



Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Químico-Farmacobiología

**“Construcción de líneas celulares estables con expresión
inducible en sentido y antisentido de los genes eIF3f y ADRA
1B en células humanas A549”.**

TESIS

Para obtener el grado de:
LICENCIATURA EN QUÍMICO-FARMACOBIOLOGA

Presenta:
Mariannela Celeste Ruiz Ruiz

Director de tesis:
D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván

Morelia, Michoacán

Octubre 2017

“...el hombre se coloca ante la Naturaleza como un buey ante un palacio: por muy grandes que sean sus ojos, la ignorancia de la lógica arquitectónica le impide ver la belleza del edificio”.

Adagio popular

DEDICATORIA

Mamá, Papá, no sé que hice para merecer unos padres tan maravillosos como ustedes, no saben lo afortunada que me siento de ser su hija. Dios, en su infinita bondad, eligió los mejores para mí.

Mamá, Papá, todo lo que soy ahora se los debo a ustedes, no hay día que no agradezca a la Vida por tener la dicha de seguir compartiendo mis días con ustedes; de poder hacerlos reír, de llenarlos de alegrías y satisfacciones.

También, les quiero pedir perdón por lo injusta que he sido al obligarles a ver la vida a través de mí. Perdón por querer forzarlos a ver en mí lo que aún no soy pero que seré. Y aunque cada día hago mi mejor esfuerzo, espero algún día ser la hija que ustedes merecen y de la que se sientan orgullosos. A veces me doy cuenta de la forma en que me ven: una niña que trata de alcanzar las estrellas pero con pasos inseguros, pusilánime. Razón por la que creo dudan de mí. Pero yo les digo que confíen

Mamá, Papá, solicito su bendición y la gracia de Dios para emprender "el viaje". Prometo con el corazón en la mano que nunca los olvidaré y nunca los abandonaré.

Mamá, Papá, profundamente
GRACIAS

LOS AMO

A G R A D E C I M I E N T O S

De manera muy especial le agradezco al **Dr. Marco Aurelio Pardo Galván**.

Me alegra haber caído fortuitamente en su laboratorio. Su instrucción y enseñanza han sido un hito en mi vida. Gracias por compartir su conocimiento y sabiduría. Gracias por cuestionar cosas que, aunque para los demás parecieran irrelevantes, para mí eran cruciales.

Gracias por mantener en mí la mecha encendida de un ideal, que un día estuvo a punto de extinguirse. Su rebeldía ante lo que le parece incorrecto y a la vez el temple con el que afronta las circunstancias que lo han puesto donde está, han sido para mí motivo de inspiración y admiración. Ojalá en este mundo hubiera más profesores como usted, concientes de su compromiso socialenseñando con tanta dedicación a sus estudiantes.

Dr. Pardo, gracias por creer en mí antes que yo misma. Gracias por todos esos sermones y reprimendas; aprendí que vinimos a este mundo a *dejar la piel en el ruedo* y a no quedarse con nada. Créame cuando le digo que llevo tatuadas con hierro caliente cada una de sus enseñanzas. Verdaderamente, es usted un buen modelo a seguir.

Por todo esto y más, **MUCHAS GRACIAS**.



También quiero agradecer de manera muy particular a la **Dra. Ana Edith Higareda Mendoza**, quien fue mi profesora de Fisicoquímica IV mientras cursaba el 4to semestre de la carrera.

Gracias Profesora por habernos dado, el que para mí fue sin duda alguna, el mejor consejo que pudimos haber recibido en ese tiempo, donde la mayoría de nosotros, salvo unos pocos, no le dabamos gran importancia al ser buen estudiante. La profesora una vez nos dijo: “Chicos, el promedio SÍ IMPORTA”. Fue entonces cuando cobré conciencia de la vida de estudiante que había llevado hasta ese momento. Pudo sonar demasiado obvio, pero para los que íbamos con la corriente, anestesiados por la rutina, NADA es demasiado obvio.

Al final del curso, entre la bola, le pregunté: “Profesora, ¿cree que aún tengamos oportunidad?” Con toda la convicción del mundo, ella nos respondió: “¡Claro que sí, por su puesto que sí!”.

GRACIAS PROFESORA EDITH, porque ahora tengo la posibilidad de aspirar a cosas mucho más grandes.

El presente trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Biología Molecular** del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y en el **Laboratorio de Biología Celular Humana** de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, ambos pertenecientes a la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, bajo la asesoría del **Dr. Marco Aurelio Pardo Galván** en colaboración con la **Dra. Ana Edith Higareda Mendoza**.

**CONSTRUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
CON EXPRESIÓN INDUCIBLE EN SENTIDO Y
ANTISENTIDO DE LOS GENES eIF3f y ADRA 1B EN
CÉLULAS HUMANAS A549**

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 9

ABSTRACT 10

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 11

1. GEN 12

- 1.1 Estructura de un gen eucariótico. 12
- 1.2 Estructura de un gen procariótico. 12
- 1.3 Secuencias basales del promotor. 13
- 1.4 Secuencias proximales del promotor. 13
- 1.5 Secuencias distales del promotor. 14

2. EXPRESIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS 14

- 2.1 Empaquetamiento del ADN. 15
- 2.2 Transcripción de ADN a ARN. 16
- 2.3 Maduración de ARNm mensajero. 17
- 2.4 Traducción de ARN: síntesis de proteínas. 17
- 2.5 Modificaciones postraduccionales. 19

3. INGENIERÍA GENÉTICA: Sistemas de expresión génica 20

- 3.1 Desarrollo de sistemas de expresión regulables. 21
 - 3.1.1 Genes Gal. 22
 - 3.1.2 Mecanismo de activación por Gal4. 22
 - 3.1.3 Sistema RU486. 22

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES 24

1. CARACTERÍSTICAS DEL COMPLEJO eIF3 24

- 1.1 eIF3f. 25

2. RECEPTORES ADRENÉRGICOS 26

- 2.1 Receptores adrenérgicos β . 27
- 2.2 Receptores adrenérgicos α . 28
 - 2.2.1 Receptores adrenérgicos α_{1B} . 28
 - 2.2.2 Receptores adrenérgicos α_1 y proliferación celular. 29
 - 2.2.3 Receptor adrenérgico α_{1B} (ADRA 1B). 30

3. RELACIÓN ENTRE eIF3f Y EL RECEPTOR ADRENÉRGICO α_{1B} (ADRA 1B) 32

4. A549: ELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR 35

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN (Pregunta) 36

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS 36

CAPÍTULO V. OBJETIVOS 37

CAPÍTULO VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 38

CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS 39

1. SISTEMA DE EXPRESIÓN GeneSwitch™. 39
 - 1.1 Proteína GAL4-DBD/hpr-LBD/p65-AD. 40
 - 1.2 Mecanismo de acción. 40
2. VECTORES DE CLONACIÓN 42
3. MEDIOS DE CULTIVO 43
4. TÉCNICAS MOLECULARES 44
 - 4.1 Técnica por lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos de bajo peso molecular (<50Kb) - MINIPREP - 44
 - 4.2 Midiprep. 45
 - 4.3 Electroforesis en gel de agarosa. 45
 - 4.4 Digestión de ADN. 45
 - 4.5 Ligación de ADN. 46
 - 4.6 Limpieza de ADN. 46
 - 4.7 Elución en gel de ADN. 46
 - 4.8 Reacción en cadena de la polimerasa. 47
 - 4.9 Ensayo de Western blot. 47
5. TÉCNICAS GENÉTICAS 49
 - 5.1 Transformación por electroporación. 49
 - 5.2 Preparación de células electrocompetentes. 49
 - 5.3 Transformación por calcio (Ca^{+2}). 50
 - 5.4 Preparación de células para transformación por Ca^{+2} . 50
6. TÉCNICAS CELULARES 50
 - 6.1 Mantenimiento y manejo de la línea celular A549. 50
 - 6.2 Descongelado de células. 50
 - 6.3 Resiembra. 51
 - 6.4. Determinación de concentración celular y viabilidad. 51
 - 6.5 Transfección. 52
 - 6.6 Cosecha y lisis celular. 52
 - 6.7 Determinación de proteína (Bradford). 52
 - 6.8 Ensayo de β -galactosidasa. 53
 - 6.9 Ensayo de Azul de Alamar. 53

CAPÍTULO VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 55

1. CRITERIOS DE CLONACIÓN PARA LAS CONSTRUCCIONES DE eIF3f Y ADRA 1B 55
2. CONSTRUCCIÓN DE pGene/eIF3f SENTIDO Y ANTISENTIDO 56
3. CONSTRUCCIÓN DE pGene/ADRA 1B SENTIDO Y ANTISENTIDO 64

3.1	pGeneV5-His/ADRA 1B sentido.	67
3.1.1	Subclonación de ADRA 1B sentido en pTRI-kan 18.	67
3.1.2	Subclonación de ADRA 1B sentido en pBluescript SK+.	69
3.1.3	Clonación final de ADRA 1B sentido en pGeneV5-His.	70
3.2	pGeneV5-His/ADRA 1Bantisentido.	72
3.2.1	Subclonación de ARAN 1B antisentido en pBluescript SK+.	73
3.2.2	Clonación final de ADRA 1B antisentido en pGeneV5-His.	75
4.	CONFIRMACIÓN DE LAS CUATRO CONSTRUCCIONES FINALES	76
5.	SELECCIÓN DE TRANSFECTANTES ESTABLES DOBLES	77
5.1	Selección de transfectantes estables con pSwitch.	77
5.1.1	Determinación de la concentración de antibióticos.	77
5.1.2	Transfección y selección de clonas con pSwitch.	78
5.1.3	Confirmación de transfectantes estables con pSwitch.	79
5.1.3.1	Ensayo de β -galactosidasa.	79
5.1.3.2	PCR.	80
5.2	Selección de transfectantes estables dobles.	81
6.	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS DE eIF3f y ADRA 1B	81
6.1	Determinación de proteína (Bradford).	82
6.2	Evaluación de las construcciones de eIF3f.	82
6.3	Evaluación de las construcciones de ADRA 1B.	84
7.	CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES DE eIF3f Y ADRA 1B	86
7.1	Cinética de expresión del sentido de eIF3f	87
7.2	Cinética de expresión del anisentido de eIF3f	88
7.3	Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B	90
7.4	Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B	92
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS		95
BIBLIOGRAFÍA		96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema general de una célula eucariótica.	11
Figura 1.2. Esquema general de una célula procariótica.	11
Figura 1.3. Estructura general de un gen eucariótico.	12
Figura 1.4. Comparación entre un cromosoma interfásico y un cromosoma mitótico.	15
Figura 1.5. Inicio de la transcripción a partir de un promotor para la ARN polimerasa II.	18
Figura 1.6. Elongación durante la traducción.	21
Figura 1.7. Esquema general de un sistema de dos híbridos.	21
Figura 1.9. Activación transcripcional por Gal4.	23
Figura 1.10. Diagrama de la proteína quimérica pGL-VP usada en el sistema RU486.	23
Figura 2.1. Propuesta del modelo de eIF3 por Zhou en 2008.	24
Figura 2.2. Participación de eIF3f en la traducción.	25
Figura 2.3. Expresión de p27 al modificar la actividad de los α 1ARs.	30
Figura 2.4. Ruta de señalización para la degradación de p27.	32
Figura 2.5. Mecanismo de traducción de señales por ADRA 1B/eIF3f propuesto por Gutiérrez-Fernández y col., 2015.	33
Figura 6.1 Estrategia general para la construcción de líneas celulares estables con expresión inducible en sentido y antisentido de los genes ADRA 1B y eIF3f.	38
Figura 7.1. Mecanismo de acción del Sistema de expresión GeneSwitch™.	41
Figura 7.2. Mapa de clonación de pBluescript II SK+.	42
Figura 7.3. Mapa de clonación de pTRI-kan 18.	43
Figura 8.1. Mapa de restricción de pGeneV5-His.	55
Figura 8.2. Mapa físico de pGeneV5-His.	56
Figura 8.3. Mapa de restricción de pRCE021.	57
Figura 8.4. Sitio múltiple de clonación de GeneV5-His.	58
Figura 8.5. Estrategia de clonación de eIF3f en pGeneV5-His.	59
Figura 8.6. Clonación del antisentido de eIF3f en pGeneV5-His.	63
Figura 8.7. Mapa físico de pcDNA3.1+.	64
Figura 8.8. Estrategia de clonación para ADRA 1B sentido.	65
Figura 8.9. Clonación de ADRA 1B sentido en pTRI-kan 18.	67
Figura 8.10. Clonación de ADRA 1B sentido en pBluescript II SK+.	69
Figura 8.11. Clonación de ADRA 1B en pGeneV5-His.	70
Figura 8.12. Mapa de restricción de ADRA 1B (1563 pb).	72
Figura 8.13. Estrategia de clonación para ADRA 1B antisentido.	73
Figura 8.14. Estrategia de digestión para comprobar pBluescript II SK+/ADRA 1B antisentido.	74
Figura 8.15. Clonación de ADRA 1B antisentido en pGeneV5-His.	
Figura 8.16 Mapa físico de pGeneV5-His/LacZ.	
Figura 8.17. Ensayo de β -galactosidasa y determinación de la concentración óptima de inducción de mifepristona.	79

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 8.1. Confirmación del peso de pRCE021 4.1 kb.	60
Fotografía 8.2. Doble digestión de pRCE021.	60
Fotografía 8.3.A. Elución en gel de agarosa de eIF3f sentido y antisentido.	61
Fotografía 8.3.B. Resultado de la elución en gel de agarosa de eIF3f sentido y antisentido.	61

Fotografía 8.4.A. Purificación de las transformantes de eIF3f. 62

Fotografía 8.4.B. Comprobación de las construcciones de eIF3f diferidas con *Eco RI*. 62

Fotografía 8.5. Resultado de la elución en gel de ADRA 1B en sentido y antisentido. 66

Fotografía 8.6. Resultado de la purificación de pTRI-kan18/ADRA 1B sentido. 68

Fotografía 8.7. Digestión de pTRI-kan18/ADRA 1B sentido con *Xba I*. 68

Fotografía 8.8. Digestión de pBluescript SK+/ADRA 1B sentido con *Apa I*. 68

Fotografía 8.9.A. Purificación de ADN de colonias probables de tener pGeneV5-His/ADRA 1B sentido. 71

Fotografía 8.9.B. Digestión de pGene/ADRA 1B con *Eco RI*. 71

Fotografía 8.10. Digestión de pBluescript SK+/ADRA 1B con *Sma I*. 74

Fotografía 8.11. pGeneV5-His/ADRA 1B antisentido. 75

Fotografía 8.12. Confirmación de las construcciones de eIF3f y ADRA 1B. 76

Fotografía 8.13. Resultado de la PCR de las colonias de A549. 81

Fotografía 8.14. Western blot de las construcciones de eIF3f. 82

Fotografía 8.15. Western blot de las construcciones de ADRA 1B. 84

Fotografía 8.16. Cinética de expresión del sentido de eIF3f. 86

Fotografía 8.17. Cinética de expresión del antisentido de eIF3f. 88

Fotografía 8.18. Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B. 90

Fotografía 8.19. Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B. 92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Modificaciones postraduccionales. 19

Tabla 1.2. Modificaciones postraduccionales según el aminoácido modificado. 20

Tabla 2.1. Expresión de genes de ciclo celular durante la activación de los α 1ARs. 29

Tabla 7.1. Características de la proteína Gal4. 40

Tabla 7.2. Soluciones utilizadas en la purificación de ADN por lisis alcalina. 44

Tabla 7.3. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección primaria. 48

Tabla 7.4. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección secundaria. 48

Tabla 8.1. Estrategia de confirmación de para las construcciones de ADRA 1B y eIF3f. 76

Tabla 8.2. Determinación de proteína de las clonas de ADRA 1B y eIF3. 82

Tabla 8.3. Resultados de expresión de las construcciones de eIF3f. 83

Tabla 8.4. Resultados de expresión de las construcciones de ADRA 1B. 85

Tabla 8.5. Resultados de la cinética de expresión del sentido de eIF3f. 87

Tabla 8.6. Resultados de la cinética de expresión del antisentido de eIF3f. 88

Tabla 8.7. Resultados de la cinética de expresión del sentido de ADRA 1B. 90

Tabla 8.8. Resultados de la cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B. 92

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 8.1. Viabilidad/citotoxicidad para la Higromicina y Zeocina™. 78

Gráfico 8.2. Expresión de eIF3f. 83

Gráfico 8.3. Expresión de ADRA 1B. 85

Gráfico 8.4. Cinética de expresión del sentido de eIF3f. 87

Gráfico 8.5. Cinética de expresión del antisentido de eIF3f. 89

Gráfico 8.6. Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B. 91

Gráfico 8.7. Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B. 93

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AD	Dominio de activación
ADRA 1A	Receptor adrenérgico α_1 A
ADRA 1B	Receptor adrenérgico α_1 B
ADRA 1D	Receptor adrenérgico α_1 D
Akt	Proteína quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt- aa	Ácido ribonucleico de transferencia unido a un aminoácido
ARNt-Met	Ácido ribonucleico de transferencia- Metionina
ARs	Receptores adrenérgicos
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
Cip	Proteína que interactúa con quinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina
DBD	Dominio de unión al ADN
eIF	Factor de inicio de la traducción en eucariotes
eIF3f	Subunidad f del factor eucariótico 3 de iniciación de la traducción
GDP	Guanosín difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
His	Histidina
Hpr	Receptor de progesterona humano
INK4	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina 4
IP3	1,4,5 trifosfato
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología
Kip	Proteína inhibidora de quinasa
LBD	Dominio de unión al ligando
Medio LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Met	Metionina
MPN	Dominio Mpr1 p, Pad1P N-terminal
mTOR	Proteína objetivo de la Rapamicina en mamíferos

PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PI	Fosfoinosítido
PIK3	Fosfoinositol 3 quinasa
PIP2	Fosfatidil inositol 2 fosfato
PIP3	Fosfatidil 3 fosfato
PLC	Fosfolipasa C
RU486	Mifepristona
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa
SFC	SKp1-Cullin-F-complejo proteico de caja-o box-
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
UAS	Secuencias activadoras corriente arriba
WB	Western blot
α1AR	Receptores adrenérgicos α_1
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa (κ) de las células B activadas.

R E S U M E N

El gen eIF3f (*subunidad f del factor eucariótico 3 de iniciación de la traducción*) ha sido ampliamente estudiado y los resultados muestran la importancia que tiene en múltiples y diversos procesos biológicos tales como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y de la transcripción, entre otros, debido a su capacidad para asociarse a complejos multiproteicos. Se ha demostrado que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular, mientras que en G0 su expresión está abatida; esto en la línea celular A549. Igualmente se demostró que la sobreexpresión o silenciamiento del gen eIF3f afecta el crecimiento celular e induce apoptosis (Higareda y Pardo, 2010). Lo anterior sugiere que eIF3f podría jugar un papel importante durante el ciclo celular. Otro gen de reciente interés es ADRA 1B, miembro de los receptores adrenérgicos (α_1) acoplados a proteínas $G_{q/11}$ que llevan a cabo la activación de diversas rutas de señalización, como son la de la fosfolipasa C (PLC) y la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítido (PI), con aumentos de calcio intracelular libre y la activación de la proteína quinasa C (PKC). A pesar de ser un receptor adrenérgico, ADRA 1B no parece estar involucrado de la misma manera en vasoconstricción como los subtipos A y D; más bien se ha encontrado involucrado en proliferación celular (González-Cabrera, 2004). Al sobreexpresarlo, aumenta la proliferación celular, por lo que se le considera un protooncogen (Allen *et al.*, 1991). Recientemente nuestro grupo de investigación descubrió que eIF3f y ADRA 1B interactúan física y funcionalmente (Gutiérrez-González *et al.*, 2015). La interacción física que tiene eIF3f con ADRA 1B es de gran interés considerando los antecedentes que ambos genes tienen en relación al ciclo celular y proliferación celular. Sin embargo los métodos experimentales utilizados para estudios de expresión génica de estos dos genes son poco eficientes, demasiado variables e innecesariamente extenuantes. En el presente trabajo se propuso implementar un sistema controlable que nos permita estudiar la relación de estos genes con mayor eficacia y precisión. Para esto, se construyeron líneas celulares estables que expresan individualmente y de manera inducible, a los genes eIF3f y ADRA 1B en sentido y en antisentido en células humanas A549. Para dichas construcciones, se utilizó el sistema de expresión inducible GeneSwitch System™ (Invitrogen). Este proyecto consiste de dos partes, una que corresponde al área de Biología Molecular y consta del desarrollo experimental de las construcciones genéticas en sentido y antisentido de eIF3f y ADRA 1B. La segunda parte corresponde al área de Biología Celular Humana, consistió en la transfección y selección de células A549 con dichas construcciones, creando líneas celulares estables con expresión inducible de eIF3f y ADRA 1B en sentido y antisentido.

Palabras clave: eIF3f, ADRA 1B, transfectantes estables, expresión inducible, células A549.

A B S T R A C T

The gen eIF3f (eukaryotic translation initiation factor 3f) has been widely studied showing its importance in several and multiple biological processes such as translation initiation, proteosomal regulation, and transcription regulation, among others, due to its capability to associate to multiprotein complexes. Also, it was shown that eIF3f expression is biphasic and circumscribed to the S and M phases of the cell cycle, while its expression in G0 is lowered in A549. Likewise, it was demonstrated that deregulation of eIF3f by overexpression or silencing negatively affects cell viability and induces apoptosis (Higareda y Pardo, 2010). This suggests that eIF3f might have an important role cell cycle control. Another gene of recent interest is ADRA 1B which is a member of adrenergic receptors (α_1) coupled to $G_{q/11}$ proteins activating various signaling pathways such as phospholipase C (PLC) and stimulation of phosphoinositide (PI) hydrolysis, increasing free-intracellular calcium and activation of protein C kinase (PCK). Although ADRA 1B is an adrenergic receptor, it does not seem to be involved primarily in vasoconstriction, but has rather been involved in cell proliferation (González-Cabrera, 2004). Also, it has been suggested to be a proto-oncogene, since altering its function by mutation induces an increased proliferation state (Allen *et al*, 1991). Recently, our research group discovered a physical and functional interaction between ADRA 1B and eIF3f (Gutiérrez-Fernández y col., 2015). This interaction is of great interest, considering the background of these two genes in regards with cell cycle and cell proliferation. Nevertheless, the experimental methods we have used until now lack precision, and high unnecessary experimental complications, due to the nature of our experimental model (transient transfected cells). In this work, it is proposed to eliminate transient transfection by generating a perennial system which allows to study ADRA 1B and/or eIF3f function with more efficiency and accuracy. The aim of this work was to create a stable cell lines which inducibly express sense or antisense of eIF3f and ADRA 1B genes in A549 human cells; for which, we used the commercial inducible expression system: GeneSwitch System™ (Invitrogen). This project consisted of two parts, one that corresponds to Molecular Biology which consists of the design of sense and antisense genetic expression constructs of eIF3f y ADRA 1B. The second part corresponds to Cell Biology, that comprises human cell transfection (A549) with the genetic constructs to create stable cell lines with eIF3f and ADRA 1B. Finally, we achieve to create stable cell lines with sense and antisense inducible expression of eIF3f and ADRA 1B genes in A549 human cells.

Key words: eIF3f, ADRA 1B, stably transfected, inducible expression, A549 cells.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La superficie de nuestro planeta está poblada por seres vivos sorprendentes y todas estas especies están interrelacionadas, en el espacio y en el tiempo, por una lógica exacta. Por medio de la observación, el hombre descubrió que todo ser vivo posee ciertas características que lo distinguen de lo inanimado: complejidad y organización, metabolismo, homeostasis, reproducción, crecimiento, sensibilidad y evolución (Avers, 1991). Desde entonces, el ser humano ha mostrado un gran interés en el estudio de los seres vivos y las propiedades fundamentales que los caracterizan y los distinguen de la materia inerte (Alberts *et al*, 2004). De tal manera que surgió una nueva interrogante, ¿Qué es lo que le da éstas características a los seres vivos?

“La clave para cada uno de los problemas biológicos finalmente se debe buscar en la célula, porque cada organismo viviente es, o a veces ha sido, una célula”.

- E.B. Wilson, *Biólogo celular* (1925) -

Todos los organismos vivos están formados por células. La célula es la unidad estructural y funcional de todo ser vivo. Existen dos tipos de células fundamentales: procariotas y eucariotas. Las procariotas son células muy pequeñas, como los micoplasmas, bacterias y algas verde-azuladas (cianobacterias). Su organización es más sencilla que la de las células eucariotas. Contienen ribosomas y algunos sistemas de membranas que no forman organelos verdaderos (Fig. 1). Por otro lado, las células eucariotas tienen un núcleo definido gracias a una membrana nuclear donde contienen su material genético, poseen un modelo organizacional mucho más complejo, su tamaño es mucho mayor y en el citoplasma es posible encontrar un conjunto de estructuras celulares que cumplen diversas funciones (Fig. 2) (Paniagua *et al*, 1999).

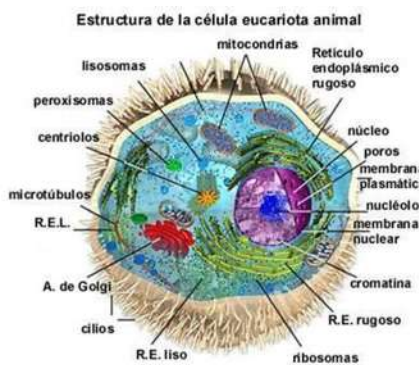


Figura 1.1. Esquema general de una célula eucariota (Avers, 1991).

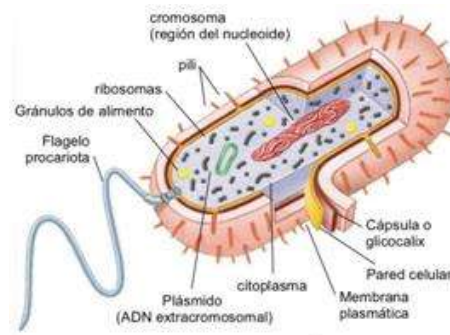


Figura. 1.2. Esquema general de una célula procariota (Avers, 1991).

1. GEN

1.1 Estructura de un gen eucariótico.

Uno de los principales propósitos de un organismo es la perpetuación de su material genético. Por ello, las propiedades de las estructuras celulares que permiten llevar a cabo esa tarea son la clave de la herencia. La pregunta crucial a la que debemos responder es: ¿Cómo logra una célula dar lugar a otra del mismo tipo? La respuesta se encuentra en los genes. El gen es la unidad funcional de la información genética, es decir, un fragmento de ADN que sirve para codificar información para la síntesis de macromoléculas (proteínas, ARNr, ARNt, ARNm). A nivel estructural, en eucariotas se amplía la idea de un gen como un segmento de ADN constituido por intrones y exones, para concebirlo como una estructura que además contiene secuencias reguladoras y regiones promotoras (Fig. 3) (Alberts *et al.*, 2004; Karp, 2005).

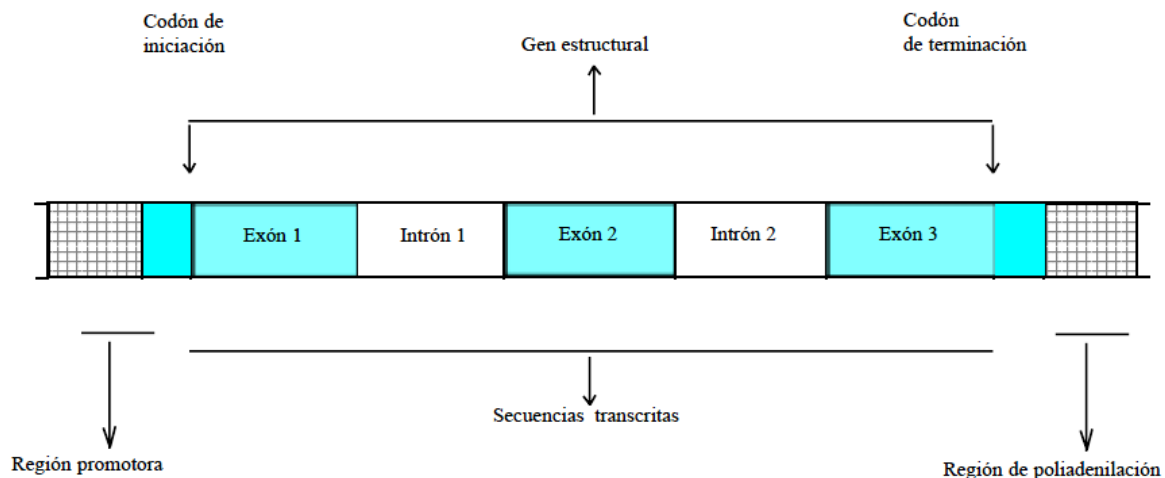


Figura 1.3. **Estructura general de un gen eucariótico** (Avers, 1991). Un gen eucariótico está conformado por secuencias exónicas e intrónicas delimitado por un codón de inicio y uno de termino.

1.2 Estructura de promotores eucarióticos.

Un promotor se define como la secuencia continua de ADN que es suficiente para dirigir la correcta iniciación de la transcripción de un gen mediada por la ARN polimerasa. A cada promotor se le puede unir un número variable de factores de transcripción que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la ARN polimerasa o de otros factores de transcripción, y en consecuencia determinando la posición y eficacia del inicio de la transcripción (Luque y Herráez, 2008).

La regulación de los genes de clase II (es decir, aquellos transcritos por la ARNpoli-II) es del máximo interés por ser responsables de la síntesis de los ARNm y, por lo tanto, de la síntesis de todas las proteínas. Sus promotores se localizan en dirección 5' (río arriba) del origen de transcripción y muestran una mayor variación de secuencia que los promotores de ARNpol-I y II (Luque y Herráez, 2008). El promotor de los genes de clase II contiene elementos basales, proximales y distales en cis que son reconocidos por factores generales de la transcripción, factores de transcripción específicos y potenciadores o silenciadores, respectivamente (Recillas y Escamilla, 2004).

