3±0.8	3.8±0.2	54.9±0.3
	PfTCTP	61.3±6.9	19.3±2.2	17.0±4.0	2.4±0.7	96.4±0.9**

Splenic B cells (2×10^6 cells/well) were plated with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and incubated with 10 μ g/mL of recombinant HsTCTP or PfTCTP labeled with Oregon Green 488 (green) fluorochrome for 24–120 h at 37°C and 5% CO₂. The percentage of cell cycle distribution and incorporation of fluorescently-labeled PfTCTP and HsTCTP into splenic B cells was analyzed by flow cytometry (FACS). Results (%) are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations. One of two similar experiments is shown. Incorporation, percentage of incorporation of fluorescently-labeled protein into B cells.

*, $p < 0.05$ vs 10 μ g/mL labeled HsTCTP treated B cells

***, $p < 0.01$ vs 10 μ g/mL labeled HsTCTP treated B cells

doi:10.1371/journal.pone.0085514.t001

Discussion

TCTP is a central conserved regulator of growth in eukaryotes, with diverse functions in different organisms. However, the function of secreted forms of this protein is unclear and whether in multicellular eukaryotes this protein is secreted in a tissue- or cell-type-specific manner, as is likely the case in vertebrates.

PfTCTP, as well as several other forms of TCTP belonging to blood-borne parasites, are secreted to the bloodstream of its vertebrate hosts and it is reasonable to assume that it may have a role in pathogenicity and virulence [16]. However, a direct role in such processes has not been found yet. Recently, the capacity of PfTCTP to elicit histamine release and enhanced reactivity of basophils in malaria patients has been described, suggesting that it may be involved in inflammation [9,10]. This could contribute to pathogen survival and/or spread within its host.

It has been found that indeed *Plasmodium* TCTP and human TCTP show structural variations, particularly in the domain encompassing residues 22–30 near the NH₂ terminus, which is a β strand in HsTCTP, while in *Plasmodium knowlesi* TCTP is an α helix [12]. Intriguingly, the predicted secondary structure of TCTPs from other members of the *Plasmodium* genus suggests that this variation is conspicuous in this species (data not shown), since no β strand is predicted in this same sequence stretch, in contrast to all other TCTPs. According to a previous study in our group, the structural variation between these proteins also causes a more general structural distortion in the putative G-protein binding pocket of PfTCTP [12]. It must be mentioned that some studies have found a link between this potential structure and the function of TCTP, while others have failed to find a G-protein binding activity [17–20]. Nonetheless, there is sufficient evidence to suggest that the aforementioned pocket is necessary for TCTP

function, although not necessarily via GTP replenishment of G-proteins.

In order to determine whether PfTCTP displays similar capabilities relative to HsTCTP that acts as B cell growth factor [7], viable B cell density and incorporation of fluorescently-labeled proteins were determined. Our results indicate that PfTCTP showed a lower B cell stimulatory effect than HsTCTP. Flow cytometry analyses revealed that both recombinant proteins are incorporated into splenic B cells, but differed significantly on the rate and percentage of incorporation. Mouse splenic B cells incorporated PfTCTP recombinant protein in a higher rate and reached 96% of protein input incorporation. According to our confocal results, both recombinant proteins are internalized within B cells, and can be accumulated in different cell compartments since PfTCTP showed a diffuse distribution throughout the whole cytoplasm.

Considering that *Plasmodium* TCTP may act like a dominant negative mutant during infection [12], our results could have interesting implications. PfTCTP is present in serum of infected individuals at high concentrations and can induce histamine release [9]; nevertheless, according to our results, it shows a lower B cell stimulatory effect compared with HsTCTP. In addition to this, splenic B cells showed a more efficient and faster incorporation of PfTCTP than HsTCTP. More detailed *in vitro* and *in vivo* assays are required to verify whether PfTCTP is implicated in preventing the onset of the immune response over an infection. It must be considered that the homology between the human and mouse TCTP is close to 96%, therefore it is probable that the latter shows similar effects and therefore the results observed in this work are biologically relevant.

