

## Trabajos

---

### Modelado Tridimensional de la Proteína Telomerasa Transcriptasa Inversa Humana

---

RECIBIDO: 2/7/07

ACEPTADO: 13/9/07

**Galán Romano F.S.<sup>1</sup> • Sferco S.J.<sup>1,2</sup>**

1. Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.

2. INTEC (CONICET-UNL), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina.

**RESUMEN:** Se presentan modelos tridimensionales de la proteína TERT humana completa, obtenidos utilizando servidores disponibles en la web, que implementan las mejores técnicas disponibles en la actualidad de modelado de proteínas por fold recognition. Los modelos seleccionados predicen una superestructura formada por pequeñas hélices alfas, que tiene la forma de una banda que tiende a cerrarse en un círculo, con una concavidad a lo largo de toda su parte media. Dos de los modelos obtenidos permiten comprender la mayor parte de la información experimental disponible sobre esta proteína, así como la interpretación de su funcionamiento según un esquema teórico propuesto anteriormente. Nuestros modelos permiten además, imaginar sitios alternativos de interacción con la contraparte de ARN de esta proteína, así como su unión a ADN.

**PALABRAS CLAVE:** Telomerasa, hTERT, modelado molecular.

**SUMMARY:** Tridimensional models for the full human TERT protein are presented, using the best performance fold recognition web servers currently available. The select models predict a superstructure formed by small alpha helices folded in such a way that tends to form a circle with a concavity along all its medium part. Two obtained models allow to understand all the available experimental information about this protein, as well as to interpret its functioning according to a theoretical scheme previously proposed. Furthermore, our models allow to consider alternative sites for the interaction with the RNA subunit as well as DNA.

**KEY WORDS:** Telomerase, hTERT, molecular modelling.

## I. Introducción

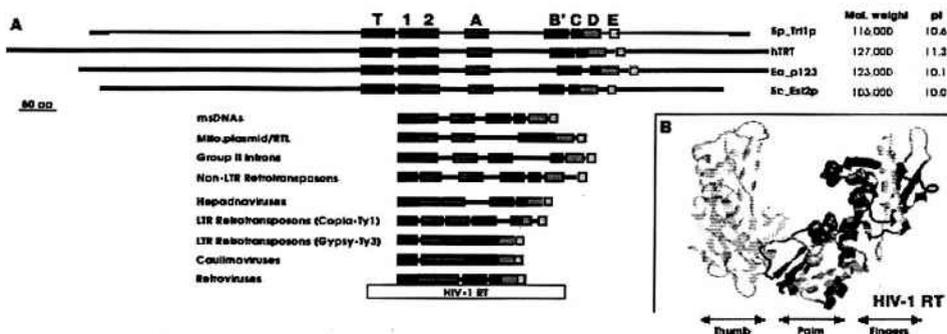
La telomerasa humana es una ribonucleoproteína compuesta por dos subunidades: una proteica, llamada Telomerasa Transcriptasa Inversa (hTERT, Telomerase Reverse Transcriptase, por sus siglas en inglés) y la otra compuesta por ARN, llamada Telomerasa RNA (hTR), que contiene la plantilla esencial para la síntesis de las repeticiones teloméricas. La telomerasa se encarga de agregar los telómeros en los extremos de las moléculas de ADN. Estos, son oligómeros repetidos de TTAGGG, cuya secuencia simple de nucleótidos se repite en los extremos de los cromosomas hasta un total de cientos de pares de bases en levaduras y protozoos y unos miles de pares de bases en vertebrados. Esto protege a los extremos de ADN de ataques de exonucleasas y permite una replicación de los cromosomas sin pérdida de información genética. Sin embargo, dado que la mayoría de las células somáticas carecen de telomerasa, los telómeros se acortan con cada ciclo celular, ocurriendo este proceso en paralelo con el envejecimiento celular. La pérdida completa de telómeros produce la muerte celular programada.(1,2) Estudios en ratones deficientes en telomerasa muestran un envejecimiento prematuro y un descenso en la proliferación potencial de la población de células madres de individuos adultos.(3)

La subunidad TR de la telomerasa es diferente en cada especie aunque manteniendo similitud en la estructura del núcleo, mientras que la TERT es conservada dentro de las eucariotas.(4) La hTR se expresa constitutivamente haya o no actividad telomérica en las células, mientras que la subunidad hTERT esta casi siempre ausente en las células normales humanas,(3,5) encontrándose solo presente en células madres y células germinales, donde los niveles

no son suficientes para prevenir el acortamiento progresivo de los telómeros con la edad.(3) Por otra parte, se ha encontrado que la hTERT se expresa en más del 85% de las células tumorales humanas así como también en líneas celulares inmortales,(6,7) permitiendo entender de este modo el mecanismo para la inmortalidad celular. Esto también permite considerar el bloqueo de la hTERT como una de las acciones posibles para reducir los procesos cancerígenos.