1.2.1 Secuencias basales del promotor.

Los elementos basales suelen encontrarse cercanos al sitio de inicio de la transcripción, dentro de un intervalo que va de +20 a -30 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción. También se encuentran los denominados elementos "core" del promotor, por ser las secuencias a las que se unen los factores de transcripción generales que forman el complejo de preinicio y el reclutamiento de la ARNpol (Recillas y Escamilla, 2004). Dentro de esta región puede encontrarse la caja TATA, situada típicamente alrededor de las posiciones -15 a -20 pb. Otra secuencia basal frecuentemente es la secuencia necesaria Inr, situada sobre el propio origen entre -3 y +5 pb (Luque y Herráez, 2008; Recillas y Escamilla, 2004). La iniciación de la transcripción para ARNm es realizada por un complejo formado por la ARN polimerasa II y factores de transcripción, ensamblado alrededor del punto de inicio. El papel de la caja TATA es situar convenientemente a la ARNpol-II (por medio de una interacción con TFIID y otros) para que la transcripción se inicie en el lugar correcto. Los promotores que carecen de secuencias TATA hacen que el sitio de inicio se vuelva errático y suelen carecer de un punto de inicio fijo (Karp, 2005; Lewis, 1994).

1.2.2 Secuencias proximales del promotor.

Generalmente el promotor basal no es suficiente por sí mismo para promover el inicio de la transcripción, sino que se requiere de la intervención de otra región conocida como promotor proximal. El promotor proximal está cercano al promotor basal, pero más alejado corriente arriba del origen, comúnmente entre las posiciones -30 y -200. Los elementos proximales determinan la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción (Luque y Herráez, 2008). De estas regiones proximales, es común la caja CAAT suele estar situada alrededor de la posición -80, pero puede ejercer su función a distancias muy variables del punto de inicio y se puede encontrar en cualquier orientación. Los estudios de susceptibilidad a las mutaciones sugieren que la secuencia CAAT tiene el papel más importante en la determinación de la eficacia del promotor (Lewis, 1994).

1.2.3 Secuencias distales del promotor.

Los promotores eucarióticos no funcionan necesariamente solos. Al menos en algunos casos, la actividad de un promotor puede aumentar significativamente debido a la presencia de un potenciador o enhacer, una región de ADN formada por otro grupo de secuencias localizadas a una distancia muy variable de los módulos que constituyen al promotor. Además pueden ejercer su función en cualquier orientación (Lewis, 1994).

Algunos ejemplos de potenciadores son el de SV40 localizado en una región del genoma que contiene dos secuencias idénticas de 72 pb cada una, repetidas en tándem unos ~200pb por delante del punto de iniciación de la unidad transcripcional. Su transcripción *in vivo* aumenta más de 200 veces en cualquier orientación (Lewis, 1994).

En levaduras hay elementos análogos a los potenciadores: las **UAS** o secuencias activadoras delanteras (*upstream activating sequences*). Pueden ejercer su función en cualquier orientación y a cualquier distancia por delante del promotor. Dichas secuencias desempeñan un papel regulador: la unión de proteínas reguladoras a secuencias UAS activa los genes situados corriente abajo (Lewis, 1994).

Los silenciadores se han definido como elementos a los que se unen factores que tienen un efecto negativo sobre la transcripción de manera independiente de su posición y orientación en relación con el sitio de la transcripción. Además de los silenciadores clásicos, se han definido secuencias denominadas elementos reguladores negativos, cuya actividad si es dependiente de su posición. Se cree que los silenciadores interfieren con el ensamblaje de la maquinaria transcripcional, mientras que los elementos reguladores negativos requieren proteínas que interfieren con la fijación de otros factores transcripcionales a su sitio de unión de ADN (Recillas y Escamilla, 2004; Clark y col., 1993).

2. EXPRESIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS

La regulación de la expresión genética en células eucariotas es un proceso largo y complejo. Para su estudio y una mejor comprensión se aborda a diferentes niveles los cuales serán descritos brevemente debido a la importancia que tienen en este trabajo.

1. Empaquetamiento del ADN
2. Transcripción
3. Maduración del ARN mensajero
4. Traducción: síntesis de proteínas
5. Modificaciones postraduccionales

PRIMER NIVEL DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

2.1 Empaquetamiento del ADN.

El ADN, en eucariotas, se dispone básicamente en dos formas diferentes dependiendo del estado de la célula. Si la célula se encuentra en la interfase, que es cuando el material genético se duplica, el ADN se encuentra disperso en el núcleo en forma de **cromatina**. Cuando la célula entra a la fase mitótica, esta cromatina alcanza el máximo grado de condensación formando los **cromosomas** (Alberts *et al.*, 2004).

Inicialmente el ADN disperso en el núcleo se encuentra unido a las **histonas** (H2A, H2B, H3 y H4) formando lo que se conoce como cromatina. Las histonas forman una especie de núcleo histónico central (octámero de histonas) denominado **nucleosoma** enrollando alrededor de 140 pares de bases del ADN. Posteriormente los nucleosomas se pliegan sobre sí mismos dando lugar a una estructura solenoide con 6 a 7 nucleosomas por vuelta, dicha disposición se le conoce como **fibra cromática**. Finalmente, cuando la célula entra a la mitosis, la cromatina alcanza el último nivel en la jerarquía del empaquetamiento del ADN: **el cromosoma** (Alberts *et al.*, 2004).

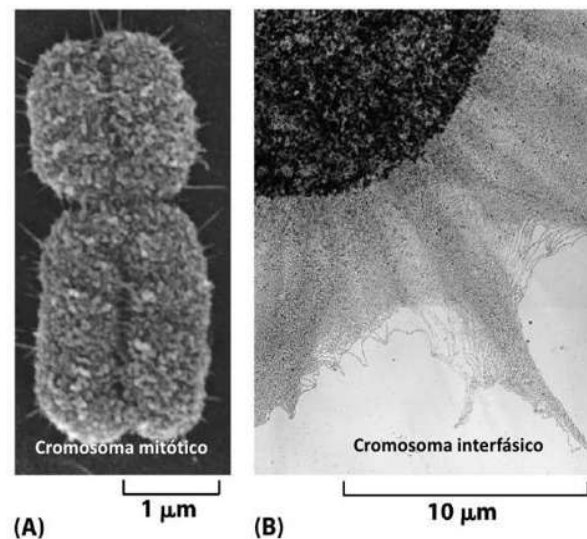


Figura 1.4. **Comparación entre un cromosoma interfásico y un cromosoma mitótico.** Es esta imagen se observa como el ADN se encuentra totalmente compactado en la mitosis (metafase) y disperso durante la interfase (Alberts *et al.*, 2004).

SEGUNDO NIVEL DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

2.2 Transcripción del ADN a ARN.

La transcripción es un proceso en el cual una cadena de ADN provee la información para la síntesis de una de ARN. Para efectuar la transcripción son necesarias una serie de modificaciones reversibles en las histonas, algunas de las cuales están en relación con la descondensación del ADN para “activar” los genes (Paniagua, 1999).

La transcripción se realiza por la acción de la enzima ARN polimerasa II que cataliza la síntesis de una molécula de ARN mensajero (ARNm). El primer paso es el reconocimiento de la zona promotora, denominada **caja TATA** (o su correspondiente), por la **proteína de unión a la caja TATA** o **TBP** (*TATA Binding Protein*, por sus siglas en inglés) que forma parte de un complejo proteico mucho más grande llamado **TFIID** (*transcription factor for polymerase II-fraction D*). Consecuentemente, a este complejo se le añaden otros dos factores, **TFIIA** y **TFIIB** que promueven la unión posterior de la ARN polimerasa II con su **TFIIF** unido. Otro par de proteínas (**TFIIE** y **TFIIH**) se unen al complejo y fosforilan, específicamente TFIIH, a las serinas de la subunidad grande de la ARN polimerasa II en la región carboxi-terminal, lo que provoca el arranque de la ARN polimerasa para la síntesis de un ARNm primario en dirección 5' → 3' (Alberts, 2004; Karp, 2005).

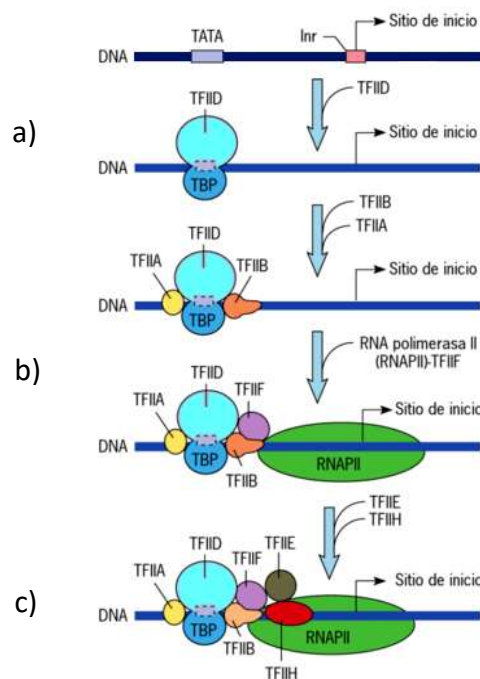


Figura 1.5. Inicio de la transcripción a partir de un promotor para la ARN polimerasa II eucariota (Karp, 2005). a). Reconocimiento de la caja TATA por la TBP y por TFIID. b) Reclutamiento de la ARN polimerasa II. c) Complejo de la transcripción completado.

TERCER NIVEL DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

2.3 Maduración del ARN mensajero.

El transcrito primario generado durante la transcripción se procesa en el núcleo para formar un ARNm maduro que se transporta al citoplasma. Esta conversión incluye la modificación covalente de ambos extremos del ARNm y la eliminación de las secuencias intrónicas que son escindidas por corte y empalme del ARN (Karp, 2005).

Las modificaciones de los extremos del ARNm eucariota son la adición de una “caperuza” al extremo 5’ que consiste en un nucleótido de guanina modificado, **7-metil guanosina** unido mediante un enlace fosfodiéster 5’-5’. Este casquete previene que las exonucleasas digieran el extremo 5’ del ARNm favoreciendo el transporte del ARNm fuera del núcleo y tiene un papel importante en el inicio de la traducción (Alberts *et al.*, 2004; Paniagua, 1999).

La poliadenilación del extremo 3’ implica la incorporación de bloques de poli-A, con 200 o más restos AMP (adenosín monofosfato); dicha reacción tiene lugar en el núcleo por acción de la **poliadeniltransferasa** y comienza unos 20 nucleótidos corriente abajo de la secuencia AAUAAA (Alberts *et al.*, 2004; Karp, 2005).

Después de esto se efectúa el **splicing** o edición del ARNm, proceso llevado a cabo por el espliceosoma que se encarga de reconocer y remover los intrones (regiones no codificantes) empalmado las regiones codificantes para producir un ARNm maduro (Alberts *et al.*, 2004; Avers, 1991).

CUARTO NIVEL DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

2.4 Traducción del ADN: síntesis de proteínas.

El mecanismo por el que una célula convierte la información de una molécula de ARN mensajero en una proteína es llamado **traducción**. Básicamente consta de cuatro etapas diferentes: activación de los aminoácidos, iniciación de la cadena polipeptídica, elongación y terminación.

La activación de los aminoácidos se da mediante la esterificación de éstos a los ARN de transferencia por la acción de la enzima **aminoacil-ARNt-sintetasa**. Los ARNt transportan los aminoácidos al ribosoma, lugar donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas (Lehninger, 2003). La fase de iniciación traduccional es el principal punto de control en la expresión genética relacionada a la síntesis de proteínas, ya que regula su velocidad. La célula regula la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de algunos factores de iniciación, llamados “eIFs” en eucariontes (Mathews *et al.* 2007). La iniciación de la traducción comprende cuatro pasos subsecuentes: (I) la formación del complejo de preiniciación 43S, el cual incluye la subunidad ribosomal pequeña (40S), el ARN de transferencia iniciador (Met-ARNtⁱMet), GTP y los factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 y eIF5; (II) el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5’ cap del ARNm que previamente ha sido reconocido por eIF4F; (III) escrutinio de la región 5’ no traducida (5’ UTR) del

ARNm y el reconocimiento del codón de inicio; y (IV) unión de la subunidad ribosomal grande (60S) para ensamblar un ribosoma completo (80S) (Pestova et al. 2000, Pestova et al. 2002, Preiss et al. 2003, Mathews et al. 2007). Cada ribosoma contiene tres centros de unión para las moléculas de ARN; uno de ellos es el centro de unión al ARNm, un centro **A** y otro **P** que son los centros de unión a los ARNt (Alberts *et al.*, 2004). La traducción de los codones se lleva a cabo en dirección 5'→3' (Lehninger, 2003). Primero se forma un complejo ternario **EF-Tu-GTP- ARNt-aa**, este complejo sitúa el primer ARNt-aa en el sitio A del ribosoma. Con el Met-ARNt (aminoácido iniciador) en el centro P y el recién captado ARNt-aa sobre el centro A, se forma el primer enlace peptídico por acción de la **peptidil transferasa** presente en la subunidad mayor del ribosoma. Después de esto, el ribosoma se traslada al nuevo codón del ARNm y simultáneamente cambia el peptidil-ARNt desde el centro A al centro P, para ello se requiere otro factor de elongación **EF-G** (**eEF2** en eucariotas), así como GTP. El centro A queda entonces abierto, con un nuevo codón en su sitio listo para recibir a un nuevo aa-ARNt y comenzar un nuevo ciclo de prolongación. Cuando el ribosoma alcanza uno de estos codones, UAA, UAG o UGA se detiene el proceso y se libera el polipéptido, para lo cual se requieren factores de liberación como **eRF1** y **eRF3**; el enlace éster entre la cadena polipeptídica y el último ARNt se hidroliza, el ARNm abandonan al ribosoma y éste se disocia en sus dos subunidades 40S y 60S, proceso que requiere de nuevo a los factores de iniciación específicos, pudiendo de este modo iniciarse una nueva cadena polipeptídica (Fig. 1.6) (Lehninger, 2003).

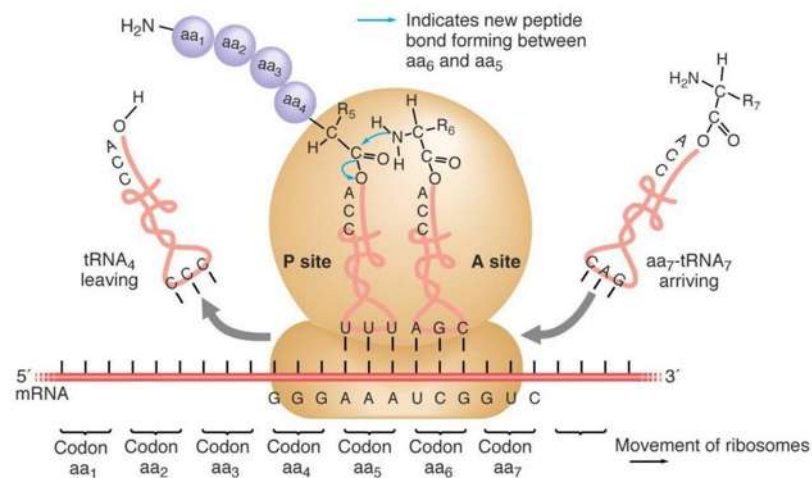


Figura 1.6. Elongación durante la traducción: entrada del ARNt, formación del enlace peptídico y salida del ARNt. Después del primer aminoácido (Met-ARNt) el segundo entra en el sitio A del ribosoma y por medio de la peptidil transferasa se establece el enlace peptídico entre ambos aminoácidos. El ribosoma se desplaza en dirección 5' → 3' hacia un nuevo codón dejando el sitio A disponible para la entrada de una nuevo ARNt-aa (Lehninger, 2003).

QUINTO NIVEL DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

2.5 Modificaciones postraduccionales.

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas inducen una gran variedad de cambios estructurales y funcionales y constituyen un mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica, por lo tanto, al terminar la construcción de un polipéptido, es posible que se requiera de alguna modificación covalente para producir una proteína biológicamente activa y/o para proteger a los péptidos y a las proteínas de su degradación (Pérez-Sala, 2012). La Tabla 1.1 se describen las modificaciones más frecuentes y dichas modificaciones ocurren en un aminoácido específico dentro de un motivo particular (Tabla 1.2).

Tabla 1.1. Modificaciones postraduccionales.

Formación de enlaces covalentes	Rotura de enlaces covalentes
Puentes disulfuro entre proteínas, unión de pequeñas moléculas	Proteólisis. Escisión de un fragmento proteico y activación de la proteína.
Fosforilación. Adición de un grupo fosfato.	Autoproteólisis.
O y N- glicosilación. Adición de un monosacárido.	Rotura de secuencias señal. Peptidasas de la señal.
Hidroxilación. Adición de un grupo hidroxilo.	Proteólisis intramolecular
Acilación. Adición de un grupo acilo.	Neuropéptidos
Metilación. Adición de un grupo metilo.	Hormonas (insulina)
Amidación. Adición de un grupo amida.	Morfógenos (notch, shh)
Carboxilación. Adición de un grupo carboxilo.	Activación de zimógenos
Unión de otras proteínas	Cascada de coagulación sanguínea
Ubiquitinación. Marcaje de la proteína [con ubiquitina] para su degradación.	Rotura de enlaces covalentes
SUMOilación. Adición de otra pequeña proteína (11kDa) llamada SUMO (small ubiquitinrelated modifier).	Proteólisis. Escisión de un fragmento proteico y activación de la proteína.
Otro tipo de modificaciones	
Glicosilación. Adición de un glúcido.	
Glicación. Modificación no enzimática de los grupos amino de las proteínas por la acción de azúcares reductores.	
Sulfonilación. Adición de un sulfóxido.	
Prenilación. Adición de moléculas hidrofóbicas.	
Nitrosilación. Adición de un grupo nitroxilo (HNO).	
Nitración. Adición de un grupo nitro (-NO).	
Formilación. Adición de un grupo formil.	

Formilación. Adición de un grupo formil.

ADP-ribosilación. Adición de una ADP-ribosa

Tabla 1.2 Modificaciones postraduccionales según el aminoácido modificado.

Aminoterminal (NH₂-)	Formilación, acetilación, acilación, glicosilación
Carboxiterminal (COO⁻)	Metilación, ADP-ribosilación
Arginina	Acetilación, metilación, ADP-ribosilación
Asparagina	N-glicosilación, metilación, desaminación
Ácido aspártico	Metilación, hidroxilación
Cisteína	Formación de puentes disulfuro, acilación, prenilación, unión de grupos prostéticos (hemo)
Ácido glutámico	Metilación, carboxilación, ADP-ribosilación
Glutamina	Desaminación
Histidina	Metilación, fosforilación, ADP-ribosilación
Lisina	N-acetilación, metilación, oxidación, hidroxilación, ubiquitinación
Metionina	Formación de sulfóxidos
Fenilalanina	β-hidroxilación, O-glicosilación
Prolina	Hidroxilación, O-glicosilación
Serina	Fosforilación, O-glicosilación, acetilación
Treonina	Fosforilación, O-glicosilación, metilación
Triptófano	β-hidroxilación
Tirosina	Fosforilación, yodación, adenilación, sulfatación, hidroxilación

(Karp, 2005; Paniagua, 1999; Pérez-Sala, 2012).

3. INGENIERÍA GENÉTICA: Sistemas de expresión génica

Los sistemas de expresión génica que permiten reintroducir a células u organismos genes manipulados en el laboratorio, bajo esquemas de regulación eficiente, ofrecen grandes ventajas para estudiar la función de las proteínas codificadas por éstos. Se considera que lograr una expresión génica finamente controlada, es prerequisite para una amplia variedad de estudios y aplicaciones en biomedicina (Gossen, 1994).

Una característica esencial de estos sistemas es su potencial para controlar de manera eficiente y reversible la actividad del gen que se ha introducido, ya sea a un modelo celular o animal; de manera que esto ha abierto nuevas rutas para el estudio de la función de proteínas recombinantes con potencial terapéutico, modulación de transgenes para revertir padecimientos hereditarios en modelos animales, entre otras (Castillo, 2004).

3.1 Desarrollo de sistemas de expresión regulables.

El desarrollo de sistemas artificiales de expresión regulables para células eucarióticas surgió del entendimiento de los mecanismos de la iniciación de la transcripción. Experimentos realizados a partir de 1980 establecieron que los activadores transcripcionales eucarióticos son frecuentemente modulares, con al menos dos dominios separables: uno que se une al ADN (de unión) y otro que activa la transcripción (de activación). Los primeros experimentos hechos en eucariotes inferiores como las levaduras, mostraron que la unión a un sitio del ADN, ya sea por un represor procariótico o por un activador eucariótico mutado en su dominio de activación, no era suficiente para reprimir o activar la transcripción, respectivamente (Brent, 1984; Keegan, 1986). En cambio, posteriores experimentos donde se intercambiaron dichos dominios demostraron que proteínas quiméricas que contenían un dominio de unión a ADN (que podría inclusive ser de origen procariótico), fusionados a dominios de activación de activadores transcripcionales eucarióticos, sí estimulaban la transcripción (Castillo, 2004). Esto fue probado en levaduras utilizando un híbrido formado por la secuencia que codifica para el dominio de unión de a ADN del represor bacteriano LexA y la secuencia de ADN que genera el dominio de activación del factor transcripcional Gal4 de la propia levadura (Fig. 1.7) (Brent, 1997). También se han desarrollado sistemas de un solo híbrido, en donde los dominios de proteínas que se unen a pequeñas secuencias de ADN se han combinado en una misma proteína con dominios activadores potentes, para formar nuevas proteínas quiméricas que pueden reconocer pequeñas secuencias nucleótidas colocadas muy cerca del gen reportero cuya expresión se quiere regular. Entre los sistemas inducibles que se han vuelto más populares se encuentran los de FK506/rifampicina, el de ecdisoma, el inducible por tetraciclina y el de RU486 (mifepristona) (Castillo, 2004).

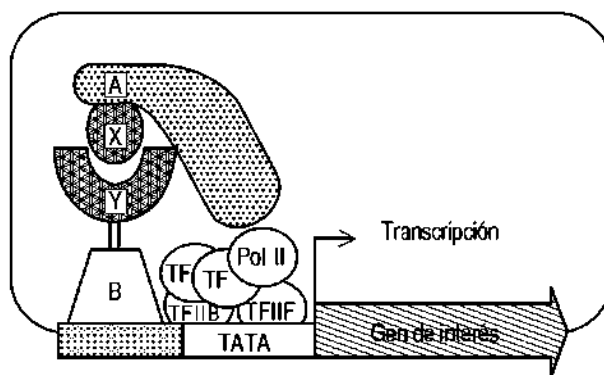


Figura 1.7. **Esquema general de un sistema de dos híbridos.** La interacción de los dominios de unión entre proteínas X y Y conduce a la formación de un factor transcripcional quimérico funcional que activa la transcripción del gen reportero: **A**, puede ser cualquier dominio activador derivado ya sea de la proteína VP16 del virus *Herpes simplex* o del factor transcripcional Gal4 de levadura. **B**, es un dominio de unión a ADN sea derivado de Gal4, del represor del operón a resistencia a tetraciclina (TetR) o de otros factores transcripcionales (Castillo, 2004).

3.1.1 Genes Gal.

Uno de los primeros modelos biológicos para el estudio de la regulación transcripcional en eucariotas fue el del proceso de degradación de la galactosa mediada por la expresión de genes en levadura, la cual está bajo el control de un factor transcripcional denominado Gal4 (Traven *et al.*, 2006).

Los productos de los genes GAL son necesarios para el transporte y metabolismo de la galactosa dentro de la célula. Gal4 codifica para una proteína de 881 aminoácidos identificada en *Saccharomyces cerevisiae* y está catalogada como un regulador positivo a nivel transcripcional de genes como Gal1 (galactoquinasa), Gal2 (galactosa permeasa), Gal7 (α -D-galactosa-1-fosfato uridiltransferasa), Gal10 (uridina difosfogalactosa-4-epimerasa) y MEL1 (α -galactosidasa). Ver figura 1.9 (Duffy, 2002; Laughon, 1983).

3.1.2 Mecanismo de activación por Gal4.

La activación de Gal4 opera a través de un enhancer UASGAL (upstream activating sequences) de 17 pares de bases ubicado en los promotores de dichos genes. En ausencia de galactosa, Gal4 se encuentra formando un complejo con Gal80 (represor) en el sitio de activación UASGAL. Al estar acompañado con Gal80, GAL4 no puede activar la transcripción. En presencia del inductor se disocia Gal80 (por la acción de Gal3 que entra al núcleo desde el citoplasma activado por la presencia de galactosa) de Gal4 y éste puede activar la transcripción de los genes GAL que codifican las enzimas que convierten la galactosa en glucosa. Gal4 activa la transcripción mediante el reclutamiento de coactivadores y otros factores transcripcionales a su dominio de activación, entre ellos está SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa) que actúa como andamio entre el complejo de preinicio y el promotor. También interviene otra molécula denominada Mediador, la cual forma un complejo con SAGA y Gal4 para unirse a TBP y TFIIB, quienes son señal para la unión de la ARN polimerasa II (Fig. 1.8) (Laughon, 1983; Traven *et al.*, 2002).

3.1.3 Sistema RU486.

Este sistema fue desarrollado originalmente por Wang *et al.* en 1994, consiste en una proteína quimérica (pGL-VP) que contiene un dominio de unión al ligando (RU486), proveniente del receptor de progesterona humano hPRB891, un dominio de unión al ADN que es el factor transcripcional Gal4 de levadura y un dominio de activación de la transcripción del virus *Herpes simplex*. Esta proteína activa los genes que están bajo el promotor Gal4 en respuesta a la inducción por RU486 (mifepristona). La proteína contiene un receptor de progesterona mutado por delección de 19 aminoácidos en la región C-terminal con lo que pierde afinidad por la progesterona endógena y, paradójicamente, se vuelve afín a RU486 (antagonista de los receptores de progesterona en humano), ventaja que es aprovechada para activar la transcripción (Fig. 1.9).

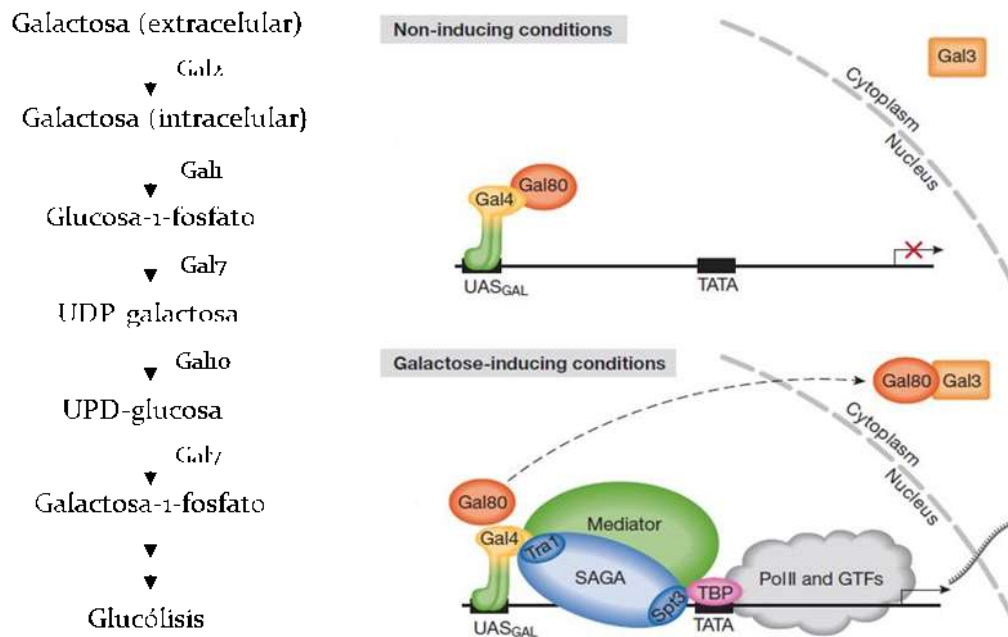


Figura 1.8. **Activación transcripcional por Gal4.** En ausencia de galactosa, la actividad de Gal4 es bloqueada por la unión de Gal80 a su dominio de activación. Cuando el inductor está presente, Gal80 es removido del dominio de activación de Gal4, quien está habilitado para reclutar la maquinaria de transcripción. GTFs, factores de transcripción generales; SAGA, Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa; TBP, proteína de unión a TATA. Del lado izquierdo se muestra la ruta de GAL en levadura. La galactosa necesita ser modificada por las enzimas Gal 1, 2, 7 y 10 para convertirla en glucosa-1-fosfato y entrar a la ruta glucolítica (Traven *et al.*, 2002).

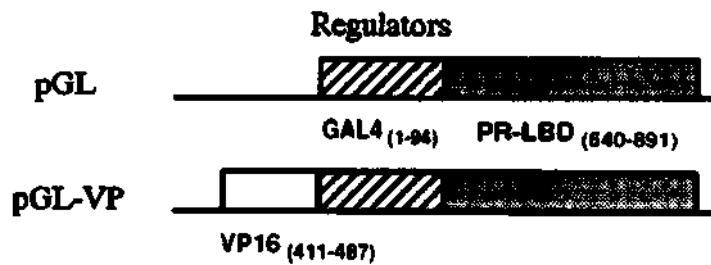


Figura 1.9. **Diagrama de la proteína quimérica usada en el sistema RU486.** Para la construcción de esta proteína (pGL-VP) se partió de pGL que contiene Gal4 y el dominio de unión al ligando (PR-LBD), posteriormente se ligó el dominio de activación de la transcripción (VP16) (Wang *et al.*, 1994).

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

1. CARACTERÍSTICAS DEL COMPLEJO eIF3

El factor de iniciación 3 (eIF3) es un complejo proteico con una masa aproximada a los 700 kDa que forma parte del complejo de iniciación 43S; es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de síntesis de proteínas (Hall *et al.*, 2004). eIF3 sirve como andamio y catalizador de la unión entre el ARNm activado, la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario (Pestova *et al.*, 2002); en mamíferos consta de hasta 13 subunidades no idénticas que varían de tamaño (Fig. 2.1), desde 28 hasta 170 kDa. Las subunidades del complejo son denominadas como: eIF3a (p170), eIF3b (p116), eIF3c (p110), eIF3d (p66), eIF3e (p48), eIF3f (p47), eIF3g (p44), eIF3h (p40), eIF3i (p36), eIF3j (p35), eIF3k (p35), eIF3l (p28), eIF3m (GA17) (Fig 21) (Burks *et al.*, 2001). eIF3 interviene en la disociación del ribosoma funcional 80S, en las subunidades 40 y 60S, y se une a la subunidad menor del ribosoma en ausencia de otros factores. Asimismo, eIF3 es de gran importancia para la restauración del ribosoma funcional 80S en el codón de inicio del mensajero (Asano *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2004).