TCTP lacks a signal peptide and requires a transmembrane protein for its secretion. Furthermore, a specific sequence in this protein is sufficient for its export [21]. It is not clear what fraction of the intracellular pool of TCTP is secreted, and if so, which factors trigger such release and the tissue-specificity of this process. On the other hand, there is no information regarding the putative receptor for secreted TCTP in basophils or B cells. TCTP contains a protein transduction domain (PTD) which allows for its internalization [22]. This domain is located in the NH₂-terminus of the protein (probably amino acids 1–10). Interestingly, this domain is part of a β -strand, which in *P. knowlesi* and *P. falciparum*, but not in HsTCTP or *Schizosaccharomyces pombe*, lies partially behind the putative G-protein binding pocket [11,12]. This structural alteration could result in both a more efficient internalization of PfTCTP and in its lower proliferative activity. Our results suggest that PfTCTP could interfere with the action of HsTCTP, although additional work is required to elucidate whether PfTCTP could block the potential receptors for HsTCTP or if cytosolic PfTCTP could interfere with the action of HsTCTP through titration of its interaction partners. It has been shown that TCTP requires dimerization in order to function as an extracellular cytokine [23], and our PfTCTP and HsTCTP preparations are most likely monomers. However, TCTP can be found in sera of healthy and asthmatic individuals as both monomers and dimers [23]. Furthermore monomers of TCTP are capable of activating B cell proliferation, so their presence in sera have probable biological significance [7].

In the present study we have found some differences on the effect of human TCTP and PfTCTP recombinant proteins on primary cultures of mouse splenic B cells. Considering that during malaria memory B cells suffer a decrease [24,25], it is possible that PfTCTP could be also involved in this process. Our data thus also hint to a therapy targeting PfTCTP that may be helpful

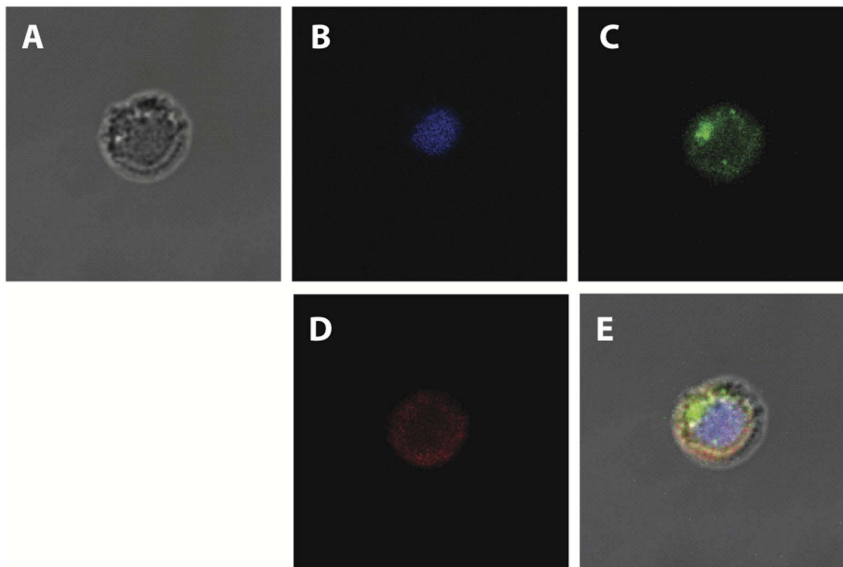


Figure 2. Localization of incorporated TCTP in B cells. Confocal microscopy analysis of negatively isolated B cells (2×10^5 cells/well) incubated 30 min with 50 ng/mL of recombinant HsTCTP labeled with Oregon Green 488 dye (green) and 50 ng/mL of recombinant PfTCTP labeled with Alexa Fluor 594 dye (red). Representative images are shown. A. Bright field. B. DAPI staining C. Green fluorescence. D. Red fluorescence. E. Merge. doi:10.1371/journal.pone.0085514.g002

to control some of the effects of malaria on the host immune system. On the other hand, PfTCTP could be engineered to further enhance its ability to bind splenic B cells and, at the same time, to block proliferation. This could open new avenues to treat cancer.