La TERT humana es una proteína constituida por 16 exones, que contabilizan 1132 aminoácidos, mientras que su contraparte de ARN está constituida por 451 nucleótidos.(2) Se puede considerar que la hTERT es una transcriptasa inversa (RT) especializada que, a diferencia de otras transcriptasas inversas comunes en virus, lleva unida a sí misma el propio molde de ARN para su transcripción en el ADN cromosómico. El dominio catalítico RT de la hTERT contiene motivos que también están presentes en dominios catalíticos de otras RTs, así como en el HIV-1, tal como se muestra en la Fig. 1A. La Fig. 1B muestra la estructura tridimensional experimental del dominio RT de HIV-1, que puede considerarse como una guía posible de la estructura tridimensional del dominio RT de hTERT, que no es experimentalmente conocida.

**Figura 1:** (A) Esquema comparativo de motivos en las secuencias de diversas telomerasas, retrotransposones, retrovirus y en el HIV-1 RT. La hTERT en este gráfico está mencionada como hTRT. (B) Estructura cristalina de la subunidad p66 de HIV-1 RT. Se aprecia una forma tipo "manopla", conteniendo los motivos "dedos", "palma" y "pulgar". Figura tomada de Nakamura et al.(8)



La estructura detallada de la enzima biológica no se conoce aún en ninguno de los organismos. Originalmente, la telomerasa ha sido purificada del ciliado *Euplotes aediculatus* como un complejo de TERT, TR y una proteína denominada p43.(9) En humanos se han propuesto hasta 32 proteínas distintas asociadas a la hTERT.(10) En el último trabajo publicado al respecto, utilizando secuenciamiento de espectrometría de masas de los componentes proteicos y las determinaciones del tamaño molecular, se concluye que la composición enzimática es un complejo formado por 2 proteínas hTERT, 2 hTR y 2 proteínas adicionales idénticas que fueron identificadas como diskéricas.(10) Estos estudios parecen confirmar otros realizados previamente analizando la actividad biológica de diferentes fragmentos, donde también se propusieron modelos formados por dos unidades de hTERT y hTR.(11) Lamentablemente no se dispone información experimental de difracción de rayos X o RMN que permita entender la estructura tridimensional de la hTERT. Tampoco se conocen las correspondientes es-

tructuras tridimensionales de las TERT de los otros organismos en los que ha sido secuenciada, con excepción de un pequeño fragmento del N-terminal de la TERT de la *tetrahymena thermophila*,(12) que no guarda ninguna similitud de secuencia con la TERT humana. Por esta razón, es de sumo interés disponer de un modelo teórico tridimensional que ayude a comprender un poco mejor la complejidad de esta enzima.

### Objetivo:

El objetivo de este trabajo es presentar modelos tridimensionales de la hTERT obtenidos utilizando las técnicas bioinformáticas disponibles en la actualidad. Debido a la muy baja identidad de secuencias entre la hTERT y las proteínas del Protein Data Bank (PDB), hemos debido utilizar para este trabajo las técnicas de reconocimiento de patrones de plegamiento (fold recognition), tal como se describe en la siguiente sección.

### II. Metodología utilizada

Los métodos de modelado de proteínas conocidos como de modelado compara-

tivo, normalmente tienen su base en el alineamiento de la secuencia de la proteína que nos interesa (que llamaremos incógnita) con una o varias proteínas de secuencia y estructura tridimensional conocida (que llamaremos patrones). Este alineamiento permite inferir la relación evolutiva entre la proteína incógnita y los patrones. Si la identidad de secuencias es mayor al 25% es posible utilizar los métodos estándares llamados de modelado por homología que, dependiendo del método particular, permiten armar modelos tridimensionales a partir de las comparaciones secuencia-secuencia, secuencia-perfil (una forma particular de guardar información sobre alineamientos múltiples) y perfil-secuencia. Para identidades de secuencias menores al 25%, se han desarrollado toda una serie de métodos denominados de fold recognition que, basados en la comparación perfil-perfil, realizan la búsqueda de homólogos remotos, incorporando además la noción de alineamiento estructural de fragmentos (threading) y toda otra información predecible sobre la secuencia incógnita, como por ejemplo, la predicción de elementos de estructura secundaria, la identificación de motivos estructurales o biológicos en bases de datos de perfiles como, por ejemplo PROFILE o Pfam, etc. Dado que nuestra proteína incógnita es la hTERT y la búsqueda de alineamiento con los buscadores tradicionales tipo BLAST, PSI-BLAST o ClustalW, prácticamente no encuentra homología con las proteínas conocidas del PDB, deberemos utilizar los métodos basados en fold recognition.