El factor eIF3 (Fig. 2.1) ha sido purificado en diversas especies eucariotas, de los cuales se han obtenido distintos números de subunidades que dependen del organismo donde se extrajo. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* eIF3 consta de 5 subunidades: eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i. Se propone que estas cinco subunidades, que están conservadas en todas las especies eucariotas, forman el corazón catalítico y que el resto tienen funciones moduladoras en el proceso de síntesis de proteínas (Burks *et al.*, 2001). Sin embargo, Masutani y colaboradores, en el 2007, reportan que en mamíferos sólo tres de estas cinco subunidades (eIF3a, b y c) y tres subunidades no conservadas (eIF3e, f y h) son indispensables para mantener un nivel adecuado de síntesis de proteínas y que el resto de las subunidades sólo modulan la actividad del complejo eIF3.

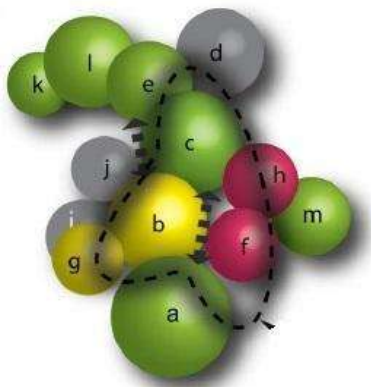


Figura 2.1. **Propuesta del modelo de eIF3.** Se muestra la forma en la que se organizan las subunidades, coloreadas de acuerdo a los dominios que contiene. Dominios PCI (verdes), dominios MPN (rojo), que contienen motivos de reconocimiento de ARN(amarillo) (Zhou, 2008).

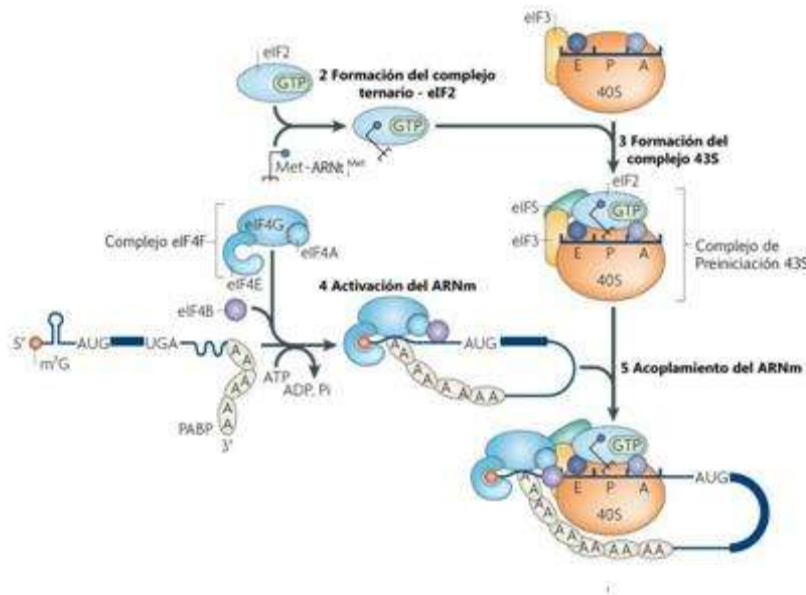


Figura 2.2. **Participación de eIF3 en la traducción.**eIF3 previene que la subunidad 40S del ribosoma se una prematuramente a la subunidad 60S.(Modificado de Jackson et al, 2010).

1.1eIF3f

El gen eIF3f (p47) pertenece a la familia génica Mov34, que relaciona a sus miembros por contener un dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) hacia el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de las proteínas de asociarse a complejos multiproteicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind *et al.*, 1998). Así también, la característica particular de cada proteína la determinaría su extremo carboxilo terminal. Asimismo, se ha descrito que los eIF3f de organismos amniota contienen un dominio conservado en su extremo amino terminal rico en prolinas y alaninas de función aun desconocida (Gutiérrez-Fernández *et al.*, 2015).

En el genoma humano, eIF3f se encuentra codificado en el cromosoma 11; es un gen con 8 exones y 7 intrones y codifica una proteína de 357 aminoácidos. Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2 que sólo presenta la secuencia codificante (sin intrones) de una proteína de 361 aa. La identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos es del 97%. En las líneas celulares A549 y 293H se ha demostrado que la copia en el cromosoma 2 no es funcional, tratándose de un retropseudogen (Higareda y Pardo, 2010).

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la sobreexpresión del gen de eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica (Higareda *et al.*, 2003; Shi *et al.*,

2006), por lo que se considera un modulador del proceso. La proteína eIF3f forma parte de eIF3, y es capaz de interactuar con proteínas diferentes de las de este complejo multiproteico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la quinasa ribosomal S6K1 interactúa con eIF3f a través del dominio MPN. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la quinasa mTOR (mammalian target of Rapamicine) interacciona con eIF3f a través del dominio señalador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés) y mTOR fosforila la S6K1 liberándola de eIF3f, y de esta manera fosforila a su segundo blanco, la proteína 4E-BP1 (Holz *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006). La proteína eIF3f muestra características de unión proteína-proteína excepcionales, ya que también interactúa establemente con proteínas involucradas con procesos diferentes a los del complejo eIF3 y la síntesis proteica. Por ejemplo, se reportó que eIF3f se relaciona físicamente con la proteína TRC8, que es una ubiquitin-E3 ligasa, la cual se localiza en el retículo endoplásmico y sensa los niveles exógenos de colesterol (Lee *et al.*, 2010). También, Lagirand-Cantaloube y colaboradores (2008) reportan que en células de mioblasto de ratón (C2C12), la ubiquitin-E3 ligasa Atrogin 1/MAFbx interacciona, a través de un dominio rico en residuos de leucina, con el dominio MPN de eIF3f.

Por otro lado, existe evidencia de que el sobreexpresar al gen eIF3f afecta al crecimiento celular e induce apoptosis, como fue reportado por Shi *et al.* (2006) en la línea celular A375, por Higareda y Pardo (2010) en la línea celular A549 y por Llanderal-Mendoza (2003) en células de tabaco TBY-2. Asimismo, se reportó que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular y que su expresión en G0 está abatida, esto en línea celular A549. Este perfil de expresión fue corroborado mediante estudios en cultivos asincrónicos y sincronizados en G0, M y S transfectados con la región promotora inmediata al gen eIF3f fusionada transcripcionalmente al gen reportero de luciferasa. Igualmente, se reportó que la sobreexpresión del gen inhibe la síntesis global de proteínas (Higareda *et al.*, 2003) y si consideramos que la síntesis global de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular en mamíferos (Fan y Penman, 1970) es coherente hacer la relación con su perfil de expresión y sugerir su contribución en este proceso.

2. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos (ARs) pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Veulens y Rodríguez, 2009), encontrándose en la subfamilia A según la clasificación de la Unión Internacional de la Farmacología (IUPHAR, por sus siglas en inglés). La familia de los ARs incluye nueve productos de genes diferentes:

- Receptores β
 - Receptor β_1
 - Receptor β_2
 - Receptor β_3

-
- Receptores α_1
 - Receptor α_{1A}
 - Receptor α_{1B}
 - Receptor α_{1D}

 - Receptores α_2
 - Receptor α_{2A}
 - Receptor α_{2B}
 - Receptor α_{2C}

Los receptores adrenérgicos median los efectos funcionales de catecolaminas, como la epinefrina y la norepinefrina. Las catecolaminas son neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo. Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Contienen un grupo catecol y un grupo amino. El precursor de todos es la tirosina, que se usa como fuente en las neuronas catecolaminérgicas (productoras de catecolaminas). La adrenalina y noradrenalina median las funciones del sistema nervioso simpático mediante la activación de receptores adrenérgicos acoplados a proteínas G. En cuanto a la fijación de ligandos, la marcación y mutagénesis de sitio dirigido de aminoácidos individuales han mostrado que las regiones de transmembrana conservadas tienen una participación crucial en la fijación de ligandos (Strader *et al.*, 1994; Hutchis, 1994). Estas regiones parecen crear un saco para la fijación de ligandos que colocan las catecolaminas en sentido horizontal o perpendicular respecto a la bicapa lipídica. Cada subtipo presenta mayor preferencia por una clase particular de proteínas G, por ejemplo, los receptores adrenérgicos α_1 a Gq, los receptores adrenérgicos α_2 a Gi y los receptores adrenérgicos β a Gs.

2.1 Receptores adrenérgicos β .

Los tres receptores adrenérgicos β comparten una identidad de secuencia de aminoácidos cercana a 60% dentro de las regiones transmembrana, donde se encuentra el saco de fijación de ligandos para la adrenalina y la noradrenalina. Con base en resultados de mutagénesis sitio dirigida, se han identificado aminoácidos individuales en el receptor adrenérgico β_2 que interactúan con cada uno de los grupos funcionales sobre la molécula agonista de catecolamina (Goodman y Gilman, 2007).

Los receptores β regulan innumerables respuestas funcionales que incluyen la frecuencia y la contractibilidad cardíacas, la relajación del músculo de fibra lisa y múltiples funciones metabólicas. Los tres subtipos de receptores β se acoplan a Gs y activan la adenilciclase. Sin embargo, datos recientes sugieren diferencias en las señales “corriente abajo” y fenómenos activados por los tres receptores β . Las catecolaminas estimulan la

regulación retroalimentaria de receptores β , es decir, sensibilización y regulación negativa de los receptores adrenérgicos β (Goodman y Gilman, 2007).

Los receptores β difieren en el grado en que experimentan dicha regulación y el más susceptible es el receptor β_2 . La estimulación de los receptores adrenérgicos β culmina en la acumulación de AMP cíclico, la activación de PKA y la alternación de la función de innumerables proteínas celulares, como la consecuencia de su fosforilación. Además, Gs intensifica directamente la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje en la membrana plasmática del músculo de fibra estriada y el cardíaco (Goodman y Gilman, 2007).

2.2 Receptores adrenérgicos α .

Las secuencias deducidas de aminoácidos a partir de los tres genes de receptores de α_1 (α_1 AR) y los tres genes del receptor α_2 (α_2 AR) concuerdan con el paradigma establecido para GPCR. Aunque no se han investigado tan a fondo como los receptores β , los aspectos estructurales generales y su relación con la función de la fijación del ligando y la activación de proteína G parecen concordar con los establecidos sobre los receptores β . Dentro de los dominios transmembrana, los tres α_1 AR comparten una identidad aproximada del 75% en cuanto a residuos aminoácidos, al igual que los tres α_2 AR (Goodman y Gilman, 2007).

2.2.1 Receptores adrenérgicos α_1 .

Los receptores adrenérgicos α_1 (α_1 ARs) son receptores adrenérgicos presentes en la membrana plasmática de ciertas células, cuya función principal es la vasoconstricción; juegan un papel importante en la fisiología normal y en muchos estados de enfermedad; la comprensión de sus vías de señalización y los mecanismo de regulación son de importancia considerable, en particular para la identificación de dianas farmacológicas para la modulación terapéutica (Toews *et al.*, 2003).

En humanos, los receptores α_1 A (ADRA 1A), α_1 B (ADRA 1B) y α_1 D (ADRA 1D) están codificados por distintos genes que se encuentran localizados en los cromosomas 8, 5 y 20 respectivamente (Guimarães y Morua, 2001). Los subtipos de α_1 ARs se expresan en varios órganos, incluidos cerebro, corazón, vasos sanguíneos, el hígado, los riñones, la próstata y el bazo, en el que intervienen una gran variedad de efectos funcionales, tales como la modulación de la neurotransmisión, la vasoconstricción, el inotropismo cardíaco (Cotecchia, 2010). Se le atribuye también la regulación de varias funciones centrales incluyendo la transmisión sináptica, la plasticidad, la actividad motora, así como la atención y la memoria. Por ejemplo, se cree que la activación de los α_1 AR atenúa la excitabilidad piramidal de neuronas en el hipocampo, mientras que en las zonas de la corteza cerebral, la activación de α_1 AR potencia la excitación en respuesta al glutamato o acetilcolina. La activación α_1 AR es principalmente excitatoria en regiones como el núcleo reticular talámico, dorsal de rafe y las neuronas motoras espinosas. Estas características funcionales implican una complejidad creciente de la señalización y la regulación de los subtipos de α_1 AR que podrían representar la base mecánica de su especificidad funcional en diversos tejidos (Cotecchia, 2010).

2.2.2 Receptores adrenérgicos y proliferación celular.

En general, se ha encontrado que algunos receptores acoplados a proteínas G que pueden participar en la modulación de vías de señalización involucradas en el control de la proliferación celular (Allen *et al.*, 1991). Aunque se sabe poco sobre los mecanismos moleculares por el que distintos subtipos de α_1 ARs regulan la proliferación celular, en el 2004 González-Cabrera y colaboradores encontraron en fibroblastos Rat-1, cuyas vías están estimuladas por α_1 AR, que la activación por epinefrina altera la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, entre estos genes se incluyen: ciclina E, ciclina D1, ciclina B, quinasas dependientes de ciclina (Cdk2 y Cdk1), antígeno de proliferación nuclear (PCNA), promotor de Cdc2, inhibidores de quinasas dependiente de ciclina (p27^{kip1}, p21^{Cip1}) y ADN polimerasas I-IV (Tabla 2.1).

Gen	α_{1A} AR	α_{1B} AR	α_{1D} AR
Ciclina E	-3.3 ± 0.7	SC	-4.4 ± 0.2
CDK2- α	2.4 ± 0.7	SC	-4.1 ± 0.2
PCNA	-2.1 ± 0.1	SC	-3.3 ± 0.0
ADN pol. α -subunidad I	-2.5 ± 0.1	SC	-2.0 ± 0.1
ADN pol. α -subunidad II	-4.9 ± 1.0	SC	-3.9 ± 1.0
ADN pol. α -subunidad III	-2.6 ± 0.5	SC	-4.2 ± 0.2
ADN pol. α -subunidad IV	-2.6 ± 0.1	SC	-4.2 ± 0.1
Ciclina B	-4.0 ± 0.1	SC	-6.7 ± 1.0
Promotor de Cdc2	-2.4 ± 0.3	SC	-3.5 ± 0.1
CCND1	SC	7.3 ± 0.4	SC
Ciclina D1	SC	4.8 ± 0.7	SC
p27 ^{kip1}	13.7 ± 1.2	6.5 ± 1.2 ???	13.4 ± 0.7
p21 ^{Cip1}	SC	4.7 ± 1.7	SC

Tabla 2.1. **Expresión de genes del ciclo celular durante la activación de los α_1 ARs.** Cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular luego de la exposición de los α_1 ARs a epinefrina (10 μ M, 1h). Los datos indican un incremento (valores positivos) o un decremento (valores negativos) en la transcripción de los genes antes mencionados. Dichos cambios son en comparación con células no transfectadas. SC, sin cambios; Pol, polimerasa (González- Cabrera, 2004).

Estos productos génicos son reguladores clave de la progresión del ciclo celular durante la transición G1/S y antes de la mitosis (M). La progresión a través de G1 se da por la formación y la activación de los complejos ciclina D/Cdk 4-6 y ciclina E/Cdk2. Además de la unión de subunidades reguladoras (ciclinas), la actividad de las enzimas Cdk está regulada por la fosforilación-desfosforilación y la interacción con los inhibidores de Cdk

(CDKIs), incluyendo p27^{Kip1} y p21^{Cip1}. Estos últimos son reguladores negativos de la actividad Cdk, que se unen a los complejos ciclina/Cdk y conducen a la detención del ciclo celular. Los receptores adrenérgicos ADRA 1A y ADRA 1D fueron encontrados como inhibidores de genes involucrados en la síntesis de ADN y en el control de la progresión G1/S y por tanto deteniendo el ciclo celular en esta etapa. En contraste, el receptor adrenérgico ADRA 1B causa una desregulación o avance en el ciclo celular (Jiménez-Alcantar, 2014), por lo que se ha considerado como un protooncogen.

Al investigar la asociación de los receptores adrenérgicos con la expresión de p27^{Kip1}, se encontró que al poner en contacto a los receptores adrenérgicos α_1 A y α_1 D con epinefrina existe un aumento en la expresión de p27 en comparación con aquellas células que no entraron en contacto con la epinefrina. Por el lado contrario, al agonizar al receptor adrenérgico α_1 B con epinefrina, se encontró una disminución en la expresión de la proteína p27 (Fig. 2.3) (González-Cabrera, 2004).

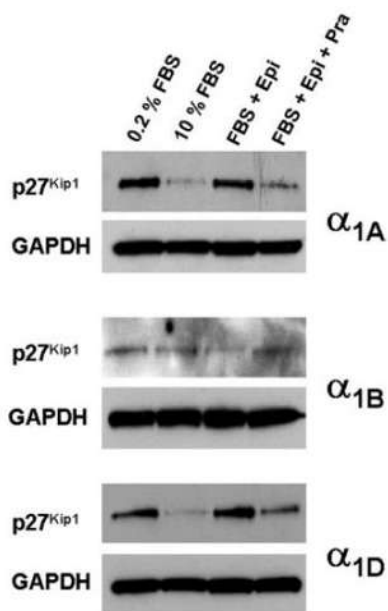


Figura 2.3. Expresión de p27 al modificar la actividad de los α_1 AR. Las células estuvieron expuestas durante 48 hrs a un ambiente bajo en suero (0.2% FBS), luego las células se incubaron con 10% suero (10% FBS) o con 10% suero con epinefrina en presencia (10% FBS + Epi) y ausencia de prazosina (10% FBS + Epi + Prazo). La expresión de p27 fue determinada por lisis celular y un Western blot. Las membranas fueron “rasuradas” y detectadas contra GAPDH para comparar la carga de proteína (González-Cabrera, 2004).

2.2.3 Receptor adrenérgico α_1 B.

Los receptores adrenérgicos α_1 B (ADRA 1B) acoplan a las proteínas G_{q/11}, al unir a sus agonistas, y llevan a la activación de diversas rutas de señalización como lo son la de la fosfolipasa C (PLC) y la estimulación de la hidrólisis fosfoinositido (PI), con aumentos en el calcio intracelular libre y la activación de proteínas quinasa C (PKC), siendo estos algunos casos de los eventos clásicamente descritos de su función (Toews, 2003).

La alteración mutacional de aminoácidos claves en el carbonilo terminal del tercer bucle intracelular (Arg²⁸⁸-Lys, Lys²⁹⁰, His, y Ala²⁹³-Leu) de ADRA 1B, importante para el acoplamiento de la proteína G, puede llegar a ser un mecanismo generalizado para la inducción de la actividad constitutiva y la activación de este protooncogen. *In vivo*, estas mutaciones se pueden presentar espontáneamente alterando la función normal de estos receptores y resultando en estados de enfermedades en las cuales existe un crecimiento celular incontrolado, es decir, se encuentra asociado a cáncer. Además, la indentificación de tales receptores mutantes puede proporcionar marcadores específicos de la enfermedad y blancos farmacológicos para la intervención terapéutica (Allen *et al.*, 1991).

Un estudio reciente mostró que al estimular a los α 1AR con los agonistas fenilefrina y noradrenalina se activa a la proteína Akt mediante la fosforilación de su serina 473 (Strittmater *et al.*, 2012). La proteína quinasa B o también denominada Akt es una serina/treonina quinasa que tiene el rol crucial en el balance celular de supervivencia o apoptosis. Akt constituye un nodo importante en diversas cascadas de señalización corriente debajo de los receptores celulares, juega un papel importante en procesos tales como la proliferación y supervivencia celular, transcripción y síntesis de proteínas y la progresión a través del ciclo celular (Liao y Hung, 2010).

En el año 2010, Shanmugasundaram y colaboradores describieron una ruta de transducción de señales que lleva como producto final la destrucción de un regulador clave del ciclo celular, la proteína p27^{kip}, en la que la proteína Akt activada (fosforilada en la serina 473) participa como uno de los intermediarios de la vía (Fig.2.3). La vía comienza con la activación de la proteína PI3K (fosfatoinositol 3 quinasa), que son enzimas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de las moléculas llamadas en conjunto fosfatidilinositol (PIP2). La fosforilación de PIP2 o su cambio a PIP3 activa la proteína denominada mTORC2. mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es una serina treonina quinasa que toma su nombre por ser blanco de la rapamicina (inmunosupresor utilizado para el rechazo de trasplantes), y controla procesos celulares de supervivencia. Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (también llamado complejo mTOR-1 o mTORC1), que se define por su interacción con Raptor (rapamycin-insensitive companion of mTOR). Al contrario que mTORC1, que fosforila los efectores de mTOR como la quinasa S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 14EBP1 (por medio de eIF3f), mTORC2 (Rictor) controla el citoesqueleto de actina así como a la proteína Akt. La vía de mTOR se encuentra regulada en células eucarióticas a través de la vía PI3K/Akt y es estimulada en respuesta a mitógenos y nutrientes. Al activarse la proteína Akt, ésta promueve a su vez una fosforilación en la proteína Skp2, una vez activada la proteína se une a su complejo SFC (Skp1-Cullin-F-complejo preteico de caja-o box) para adicionar moléculas de ubiquitina a la proteína p27 y su subsecuente degradación en el proteosoma 26S (Fig. 2.4), activando así al complejo CycE/CDK2 y permitiendo la progresión hacia la fase S.

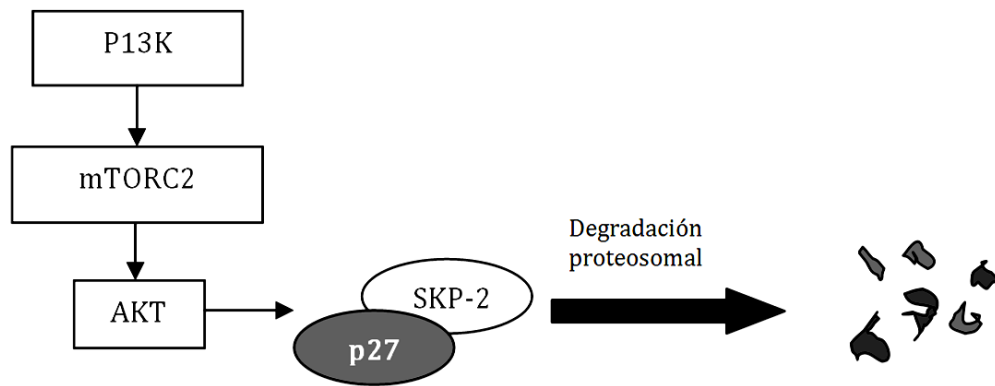


Figura 2.4. **Ruta de señalización para la degradación de p27.** P13K regula la actividad de mTORC2 que altera el balance entre la proteína SKP-2 y p27, llevando a esta última a su destrucción (Shanmugasundaram *et al.*, 2010).

3. RELACIÓN ENTRE EIF3F Y EL RECEPTOR ADRENÉRGICO α_1B (ADRA 1B).

Recientemente, Gutiérrez-Fernández y colaboradores (2015) reportaron que eIF3f se encuentra asociado al receptor adrenérgico α_1B en células A549 al analizar interacciones proteicas diferentes a las del complejo eIF3. Se replicaron los experimentos en tres líneas celulares más; la HepG2, Ramos y MC3T3-E1, mostrando los mismos resultados. Este dato confirma que el complejo (eIF3f-ADRA 1B) no es específico de un tipo celular y sugiere que eIF3f podría participar en otros procesos celulares, además del inicio de síntesis de proteínas. Finalmente se confirmó que, efectivamente, la proteína eIF3f se asocia con el receptor adrenérgico ADRA 1B, involucrado en proliferación celular, y que dicha asociación estimula la actividad adrenérgica.

Mecanismo de acción propuesto por Gutiérrez- Fernández y col. en 2015

Las proteínas G son una familia de proteínas heterotriméricas formadas por tres subunidades denominadas α , β y γ , responsables de muchos procesos de transducción de señal y participan en multitud de procesos de interés tanto fisiológico como fisiopatológico. La característica común de esta familia de proteínas es que en nucleótidos de guanina, en concreto intercambian GDP por GTP, gracias a la interacción con un receptor activado, pasando de un estado inactivo a otro activo, en el que la subunidad α , unida a GTP, se disocia del dímero $\beta\gamma$, permitiéndose así que ejerzan ambos los efectos correspondientes sobre los sustratos diana dando lugar a la respuesta celular (Pin *et al.*, 2003). La subunidad α cataliza la hidrólisis de GTP a GDP, volviendo la proteína G a su estado inactivo (Fig. 2.5).

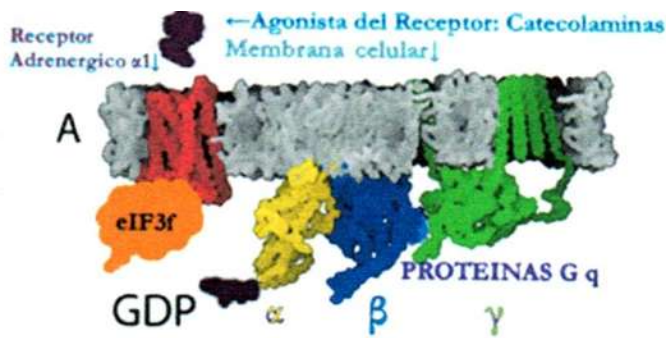
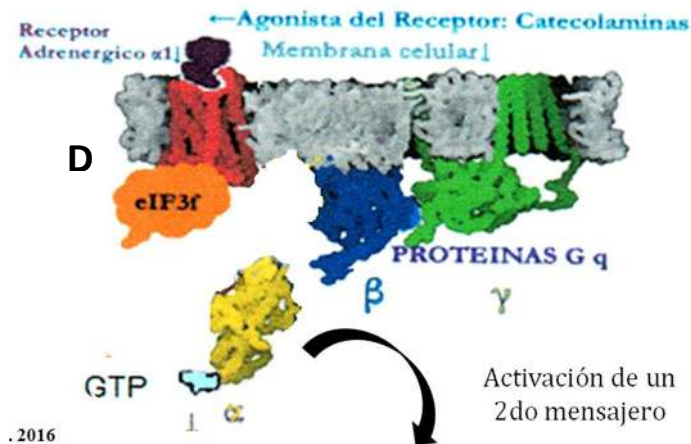


Figura 2.5. **Mecanismo de transducción de señales por ADRA 1B/eIF3f propuesto por Gutiérrez-Fernández y col., 2015.** A) El receptor adrenérgico (rojo) es inactivo. eIF3f (naranja) está asociado al receptor de manera estable. La proteína Gq (amarillo) está unida a GDP. No hay transducción de señal. B) El receptor adrenérgico es activado por el



. 2016

Imagen continúa abajo

Shanmugasundaran y
col, 2010.



Al degradarse p27 el ciclo celular progresa hacia la fase S

Posteriormente, Jiménez-Alcantar (2014), sugirió que el complejo multiproteico formado por eIF3f y el receptor adrenérgico ADRA 1B modula la degradación de la proteína p27 marcada con ubiquitina, con la participación de Akt.

Estos antecedentes indican la importancia que tiene el desarrollo de líneas celulares estables con eIF3f y ADRA 1B. Actualmente existen metodologías que permiten transferir y expresar genes en un organismo a través de vectores de clonación. Para la transfección de células eucariotas con dichos plásmidos se requiere de mucho material y/o recursos para realizar numerosos experimentos, lo que llevó a este equipo de trabajo a implementar un método que permitiera facilitar la labor experimental y con esto, optimizar la expresión de dichas proteínas, con lo que se acortarían los tiempos de experimentación, se reduciría el gasto de recursos y materiales, y se obtendrían resultados más precisos y reproducibles.

El presente trabajo tiene como objetivo principal el diseño molecular de construcciones genéticas en sentido y antisentido para los genes de *Homo sapiens* eIF3f (subunidad f del factor eucariótico de iniciación 3) y ADRA 1B (receptor adrenérgico α_1 1B). Dichas construcciones se llevaron a cabo utilizando al sistema de expresión inducible GeneSwitch™, que permite tener al usuario un control permanente sobre la producción de la proteína.

4. A549: Elección de la línea celular.

La línea celular A549 fue desarrollada por primera vez en 1972 a través de la remoción y cultivo de tejido canceroso de pulmón en un tumor extirpado de un hombre de 58 años de edad. Las células A549 son células

humanas de epitelio alveolar basal. Son de naturaleza escamosa y responsables de la difusión de sustancias a través de los alvéolos del pulmón. *In vitro* estas crecen adherentemente como una monocapa e *in vivo* pueden inducir tumores en ratones atímicos. Las células A549 pueden sintetizar lecitina con un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados utilizando la vía de la citidina difosfocolina (ATCC® CCL185™).

Se eligió esta línea celular porque además de ser una de las líneas disponibles en el laboratorio, se ha determinado, en trabajos anteriores (Jiménez-Alcantar, 2014), que posee un nivel de expresión mínimo para el subtipoADRA 1D y no expresa ADRA 1A.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

La construcción de una línea celular estable que exprese de manera inducible a los genes eIF3f y ADRA 1B en sentido y antisentido, permitirá realizar futuros estudios experimentales en relación al comportamiento de estos dos genes durante el ciclo celular, incluyendo la interacción que existe entre ambos genes, así como elucidar nuevas posible rutas de señalización en la que esta interacción esté involucrada. Dichotrabajo experimental se llevaría a cabo de una forma más eficiente y precisa, aumentando la calidad experimental, reduciendo costos y acelerando los tiempos en la experimentación.

--- Pregunta ---

¿,,,,,, desarrollar una línea celular humana estable que exprese de manera induciblea los genes eIF3f y ADRA 1B?

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

Es posible la construcción de una línea celular estable que exprese de manera inducible los genes eIF3f y ADRA 1B en sentido y antisentido en células humanas A549.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

Objetivo general

Construir líneas celulares estables que expresen de manera inducible, en sentido y antisentido, a los genes eIF3f y ADRA 1B en células humanas A549.

Objetivos específicos

- Llevar a cabo la construcción de los siguientes plásmidos:
 - pGene-eIF3f sentido
 - pGene-eIF3f antisentido
 - pGene-ADRA 1B sentido
 - pGene-ADRA 1B antisentido
- Obtener células humanas A549 estables con pSwitch.
- Obtener células humanas A549 estables con pGene-inserto.
- Seleccionar transfectantes estables dobles.
- Evaluar las transfectantes estables dobles.

CAPÍTULO VI

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.- Ligación del gen de interés dentro del pGene/V5-His.