References

- Bommer U, Thiele B (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 36: 379–385. PubMed: 14687915.
- Nagano-Ito M, Ichikawa S (2012) Biological effects of mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis. *Biochem Res Int* 2012: 204960–67. doi: 10.1155/2012/204960. PubMed: 22675633.
- Brioudes F, Thierry AM, Chambrier P, Mollereau B, Bendahmane M (2010) Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 16384–16389. doi: 10.1073/pnas.1007926107. PubMed: 20736351.
- MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269: 688–690. PubMed: 7542803.
- Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald SM (1997) Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *J Immunol* 159: 447–452. PubMed: 9200485.
- Bheekha-Escura R, MacGlashan DW, Langdon JM, MacDonald SM (2000) Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. *Blood* 96: 2191–2198. PubMed: 10979965.
- Kang HS, Lee MJ, Song H, Han SH, Kim YM, et al. (2001) Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. *J Immunol* 166: 6545–6554. PubMed: 11359806.
- Yoneda K, Rokutan K, Nakamura Y, Yanagawa H, Kondo-Teshima S, et al. (2004) Stimulation of human bronchial epithelial cells by IgE-dependent histamine-releasing factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L174–181. PubMed: 12948934.
- MacDonald SM, Bhisuthibhan J, Shapiro TA, Rogerson SJ, Taylor TE, et al. (2001) Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homologue *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10829–10832. PubMed: 11535839.
- Pelleau S, Diop S, Dia Badiane M, Vitte J, Beguin P, et al. (2012) Enhanced basophil reactivities during severe malaria and their relationship with the *Plasmodium falciparum* histamine-releasing factor translationally controlled tumor protein. *Infect Immun* 80: 2963–2970. doi: 10.1128/IAI.00072-12. PubMed: 22753372.
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, et al. (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 8: 701–4. PubMed: 11473261.
- Hinojosa-Moya J, Xoconostle-Cázares B, Piedra-Ibarra E, Méndez-Tenorio A, Lucas WJ, et al. (2008) Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor protein. *J Mol Evol* 66: 472–483. doi: 10.1007/s00239-008-9099-z. PubMed: 18392759.
- Eichhorn T, Winter D, Büchele B, Dirdjaja N, Frank M, et al. (2013) Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 85: 38–45. doi: 10.1016/j.bcp.2012.10.006. PubMed: 23085438.
- Nunes MC, Goldring JP, Doerig C, Scherf A (2007) A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol* 63: 391–403. PubMed: 17181785.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Gnanasekar M, Rao KV, Chen L, Narayanan RB, Geetha M, et al. (2002) Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 107–118. PubMed: 11985867.
- Hsu Y, Chern JJ, Cai Y, Liu M, Choi K (2007) Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445: 785–788. PubMed: 17301792.
- Wang X, Fonseca BD, Tang H, Liu R, Elia A, et al. (2008) Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biol Chem* 283: 30482–30492. doi: 10.1074/jbc.M803348200. PubMed: 18676370.
- Rehmann H, Brüning M, Berghaus C, Schwarten M, Köhler K, et al. (2008) Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. *FEBS Lett* 582: 3005–3010. doi: 10.1016/j.febslet.2008.07.057. PubMed: 18692051.
- Dong X, Yang B, Li Y, Zhong C, Ding J (2009) Molecular basis of the acceleration of the GDP-GTP exchange of human ras homolog enriched in brain by human translationally controlled tumor protein. *J Biol Chem* 284: 23754–23764. doi: 10.1074/jbc.M109.012823. PubMed: 19570981.
- Amzallag N, Passer BJ, Allanic D, Segura E, Thery C, et al. (2004) TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem* 279: 46104–46112. PubMed: 15319436.
- Kim M, Kim M, Kim HY, Kim S, Jung J, et al. (2011) A protein transduction domain located at the NH₂-terminus of human translationally controlled tumor

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RRM BXC. Performed the experiments: BCP BXC RRM. Analyzed the data: BCP BXC RLC RHR JOL RRM. Contributed reagents/materials/analysis tools: BXC RHR JOL RRM. Wrote the paper: BCP BXC RRM.

- protein for delivery of active molecules to cells. *Biomaterials* 32: 222–230. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.077. PubMed: 20863558.
23. Kim M, Min HJ, Won HY, Park H, Lee JC, et al. (2009) Dimerization of translationally controlled tumor protein is essential for its cytokine-like activity. *PLoS One* 4: e6464. doi: 10.1371/journal.pone.0006464. PubMed: 19649253.
24. Asito AS, Piriou E, Jura WG, Ouma C, Odada PS, et al. (2011) Suppression of circulating IgD+CD27+ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya. *Malar J* 10: 362. doi: 10.1186/1475-2875-10-362. PubMed: 22166136.
25. Scholzen A, Sauerwein RW (2013) How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends Parasitol* 29: 252–262. doi: 10.1016/j.pt.2013.03.002. PubMed: 23562778.