Como primer paso en la predicción del modelo tridimensional, utilizamos los servidores de predicción de estructura secundaria disponibles en la web. De toda la gama disponible elegimos utilizar los servidores PSIPRED(13) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psi->

[pred/psiform.html](http://psiform.html)) y Porter(14) (<http://distill.ucd.ie/porter/>). El servidor PSIPRED es el método que prácticamente brinda los resultados consenso en la comparación entre todos los predictores de estructura secundaria, mientras que el servidor Porter, además de ser uno de los más recientes, proporciona aún mejores resultados que el consenso. Las predicciones realizadas por ambos métodos en proteínas de estructuras conocidas están entre un 76% a un 79% de exactitud, lo que hace muy confiables a este tipo de predicciones. Por esta razón, utilizaremos los resultados de las predicciones de estos dos métodos como uno de los elementos a tener en cuenta al momento de evaluar los diferentes modelos tridimensionales obtenidos por los predictores de estructura terciaria. Ambos métodos asignan a cada aminoácido alguna de las tres posibles estructuras: hélices (H), filamentos beta (E) o coils (C) condensando en solo tres formas las ocho estructuras secundarias originalmente definidas por Kabsch y Sander en el diccionario de estructuras secundarias de proteínas (DSSP).(15)

Existe toda una gama de servidores de modelado de la estructura terciaria por fold recognition accesibles en la web, que son gratuitos para la investigación académica.(16-21) A partir del envío de la secuencia de la proteína incógnita devuelven varios archivos con las coordenadas de los átomos correspondientes a los diversos modelos obtenidos, ordenados por un parámetro de scoring. Para la obtención de los modelos tridimensionales de la hTERT, hemos elegido los servidores que resultaron estar entre los mejor posicionados en la predicción de estructuras tridimensionales en las dos últimas ediciones de la CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction),(17,19,21,22) y que a su vez

aceptaban modelar proteínas con más de mil aminoácidos. Los métodos y servidores utilizados para la hTERT fueron: el SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup> (ambos en <http://sparks.informatics.iupui.edu/>), (17,19) y el I-TASSER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>). (21)

Finalmente, para validar y elegir entre los modelos tridimensionales obtenidos, hemos usado el método más utilizado y confiable en la actualidad, es decir, el Verify3D Structure Evaluation Server ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/)). (23,24)

Este servidor, que es, a su vez, el recomendado por los servidores de estructura terciaria, asigna un valor a cada aminoácido de la secuencia que expresa cuan "confortable" está el mismo en la estructura predicha. El mejor modelo es aquel que tiene la mayor cantidad posible (sino todos) de valores positivos para cada aminoácido cercano a 0.4.

Todos los servidores públicos antes mencionados, ya sea de predicción de estructura secundaria, predicción de estructura terciaria o validación de los modelos, fueron consultados durante los meses de mayo y junio de 2007.

### III. Resultados obtenidos y discusión

#### *Estructura secundaria y modelos tridimensionales de hTERT*

La estructura secundaria predicha por PSIPRED y Porter se encuentra incluida en la Tabla 1, donde para mayor claridad solo se indican las hélices (H) y las estructuras extendidas (E), correspondiendo los espacios en blanco a los coils. Como puede observarse, ambos métodos predicen que la hTERT es una proteína formada mayoritariamente por hélices  $\alpha$ , con muy poco contenido de estructuras extendidas tipo  $\beta$ . Más aún, ambos métodos coinciden en sus pre-

dicciones en la mayoría de los motivos, presentando diferencias solo en algunos pequeños segmentos de aminoácidos.