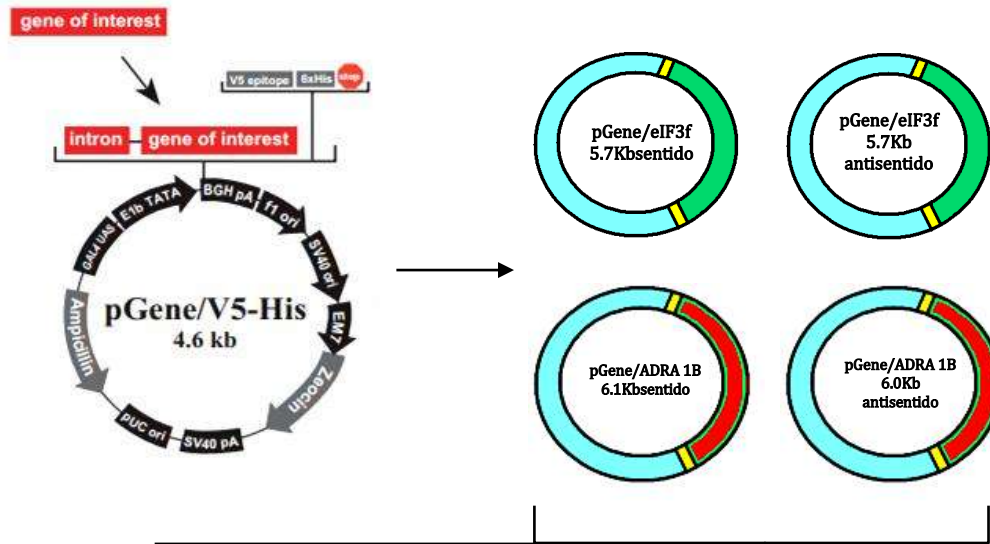
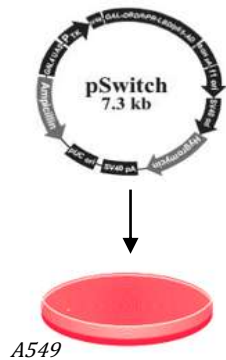
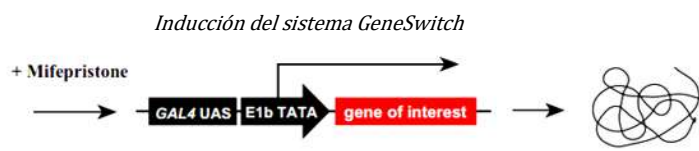


Figura 6.1. Estrategia general para la construcción de líneas celulares estables con expresión inducible en sentido y antisentido de los genes elf3f y ADRA 1B en sentido y antisentido en células humanas A549. Primero se clonan elf3f y ADRA 1B orientados en sentido y antisentido en pGeneV5-His. Posteriormente las células A549 son transfectadas con pSwitch y con las clonas, para después inducir la expresión de las proteínas utilizando el Sistema GeneSwitch™ con mifepristona. La expresión de las transfectantes estables dobles son

2.- Transfección de A549 con pSwitch.



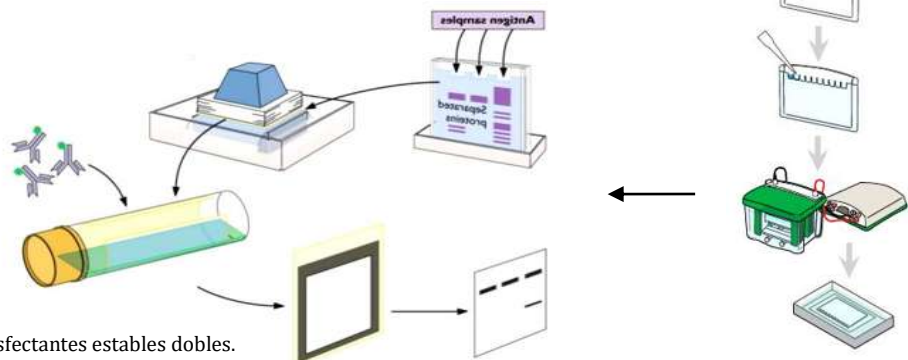
3.- Selección de transfectantes estables con pSwitch.



4.- Transfección de A549 con las construcciones de pGeneV5His/inserto.

5.- Selección de transfectantes estables dobles.

6.- Evaluación de las transfectantes estables dobles.



CAPÍTULO VII

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SISTEMA DE EXPRESIÓN GeneSwitch™.

El sistema GeneSwitch™ es un método de expresión inducible desarrollado originalmente por Wang *et al* (1994), y amablemente donado por el Dr. Víctor Meza Carmen, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Este sistema utiliza un compuesto sintético no esteroideo, que actúa como agonista del receptor de progesterona para activar una proteína reguladora (GAL4-DBD/hpr-LBD/p65-AD) que promueve la transcripción del gen de interés. Este sistema incluye lo siguiente:

- Un plásmido de expresión inducible: **pGene/V5-H**. En donde la expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor híbrido que contiene un GAL UAS proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (Giniger, 1985; Laughon, 1984) y una caja TATA de adenovirus E1b.
- Un plásmido regulador: **pSwitch**. Este plásmido codifica una proteína de fusión que consiste en tres dominios de unión; uno al ADN (DBD) activado por un GAL4 de levadura, un dominio a un receptor truncado de progesterona (hPR-LBD) y otro a la subunidad p56 de NF-κB (Vegeto, 1992; Schmitz, 1991).
- Mifepristona, compuesto esteroideo sintético análogo de la progesterona que induce la expresión del gen de interés (Vegeto, 1992; Wang, 1994; Wang, 1997).
- Un plásmido control que contiene el gen lacZ: **pGene/V5-His/lacZ**, el cual al ser cotransfectado con pSwitch expresa β-galactosidasa por la acción de la mifepristona (Miller, 1972).

1.1 Proteína GAL4-DBD/hpr-LBD/p65-AD.

La proteína GAL4-DBD/hpr-LBD/p65-AD (proteína GAL4) es una proteína híbrida compuesta por tres dominios de unión específicos:

Tabla 7.1 Características de la proteína GAL4.

GAL4		Permite a la proteína GAL4 unirse al
Origen: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dominio de unión al ADN	ADN a los sitios de GAL UAS
Receptor truncado de progesterona (hPR)	Dominio de unión al ligando (mifepristona)	Permite la unión específica de la mifepristona y la consecuente activación de la proteína GAL4
Origen: <i>Homo sapiens</i>		
Subunidad p65 de NF-κB		Permite la activación de la
Origen: <i>Homo sapiens</i>	Dominio de activación	transcripción del gen de interés

En el Sistema GeneSwitch™ la proteína GAL4 funciona como un factor transcripcional ligando-dependiente que activa su misma expresión y la expresión del gen de interés a través de GAL4-DBD a los sitios de unión de GAL4 UAS en el pSwitch. La combinación de los dominios expuestos anteriormente, le confieren al sistema las siguientes características:

- ✓ La proteína no tiene efecto en genes endógenos, debido a que el GAL4-DBD es de levadura, y solo puede activar la transcripción de los genes cuya expresión estén bajo el promotor de GAL4 UAS (ej. el gen de interés y la proteína GAL4).
- ✓ El hPR-LBD truncado tiene una delección de 19 aminoácidos en el C-terminal que le confiere afinidad por la mifepristona (RU486) y anula la afinidad para unirse a la progesterona o agonistas y a otras hormonas esteroideas endógenas (Vegeto, 1992; Wang 1994; Wang, 1997).

1.2 Mecanismo de acción.

Una vez que pSwitch y pGeneV5-His/inserto son introducidos a las células, en ausencia de mifepristona, la proteína reguladora (GeneSwitch) comenzará a sintetizarse a concentraciones muy bajas en su forma inactiva por la activación del promotor TK del pSwitch.

Al adicionar la mifepristona, ésta se une con gran afinidad al dominio truncado del receptor de progesterona (hPR-LBD) en la proteína reguladora lo que provoca un cambio conformacional que activa la proteína. A

continuación, el ligando interactúa con el sitio de unión de Gal4 en UAS de ambos plásmidos, pGeneV5-His y pSwitch, activando la transcripción del gen de interés, desde la caja TATA de adenovirus E1b y de la proteína encargada de regular el sistema desde el promotor TK. La expresión del gen de interés se ve amplificada a través de un bucle de retroalimentación que es regulado por la proteína GeneSwitch (unida a la secuencia UAS de Gal4) donde el dímero Gal4-mifepristona estimula la activación a gran escala de su propio gen así como del gen de interés (Fig. 7.1).

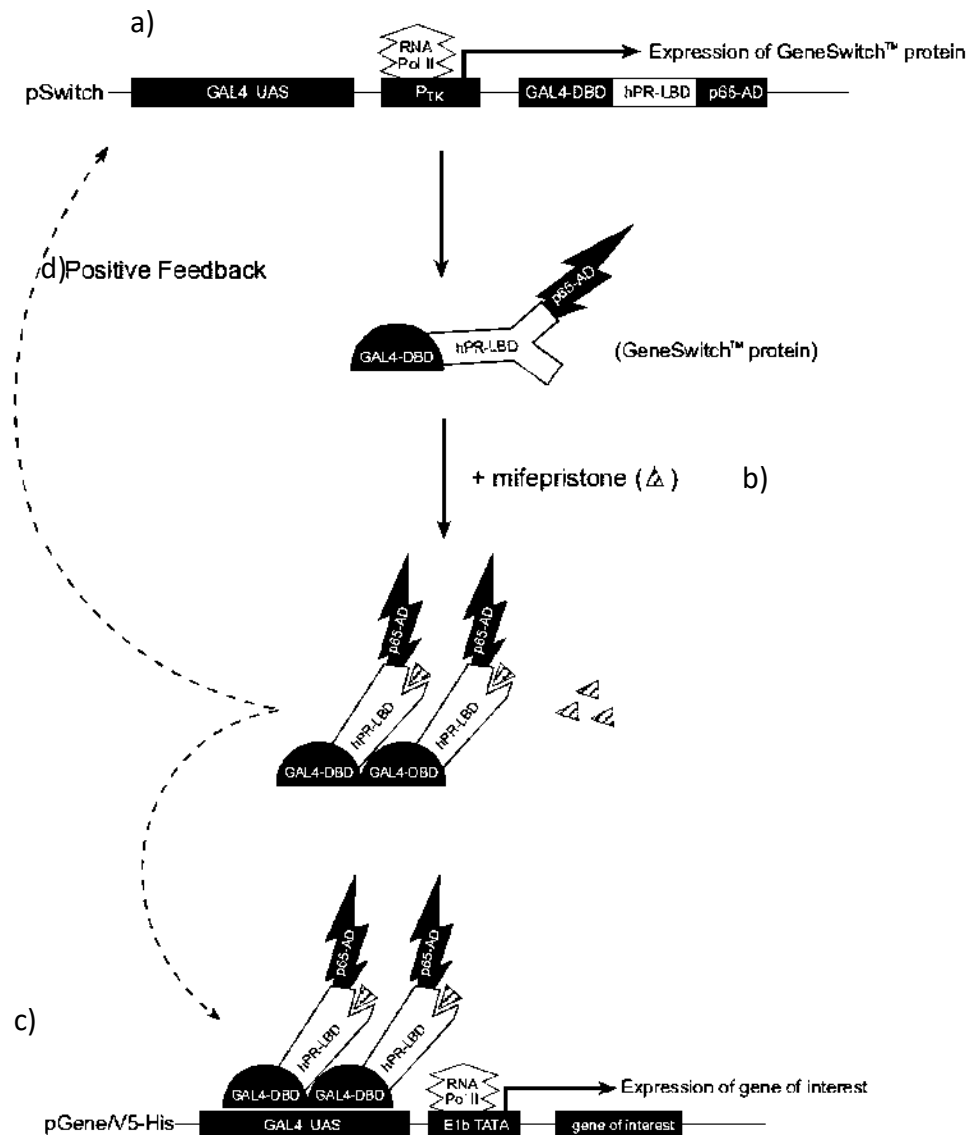


Figura 7.1. **Mecanismo de acción del Sistema de Expresión GeneSwitch™.**

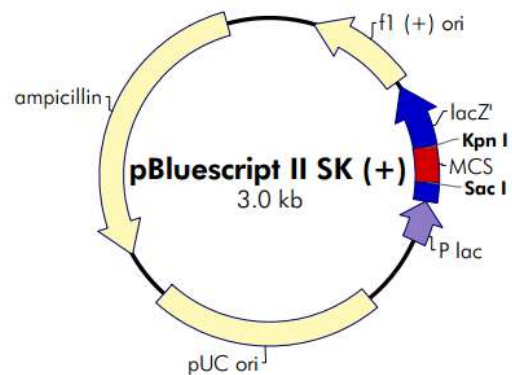
a) El pSwitch expresa la proteína GAL4 en forma inactiva. b) Al unirse con la mifepristona ésta se activa. c) La proteína GAL4 activada se une al dominio de unión GAL4 UAS en el pGene/V5-His promoviendo la expresión del gen de interés. d) Se crea un *feedback* positivo cuando la proteína también se une a pSwitch promoviendo la expresión de la proteína GAL4.

2. VECTORES DE CLONACIÓN

pBluescript II SK +

En trabajos previos se le insertó la secuencia codificante del gen de eIF3f del cromosoma 11, a dicha construcción se le denominó pRCE021 (Fig. 7.2). Este mismo vector se utilizó para subclonar ADRA 1B orientado en sentido y antisentido (ver más adelante).

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



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

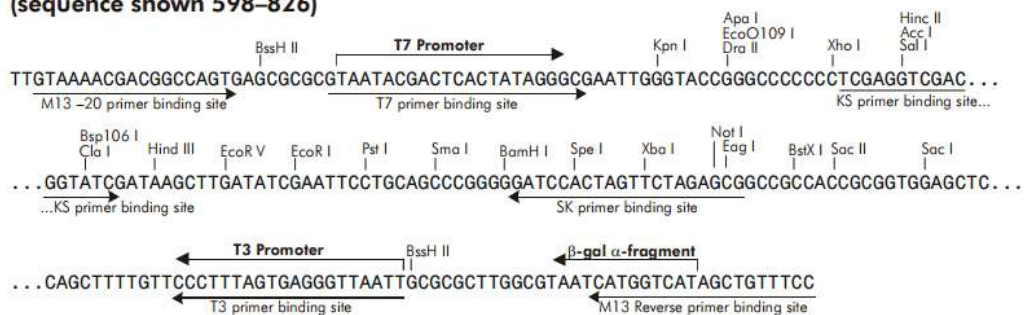


Figura 7.2. Mapa de clonación de pBluescript II SK (+). Stratagene Cat. No. 212205. Plásmido en el cual se insertó una copia del cDNA del gen de eIF3f bajo el promotor T3. También se utilizó para subclonar ADRA 1B en sentido y antisentido bajo el promotor T7.

pTRIkan 18

Este vector fue uno de los plásmidos intermediarios utilizados para subclonar ADRA 1B (orientado en sentido) para obtener la clona final en pGeneV5-His. Este vector es resistente a kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml y contiene el gen de β-galactosidasa que permite la selección de las transformantes (Fig. 7.3).

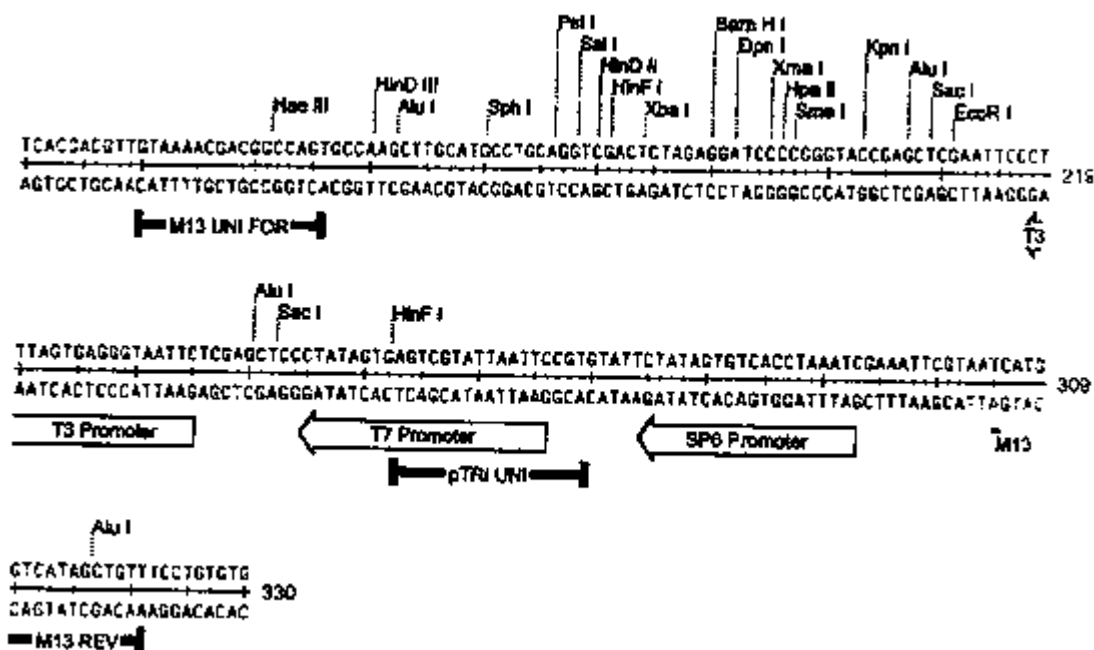


Figura 7.3. Mapa de clonación de pTRI-kan 18. (Ambion) Cat. No. 7403. Plásmido en el cual se subclonó el gen de ADRA 1B bajo el promotor T3 orientado en antisentido.

3. MEDIOS DE CULTIVO

A los medios de cultivo se les agregó antibiótico(s) a concentraciones según el requerimiento de la cepa. La cepa con la que se estuvo trabajando es *Escherichia coli* DH5α.

Medio LB.

Este medio (Luria Broth) se utilizó para cultivar las cepas de *Escherichia coli* DH5α.

Se disuelven los siguientes componentes en 900ml de agua destilada:

- ✓ 10g de triptona
- ✓ 5g de extracto de levadura

- ✓ 10g cloruro de sodio

Se afora a un litro con agua y se esteriliza por autoclave 20min/120°C. Si se desea medio sólido se adicionan 15g/L de agar después de aforar y antes de esterilizar.

4. TÉCNICAS MOLECULARES

4.1 Técnica por lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos de bajo peso molecular (< 50 Kb)- MINIPREP -

Sembrar un inóculo de bacterias en 3ml de Medio LB con su respectivo antibiótico. Incubar durante 24 horas a 37°C en agitación moderada (150-200 rpm). Colocar 1.4 ml de cultivo en tubos eppendorf y centrifugar 30 seg/13,200 rpm. Desechar el sobrenadante por decantación. Resuspender el pellet en 100ul de Solución I. Incubar en hielo (4°C) por 5 min, manteniendo el tubo destapado. Añadir 200ul de Solución II cerrar la tapa y mezclar suavemente invirtiendo el tubo (6 veces) e incubar en hielo (4°C) por 2-3 min. Añadir 150ul de Solución III, mezclar en posición invertida e incubar en hielo (4°C) por 5 min. Centrifugar 5min /13,200 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo y desechar el pellet. Añadir un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) mezclar en vórtex por 30 seg. Centrifugar 5 min /13,200 rpm y transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf. Añadir un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) mezclar en vórtex por 30 seg. Transferir fase acuosa a otro tubo y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar. Incubar 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar 5 min/13,200 rpm y desechar el sobrenadante. Añadir 500ul de etanol al 70% a -20°C, mezclar bien y centrifugar 3 min/13,200 rpm. Desechar el sobrenadante y secar el pellet al vacío (10 min). Resuspender el pellet en 30ul de agua estéril con RNAsa e incubar 15-20 min a 37°C. Correr un gel de agarosa al 1% para verificar el producto de la purificación.

Tabla 7.2 Soluciones utilizadas en la purificación de ADN por lisis alcalina.

Solución I	Solución II	Solución III
-50mM Glucosa PM 180.2 -25mM Tris.Cl (pH 8.0) PM 121.11 -10mM EDTA (pH 8.0) PM 327.24 Para esta solución es conveniente preparar 100 ml, esterilizar en autoclave 15-20min y guardar a 4°C.	-0.2N NaOH (diluída de un stock 10N) -1% SDS (de un stock 10%) Usar solución fresca para cada purificación. Para 1ml: 880ul H ₂ O, 100ul, 20ul NaOH.	- H ₂ O 28.5ml -5M Acetato de Potasio 60ml -Ácido Acético Glacial 11.5ml Cantidades para preparar 100ml de solución. Almacenar a 4°C.

4.2 Midiprep (Kit NucleoBond® plasmid purification Lot 1304/002).

Sembrar un inóculo de bacterias en 50ml en Medio LB con su respectivo antibiótico. Incubar durante 24 horas a 37°C en agitación moderada (150-200 rpm). Verter el inóculo en tubos para rotor JA-20 y centrifugar a 7000rpm/15min/4°C. Decantar y adicionar Buffer S1+RNAasa A. Homogeneizar. Después adicionar 4ml de Buffer S2 (buffer de lisis) y mezclar gentilmente (NO VÓRTEX) invirtiendo el tubo 6-8 veces. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 2-3min (max. 5min). Neutralizar con 4ml Buffer S3 (4°C) invertir el tubo gentilmente 6-8 veces e incubar en hielo por 5min. Calibrar la columna añadiendo 2.5ml de Buffer N2 y esperar a que se vacíe. Mientras se calibra la columna centrifugar el lisado a 12000g/5min/4°C. Posteriormente, hacer pasar el sobrenadante a través de la columna utilizando un embudo estéril con un papel filtro mojado (para que el ADN no se quede en las fibras del papel filtro). Esperar a que termine de gotear (el ADN se quedará en la resina) y descartar el líquido que gotea de la columna. Lavar la columna (sin embudo) añadiendo 12ml de Buffer N3. Eluir con Buffer N5 y recuperar en un tubo de 50ml limpio y estéril. Precipitar con 3.5ml de isopropanol mezclar y centrifugar en rotor JA-20 a 12500rpm/30min/4°C. Opcional: lavar con etanol al 70%. Descartar el sobrenadante y disolver el pellet con 150-200µl de H₂O destilada. Mezclar en el shaker durante 30min, girar el tubo cada 7-10min. Por último con una micropipeta tomar el ADN y pasarlo a un tubo eppendorff. Etiquetar y guardar a -20°C.

4.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Para preparar un gel de agarosa al 1%:

Disolver por calor 1g de agarosa por cada 100 ml de TAE 1X en un matraz. Preparar lo que sea necesario. Disolver en horno de microondas. Enfriar. Una vez tibia la solución, añadir 1µl de Bromuro de etidio. Poner cinta alrededor de la cama poner el peine y después vaciar la solución. Esperar 30min a que se solidifique. Después retirar el peine con cuidado de no romper el gel, la cinta y se pone dentro de la cámara. Llenar la cámara con Buffer TAE 1X (del mismo que se utilizó para preparar el gel) hasta cubrir el gel. Cargar los pozos con la muestra. Conectar la cámara a la fuente de poder, encender el equipo. Correr la electroforesis a 80V durante 1-2 horas.

4.4 Digestión de ADN.

Para realizar una digestión de ADN genómico o plasmídico utilizando enzimas de restricción, se mezclan los siguientes componentes bajo las siguientes condiciones:

- H₂O
- ADN problema
- Enzima de restricción (la que convenga)
- Buffer de digestión apropiado para la enzima

Las cantidades de cada componente se ajustan al volumen total de la digestión.

El volumen total de las digestiones realizadas es de alrededor de 40-70µl según convenga. La reacción se incubó a la temperatura indicada para que actúe la enzima, normalmente a 37°C. Si es necesario, se corre en un gel de agarosa 1% TAE 1X una muestra para ver el estado del producto de la digestión.

4.5 Ligación de ADN (pasajero) a un vector conocido (vehículo).

Para realizar una ligación se prepara la siguiente mezcla y se incubó a 14°C durante 1hr o transnoche o según lo indique la información del fabricante de la enzima (ligasa).

- H2O estéril
- ADN vehículo
- DADN pasajero
- Buffer de ligasa
- Enzima ligasa

Las cantidades de cada componente se ajustan al volumen total de la digestión.

El volumen total de las ligaciones realizadas es alrededor de 15µl, se recomienda manejar volúmenes pequeños para que los eventos de colisión entre el inserto y el vehículo sean mayores.

4.6 Limpieza de ADN.

La limpieza del ADN se realiza después de cada digestión para eliminar impurezas como colorantes, restos de enzima, sales y otras moléculas que pudieran intervenir en la siguiente digestión y/o ligación. Se utilizó el Kit MinElute® Reaction Clean Up (cat. Nos. 28204 y 28204).

Agregar 300µl de buffer ERC para un volumen de 20-100µl y mezclar en el vórtex. Transferir el ADN a una columna y centrifugar a 13,000 rpm/1 min. Descartar el remanente y adicionar a la columna 750µl de buffer PE. Centrifugar 13,000 rpm/1 min. Descartar el remanente y centrifugar una vez más. Pasar la columna a un tubo eppendorff sin tapa. Agregar a la columna la cantidad que convenga de agua destilada (10µl como mínimo) e incubó 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar 13,000 rpm/1 min. Tapar, rotular y conservar a -20°C.

4.7 Elución en gel de ADN.

Este procedimiento se realizó utilizando el Kit Combo PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification. Invitrogen Life Technologies Lot 326.02.21.02.

Correr un gel con el ADN que se va a eluir. Después de la electroforesis, extraer el área mínima del gel en el que está contenido (se recomienda poner una muestra de referencia) el fragmento de ADN de interés e

introducirlo en un tubo eppendorf de peso conocido. Pesar el tubo con el gel. Añadir 3 volúmenes de Buffer para Solubilizar (L3) en relación al peso del gel (3:1). Incubar a 50°C en Baño María por 10 min, invertir el tubo cada 3 min hasta que el gel se disuelva por completo. Después de que el gel se disuelva incubar por 5 min más. Transferir el volumen total a una columna y centrifugar a 12,000 g durante 1 min. Descartar el remanente y centrifugar una vez más 12,000 g/1min. Añadir 500ul de Buffer de Lavado (W3) a la columna y centrifugar a máxima velocidad por 1 min. Descartar el remanente y centrifugar a máxima velocidad por 2-3 min. Descartar el remanente. Pasar la columna a un tubo eppendorf y añadir 50ul de Buffer Eluyente (E1). Incubar durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12,000 g por 1 min. Conservar el ADN eluido a -20°C.

4.8 Reacción en cadena de la polimerasa.

La PCR se hizo para verificar la presencia del pSwitch en las células A549. La reacción inicial se llevó acabo con las siguientes cantidades de reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD	MUESTRA
H2O	c.b.p. 50µl totales	A2 - 3 µl
Buffer 10X	5 µl	A3 - 2 µl
dNTP's 10mM	1.5 µl	B1 - 2.5 µl
MgSO4 50Mm	1 µl	B2 - 3 µl
Primer [20pMoles]	2 µl (de cada oligo)	C1 - 3 µl
Templado	100ng	C2 - 3 µl
Enzima	0.5 µl	D1 - 3 µl
		D2 - 2 µl

El termociclador se programó para 30 ciclos.

4.9 Ensayo de Western blot.

Electroforesis.

El corrimiento electroforético se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrilamimide gel electrophoresis) utilizando el gel separador al 10% y el gel concentrador al 5%. De cada lisado se carga la proteína en los pozos del gel previamente limpios con buffer de corrida; el corrimiento electroforético se realiza (solución SDS/Glicina/Tris-base pH8.3) a 80V de 90 a 120min.

Transferencia.

Luego de la electroforesis, los geles se colocan en buffer Towin o de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 192mM, metanol 20%) con agitación recíproca de 3-5min, mientras que por otro lado la membrana de

difluoruro de polivinilideno (PVDF) se hidrata en metanol con agitación recíproca durante 20seg; se lava dos veces con agua tridestilada y se coloca en buffer Towin con agitación recíproca por 5min. La proteína se transfiere a una membrana de PVDF, colocando el gel en un “emparedado” de papeles filtro humedecidos previamente en buffer Towin en el siguiente orden ascendente dentro de una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad trans-blot SD semi-dry transfer cell): papel Criterion, papel Bio-Rad 920, membrana PDVF, gel de poliacrilamida, papel Bio-Rad 920 y Criterion, eliminando las burbujas en cada capa. Limpiar el exceso de buffer de la placa de transferencia, cerrar la cámara. La transferencia se deja por 90min a 20V. Después de la transferencia, la membrana se deja secar por 30min, se polariza con metanol, se lava dos veces con agua tridestilada y se coloca en TBS1X durante 5min para su posterior bloqueo.

Bloqueo e incubación de anticuerpos.

El bloqueo se lleva a cabo en solución de BSA al 4% disuelto en TBS-T (TBS1X más Tween 20 al 0.1%) durante 60 a T.A. en agitación suave. Una vez terminado el bloqueo se desecha la solución de bloqueo y se procede a incubar la membrana con el anticuerpo primario correspondiente. La concentración de los anticuerpos primarios puede variar según el volumen que se requiera emplear.

Tabla 7.3. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección primaria.

Ac. Primario	Origen	Dilución	Marca
eIF3f	Conejo	1:2000	Biolegend
ADRA 1B	Conejo	1:1000	OriGene
GAPDH	Ratón	1:2500	Santa Cruz Biotechnology

La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C en agitación suave. El anticuerpo es disuelto en solución de bloqueo y en un volumen que cubra toda la superficie de la membrana.

Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se hacen 5 lavados de 7min cada uno con TBS-T (TBS más Tween 20 al 0.1%) en agitación vigorosa. Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (volumen necesario para cubrir la membrana) en agitación suave durante 60min a temperatura ambiente y posteriormente se realizan 5 lavados de 6min cada uno con TBS-T en agitación vigorosa. Los anticuerpos secundarios se unen a una región específica de los anticuerpos primarios y además están unidos a peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno, reacción que genera luz. Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la exposición a la luz que se desprende de la reacción y permite detectar la actividad enzimática. La concentración de los anticuerpos secundarios puede variar según el volumen que se requiera emplear.

Tabla 7.4. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección secundaria.

Ac. Secundario	Origen	Dilución	Marca
HRP anti-conejo	Cabra	1:2000	Biolegend
HRP anti-conejo	Cabra	1:2000	Santa Cruz Technology
HRP-anti-ratón	Cabra	1:5000	Santa Cruz Technology

Revelado y digitalización.

Una vez terminados los 5 lavados, se impregna la membrana con solución de detección del kit de revelado ECL Plus Western Blotting Detection Reagent de GE Healthcare (Amershan) que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incuba la membrana por 1min y se fija sobre Kleen pack™ dentro de un cassette. En cuarto oscuro se coloca una película de rayos X sobre la membrana, se cierra el cassette y esperar 30min. Finalmente la película se revela (soluciones de revelado FujiFilm), se enjuaga en agua corriente, se coloca en una solución fijadora por aproximadamente 2min y se vuelve a enjuagar. Una vez seca la película se procede a digitalizar la señal con el software de Kodak Digital Science ID.