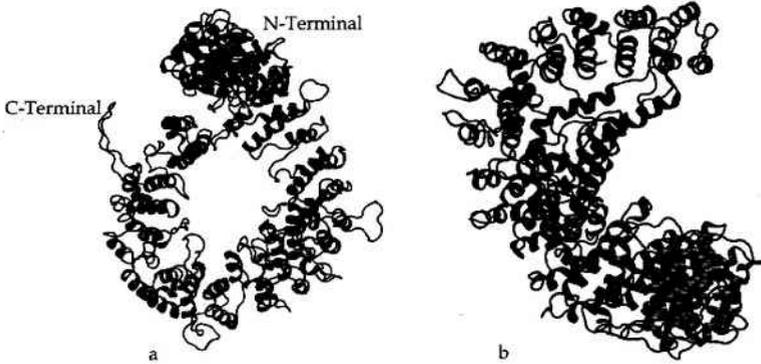
Para el modelado tridimensional de la hTERT, los servidores SP<sup>3</sup>, SP<sup>4</sup> e I-TASSER generaron 25 modelos posibles, que se redujeron a 17 considerando solo aquellos que estaban por encima del score de confiabilidad definido a su vez, por cada servidor. Estos 17 modelos fueron sistemáticamente analizados utilizando el servidor Verify3D (resultados no mostrados). El análisis de estos resultados muestra una característica común a todos los modelos: los 150 aminoácidos finales, correspondientes al C-terminal de la hTERT, toman valores negativos en Verify3D, indicando la necesidad de un refinamiento del modelo en esta porción de la proteína. En los otros casi mil aminoácidos, algunos modelos tienen una enorme mayoría de aa con valores positivos. Se procedió entonces a calcular el promedio de todos estos valores (excluyendo los 150 aa del C-terminal), y se retuvieron aquellos modelos de mayor promedio positivo, lo que redujo el número de modelos plausibles a 7. Para el siguiente paso se procedió al estudio detallado de las estructuras secundarias predichas para estos siete modelos. Teniendo en cuenta que los predictores de estructura secundaria son altamente confiables en su predicción, elegimos considerar solo aquellos modelos tridimensionales con mayor cantidad de motivos de estructura secundaria, que se corresponden con las predicciones directas de la misma. Esta comparación dio como resultado solo tres modelos satisfactorios, correspondiendo cada uno de ellos a un servidor diferente. En la Tabla 1 se incluyen los motivos de estructura secundaria contenidos en cada uno de estos modelos, que no solo permiten identificar en que aa ocurren sino también comparar



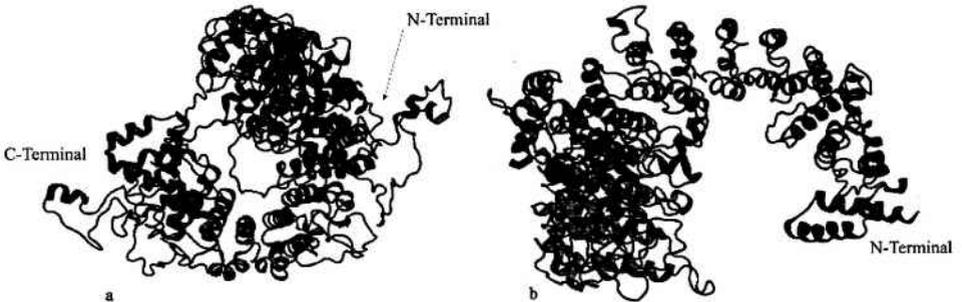




**Figura 3:** Estructura tridimensional para la hTERT humana obtenida por el servidor SP<sup>1</sup>. Descripción idem Fig. 2.



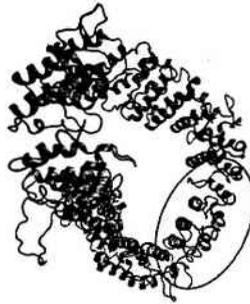
**Figura 4:** Estructura tridimensional para la hTERT humana obtenida por el servidor I-TASSER. Descripción idem Fig. 2.



Los modelos obtenidos mediante estos tres servidores tienen en común que predicen superestructuras formadas básicamente por hélices alfa. Esta superestructura tiene en los modelos de las Figs. 2 y 3 una forma de banda formada por hélices alfa que tienden a cerrarse en un círculo (pero sin llegar a hacerlo), y deformando los extremos C-terminal y N-terminal de esta banda hacia un mismo lado, como muestran las proyecciones (a) de estas figuras. Asimismo, el dominio catalítico también está curvado hacia el mismo lado que el C-termi-

nal y N-terminal, dando al modelo una concavidad, como muestran las correspondientes proyecciones (b) de estas figuras. En cambio, el modelo predicho por el servidor I-TASSER (Fig. 4) es también una banda de hélices alfas, pero en vez de formar casi un círculo como los dos modelos anteriores, aquí forma una especie de hélice de hélices alfa. En todos los casos, la banda de hélices está formada por hélices alfas casi paralelas que, en promedio, tienen siete aa y se van alternando hacia un lado y otro de la banda, ligadas por loops. La figura 5 permi-

**Figura 5:** Vista alternativa a la Fig. 3, de la estructura tridimensional para la hTERT humana obtenida por el servidor SP<sup>4</sup>. En el rasgo encerrado por el óvalo se puede apreciar el "espesor" de la banda de hélices alfa. Dicho espesor está formado por dos hélices alfa (alternándose una interior y una exterior).



te apreciar mejor este rasgo representativo (representado aquí por el modelo del servidor SP<sup>4</sup>), donde la banda de hélices alfa aparece teniendo un espesor de dos hélices alfas pequeñas.

Los modelos presentados en este trabajo deben considerarse como modelos preliminares, ya que se muestran tal y como los brindan los predictores de estructura terciaria utilizando fold recognition. Sin embargo, a pesar de considerarse preliminares, es de destacar que tres servidores diferentes sean capaces de producir modelos que se ajustan razonablemente a los predictores de estructura secundaria y básicamente coincidan en un tipo de superestructura para la proteína hTERT. Las diferencias entre las superestructuras de los servidores SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup>, con aquella obtenida por el servidor I-TASSER pueden ser consideradas como variantes rotacionales de la banda de hélices alfa. Los criterios utilizados en este trabajo para la selección de estos tres modelos (Verify3D y estructura secundaria compatible con la predicha por los predictores directos), indican que los modelos de SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup> serían levemente mejores que el modelo del I-TASSER, no habiendo diferencias apreciables

que permitan discriminar cual de entre ellos dos, es mejor que el otro. Además, los tres modelos presentan una concavidad en la zona del dominio catalítico RT, que recuerda la forma de "manopla" del mismo dominio de HIV-1. Para discriminar cual de los tres modelos es el más apropiado para la hTERT, se prevé implementar cálculos de dinámica molecular y/o Monte Carlo, que permitan el refinamiento de estas estructuras, y en particular la porción C-terminal cuya estructura fue señalada como problemática por el Verify3D.

Las únicas mediciones experimentales de diroísmo circular en TERTs, corresponden a la porción C-terminal de la TERT de levadura, obteniéndose un alto contenido de hélices  $\alpha$ . (25) Para la TERT humana, nuestros modelos predicen que las eventuales mediciones de diroísmo circular deberían indicar una altísima proporción de hélices  $\alpha$ .

A fin de evaluar si nuestros modelos son compatibles con la información experimental disponible para la hTERT, hacemos a continuación una revisión de esta información y se analiza un modelo esquemático de funcionamiento de las TERT.

### Información experimental y modelo de funcionamiento de hTERT

La actividad biológica de la hTERT ha sido analizada en distintos trabajos de la bibliografía. La porción C-terminal ha sido exhaustivamente analizada a través de cortes y supresiones de diferentes tamaños y en diferentes lugares de este dominio. Estos estudios concluyen que el dominio C-terminal debe estar completo para que la proteína no pierda actividad biológica; que las mutaciones en este dominio producen una menor adición de repeticiones de las múltiples repeticiones teloméricas (procesividad tipo II); y que los residuos de este dominio tienen relación en la complementación con otra hTERT. (11, 26, 27, 28)

Por su parte, estudios de cortes y supresiones del dominio N-terminal indican que, dependiendo del sitio particular de la supresión, la hTERT sufre pérdida de la actividad biológica. Cuando los cortes o supresiones ocurren en la porción inicial, la actividad biológica se sigue manifestando aunque en forma reducida. Por el contrario, cuando los cortes o supresiones están en la porción cercana al dominio RT, la actividad biológica desaparece. Finalmente, estos mismos estudios revelan que el dominio N-terminal tiene dos motivos de unión a la hTR. (11, 26, 29, 30, 31, 32) Sin esta unión la proteína no se complementaría con su contraparte de ARN, y no dispondría de la plantilla a fin de poder agregar los nucleótidos al ADN cromosómico.

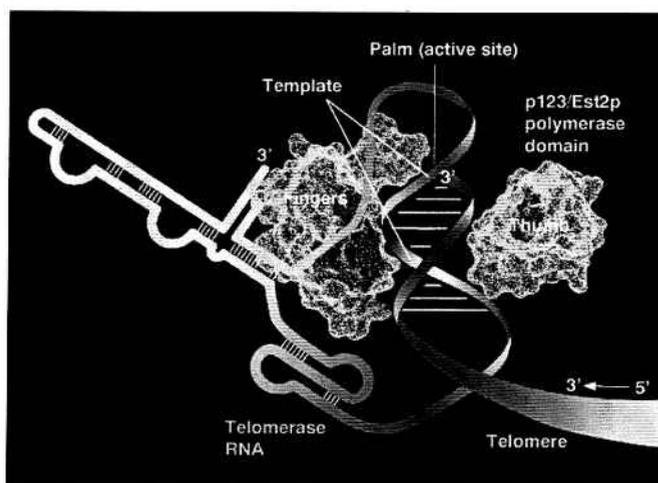
Los estudios de actividad biológica realizados mediante mutaciones en el dominio catalítico RT dan a entender que este es el dominio responsable de la correcta generación de los telómeros. Las mutaciones realizadas muestran que las zonas críticas corresponden a los aminoácidos 866 a 869 (motivo C en la Fig. 1), a los aminoácidos 890 a 908 (motivo D en la Fig.1) y entre

los aminoácidos 926 a 938 (motivo E de la Fig.1), siendo las más críticas aquellas correspondientes al motivo C de la Fig. 1. (25, 28, 33)