5. TÉCNICAS GENÉTICAS

5.1 Transformación por electroporación.

Pipetear 2ul de la ligación, colocarlo en el tubo de las células preparadas (se utilizó la cepa DH5-alfa) y homogeneizar. Incubar el tubo 1 min en hielo. Transferir el contenido del tubo a una celda de electroporación estéril. Dar un shock de 2000 volts en el electroporador durante 3 seg. Sacarlo rápidamente y resuspender en 1ml de Medio LB. Colocar todo en tubo estéril e incubar a 37°C durante no más de 1 hr en agitación suave. Tomar 150ul-200ul de este cultivo y platear sobre cajas de Petri con medio LB y sus respectivos antibióticos de selección. Incubar durante 24 hrs/37°C.

Resembrar las colonias que aparezcan.

5.2 Preparación de células electrocompetentes.

Previamente, tener preparado lo siguiente:

- ✓ 10 ml preinóculo DH5-alfa en LB solo
- ✓ 1L de LB solo
- ✓ 2L agua destilada estéril a 4°C
- ✓ 4 frascos estériles de 250 ml para centrifugación
- ✓ Glicerol estéril al 10%

Verter el preinóculo en el litro de Medio LB líquido. Incubar 2-3hrs/37°C en agitación moderada (200 ciclos/min) hasta que llegue a una concentración adecuada. Vaciar el cultivo en los 4 frascos de 250 ml y

equilibrarlos utilizando una balanza granataria. Centrifugar 15min/6000 rpm/4°C. Tirar el sobrenadante y lavar vigorosamente con 200 ml de agua estéril y fría hasta que el pellet se disuelva completamente. Centrifugar 6000 rpm / 15 min /4°C. Decantar el sobrenadante y nuevamente lavar con 200 ml de agua estéril y fría. Centrifugar 6000 rpm / 15 min /4°C. Decantar y disolver el pellet con 30 ml de glicerol estéril al 10%. Centrifugar 6000 rpm / 15 min /4°C, separar el sobrenadante con una pipeta y desecharlo. Resuspender las células con 2-3 ml de glicerol al 10% y disolver. Tomar alícuotas de 100µl por cada tubo y guardar a -80°C.

5.3 Transformación por Calcio (Ca⁺⁺).

Colocar 2ul de DNA en un tubo con células preparadas. Incubar en hielo (4°C) durante 30 min. Darles un shock a 42°C (puede ser en Baño María) por 90 seg. Incubar inmediatamente en hielo durante 2 min. Agregar 800ul de Medio LB líquido e incubar 45min /37°C en agitación suave (50 ciclos/min) y resembrar las colonias que aparezcan. Platear 100 ul de cultivo sobre cajas Petri con Medio LB y sus respectivos antibióticos. Utilizar perlas de dispersión para expandir la muestra en toda la superficie. Incubar 45min /37°C en agitación suave (50 ciclos/min) y resembrar las colonias que aparezcan.

5.4 Preparación de células para transformar por Calcio (Ca⁺⁺).

Crece las células (DH5-alfa) en 4ml de Medio LB por 24hrs/37°C. En 50ml de Medio LB líquido se agrega poco a poco (100ul) el preinóculo que se cultivó anteriormente. Incubar 2hrs/37°C. Transferir el contenido a un tubo falcon y centrifugar 10min/5,900 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 15 ml de solución de Cl₂Ca 20Mm· Cl₂Mg 80Mm y mezclar suavemente. Centrifugar 10min/5,900 rpm a 4°C. Después decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2ml de una solución de Cl₂Ca 0.1M. Alicoutar 200ul en tubos eppendorf y almacenar a -80°C.

6. TÉCNICAS CELULARES

6.1 Mantenimiento y manejo de la línea celular A549.

Para trabajar con A549 se usó una cabina de seguridad biológica Clase II A2 (ThermoForma). Se realizaron diferentes técnicas indispensables para el mantenimiento y manejo de las células durante el desarrollo del proyecto.

6.2 Descongelado de células.

Se descongela al criovial en termobañero a 37°C y se transfieren las células a un frasco T-75 cm² con 15 mL ó 5 mL, respectivamente, de medio MEM-SFB 10%, que se atempera previamente en incubadora a 37°C y 6% de CO₂ por 10 minutos. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja para oxigenar y que los gases

circulen en su interior permitiendo así que el medio alcance las condiciones de pH 7.5. Cuando el cultivo llega a la población esperada se resiembra.

6.3 Resiembra.

Se descarta el medio viejo del cultivo y se hacen dos lavados con 2mL de PBS 1X frío por cada 25 cm². Para desprender las células se impregnan con 05mL de una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25 cm² y se incuba a 37°C por 2-3 minutos. Enseguida se resuspende las células 2mL de medio MEM-SFB 10%, se calcula la concentración y la viabilidad celular para determinar el volumen a tomar de la cosecha y resembrar a una concentración inicial de 0.2X10⁶ células para un frasco T-25cm² ó 0.6X10⁶ células para un frasco T-75 cm². El volumen determinado de resiembra se deja en el frasco y se descarta el resto, se agrega al frasco MEM, 5mL en T-75 cm² ó 15 mL en T-75. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja.

6.4 Determinación de concentración celular y viabilidad.

Cada muestra de cultivo se lava 2 veces con una solución tampón de fosfatos (PBS) estéril con un pH de 7.4 a 1M. Las células se desprenden con tripsina, añadiendo 0.5mL del regulador por cada 25cm² de superficie de cultivo y posteriormente es incubado a 37°C por un lapso de 3 min. Para inhibir la acción enzimática de la tripsina se añaden 3.5mL de medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Las células resuspendidas se dividen en tres tubo y se realiza una dilución 1:1 con el azul de tripano, para realizar la determinación por triplicado. Las células viables no permitirán el paso del colorante a través de la membrana celular, mientras que las células no viables se tiñen de azul. Se transfiere una pequeña cantidad de la mezcla a una cámara de Neubauer, dejando que la cámara se llene por capilaridad. La cámara de Neubauer se coloca en un microscopio óptico invertido (LEICA) a 40X y se cuentan las células vivas y muertas encontradas en el cuadro del centro y en los cuadrados de la esquina de ambos lados de la cámara. La concentración celular se determina de la siguiente forma:

$$\text{No. Células} \times 10^6 = (\text{FC})(\text{FD}) (\text{No. Células} \times 10^6)$$

Donde:

FC = Factor de conversión de la cámara = 0.001

FD = Factor de dilución

Y:

$$\text{FD} = \frac{(\text{Vol. de muestra} + \text{Vol. de colorante})}{(\text{Vol. de muestra})}$$

El porcentaje de viabilidad celular se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \left(\frac{\text{No.de células viables}}{\text{No.de células totales}} \right) 100$$

6.5 Transfección.

Las transfecciones se realizaron en la línea celular A549, a partir de cultivos con una confluencia del 70%. Se utilizó como agente de transfección la Lipofectamina2000 (Invitrogen). Para cada millón de células se utilizan 5µg de ADN (plásmido a transfectar) y 15µl Lipofectamina2000 en 150µl de medio OptiMEM. Se incubaron a 37°C y 6% de CO₂ durante 36-48 hrs. Y se procede a cosechar las células haciendo primero 3 lavados con solución PBS. Para desprender las células se impregnan con 0.5ml de una solución de tripsina (Sigma) por cada 25cm² y se incuba a 37°C por 2-5 minutos. Luego se colectan las células en tubos eppendorf para su posterior uso.

6.6 Cosecha y lisis celular (para obtener proteína).

Para la cosecha y lisis celular se llevan a cabo los siguientes procedimientos:

- a. **Para los frascos T-25 y T-75:** se descarta el medio de cultivo. Para desprender las células se impregnan con 0.5ml de una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25cm² y se incuba a 37°C por 2-5 min. Luego se pasan las células a un tubo falcon y se centrifugan a 250g durante 5min. Luego se realizan dos lavados con PBS (2ml de PBS1X frío por cada 25cm²), entre cada lavado se repite el procedimiento de centrifugar a 250g durante 5min. Después del segundo lavado y centrifugación se decanta el PBS y el pellet celular se resuspende y se pasa a un tubo eppendorf y se agregan 20 volúmenes de buffer de lisis (P1 PrtoteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas). Las células se agitan en “shaker” 900-1200rpm durante 10min. Luego se centrifugan las muestras a 20000g durante 15min con la finalidad de quedarnos únicamente con el sobrenadante, almacenándose a -70°C.
- b. **Para los platos (10cm²):** se descarta el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con PBS1X frío (esto utilizando una pipeta para hacer los descartes). Para desprender las células se adicionan 300µl de tripsina-EDTA 1X (Sigma) previamente atemperada a 37°C, y se incuba a 37°C durante 3-5min. Arrastrar las células con 1ml PBS1X a presión sobre la base del plato, o bien, pueden ser 2 x 0.5ml a presión (se puede verificar el desprendimiento de las células en el microscopio). Transferir las células a un tubo eppendorf de 1.5ml y centrifugar a 500g/5min. Decantar el sobrenadante, vórtex para desprender el botón celular, adicionar 75µl de buffer de lisis (P1 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent Fermentas), pipetear 20 veces, vórtex 1min y agitar por 15min. Después de esto centrifugar a 16000g durante 18min. Transferir el sobrenadante (proteína) a un tubo nuevo. Etiquetar y almacenar a -70°C.

6.7 Determinación de proteína (Bradford).

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford en placas de 96 pocillos. Se diluye 1 parte de reactivo de Bradford por 4 partes de agua DDI (1:4), se cargó en los pozos 1µl de muestra y 9µl de agua. Se prepararon 2 soluciones con proteína estándar BSA.; una a 0.5 mg/ml y otra a 1.0 mg/ml como controles, un blanco (agua + react. Bradford) y otro con igepal 0.2%. Se agregan 200µl de solución de trabajo (react. Bradford preparado) a cada pozo y mezclar con la micropipeta, incubar a temperatura ambiente durante 5min en agitación moderada. La absorbancia se determinó a 595nm de longitud de onda. A cada una de las absorbancias de los lisados se le restó la absorbancia del buffer de lisis y a la absorbancia resultante se substituyó con la ecuación de la recta obtenida de nuestra curva estándar:

$$Y = 57.333X + 0.3136$$

Donde:

X = Absorbancia de la muestra

Y = Concentración de proteína en µg/muestra de ensayo Bradford

6.8 Ensayo de β- galactosidasa.

Este ensayo se hizo para hacer la primera selección de las transfectantes estables con pSwitch y para verificar que el sistema GeneSwitch™ funciona adecuadamente al inducir la expresión con mifepristona. Se utilizó el kit β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega cat.E2000).

Las colonias transfectadas con pSwitch se transfectan transitoriamente con pGene/LacZ. Posteriormente éstas son inducidas con mifepristona 1×10^{-6} M durante 24 hrs. Durante la inducción se estará expresando el gen LacZ que codifica para β-galactosidasa, enzima que reduce el sustrato ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) dando una coloración amarilla. Para esto se lisan las células pSwitch transfectadas transitoriamente con pGene/LacZ para obtener la proteína en donde se encuentra dicha enzima (la lisis se hizo en anillos de clonación). La determinación se realizó en placas de 96 pocillos: Se mezclan 30µl de lisado con 20µl de buffer de lisis reportero 1X. Como control negativo se hizo la misma mezcla pero con lisado de células pSwitch sin el pGene/LacZ. Después se descargan los 50µl por cada pozo y se adicionan otros 50µl buffer de ensayo 2X que contiene el sustrato ONPG. Mezclar, cubrir la placa e incubar a 37°C por 30 minutos. Después se detiene la reacción adicionando 150µl de carbonato de sodio 1 M. Inmediatamente se lee en el espectrofotómetro a 450nm. Es positivo cuando la muestra se torna color amarillo.

6.9 Ensayo Azul de Alamar para medir la viabilidad/citotoxicidad.

Esta determinación se realizó en cultivos expuestos a distintas concentraciones de antibióticos durante 11 días. Se siguió el protocolo sugerido por el proveedor donde primeramente se descongela y atempera el Azul

de Alamar (INVITROGEN). En condiciones de esterilidad, se adicionan cantidades de azul de Almar a los cultivos de interés una proporción equivalente al 10 % del volumen del cultivo y se incluyen controles negativos que consisten de medio sin células, con y sin azul de Alamar. Los cultivos se incuban 37°C y 5% CO₂. Transcurridas 4 horas posteriores a la adición del azul de Alamar, en condiciones de esterilidad, se colecta 1 mL del sobrenadante de cada cultivo y de los controles negativos y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro de luz visible (GENESYS 20, Spectronics Instruments) a 570 y 600 nm. La absorbancia a 600 nm mide la mayor cantidad de la forma oxidada (resazurina) y la absorbancia a 570 nm mide la mayor cantidad de la forma reducida (resorufina).

La concentración celular viable es proporcional al porcentaje de la forma reducida del Azul de Alamar, que se determina con la siguiente ecuación:

$$AR_{LW} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_o) \times 100$$

Donde:

R_o= factor de corrección. $R_o = AO_{LW} / AO_{HW}$.

AO_{LW}= AO_{570} = Abs a 570 nm del medio con azul de alamar – Abs a 600 nm del medio solo.

AO_{HW}= AO_{600} = Abs a 600 nm del medio con azul de alamar – Abs a 600 nm del medio solo.

A_{LW}= A_{570} = Abs a 570 nm de la muestra – Abs a 570 nm del medio solo.

A_{HW}= A_{600} =Abs a 600 nm de la muestra – Abs a 600 nm del medio solo.

La citotoxicidad se expresa generalmente como el nivel LD50, y es la dosificación de un material (antibiótico) que es mortal para el 50% de una población probada. Para los cálculos de citotoxicidad se utiliza la siguiente ecuación que representa el porcentaje de diferencia entre el cultivo tratado y el cultivo control, es decir, la viabilidad relativa:

$$Viabilidad\ relativa = \frac{\% Reducción\ del\ cultivo\ tratado}{\% Reducción\ del\ cultivo\ control} \times 100$$

$$Viabilidad\ relativa = \frac{ALW - (AHW \times RO) de\ la\ muestra}{ALW - (AHW \times RO) control\ positivo\ de\ crecimiento} \times 100$$

Así, cuando los valores de “viabilidad relativa” sean menores al 50%, se puede afirmar que la composición del biomaterial es citotóxico.

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CRITERIOS DE CLONACIÓN PARA LAS CONSTRUCCIONES de eIF3f y ADRA 1B.

Para poder plantear una estrategia de clonación se consideraron los siguientes aspectos que están en función de las características particulares de cada gen, el tipo de construcción que se deseaba obtener y el mapa de restricción del vector final (pGeneV5-His).

- De acuerdo con las indicaciones del fabricante [del Sistema GeneSwitch™] el gen debe ser clonado en fase con el C-terminal, en caso de que se quiera utilizar V5(señalada en morado) y/o la región de Histidinas (señalada en azul) para inmunodetectar y/o precipitar (respectivamente) la proteína. En nuestro caso no lo vamos a utilizar puesto que se va a inmunodetectar con anticuerpo contra la proteína de interés.
- En la estrategia de clonación que seguimos eliminamos por completo esas dos regiones (V5, Histidinas) incluyendo los dos codones de paro (señalados en rojo) y nos aseguramos de incluir un nuevo *stopcodon* que ya viene codificado en eIF3F y ADRA 1B (Fig. 8.1).

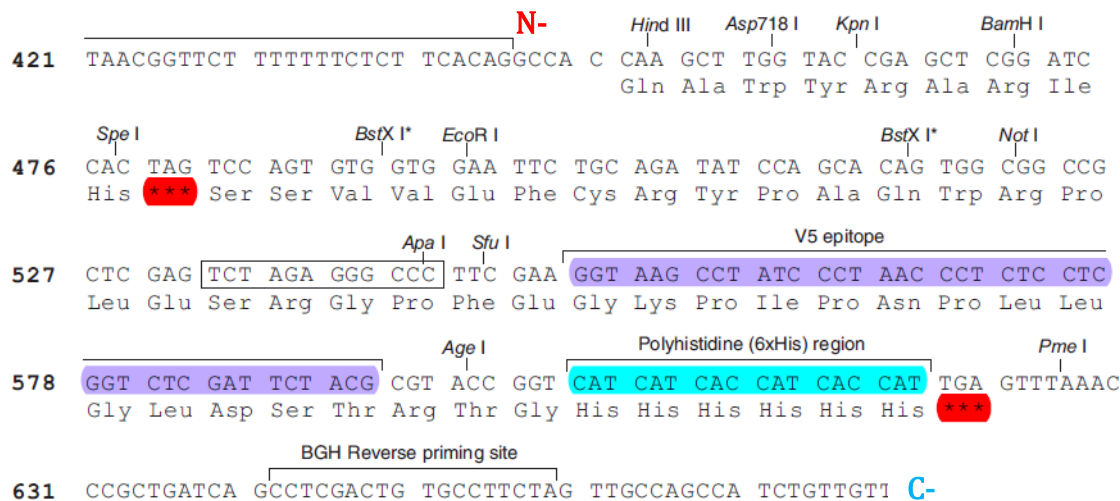


Figura 8.1. **Mapa de restricción de pGeneV5-His.** Morado: epítopo V5, permite la detección de la proteína con anticuerpos contra V5. Azul: C-terminal polihistidina (6X), permite la purificación y/o detección de la proteína. Rojo: codón de paro (stop codon).

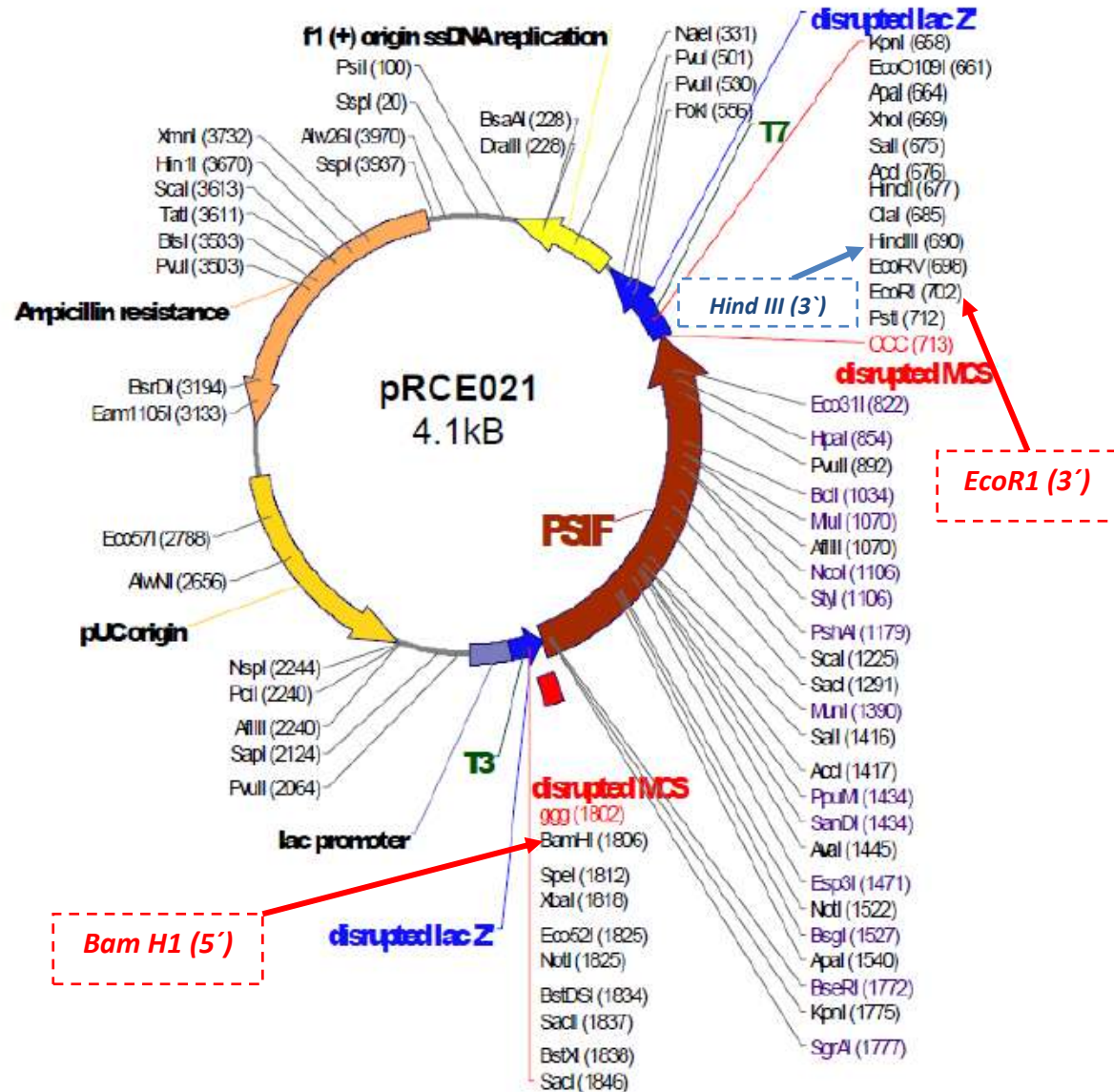


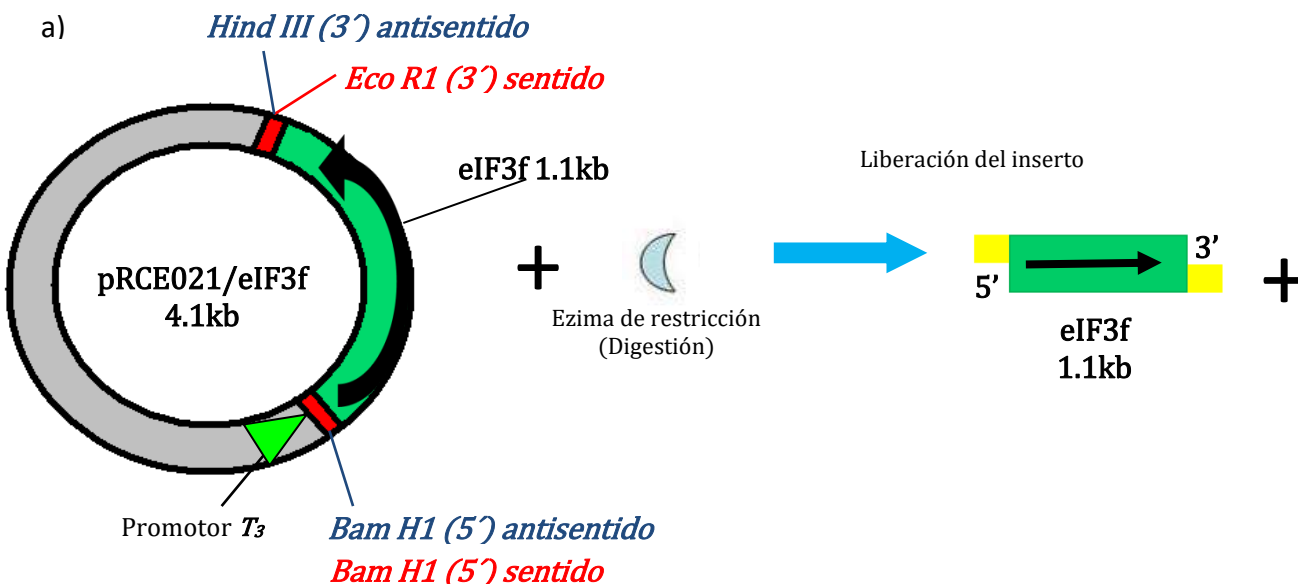
Figura 8.3. Mapa de restricción de pRCE021. Sitios de restricción para sacar *eIF3f* de pRCE021. *Bam* H1 en la región 5' y *Eco*R1 en la región 3' para clonar en sentido. *Bam* H1 en la región 5' y *Hind* III en la región 3' para clonar en antisentido.

El plásmido pRCE021 contiene una copia del cDNA del gen de *eIF3f* de humano del cromosoma 11 bajo el promotor T3 f1 (+), *ColE1*, origen de replicación en *E. coli*; gen de *LacZ*; MCS, sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a ampicilina (Higareda y Pardo 2010).

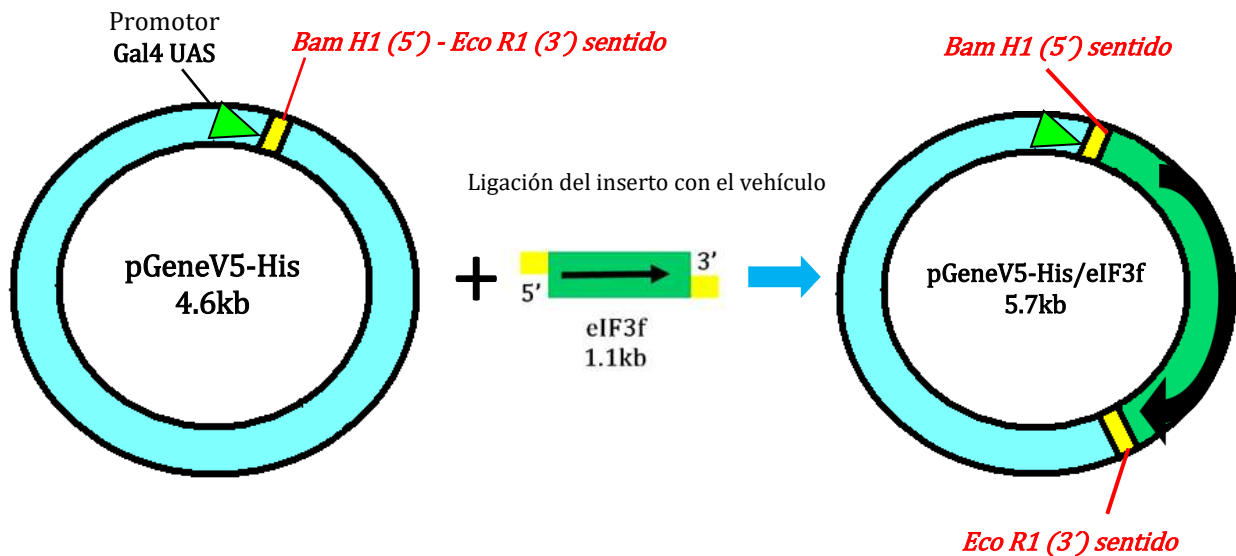
421 TAACGGTTCT TTTTCTCT TCACAGGCCA C CAA GCT TGG TAC CGA GGT CGG ATC
 Gln Ala Trp Tyr Arg Ala Arg Ile
 476 CAC TAG TCC AGT GTG GTG GAA TTC TGC AGA TAT CCA GCA CAG TGG CGG CCG
 His *** Ser Ser Val Val Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ala Gln Trp Arg Pro
 527 CTC GAG TCT AGA GGG CCC TTC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC
 Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
 578 GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTAAAC
 Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***
 631 CCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT

Restriction sites: *Hind III*, *Asp718 I*, *Kpn I*, *BamH I*, *Spe I*, *BstX I**, *EcoR I*, *BstX I**, *Not I*, *Apa I*, *Sfu I*, *Age I*, *Pme I*.
 V5 epitope, Polyhistidine (6xHis) region, BGH Reverse priming site.

Figura 8.4. Sitio múltiple de clonación de pGeneV5-His. Clonación de eIF3f en pGene V5-His. Éste plásmido será digerido con *Bam H1* y con *EcoR1* (parte amarilla) para dar lugar a eIF3f sentido. Para clonar el antisentido de eIF3f, pGene V5-His será digerido con *Bam H1* y con *Hind III* (parte verde).



b) *Clonación sentido*



c) *Clonación antisentido*

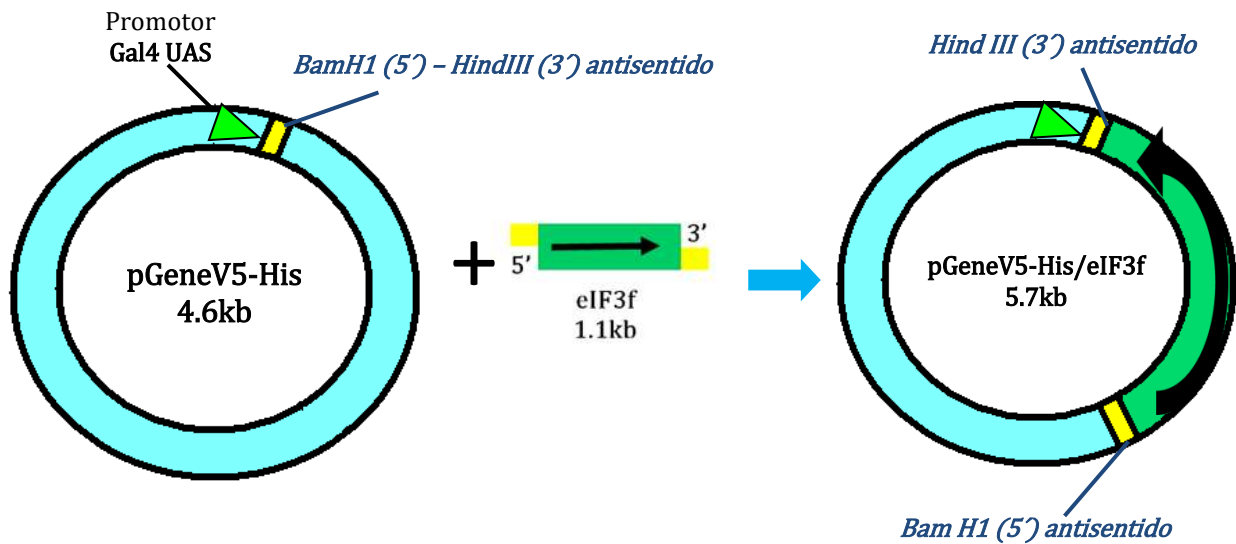
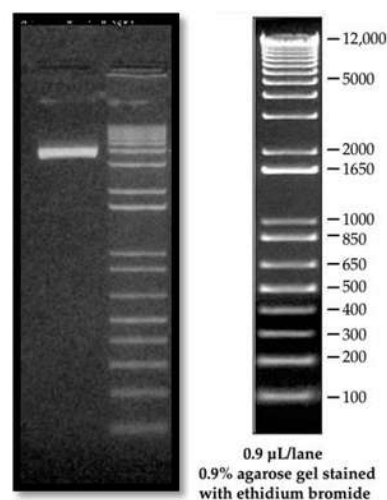


Figura 8.5. Estrategia de clonación de eIF3f en pGene V5-His. a) eIF3f sentido se libera del vector pRCE021 digiriéndolo con *Bam H1* (5') y *Eco R1* (3'). eIF3f antisentido se libera con *Bam H1* (3') y *Hind III* (5'). b) pGene se digiere con *Bam H1* (5') y *Eco R1* (3') para después ligar a eIF3f orientado en sentido. c) pGene se digiere con *Bam H1* (3') y *Hind III* (5') para después ligar a eIF3f orientado en antisentido.

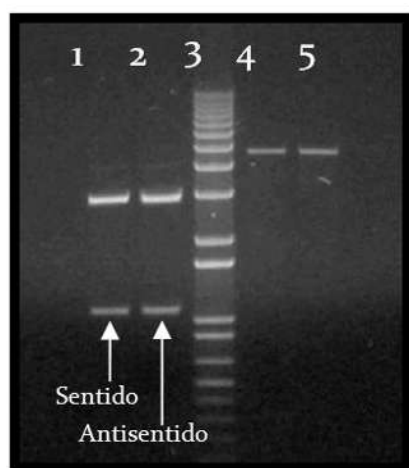
Antes de liberar el inserto, primero se comprobó que el plásmido (pRCE021) del que se partía era el correcto, es decir, que contuviera a eIF3f completo. Para esto se procedió a hacer una digestión con *Hind III* para confirmar el peso de 4.1kb. En la fotografía 8.1 se muestra el resultado de la digestión comprobando que es el plásmido correcto. A la derecha de ésta se muestra una imagen del marcador de peso molecular utilizado para correr los geles de agarosa necesarios para este proyecto: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).



Fotografía 8.1. **Confirmación del peso de pRCE021 4.1 kb.** (Izquierda) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión pRCE021 con *Hind III* para confirmar el peso de 4.1 kb. (Derecha) Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder.

Después de la confirmación se procedió a digerir un total de 3µg de pRCE021 para ambas digestiones cuya cantidad se estableció en base a la cantidad de inserto que se ligaría con el vehículo, es decir, 100ng de vehículo por cada 50ng de inserto (1:2). Primero se digirió con *Bam HI* overnight a 37°C, posteriormente se lavó utilizando el Kit Clean up eluyendo el producto de la digestión en 25µl de agua destilada con el fin de eliminar impurezas como restos de enzimas, sales, colorantes, etc., que pudieran interferir con la siguiente reacción de digestión.

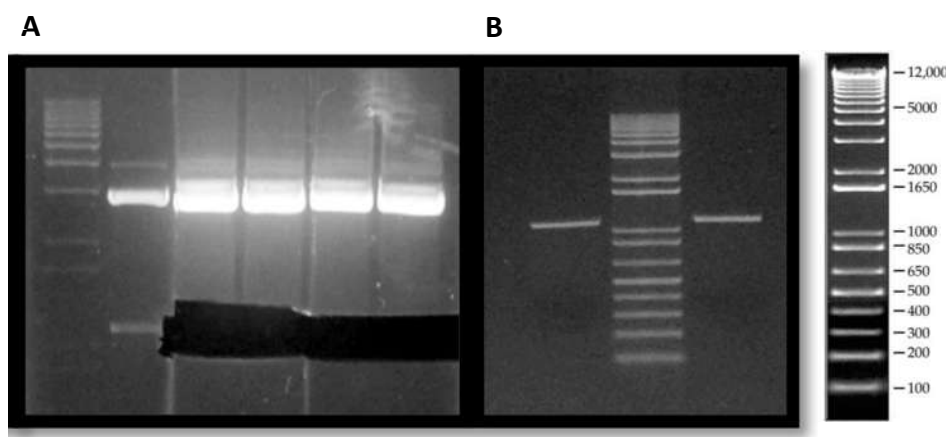
Después del lavado, se dividió el volumen de la muestra en dos para la segunda digestión con *Eco RI* para el sentido y con *Hind III* para el antisentido. De igual manera, una cantidad suficiente (600ng) de pGene V5-His se digirió con *Bam HI-EcoRI* para el sentido y con *Bam HI-Hind III* para el antisentido. En la fotografía 8.2 se muestra claramente como se libera el inserto del vector durante la digestión, también se muestra el pGene V5-His digerido con las enzimas correspondientes para ligarlo con eIF3f; la concentración del vehículo es de 30 ng/µl aproximadamente.



Fotografía 8.2. **Doble digestión de pRCE021.** Carriles: **1 y 2;** pRCE021 3.0 kb, eIF3f1.1 kb. **3;** peso molecular. **4;** pGene digerido con *Bam HI* y *EcoRI*. **5;** pGene digerido con *Bam HI* y *Hind III*.

Una vez digeridos ambos plásmidos con las enzimas respectivas, se procedió a eluir el inserto eIF3f del vector que lo contenía inicialmente (pRCE021) utilizando el Kit Combo PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification de Invitrogen Life Technologies Lot 326.02.21.02 y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El inserto se eluyó en 20µl para eIF3f sentido y en 30µl para eIF3f antisentido.

En la fotografía 8.3.A se muestra el resultado de la elución. Después de la elución se corrió un gel para verificar el peso (1.1kb) y la concentración del inserto; la cual se estimó alrededor de 50ng/µl por cada uno (Foto. 8.3.B).

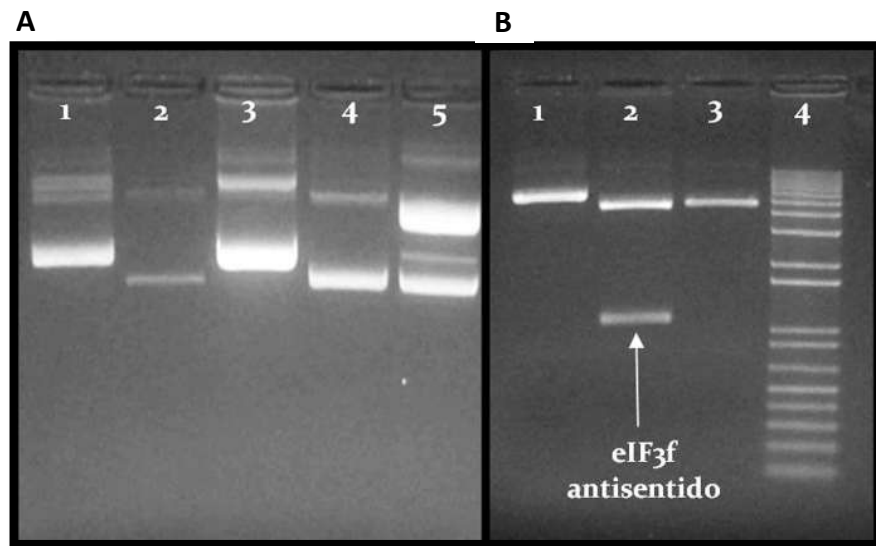


Fotografía 8.3. **A.Elución en gel de agarosa de eIF3f sentido y antisentido.** Carriles: **1**, marcador de peso molecular; **2**, muestra de referencia; **3 y 4**, eIF3f sentido 1.1 kb liberado de pRCE0213.0 kb; **5 y 6**, eIF3f antisentido liberado de pRCE0213.0 kb.**B. Resultado de la elución de eIF3f sentido y antisentido.** Carriles: **1**, eIF3f sentido 1.1 kb; **2**, marcador de peso molecular; **3**, eIF3f antisentido 1.1 kb.

Después de la elución, se procedió con la ligación de eIF3f a pGeneV5-His. Se optó por modificar la ligación a una proporción de tres moléculas de inserto por una de vehículo (3:1), es decir, eIF3f tiene un peso de 1.1 kb y pGeneV5-His tiene un peso de 4.6kb, el vehículo es al menos cuatro veces más grande que el inserto. Si la ligación es 3:1, entonces se dice que la ligación en unidades de peso será 75ng de inserto por cada 100ng de vehículo. Si la relación fuera 2:1 entonces serían 50ng de inserto por cada 100ng de vehículo. Las cantidades varían de acuerdo a la proporción entre el inserto y el vehículo, y también a la concentración de ADN que se tenga. La ligación se dejó overnight a 18°C.

Posteriormente, se transformó por calcio *E. coli* DH5 α con 3 μ l del producto de la ligación. En las cajas de Petri se observó el crecimiento de 5-7 colonias por caja que después se aislaron en medio agar LB con ampicilina a una concentración de 75 mg/ml. Luego de la transformación procedimos a la purificación de los plásmidos (Fig. 8.4.A).

Para comprobar cada una de las construcciones y diferir entre el sentido y el antisentido, se hizo una digestión con cada una de ellas, de tal manera que el producto liberado sea un inserto de peso conocido y que la enzima elegida corte en el inserto así como en el vehículo. Se eligió *EcoR*I obteniendo así las construcciones finales para eIF3f en sentido y antisentido (Fig. 8.4.B).



Fotografía 8.4. **A. Purificación de las transformantes de eIF3f.** Carriles: **1 y 2**, pGene-eIF3f sentido; **3 y 4**, pGene-eIF3f antisentido; **5**, pGene control. **B. Comprobación de las construcciones de eIF3f digeridas con *EcoR*I.** Carriles: **1**, pGene-eIF3f sentido 5.7 kb; **2**, pGene-eIF3f antisentido; **3**, pGene control 4.6 kb; **4**, marcador de peso molecular.

En la fotografía 8.4.B se muestra el resultado de la digestión de las construcciones con *EcoR*I, dicha fotografía confirma la unión de eIF3f a pGene V5-His. En el carril 1 está la construcción sentido de eIF3f la cual al ser digerida con *EcoR*I únicamente se lineariza mostrando una banda de 5.7kb aproximadamente; mientras que con la construcción antisentido (carril 2) el inserto se libera. La razón es la siguiente: Si nos ubicamos en el pRCE021, en el lado 3' de eIF3f por debajo de Hind III se encuentra un sitio de restricción para *EcoR*I (Ver Fig. 8.3) al ser cortado en Hind III ese sitio también se incluye en el inserto. Ahora bien, el pGeneV5-His también posee un sitio de restricción para *EcoR*I que queda en el 5' al momento de clonar el antisentido de eIF3f, de

tal manera que la construcción final contendrá dos sitios de restricción para *EcoR*I; uno en el 3' y otro en el 5' (Fig. 8.6).

Ergo, cuando es digerida con *EcoR*I, el inserto se libera dando como resultado en un gel de agarosa dos bandas que corresponden a *eIF3f* (1.1kb) y a *pGeneV5-His* (4.6kb).

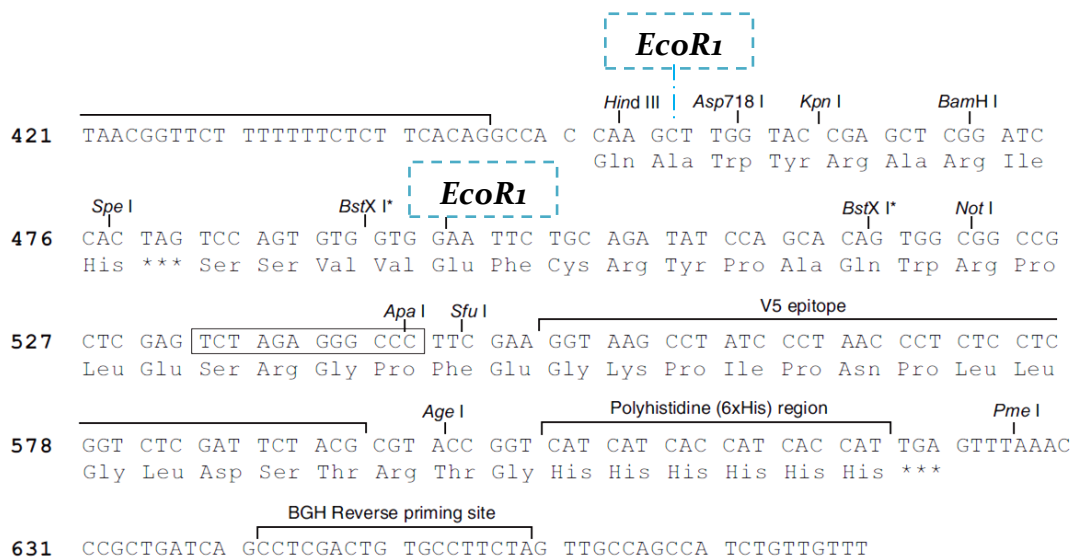


Figura 8.6. **Clonación del antisentido de *eIF3f* en *pGeneV5-His*.** La construcción antisentido de *eIF3f* posee dos sitios de restricción para *EcoR*I, los cuales son aprovechados, al digerir, para distinguirla de la construcción sentido.

3. CONSTRUCCIONES DE pGeneV5-His/ADRA 1B SENTIDO Y ANTISENTIDO

Las construcciones para ADRA 1B en sentido como en antisentido fueron un poco más laboriosas que las de eIF3f, siendo incluso necesario el uso de uno o más vectores intermediarios para obtener las clonas finales.

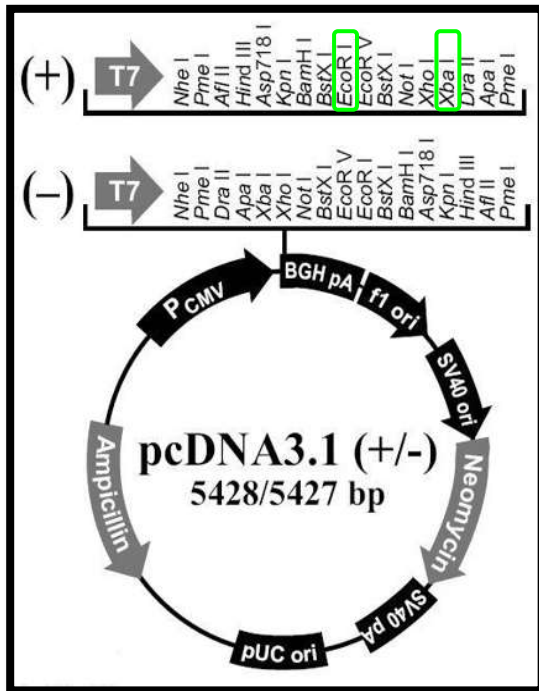
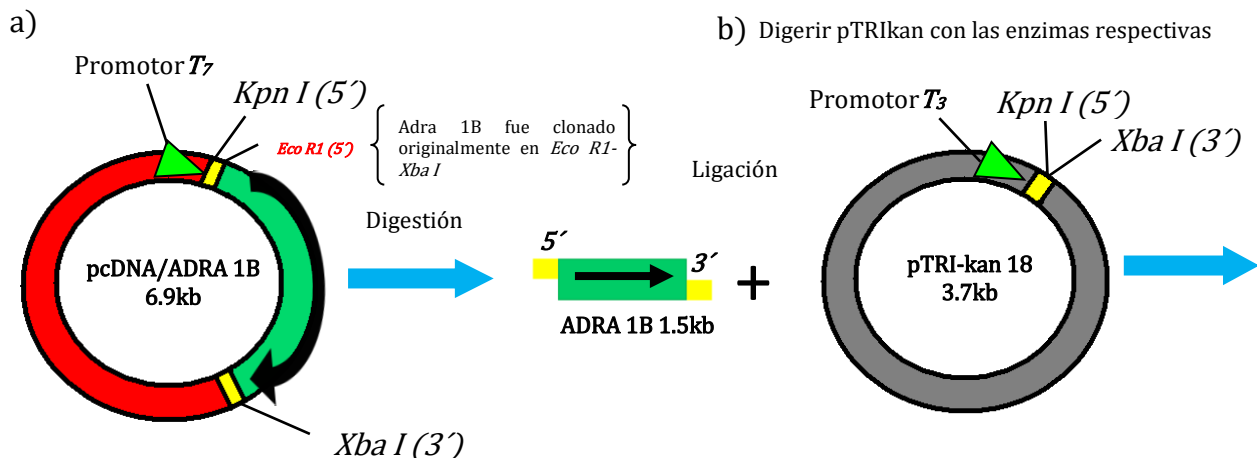
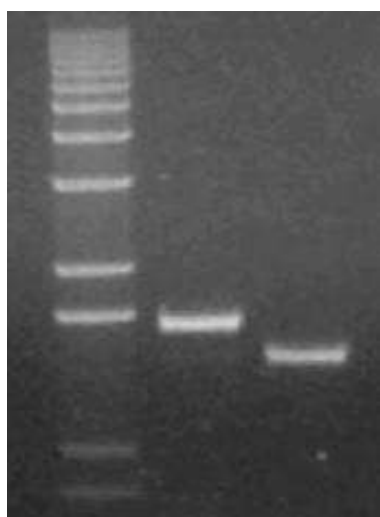


Figura 8.7. Mapa físico de pcDNA3.1. En este vector se encuentra ADRA 1B de 1.5kb clonado en *EcoRI* (5') y en *XbaI* (3') sitios señalados en verde.

La clonación de origen para ADRA 1B fue en el pcDNA3.1+ (Invitrogen) en *EcoRI* (5') y en *XbaI* (3'), el tamaño del inserto completo es de 1563 pares de bases. En la figura 8.7 se muestra el mapa físico de clonación del pcDNA3.1+, el peso total del plásmido con el inserto es de 6991 pares de bases. Para las construcciones de pGeneADRA 1B se hizo una valoración de todos los sitios posibles de restricción que coincidieran con los de pGeneV5-His, y que no cortaran dentro del inserto, de tal manera que ADRA 1B se pudiera orientar en sentido y antisentido en el vector final. Sin embargo, después de un análisis exhaustivo en ambos mapas, no se encontraron sitios de corte para clonarlo directamente en el pGeneV5-His; por lo que se tuvo que idear una estrategia de clonación que involucra a uno o más vectores en los que se tuvo que subclonar. En la figura 8.8 se muestra un esquema en el que se describe cuál fue la estrategia de clonación para la construcción de pGeneV5-His/ADRA 1B sentido y como se fue desarrollando cada subclonación.



Elución de ADRA 1B de pcDNA: Primeramente nos dispusimos liberar a ADRA 1B con las enzimas convenientes para clonarlo en sentido y antisentido dentro del pGeneV5-His. Para el sentido, extrajimos a ADRA 1B de pcDNA 3.1+ digiriendo 900 ng de plásmido con 3µl de *Xba I* (3') en un volumen total de 50µl que se incubó durante 24 hrs a 37°C. Posteriormente se lavó (Kit MinElute Clean Up QIAGEN) y se puso la segunda digestión con *Kpn I* (5') en las mismas condiciones. Para el antisentido, digerimos 900 ng de plásmido con 3µl de *Apa I* (3') en un volumen total de 50µl que se incubó a T.A. durante 24 hrs, al término de la digestión se lavó y se puso a digerir con *EcoRI* (5') por 6hrs. a 37°C. Después de las digestiones el inserto se eluyó en 50µl utilizando el Kit Combo PureLink TM Quick Gel Extraction & PCR Purification de Invitrogen. En la fotografía 8.5 se puede observar el resultado de la elución de ADRA 1B en sentido y antisentido, se estimó una cantidad aproximada de 300 ng por cada inserto. Cabe mencionar que para el antisentido de ADRA 1B no es necesaria la antisequencia codificante completa, ya que para el silenciamiento de su expresión, es suficiente sintetizar una fracción (93% en este caso) para generar un dúplex de ARN susceptible de ser degradado por ARNasas. De esta manera es como se silencia la expresión de ADRA 1B (y también de eIF3f) utilizando una construcción antisentido. Por tal motivo se eligió a *Apa I*, a pesar de que corta a 1414 pares de bases del inserto (la figura se verá más adelante), con lo que se espera que la construcción final del antisentido de ADRA 1B sea de menor peso.



Fotografía 8.5. **Resultado de la elución en gel de ADRA 1B en sentido y antisentido.** Carriles: 1, marcador de peso molecular; 2, ADRA 1B sentido (1563 pb); 3, ADRA 1B antisentido (1414 pb). Ambos insertos listos para ser ligados con pTRI-kan 18.

3.1pGeneV5-His/ADRA 1B sentido

3.1.1Subclonación de ADRA 1B sentido en pTRI-kan 18.

Para poder ligar el ADRA 1B sentido a pTRI-kan 18, éste también fue digerido con *Kpn I* - *Xba I* bajo las condiciones de digestión señaladas anteriormente. En el esquema 8.9 se muestra específicamente cuales fueron los sitios de corte en pcDNA y los sitios donde ADRA 1B fue subclonado en el pTRI-kan 18.

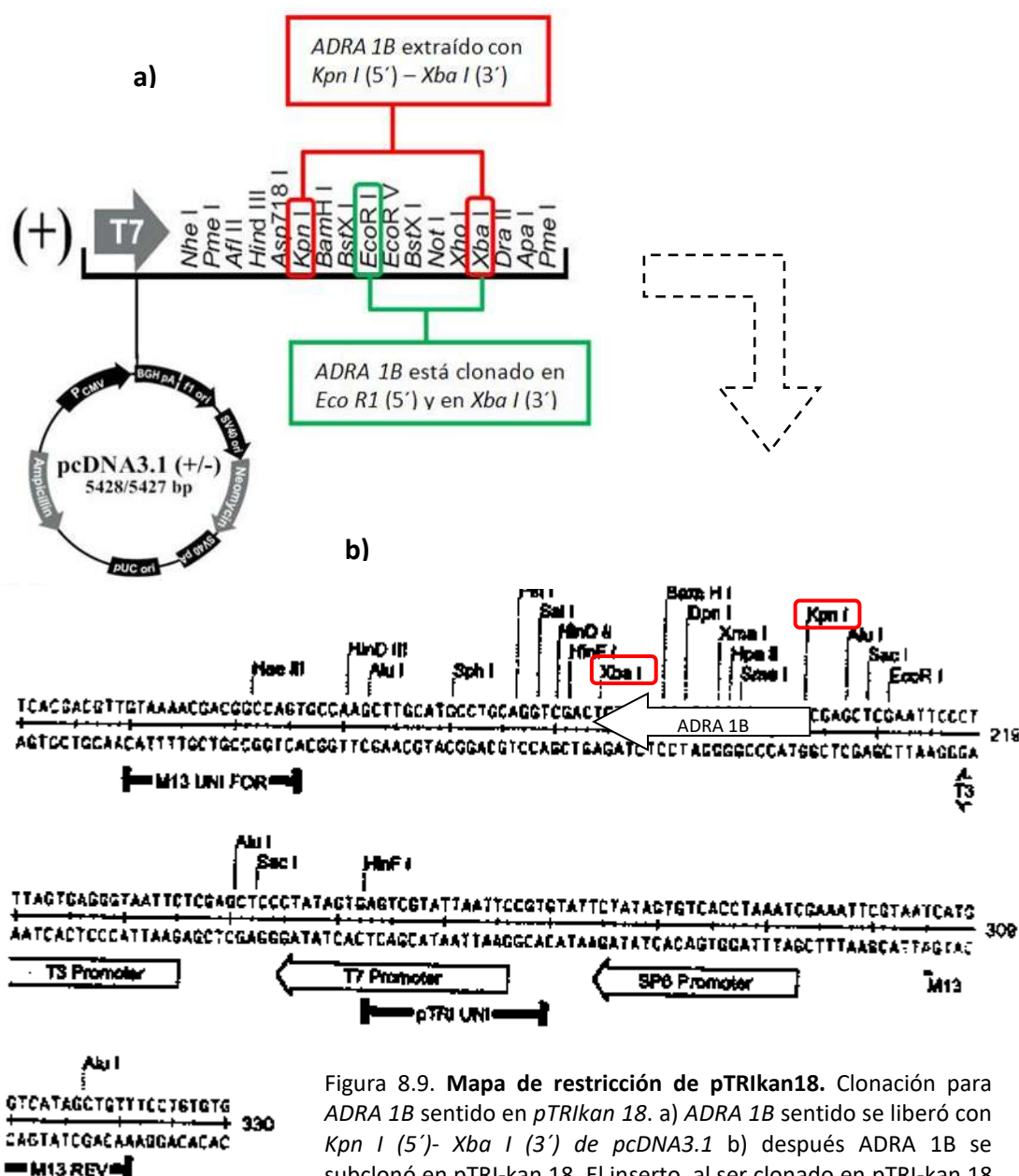
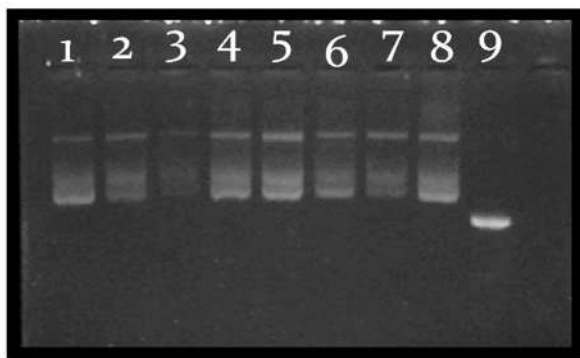
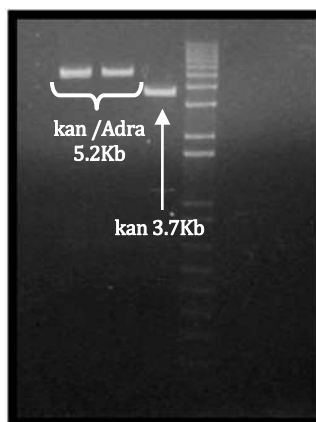


Figura 8.9. Mapa de restricción de pTRIkan18. Clonación para ADRA 1B sentido en pTRIkan 18. a) ADRA 1B sentido se liberó con *Kpn I* (5')- *Xba I* (3') de pcDNA3.1 b) después ADRA 1B se subclonó en pTRI-kan 18. El inserto, al ser clonado en pTRI-kan 18 quedó orientado en sentido con respecto al promotor T3.

Después de la elusión, se hizo la ligación de ADRA 1B con pTRI-kan 18 en una proporción de 2 moléculas de inserto por una de vehículo (2:1), es decir, por cada 100ng de vehículo se pondrán 100 ng de inserto. La ligación se llevó a cabo en un volumen total de 15 µl con 1 µl de ligasa a una temperatura de 18°C overnight. Posteriormente se transformó con 1µl de ligación por electroporación y se plaqueó en LB con Kanamicina a una concentración de 50mg/ml (KAN50). Se observó el crecimiento de 8 colonias que se aislaron para purificar el plásmido pTRI-kan/ADRA 1B sentido (miniprep). En la fotografía 8.6 se puede observar que se alcanzó el 100% de eficacia según las colonias que se aislaron, de éstas se tomaron las colonias 5 y 8, las cuales están en mayor cantidad de ADN para proceder con las digestiones de la siguiente subclonación. En la fotografía 8.7 se muestra un gel de agarosa en el que se indican dos bandas correspondientes a la construcción pTRI-kan/ADRA 1B sentido digerida con *Xba I* para confirmar el peso estimado de 5263 pb.



Fotografía 8.6. **Resultado de la purificación de pTRI-kan/ADRA 1B sentido.** Carriles: 1-8, Eventos transformados con pTRI-kan/ADRA 1B sentido; 9, pTRI-kan control



Fotografía 8.7. **Digestión de pTRI-kan18/ADRA 1B sentido con *Xba I*.** Carriles: 1 y 2: pTRI-kan18/ADRA 1B 5.2 kb sentido digerido con *Xba I*; 3, pTRI-kan18 control; 4, marcador de peso molecular.

3.1.2 Subclonación de ADRA 1B sentido a pBluescriptSK+.

La segunda subclonación fue en el vector pBluescript SK+ de 3.0 kb (Fig. 8.10). Se inició liberando el inserto de pTRI-kan 18, para esto se digirieron 600ng de este plásmido con *Kpn I* (5') durante 5 hrs a 37°C, se lavó, y enseguida se puso la segunda digestión con *Sal I* (3') durante 24 hrs a 37°C (ver Fig. 8.9, *Sal I* está señalada con verde). También se digirieron 400 ng de pBluescript SK+ con las mismas enzimas bajo las mismas condiciones para después ligarlo con el inserto en una relación de dos moléculas de inserto por una de vehículo (2:1), es decir, 100ng de inserto por cada 100 ng de vehículo. La ligación se llevó a cabo en 20µl a 18°C overnight. Posteriormente, se transformaron por electroporación 100µl de células *E. coli* DH5α con 1µl de ligación, se seleccionó con Ampicilina 75 mg/ml. Finalmente, por miniprep se purificó pBluescriptSK+/ADRA 1B sentido. Para corroborar el peso esperado (4.5 kb) el plásmido se digirió con *Apa I* (Foto.8.8).

pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601–826)

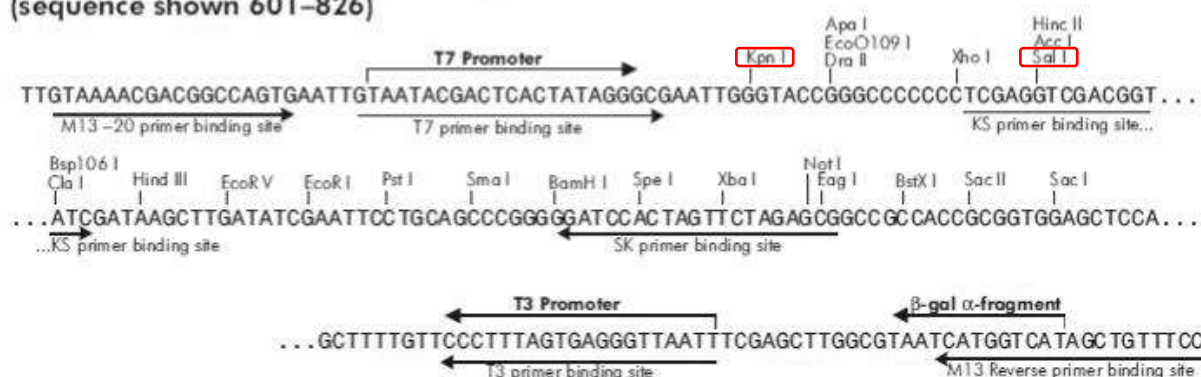
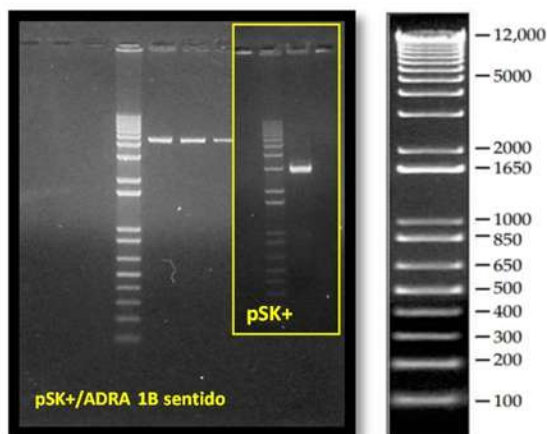


Figura 8.10. Clonación de ADRA 1B sentido en pBluescript SK+. En este plásmido ADRA 1B sentido fue clonado en *Kpn I* (5') – *Sal I* (3') bajo el promotor T7.