Debido a que los motivos del dominio RT de HIV-1 también están presentes en el dominio RT de la hTERT y en las TERT de otros organismos (tal como muestra la Fig. 1), se ha sugerido que la forma tridimensional de este último dominio podría guardar similitud estructural con el dominio del primero. Se aclara que la RT de HIV-1 es un heterodímero que tiene 2 polipéptidos denominados p66 y p51, que en conjunto forman un RT funcional con un único sitio catalítico. (34) La comparación de secuencias entre la hTERT y la RT de HIV-1 permite encontrar similitudes e inferir que el dominio catalítico de la proteína hTERT se encuentra entre los aminoácidos 604 a 935 ambos inclusive. Esta similitud entre la RT de HIV-1 humano y la hTERT ha sido extendida para la TERT de otros organismos además del humano, debido a que los motivos descriptos para el RT de los retrovirus y retrotransposones se encuentran en las subunidades proteicas de las distintas telomerasas. (8) Dado que la forma estructural del dominio RT de HIV-1 se interpreta como una forma de "manopla", con dedos, palma y pulgar (Fig. 1), se ha propuesto un esquema similar para interpretar tridimensionalmente la actividad desarrollada por las TERT. Dicho esquema se presenta en la Fig. 6, aplicado a una TERT de levadura, donde sólo se muestra el dominio RT de la misma, en una estructura tridimensional asignada a partir de su similitud con el dominio RT de HIV-1. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el RT del HIV-1 no necesita tener un molde de ARN para ejercer su actividad, cosa que sí ocurre para la actividad de las TERT. En el esquema de la Fig. 6 se supone que

la unión de la TERT con la TR de levaduras ocurre en los motivos que forman los "dedos" (fingers, en las Figs. 1 y 6). Sin embargo, de acuerdo con los datos experimentales analizados anteriormente, en la hTERT

esta unión ocurre en el dominio N-terminal. Por lo tanto, una extensión de esta figura al caso de la hTERT implicaría la incorporación del dominio N-terminal de la misma dentro de los "fingers" de la Fig. 6.



**Figura 6:** Esquema de la enzima telomerasa de levadura, unida a su contraparte de ARN y actuando sobre una hebra de ADN. Tomado de Lingner et al.(35)

### Análisis de los modelos de hTERT

Analizamos a continuación, la adecuación de los modelos tridimensionales obtenidos para la hTERT en este trabajo, con la información experimental disponible y el esquema de funcionamiento sugerido en la Fig. 6. En primer lugar, debemos mencionar que la forma tridimensional propuesta por nuestros modelos de la hTERT en la zona cercana al dominio catalítico de la misma, tiene una conformación estructural similar a la del dominio RT de HIV-1. En particular, es reconocible en nuestros modelos presentados en la parte (a) de las Figs. 2, 3 y 4, la forma de manopla de este dominio que, de acuerdo al esquema de la Fig. 6, tiene la concavidad necesaria para desarrollar la función biológica. Por otra parte, considerando nuevamente los aminoácidos cuya mutación

altera críticamente dicha función (motivo C en la Fig. 1), nuestros modelos de los servidores SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup> predicen que los mismos están situados en una hélice alfa de la superficie interior de la concavidad, quedando expuestos para su interacción con el hTR y el ADN, tal como sugiere la Fig. 6. El modelo del servidor I-TASSER en esta región sugiere la misma disposición pero no tan claramente como los anteriores. Por otra parte, los modelos predichos por los servidores SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup> difieren del predicho por el servidor I-TASSER esencialmente en la orientación del dominio N-terminal, lo que afectaría a la geometría de unión con la hTR. Los cortes y supresiones en este dominio afectan a la actividad biológica, porque afectan a la estructura de unión al hTR y que seguramente, alteran también la estructura de ma-

nopla de la hTERT. Esto último ciertamente ocurre con los cortes o supresiones en el dominio C-terminal, ya que directamente afectan la estructura del "pulgar" de la manopla. Por otra parte, las partes (b) de las Figs. 2 y 3, sugieren que la hTERT tiene otra forma de concavidad posible, con acceso a los residuos de la región catalítica RT, y permite pensar formas alternativas de unión al ARN y al ADN. Con la forma de manopla reconocible en las partes (a) de las Figs. 2, 3 y 4 es dable pensar a la hebra de ADN pasando perpendicularmente a través de las mismas, mientras que en la concavidad mostrada en las partes (b) de, al menos, las Figs. 2 y 3, la hebra de ADN podría deslizarse perpendicularmente a las mismas. Para poder analizar mejor la validez de estas hipótesis, es necesario realizar previamente un refinamiento detallado de los modelos obtenidos en este trabajo, tarea que se encuentra en preparación. Finalmente, queremos mencionar que los modelos tridimensionales obtenidos son también compatibles con los modelos propuestos de dimerización de la hTERT, (11) en donde el dominio C-terminal de una hTERT se uniría al dominio N-terminal de la otra, y viceversa.