Fotografía 8.8. Digestión de pBluescript SK+/ADRA 1B sentido con *Apa I*. En la imagen se muestra pSK+ ligado a ADRA 1B sentido digerido con *Apa I* para confirmar el peso esperado de 4.5 kb. En el recuadro amarillo es sólo pBluescript SK+ linearizado con *EcoRI* (3.0 kb).

3.1.3 Clonación final de ADRA 1B sentido en pGeneV5-His.

Para obtener la clona final de ADRA 1B sentido se digirieron alrededor de 500ng del plásmido pBluescript SK+/ADRA 1B sentido y 900ng pGeneV5-His con *Kpn I* (5') bajo condiciones ya descritas anteriormente. Después se lavaron y se prosiguió con la segunda digestión con *Spe I* (3') a 37°C overnight para pGene. Se tomaron únicamente 450ng [de pGene] para insertar el sentido de ADRA 1B; el resto se digirió con *Eco R1* para ligar el antisentido. Después de las digestiones para pSK+/Adra (con *Kpn I* (5') y *Spe I* (3')), se procedió a eluir el inserto, una vez liberado se ligó al pGene en una proporción de tres moléculas de inserto por una de vehículo (3:1), es decir, 150ng de inserto por cada 150ng de vehículo. Para concluir con la tercera construcción, se transformaron 100µl de células *E. coli* DH5α con 3µl del producto de la ligación y se seleccionaron las colonias con Ampicilina (75mg/ml). El resultado de la purificación se muestra en la fotografía 8.9.A en donde la colonia 6 es la que se desplaza menos indicando que ésta tiene probabilidades más altas de contener el inserto ligado, es por eso que tiene un peso mayor ya que las demás están a la altura del control (pGene). Para confirmar la ligación de ADRA 1B a pGene, se tomaron 2µl (50ng) de muestra para digerirlos con *Eco R1*, al ser digeridos con esta enzima el inserto se debe liberar ya que, de acuerdo al mapa de restricción de pGene, la construcción final posee dos sitios de corte para *Eco R1*; uno corresponde al sitio de clonación original de ADRA 1B en el pcDNA3.1+, y el otro se encuentra en el pGeneV5-His; por consiguiente, al correr el producto de la digestión en un gel el resultado será una banda correspondiente al vector de clonación final de 4.6 kb y otra que corresponde a ADRA 1B de 1.5 kb (Fig. 8.11). Con esto se confirma la ligación de ADRA 1B a pGeneV5-His, y no de cualquier otro inserto de ADN aleatorio de un peso aproximado (Foto 8.9.B).

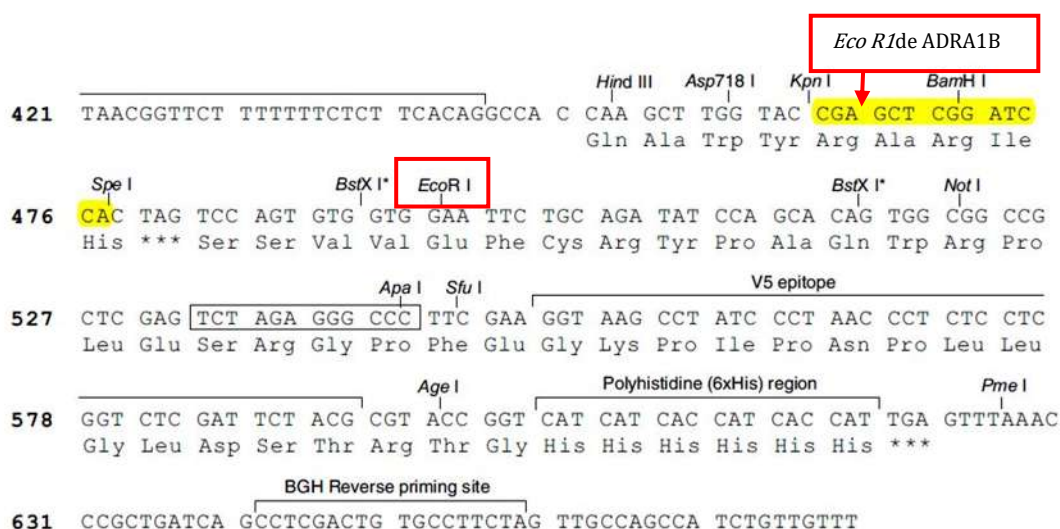
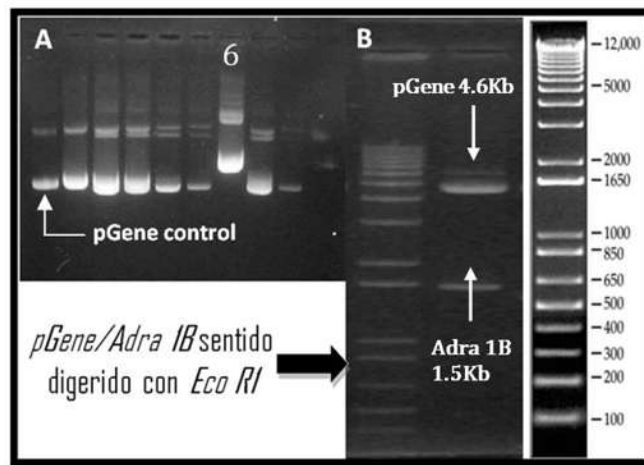


Figura 8.11. Clonación de ADRA 1B en pGeneV5-His. ADRA1B fue clonado de en pGene en *Kpn I* (5') y en *Spe I* (3'). Mismas eznimas con las que se eluyó ADRA 1B de pSK+. Obsérvese la ubiación de los sitios de *Eco R1*, uno está en el pGene y otro se incluyó en el inserto al momento de eluirlo del vector original (pcDNA).



Fotografía 8.9. **A. Purificación de ADN de colonias probables de contener pGene/ADRA 1B sentido.** La colonia 6 es la de mayor peso con lo que aumenta la probabilidad de ligación del inserto. **B. Digestión de pGene/ADRA 1B con *Eco RI*.**

RESUMEN DE CLONACIÓN PARA LA CONSTRUCCIÓN DE pGeneV5His/ADRA 1B SENTIDO

- pcDNA3.1+ se digirió con *Kpn I* (5') – *Xba I* (3') para extraer a ADRA 1B.
- ADRA 1B se ligó con pTRI-kan 18 en *Kpn I* (5') – *Xba I* (3').
- Se liberó ADRA 1B con *Kpn I* (5') – *Sal I* (3') de pTRI-kan 18.
- ADRA 1B se ligó a pBluescript SK+ en *Kpn I* (5') – *Sal I* (3').
- Se liberó ADRA 1B con *Kpn I* (5') – *Spe I* (3') de pBluescript SK+.
- Finalmente ADRA 1B se ligó a pGeneV5-His en *Kpn I* (5') – *Spe I* (3') quedando orientado en sentido.

3.2pGeneV5-His/ADRA 1B antisentido.

Para la construcción de pGeneV5-His/ADRA 1B antisentido fue necesario, al igual que con la construcción sentido de ADRA 1B, subclonar en un vector intermediario de tal manera que el inserto se pudiera orientar en antisentido en pGeneV5-His ya que la clonación directa no era posible. Después de un análisis comparativo entre los mapas de restricción de pcDNA3.1+, pGeneV5-His, ADRA 1B (Fig. 8.12) y tomando en cuenta las enzimas de las que se disponía, se encontró que se podía subclonar en pBluescript SK+ en *Eco R1* (5') – *Apa I* (3') y después clonarlo en *Kpn I* (3') y *Eco R1* (5'). En la figura 8.13 se presenta un esquema de la estrategia de clonación para ADRA 1B antisentido en el pGeneV5-His. El procedimiento para liberar el inserto ya fue descrito anteriormente.

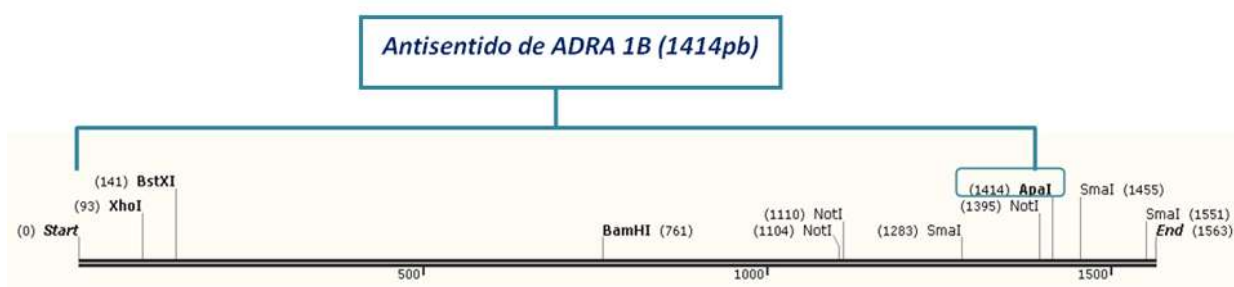
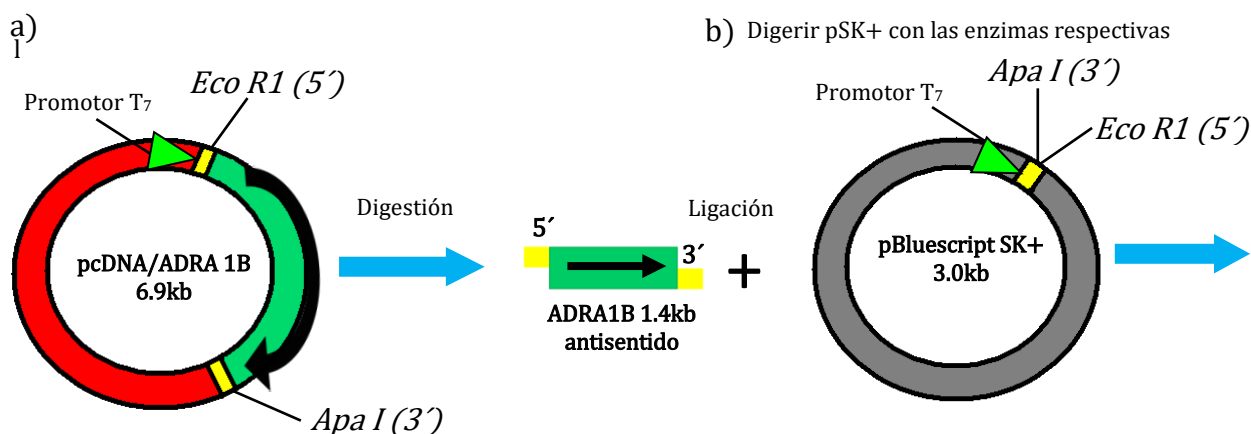


Figura 8.12. **Mapa de restricción de ADRA 1B (1563 pb).** Para extraer ADRA 1B antisentido, éste fue cortado con *Eco R1* en la región 5' y con *Apa I* en la región 3'. El tamaño del inserto es de 1414 pb. Para el sentido es necesario cortar el inserto completo.



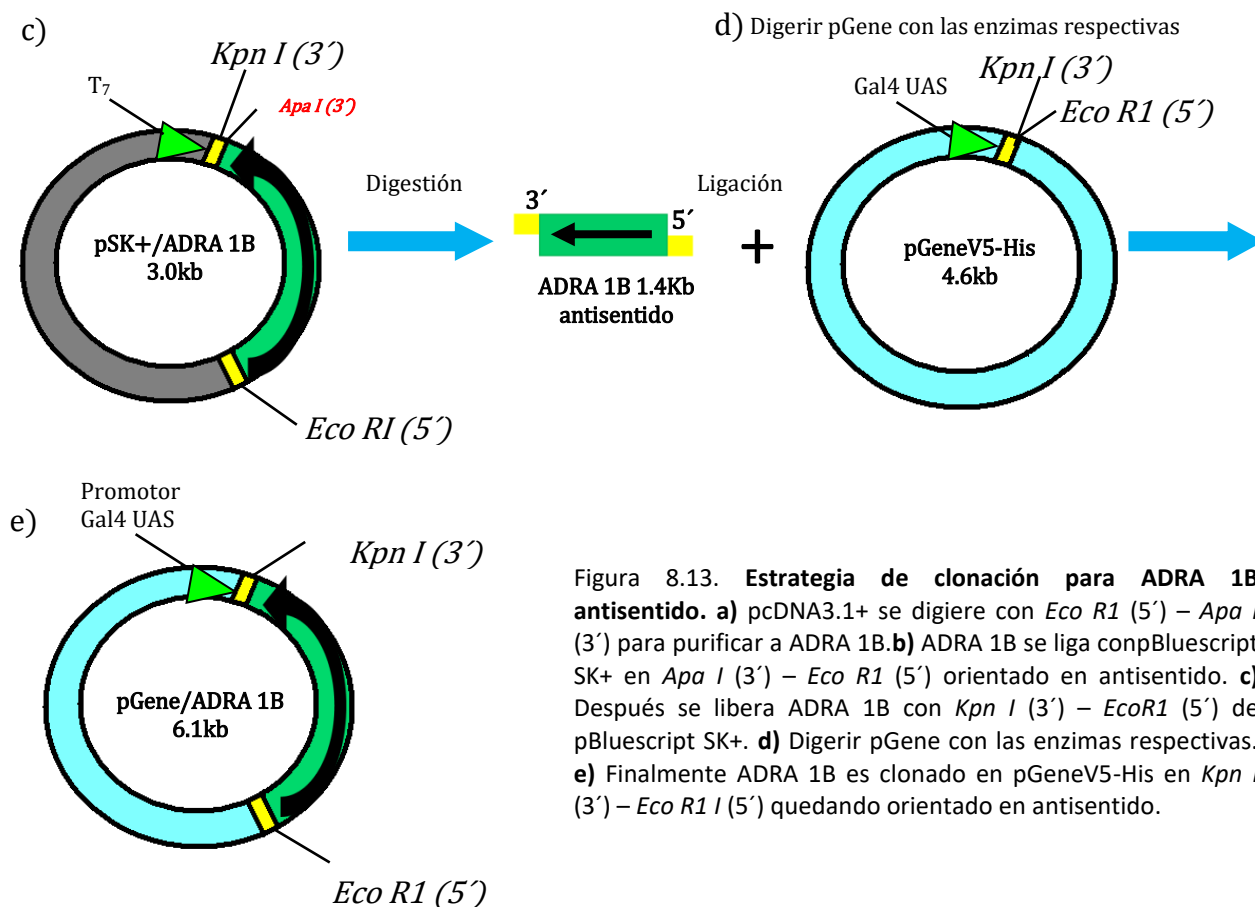
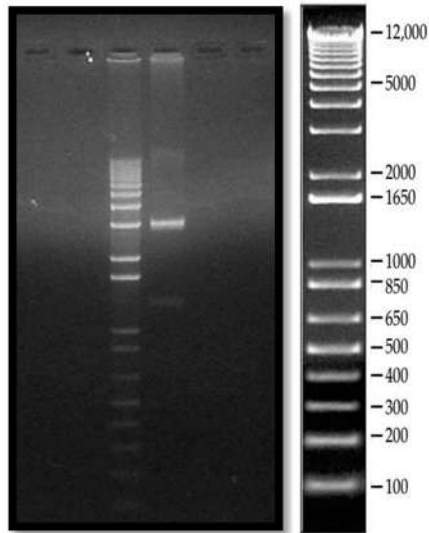


Figura 8.13. Estrategia de clonación para ADRA 1B antisentido. a) pcDNA3.1+ se digiere con *Eco RI* (5') – *Apa I* (3') para purificar a ADRA 1B. b) ADRA 1B se liga con pBluescript SK+ en *Apa I* (3') – *Eco RI* (5') orientado en antisentido. c) Después se libera ADRA 1B con *Kpn I* (3') – *Eco RI* (5') de pBluescript SK+. d) Digerir pGene con las enzimas respectivas. e) Finalmente ADRA 1B es clonado en pGeneV5-His en *Kpn I* (3') – *Eco RI* (5') quedando orientado en antisentido.

3.2.1 Subclonación de ADRA 1B antisentido en pBluescript SK+.

Una vez que ADRA 1B (300ng) se liberó del vector original, se procedió a digerir 300ng pSK+ con las mismas enzimas bajo las mismas condiciones de digestión ya establecidas. La ligación se llevó a cabo en una proporción de dos moléculas de inserto por una de vehículo (2:1), es decir, 100ng de inserto por cada 150ng de vehículo. Posteriormente se tomaron 2µl de ligación para transformar (por Ca^{++}) 100µl de células (*E. coli* DH5α), las colonias se seleccionaron en medio de cultivo LB con Ampicilina (75mg/ml); se aislaron 12 colonias que después se purificaron y de las cuales la número 11 se seleccionó como probable. Ésta se digirió con *Sma I*, de tal manera que la enzima elegida cortara en un sitio de ADRA 1B así como en uno sitio del vehículo liberando un inserto de peso conocido de 1300pb y otro de 3000pb que sería pSK+ (Foto 8.10). En la figura 8.14 se esquematizan los sitios en donde se llevaron a cabo los cortes con *Sma I* para la liberación de ADRA 1B y confirmar la subclonación en el pBluescript SK+.



Fotografía 8.10. Digestión de pBluescript SK+/ADRA 1B con *Sma* I. En esta imagen se muestran dos bandas: una de 3.0 kb que corresponde al vehículo y otra de 1.3 kb perteneciente al inserto.

pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 601–826)

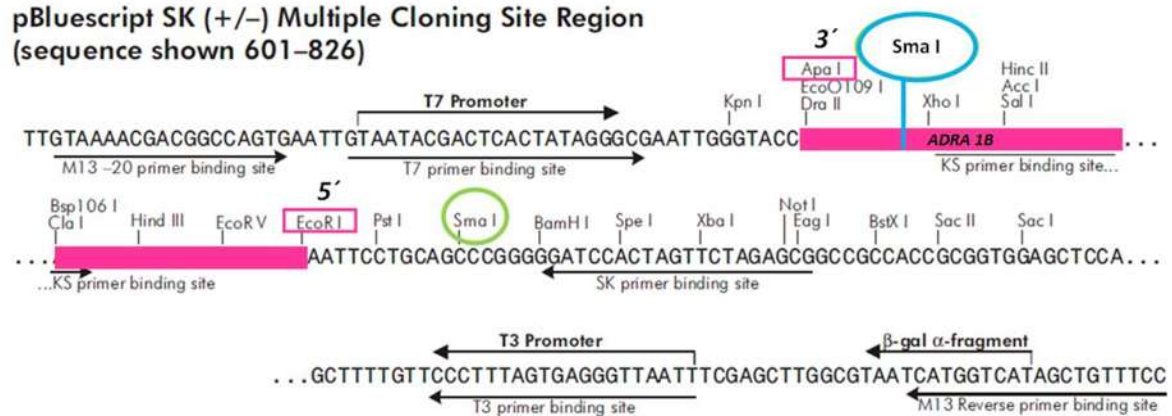


Figura 8.14. Estrategia de digestión para comprobar pBluescript SK+/ADRA 1B antisentido. Para confirmar que ADRA 1B se ligó a pSK+, el plásmido se sometió a una digestión con *Sma* I que liberaría un inserto de 1300 pb y otro de 3000 pb. En rosa se señalan los puntos en donde ADRA 1B fue clonado dentro de pSK+. En verde, el sitio de restricción para *Sma* I de pSK+, y en azul se localiza el sitio para *Sma* I dentro del inserto.

3.2.2 Clonación final de ADRA 1B antisentido pGeneV5-His.

La clona antisentido de ADRA 1B se obtuvo mediante digestiones parciales de la subclona pBluescript SK+/ADRA 1B con *Kpn I* (3') - *EcoR I* (5') durante 6 hrs. cada una a 37°C. La elución del inserto se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del kit que se utilizó, una vez que se eluyó, se ligó con el pGeneV5-His en una proporción de tres moléculas de inserto por una de vehículo (3:1), 150ng de inserto por cada 150ng de vehículo (Fig. 8.15). Se transformó con 2µl de ligación aislando 20 colonias con Ampicilina (75mg/ml), de las 20 se purificaron las primeras 4. El resultado de la purificación se muestra en la fotografía 8.11 en donde la colonia 2 en el carril 3 se desplaza menos que las demás y se encuentra por debajo del control lo que sugiere que ésta podría tener el inserto integrado a su secuencia; por lo tanto se procedió a linearizar con *EcoR I* con lo que se confirmó el peso teórico de 6.0 kb para la nueva clona (Fotografía 8.11).

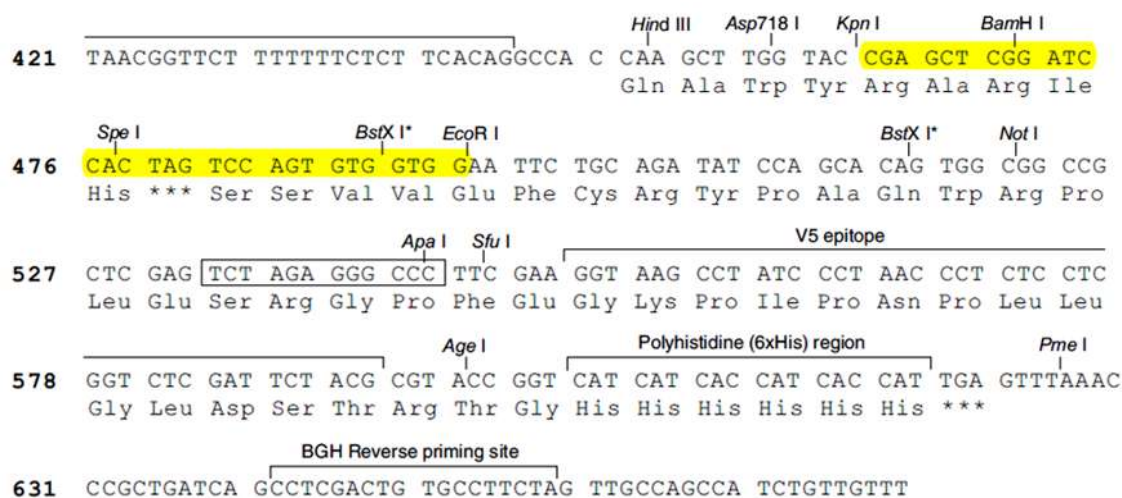
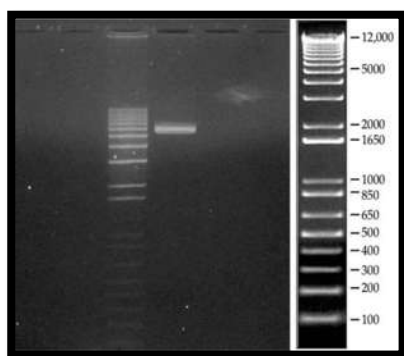


Figura 8.15. **Clonación de ADRA 1B antisentido en pGeneV5-His.** Se digirió pGene con *Kpn I* (3') - *EcoR I* (5') para ligar ADRA 1B en esos sitios orientado en antisentido.



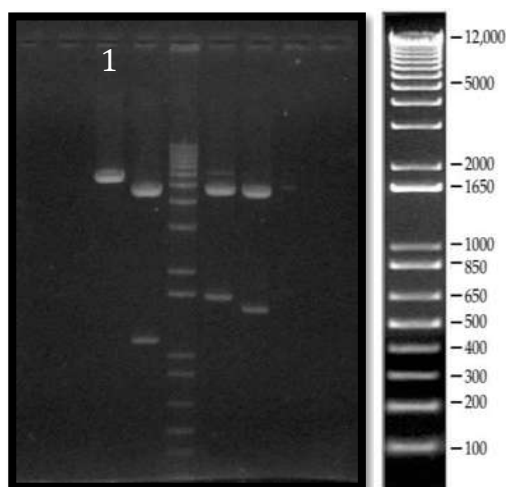
Fotografía 8.11. **pGeneV5His/ ADRA 1B antisentido.** La nueva clona de ADRA 1B se linearizó con *EcoR I* para confirmar el peso de 6.0 kb.

4. CONFIRMACIÓN DE LAS CUATRO CONSTRUCCIONES.

Para confirmar que cada una de las construcciones se llevaron a cabo adecuadamente, se procedió a establecer una estrategia de digestión para cada clona que consistió en elegir una enzima cuya secuencia de restricción se encontrara dentro del inserto así como en el vehículo liberando un inserto de peso conocido. De esta manera, la posibilidad de que se haya ligado un inserto de un peso similar al de eIF3f o ADRA 1B se reduce significativamente. Las especificaciones de la estrategia de confirmación para cada una de las clonas se encuentran en la tabla siguiente:

Tabla 8.1. Estrategia de confirmación para las construcciones de ADRA1B y eIF3f.

Clona	Peso total	Enzima	Resultado esperado en gel
pGeneV5-His/eIF3f sentido	5.7 kb	<i>Eco R1</i>	El plásmido se lineariza (1 banda 5.7kb)
pGeneV5-His/eIF3f antisentido	5.7 kb	<i>Eco R1</i>	El inserto se libera (2 bandas 4.6kb, 1.1kb)
pGeneV5-His/ADRA 1B sentido	6.1 kb	<i>Eco R1</i>	El inserto se libera (2 bandas 4.6kb, 1.5kb)
pGeneV5-His/ADRA 1B antisentido	6.0kb	<i>Apa I</i>	El inserto se libera (2 bandas 4.6kb, 1.4kb)



Fotografía 8.12. Confirmación de las construcciones de eIF3f y ADRA 1B. Carriles: 1, *pGeneV5-His/eIF3f* sentido digerido con *EcoR1*. El plásmido únicamente se lineariza mostrando una banda de 5.7kb. 2, *pGeneV5-His/eIF3f* antisentido digerido con *EcoR1*. El inserto es liberado por lo que se ve una banda de 1.1kb (eIF3f) y otra de 4.6kb (*pGene*). 3, marcador de peso molecular. 4, *pGeneV5-His/ADRA 1B* sentido digerido con *Eco R1*. El inserto se libera; en el gel se aprecian dos bandas donde una corresponde ADRA 1B (1.5kb) y otra a *pGene* (4.6kb). 5, *pGeneV5-His/ADRA 1B* antisentido. En el gel se visualiza una banda de 1.4kb de ADRA 1B y otra de 4.6kb de *pGene*.

Una vez que las clonas fueron confirmadas, se procedió a purificar una mayor cantidad de cada una de ellas utilizando el Kit de MidiPrep (20-25µg DNA) de Invitrogen. Posteriormente se almacenaron en glicerol al 16% (160µl de glicerol estéril al 30% y 840µl de inóculo) a -80°C.

5. SELECCIÓN DE TRANSFECTANTES ESTABLES

Los plásmidos, para una transfección, deben estar muy limpios y libres de contaminantes como fenol y/o cloruro de sodio ya que éstos interfieren con el crecimiento celular y afectando directamente la eficiencia de la transfección, o bien, matando las células. Por lo mismo utilizamos un kit que a la vez que purifica grandes cantidades de plásmido, también elimina dichos contaminantes. Se obtuvieron 20µg-25µg totales por cada clona de los cuales se requirieron 5µg para la transfección.

5.1 Selección de transfectantes estables con pSwitch.

Se transfectó con 5µg de pSwitch (Fig. 8.18) que previamente se linearizaron con *Bst*Z17 I (GTA↓TAC), cuyo sitio de restricción está al final de la secuencia SV40 poly A (Fig. 8.16), con el fin de aumentar la probabilidad de que el plásmido se integre al ADN cromosómico y prevenir que se una de tal manera que pueda interrumpir la secuencia que codifica a la proteína de fusión *GAL4-DBD/Hpr1bd/p65-ADu* otros elementos necesarios para la correcta expresión en células humanas. Una vez que se tenía lista la cantidad de pSwitch que se iba a utilizar para la transfección se comenzó a trabajar con las células humanas A549.

5.1.1 Determinación de la concentración de antibióticos.

Antes de iniciar la transfección se realizaron ensayos de citotoxicidad con Azul de Alamar para determinar la concentración mínima de los antibióticos para seleccionar el pSwitch (higromicina B) y pGeneV5-His (Zeocina™); concentración a la cual inhiben el crecimiento de células no-transfectadas (células que no integraron el vector a su genoma).

Para Zeocina™: la concentración estimada para la Zeocina™ se encuentra en un rango de 50-1000µg/ml. Se probaron 6 cultivos con una confluencia de ≈25% a concentraciones de 0, 50, 125, 250, 500 y 750µg/ml para ver cual sería la concentración óptima de inhibición. Después se incubaron a 37°C y 6% de CO₂. Al cuarto día se observó muerte celular a concentraciones de 250-500µg/ml. La concentración mínima que se eligió para Zeocina™ fue de 300 µg/ml.

Para higromicina B: la concentración estimada para la higromicina B se encuentra en un rango de 10-400µg/ml. Se probaron 7 cultivos con una confluencia de ≈25% a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml. Después se incubaron a 37°C y 6% de CO₂. Al séptimo día se observó muerte celular a concentraciones mayores de 200 µg/ml. La concentración mínima que se eligió para higromicina B fue de 200 µg/ml. Para la selección de las transfectantes estables dobles (pSwitch y pGene+inserto) se requiere la

presencia de ambos antibióticos, sin embargo algunas células pueden ser más sensibles a una doble selección, por tal motivo, la concentración de la higromicina B se redujo a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La concentración de la Zeocina será la misma ya que como lo indica el gráfico 8.1, éste presenta niveles muy bajos de citotoxicidad.