### Conclusiones

En este trabajo se presentan por primera vez en la literatura, modelos tridimensionales para la hTERT completa, obtenidos utilizando métodos bioinformáticos disponibles en la web. Se han empleado para esta finalidad los servidores SP<sup>3</sup>, SP<sup>4</sup> e I-TASSER; los predictores de estructura secundaria PSI-PRED y Porter; y analizada la factibilidad de los modelos con el método Verify3D. Todas estas metodologías representan las mejores herramientas disponibles en la actualidad para la obtención de modelos de estructura terciaria por fold recognition. Los

modelos tridimensionales obtenidos tienen en común de presentar a la hTERT como una superestructura formada básicamente por hélices alfa más pequeñas. Esta superestructura tiene la forma de una cinta que tiende a cerrarse sobre sí misma, pero con una concavidad a lo largo de toda su parte media. Se ha analizado en detalle la adecuación de nuestros modelos preliminares con la información experimental disponible para la hTERT, concluyendo que al menos dos de los modelos (SP<sup>3</sup> y SP<sup>4</sup>) concuerdan con la mayoría de esta información. También se analizaron nuestros modelos tridimensionales a la luz de un esquema de funcionamiento propuesto para la TERT, que extendemos para su aplicación a la TERT humana. Nuestra conclusión es que no sólo dos de los modelos obtenidos permiten explicar la mayoría de la información experimental y adecuarse a los modelos de funcionamiento propuestos, sino que también permiten pensar formas alternativas de unión al ARN y ADN al cumplir con su función biológica. A fin de profundizar el análisis de esta hipótesis, se están preparando refinamientos por dinámica molecular y Monte Carlo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Bioq. Sergio Garay por la ayuda prestada en el manejo de los programas. El presente trabajo fue realizado con fondos del Proyecto CAI+D 3/20/2006, de la Universidad Nacional del Litoral.

## Bibliografía

1. H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J.E. Darnell, "Biología Celular y Molecular", Editorial Médica Panamericana, 4ª edición, (2002).
2. Y. Cong, W.E. Wright and J.W. Shay, "Human Telomerase and its Regulation", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 407-425, (2002).
3. I. Flores, M.L. Cayuela, M.A. Blasco, "Effects of Telomerase and Telomere Length on Epidermal Stem Behavior", *Science*, **309**, 1253-1256, (2005).
4. J. Chen and C.W. Greider, "An Emerging Consensus for Telomerase RNA Structure", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14683-14684, (2004).
5. X. Yi, J.W. Shay and W.E. Wright, "Quantification of Telomerase Components and hTERT mRNA Splicing Patterns in Immortal Human Cells", *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4818-4825, (2001).
6. L. Hou, J.W.S. Tang, J. Huang, P. Huang, C. Huang, H. Kung and M.C. Lin, "Cancer Immunotherapy Targeting Telomerase Reverse Transcriptase", *Cell. Mol. Immunol.*, **3**, 1-9, (2006).
7. S. Kumakura, T.W. Tsutsui, J. Yagisawa, J.C. Barret and T. Tsutsui, "Reversible Conversion of Immortal Human Cells from Telomerase-Positive to Telomerase-Negative Cells", *Cancer Res.*, **7**, 2778-2786, (2005).
8. T.M. Nakamura, G.B. Morin, K.B. Chapman, S.L. Weinrich, W.H. Andrews, J. Lingner, C.B. Harley and T.R. Cech, "Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human", *Science*, **277**, 955-959, (1997).
9. J. Lingner and T.R. Cech, "Purification of Telomerase from *Euplotes aediculatus*: Requirement of a Primer 3' Overhang", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 10712-10717, (1996).
10. S.B. Cohen, M.E. Graham, G.O. Lovrecz, N. Bache, P.J. Robinson, R.R. Reddel, "Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells", *Science*, **315**, 1850-1853, (2007).
11. C. Auxetier and N. Lue, "The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase", *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 493-517, (2006).
12. S.A. Jacobs, E.R. Powell and T.R. Cech, "Crystal Structure of the Essential N-terminal Domain of Telomerase Reverse Transcriptase", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 218-225 (2006).
13. D.T. Jones, "Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices", *J. Mol. Biol.*, **292**, 195-202, (1999).
14. G. Pollastri and A. McLysaght, "Porter: A New, Accurate Server for Protein Secondary Structure Prediction", *Bioinformatics*, **21**, 1719-1720, (2005).
15. W. Kabsch and C. Sander, "Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features", *Biopolymers*, **22**, 2577-2637 (1983).
16. I. Cymerman, M. Feder, M. Pawlowski, M.A. Kuroski, J.M. Bujnicki, "Computational Method for Protein Structure Prediction and Fold Recognition", *Nucleic Acids and Molecular Biology*, **15**, (2004).
17. H. Zhou and Y. Zhou, "SPARKS 2 and SP3 Servers in CASP6", *Proteins*, **7**, 152-156, (2005).
18. H. Zhou and Y. Zhou, "Fold Recognition by Combining Sequence Profiles Derived From Evolution and From Depth-Dependent Structural Alignment of Fragments", *Proteins*, **58**, 321-328, (2005).
19. S. Liu, C. Zhang, S. Liang, and Y. Zhou, "Fold Recognition by Concurrent Use of Solvent Accessibility and Residue Depth", *Proteins*, in press, (2007).
20. Y. Zhang and J. Skolnick, "Tertiary Structure Predictions on a Comprehensive Benchmark of Medium to Large Size Proteins", *Biophys. J.*, **87**, 2647-2655, (2004).
21. Y. Zhang, "Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7", *Proteins*, in press (2007).

22. J. Moulton, K. Fidelis, B. Rost, T. Hubbard and A. Tramontano, "Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) - Round 6", *Protein*, **61**, 3-7, (2005).
23. R. Lüthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, "Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles", *Nature*, **356**, 83-85, (1992).
24. R. Lüthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, "A Method to Identify Protein Sequences that Fold Into a Known Three-Dimensional Structure", *Science*, **253**, 164-170, (1991).
25. S. Hossain, S. Singh and N.F. Lue, "Functional Analysis of the C-terminal Extension of Telomerase Reverse Transcriptase", *J. Biol. Chem.*, **277**, 36174-36180, (2002).
26. K. Arai, K. Masutomi, S. Khurts, S. Kaneko, K. Kobayashi and S. Murakami, "Two Independent Regions of Human Telomerase Reverse Transcriptase Are important for Its Oligomerization and Telomerase Activity", *J. Biol. Chem.*, **277**, 8538-8544, (2002).
27. S. Huard, T. Moriarty and C. Autexier, "The C Terminus of the Human Telomerase Reverse Transcriptase Is a Determinant of Enzyme Processivity", *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4059-4070, (2003).
28. S.S.R. Banik, C. Guo, A.C. Smith, S.S. Margolis, D.A. Richardson, C.A. Tirado and C.M. Counter, "C-terminal Regions of the Human Telomerase Catalytic Subunit Essential for *in Vivo* Enzyme Activity", *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6234-6246, (2002).
29. B. Armbruster, S.S.R. Banik, C. Guo, A.C. Smith and C.M. Counter, "N-terminal Domains of the Human Telomerase Catalytic Subunit Required for Enzyme Activity *in Vivo*", *Mol. Cell Biol.*, **21**, 7775-7786, (2001).
30. T. Moriarty, D.T. Marie-Egyptienne and C. Autexier, "Functional Organization of Repeat Addition Processivity and DNA Synthesis Determinants in the Human Telomerase Multimer", *Mol. Cell Biol.*, **24**, 3720-3733, (2004).
31. T. Moriarty, S. Huard, S. Dupois, and C. Autexier, "Functional Multimerization of Human Telomerase Requires an RNA Interaction Domain in the N Terminus of the Catalytic Subunit", *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1253-1265, (2002).
32. F. Bachand and C. Autexier, "Functional Regions of Human Telomerase Reverse Transcriptase and Human Telomerase RNA Required for Telomerase Activity and RNA-Protein Interactions", *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1888-1897, (2001).
33. W.C. Drosopoulos and V.R. Prasad, "The Active Site Residue Valine 867 in Human Telomerase Reverse Transcriptase Influences Nucleotide Incorporation and Fidelity", *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1155-1168, (2007).
34. T.L. Beattie, W. Zhou, M.O. Robinson and L. Harrington, "Functional Multimerization of the Human Telomerase Reverse Transcriptase", *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6151-6160, (2001).
35. J. Ligner, T.T. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad and T.R. Cech, "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit Telomerase", *Science*, **276**, 561-567, (1997).