Viabilidad/citotoxicidad por Higromicina y Zeocina™

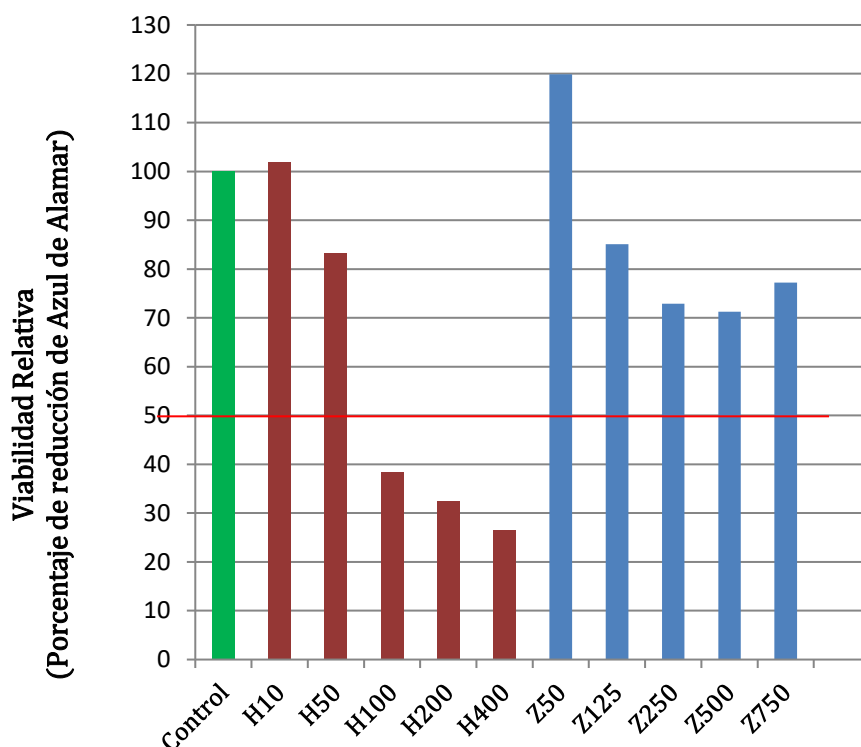


Gráfico 8.1. **Viabilidad/citotoxicidad por Higromicina y Zeocina™**. Control (verde): cultivos sin antibiótico. Cultivos con higromicina B a concentraciones de 50-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (café). Cultivos con Zeocina™ a concentraciones de 50-750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (azul). Nivel LD50 (línea roja): dosificación de un antibiótico que es mortal para el %50 de una población probada. Se considera concentración adecuada cuando está por debajo de la línea roja.

5.1.2. Transfección y selección.

La transfección se hizo con el kit Lipofectamine™ 2000 de Invitrogen de acuerdo al protocolo del fabricante. 24 horas después de la transfección se lavaron las células, se añadió medio fresco y se incubó por 24 horas más para que se recuperen. Posteriormente las células se pasaron a medio fresco. La confluencia de éstos notiene que ser mayor al 25%, si la capa de células es muy densa el antibiótico no matará las células no-transfectadas. Se incubó a 37°C por 2-3 horas hasta que las células se hubieran adherido al frasco de cultivo.

Posteriormente, se removió el medio viejo y se añadió medio fresco que contiene higromicina B (200 µg/ml) y se incubó hasta que aparecieran los foci (3-4 semanas). El medio selectivo se cambiaba cada 3 ó 4 días. Una vez que los foci aparecieron se aislaron para inducir la expresión de pSwitch con mifepristona.

5.1.3 Confirmación de transfectantes estables con pSwitch.

La presencia del pSwitch en el genoma de las células, se confirmó por dos métodos diferentes: un ensayo de β-galactosidasa y por PCR.

5.1.3.1 Ensayo de β-galactosidasa: se hizo utilizando el pGene/*lacZ* (control positivo) el cual se transfectó de forma transitoria (en células que habían sido transfectadas con pSwitch) para corroborar que el sistema estaba trabajando correctamente en A549. pGene/*lacZ* (Fig. 8.16), al igual que pGeneV5-His, contiene un promotor GAL4 UAS al que se le une la proteína *GAL4-DBD/Hpr1bd/p65-AD* codificada en el pSwitch, encargada de regular el sistema. En presencia de mifepristona

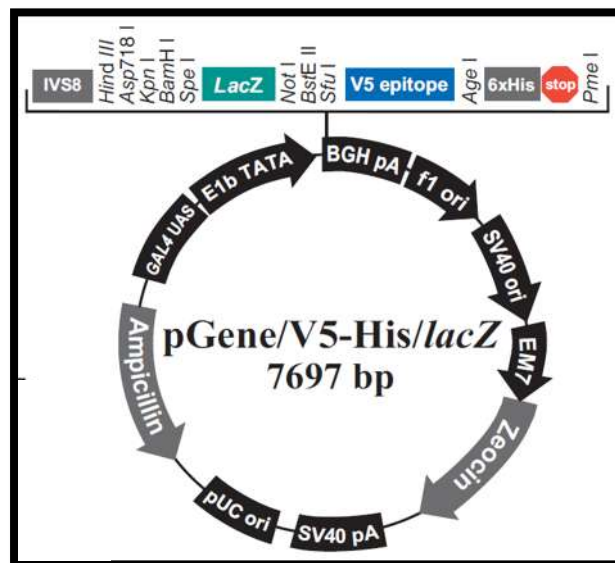


Figura 8.16. Mapa físico de pGeneV5-His/*LacZ*.

(inducidas durante 24hrs) éste plásmido comienza a expresar el gen *lacZ*, bajo el promotor GAL4 UAS, que codifica para la enzima β-galactosidasa que normalmente cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa en bacterias. La actividad de la enzima se detecta utilizando como sustrato al ONPG (orto-nitrofenil-galactopiranosido) que, al hidrolizarse por acción de la β-galactosidasa, da un color amarillo que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420nm.

Durante el ensayo de β-galactosidasa, también se probaron diferentes concentraciones de mifepristona para saber cuál era la óptima para inducir la expresión genética en el Sistema GeneSwitch™. La inducción se realizó a concentraciones de 1X10⁻⁶M, 1X10⁻⁷M, 5X10⁻⁸M, 1X10⁻⁹M. La concentración que dio positivo (color amarillo) para este ensayo fue 1X10⁻⁶M (Fig. 8.17).

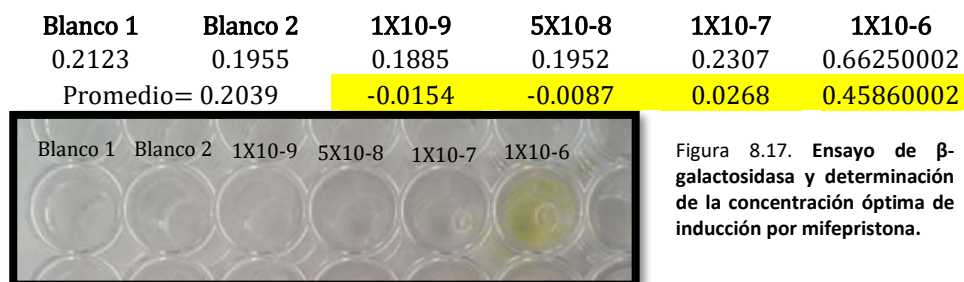


Figura 8.17. Ensayo de β-galactosidasa y determinación de la concentración óptima de inducción por mifepristona.

5.1.3.2 PCR: Para comprobar que el pSwitch se integró al genoma procedimos a hacer una PCR de una región específica del pSwitch que nos dará la información requerida. Las colonias que dieron positivo para β -galactosidasa se lisaron para obtener su ADN cromosómico. Los oligonucleótidos diseñados para la PCR fueron 5pSwitch1 5'-GACGGATCGGGAG-3' y 3pSwitch727 5'-CTTTCTAGCCTTGA-3' que abarcan una región desde el promotor GAL4 UAS (base 1) hasta el el dominio de unión de la proteína GAL4 (proteína reguladora, base 727), inserto de 727 pb (Fig. 8.18). El producto de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, la fotografía 8.13 muestra el éxito que se obtuvo en la transfección con pSwitch lo que nos permitió continuar con las transfecciones de las construcciones de eIF3f y ADRA 1B.

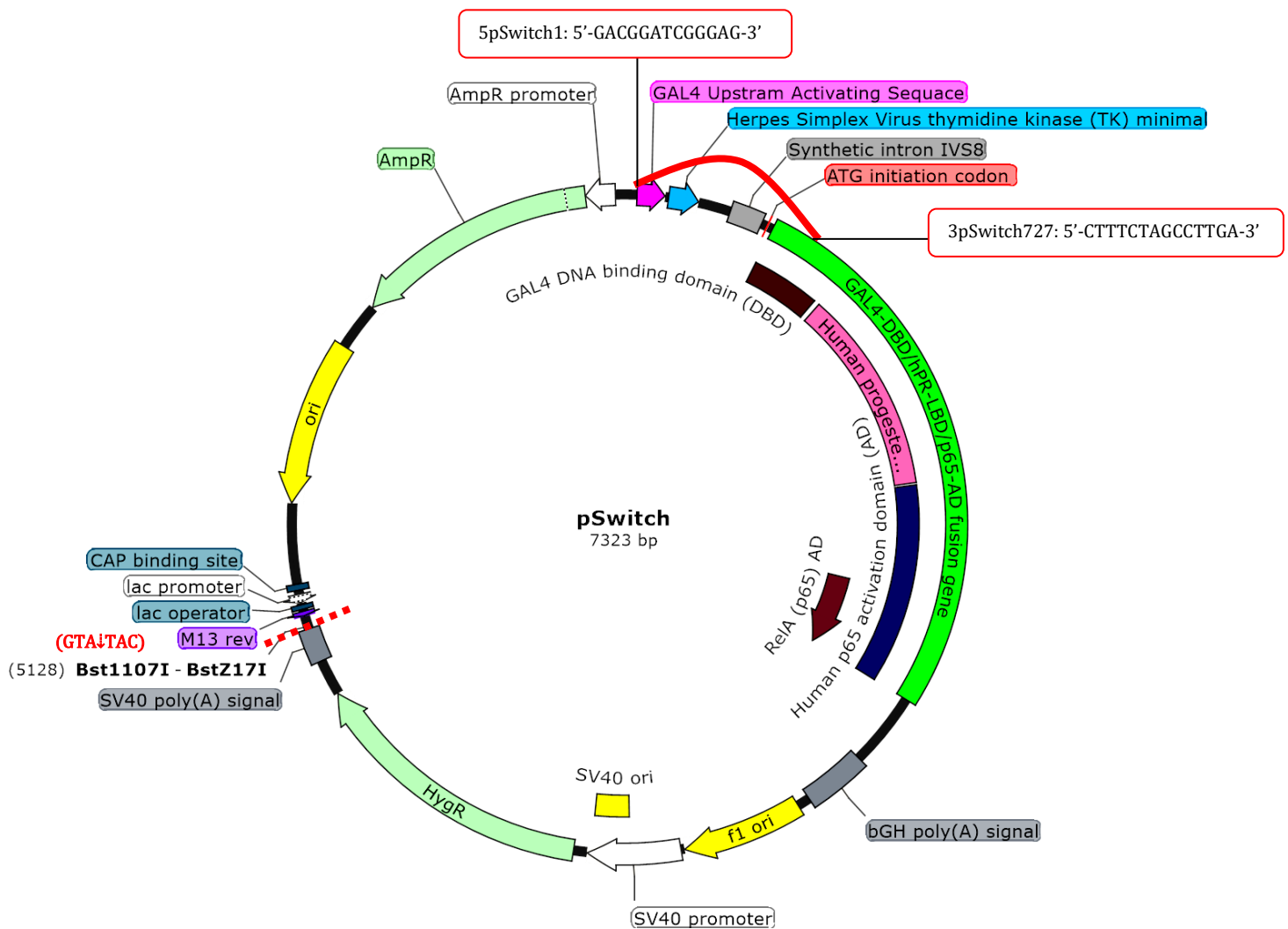


Figura 8.18. **Mapa físico de pSwitch.** La línea roja punteada señala el sitio de corte de *Bst217I*, al final de la cadena SV40 poly A. Los oligonucleótidos diseñados abarcan desde GAL4 UAS hasta la base 727 en el sitio de unión de la proteína GAL4.

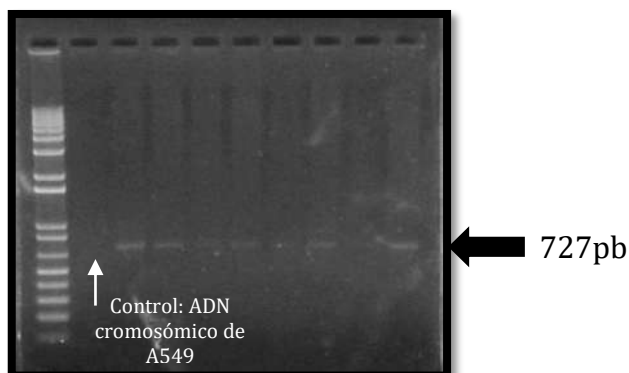


Foto 8.13. **Resultado de la PCR de las colonias A549.** Únicamente se detectaron alrededor de 727 pb de bases del pSwitch que es el fragmento esperado y que demuestra la integración del plásmido al genoma.

5.2 Selección de transfectantes estables dobles.

La transfección de A549 con las clonas de eIF3f y ADRA 1B se hizo aplicando el mismo procedimiento para seleccionar las transfectantes estables con pSwitch. Las colonias que dieron positivo para pSwitch son las que se transfectaron con cada construcción. La selección(doble) de pGeneV5-His/inserto(y también del pSwitch) se hizo utilizando Zeocina™ a una concentración final de 300 µg/ml e higromicina B a una concentración de 100 µg/ml. Los focos se observaron a las 3 ó 4 semanas de incubación las cuales se aislaron y expandieron en placas de 24 pozos para inducir la expresión con mifepristona a una concentración final de 1×10^{-6} M. Finalmente las colonias seleccionadas se aislaron para determinar la cantidad de proteína (método de Bradford) por cada clona y posteriormente determinar la expresión de las construcciones por Western blot.

6. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS DE eIF3f y ADRA 1B

La última etapa de este proyecto consistió en evaluar la expresión de las transfectantes estables dobles, las cuales se indujeron con mifepristona para determinar si las clonas se construyeron adecuadamente y que el sistema GeneSwitch™ funciona como se esperaba. Para esto se procedió a lisar las células transfectadas con cada clona para extraer proteína total, después detectar la señal de la expresión de eIF3f y/o ADRA 1B mediante experimentos de tipo Western blot.

6.1 Determinación de proteína (Bradford).

Por el método de Bradford se determinó la cantidad de proteína presente en cada una de las colonias muestra (protocolo descrito en Materiales y Métodos). La siguiente tabla muestra los valores obtenidos:

Tabla 8.2. Determinación de proteína de las clonas de ADRA 1B y eIF3f.

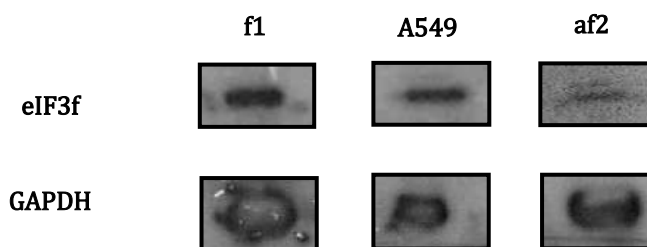
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN mg/ml							
f1	f2	af1	af2	A1	A2	aA1	aA2
0.828	1.224	1.284	0.620	1.291	0.853	1.009	0.661
ACOTACIONES							
f1	Construcción sentido de eIF3f, colonia 1						
f2	Construcción sentido de eIF3f, colonia 2						
af1	Construcción antisentido de eIF3f, colonia 1						
af2	Construcción antisentido de eIF3f, colonia 2						
A1	Construcción sentido de ADRA 1B, colonia 1						
A2	Construcción sentido de ADRA 1B, colonia 2						
aA1	Construcción antisentido de ADRA 1B, colonia 1						
aA2	Construcción antisentido de ADRA 1B, colonia 2						

6.2 Evaluación de las construcciones de eIF3f.

De las 4 muestras que se tenían para las construcciones de eIF3f (2 sentido y 2 antisentido), se hizo un Western blot para elegir cuáles de ellas expresaban o no la proteína. Se seleccionó f1 (sentido colonia 1) y af2 (antisentido colonia 2).

Resultados del Western Blot.

Las fotografías se llevaron a cabo utilizando el programa Kodak Digital Science DC120, mismo que se usó para visualizar los geles de agarosa.



Fotografía 8.14. **Revelado del Western blot para las construcciones de eIF3f.** En esta imagen se muestra cada una de las clonas de eIF3f. Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato- deshidrogenasa) como control de carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-ADRA 1B 1:1000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:2000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Para determinar la expresión o silenciamiento de cada clona, se midió la intensidad de cada banda (por densitometría con el programa Kodak Digital Science DC120) que es proporcional a la cantidad de proteína inmunodetectada, utilizando el programa informático antes mencionado. La intensidad de las bandas se mide en unidades de densidad arbitraria (UDA). También se midió GAPDH.

Tabla 8.3. Resultados de expresión de las construcciones de eIF3f.

DENSITOMETRÍA (UDA)			
	eIF3f	GAPDH	eIF3f/GAPDH
f1	101.8	115.4	0.8
A549	83.0	165.5	0.5
af2	73.0	183.3	0.3

La cantidad de proteína se normalizó con GAPDH (control de carga). GAPDH, entre otras (actina, tubulina, etc.), es una proteína que se encuentra de manera “constante” en las células, ideal para normalizar la carga de proteína y también para llevar un control de calidad en cada uno de los procedimientos que involucra un Western Blot, desde la electroforesis hasta la detección de señales. De los datos obtenidos de la medición de las bandas se deriva el siguiente gráfico:

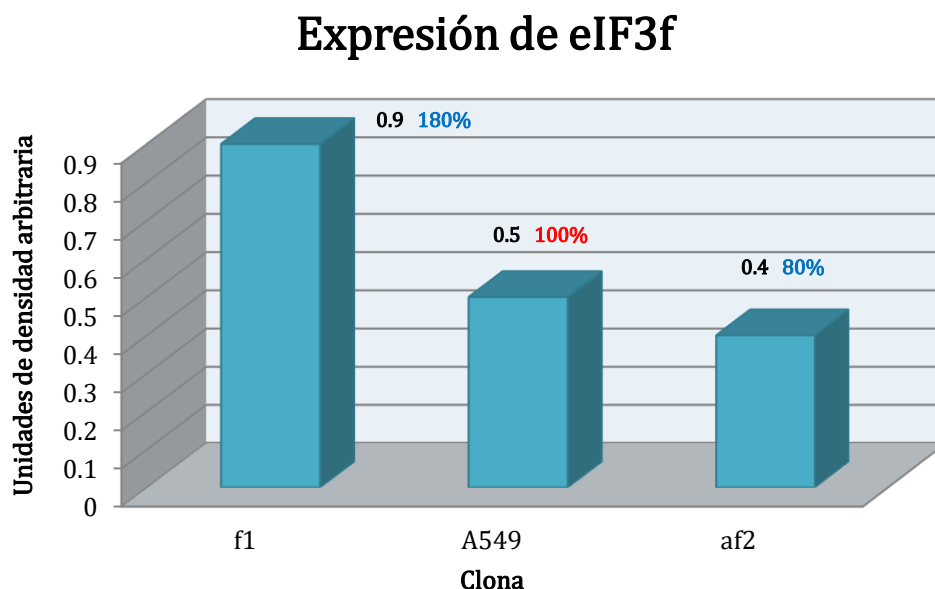


Gráfico 8.2. **Expresión de eIF3f.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA (de cada clona) de eIF3f entre las UDA de GAPDH (respectivas para cada clona), el cociente es el que se graficó. Si pasamos estos datos a porcentaje obtenemos los datos en azul: considerando que el valor de A549 = 0.5 es el 100%, entonces los valores de cada clona corresponderían a: f1, $0.9 \times 100 / 0.5 = 180\%$; af2, $0.4 \times 100 / 0.5 = 80\%$.

Interpretaciones del gráfico 8.2.

- ✓ A549: Proteína total de A549 se utilizó como control de interno. En esta, eIF3f se encuentra en cantidades normales, ya que no está silenciada ni sobreexpresada. Las construcciones fueron comparadas con A549 para así determinar si sí se sobreexpresan o se silencian.
- ✓ Construcción sentido de eIF3f, colonia 1 (f1): Con respecto a A549 (control interno) observamos que la expresión de eIF3f aumentó un 80%, lo que nos dice que la construcción sentido sí sobreexpresa el gen.
- ✓ Construcción antisentido de eIF3f, colonia 2 (af2): Para esta clona observamos que la expresión se silenció un 20%.

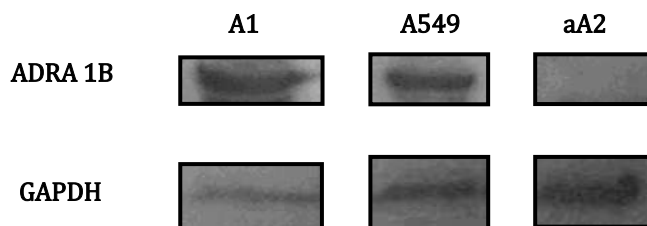
En trabajos anteriores (Higareda y Pardo, 2010) ya se ha estudiado el silenciamiento así como la sobreexpresión de eIF3f en condiciones experimentales similares a este experimento, y se observó que únicamente es posible silenciar o sobreexpresar a niveles también similares a los obtenidos en el gráfico 8.2.

6.3 Evaluación de las construcciones de ADRA 1B.

De las 4 muestras que se tenían para las construcciones de ADRA 1B (2 sentido y 2 antisentido), se hizo un Western blot para elegir cuáles de ellas expresaban o no la proteína. Se seleccionó A1 (sentido colonia 1) y aA2 (antisentido colonia 2).

Resultados del Western Blot.

Las fotografías se llevaron a cabo utilizando el programa Kodak Digital Science DC120. En la fotografía 9.15 se muestra el resultado del Western Blot para las construcciones de ADRA1 B. En la imagen se alcanza a apreciar que A1 (clona sentido colonia 1), y aA2 (clona antisentido colonia 2) parecieron haber funcionado respecto de A549.



Fotografía 8.15. **Revelado del Western blot para las construcciones de ADRA 1B.** En esta imagen se muestra cada una de las clonas de ADRA 1B. Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato- deshidrogenasa) como control de carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-ADRA 1B 1:1000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:2000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Después del revelado, procedimos a determinar la intensidad de las bandas con el programa Kodak Digital Science DC120, los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8.4. Resultados de expresión de las construcciones de ADRA 1B.

	ADRA 1B	GAPDH	ADRA 1B/GAPDH
A1	25.2	13.3	1.9
A549	15.6	11.6	1.3
aA2	1.77	17.6	0.1

La cantidad de proteína se normalizó con GAPDH (control de carga). Los datos obtenidos de la medición de las bandas derivan el siguiente gráfico:

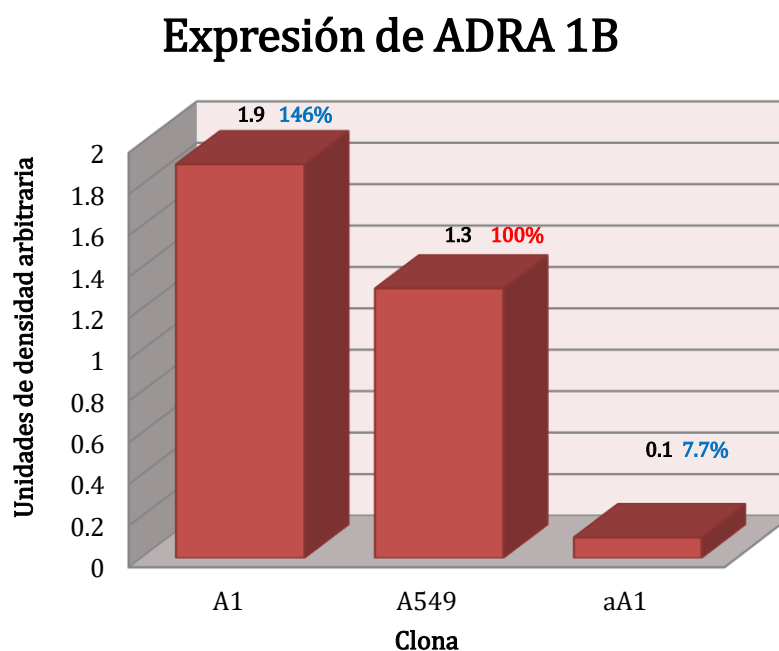


Gráfico 8.3. **Expresión de ADRA 1B.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA (de cada clona) de ADRA 1B entre las UDA de GAPDH (respectivas para cada clona), el cociente es el que se graficó. Si pasamos estos datos a porcentaje obtenemos los datos en azul: **considerando que el valor de A549 = 1.3 es el 100%**, entonces a cuánto corresponderían los valores de cada una de las clonas: **A1**, $1.9 \times 100 / 1.3 = 146\%$; **aA2**, $0.1 \times 100 / 1.3 = 7.7\%$ no se detectó señal.

Interpretaciones del gráfico 8.3.

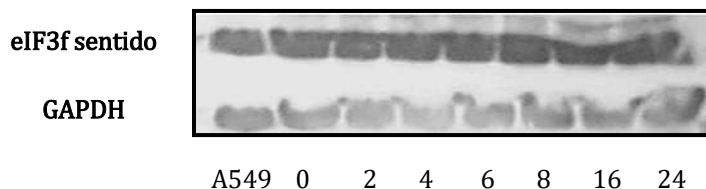
- ✓ A549: Proteína total de A549 se utilizó como control de interno. En esta, ADRA 1B se encuentra en cantidades normales, ya que no está silenciada ni sobreexpresada. Las construcciones fueron comparadas con A549 para así determinar si se sobreexpresan o se silencian.
- ✓ Construcción sentido de ADRA 1B, colonia 1 (A1): Con respecto a A549 (control interno) observamos que la expresión de ADRA 1B alcanzó un 46% más. Así, la expresión está por encima del control, por lo tanto sí sobreexpresa el gen.
- ✓ Construcción antisentido de eIF3, colonia 2 (af2): Para esta clona observamos que la expresión se silenció fuertemente. Así, la construcción antisentido cumplió con su papel al inhibir la expresión de ADRA 1B.

7. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS DE eIF3f Y ADRA 1B

La cinética de expresión se hizo con la finalidad de saber cuál es el tiempo óptimo del efecto de silenciamiento o sobreexpresión en nuestro modelo de estudio. Para esto se indujeron cultivos (confluencia 50%) para cada clona a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 hrs. Se determinó proteína (método de Bradford) y la expresión se determinó por Western Blot.

7.1 Cinética de expresión del sentido de eIF3f.

Resultados del Western blot



Fotografía 8.16. **Cinética de expresión del sentido eIF3f.** Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa) para normalizar la carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-eIF3f 1:2000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:3000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Después del revelado, procedimos a determinar la intensidad de las bandas con el programa Kodak Digital Science DC120, los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8.5. Resultados de la cinética de expresión del sentido de eIF3F.

	eIF3f	GAPDH	eIF3f/GAPDH
f0	93390	35485	2.635
f2	61429	21947	2.799
f4	71706	12145	5.921
f6	61816	20021	3.088
f8	57794	22816	2.533
f16	60991	28450	2.144
f24	83854	47525	1.764

De esta cinética se deriva el siguiente gráfico:

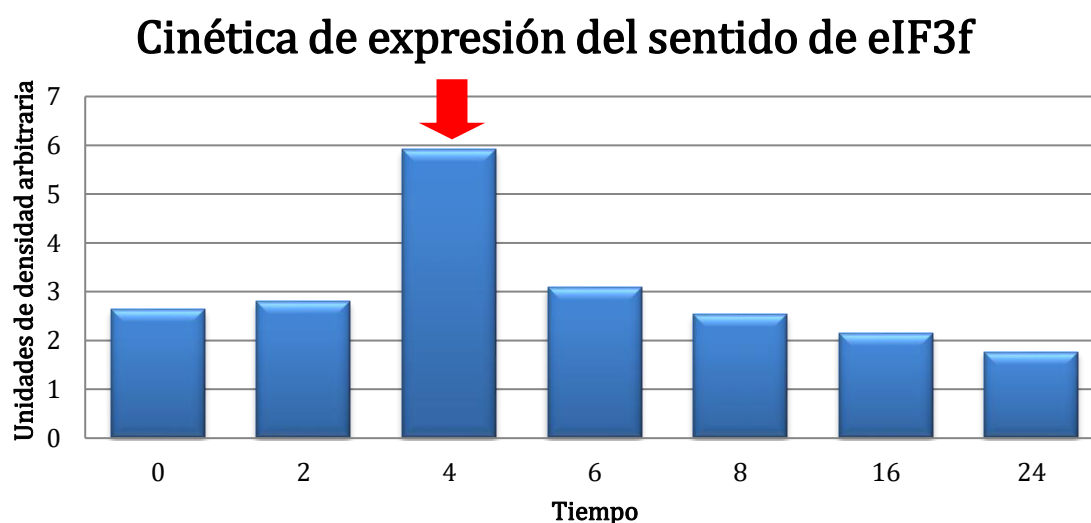


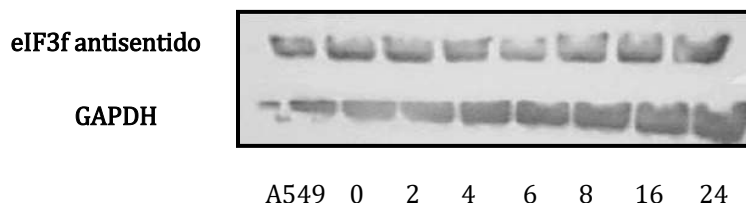
Gráfico 8.4. **Cinética de expresión del sentido de eIF3f.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA de eIF3f entre las UDA de GAPDH, el cociente es el que se graficó. La flecha roja indica el pico máximo de sobreexpresión de la construcción sentido de eIF3f.

Interpretación del gráfico 8.X:

El gráfico 8.X presenta la cinética de expresión de la construcción sentido de eIF3f. Observamos que hay un pico máximo de sobreexpresión a las 4 horas después de la inducción con mifepristona (1 μ M) alcanzando hasta un 224% con respecto al tiempo cero (control). Posteriormente la concentración de la proteína vuelve rápidamente a niveles normales, este cambio súbito después de 4 horas puede deberse a que la célula inicia procesos de degradación al detectar niveles anormales de eIF3F en un intento por conservar la homeostasis, ya que se ha demostrado (Hlgadera y Pardo, 2010) que la sobreexpresión de ésta proteína conduce a la apoptosis.

7.2. Cinética de expresión del antisentido de eIF3f.

Resultados del Western Blot



Fotografía 8.17. **Cinética de expresión del antisentido de eIF3f.** Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa) para normalizar la carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-eIF3f 1:2000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:3000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Después del revelado, procedimos a determinar la intensidad de las bandas con el programa Kodak Digital Science DC120, los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8.6. Resultado de la densitometría de la cinética de expresión del antisentido de eIF3F.

	eIF3f	GAPDH	eIF3f/GAPDH
f0	38194	35250	1.083
f2	26930	29315	0.919
f4	16654	27764	0.600
f6	10162	31358	0.324
f8	14664	41622	0.352

f16	17816	47028	0.379
f24	32460	55338	0.587

De esta cinética se deriva el siguiente gráfico:

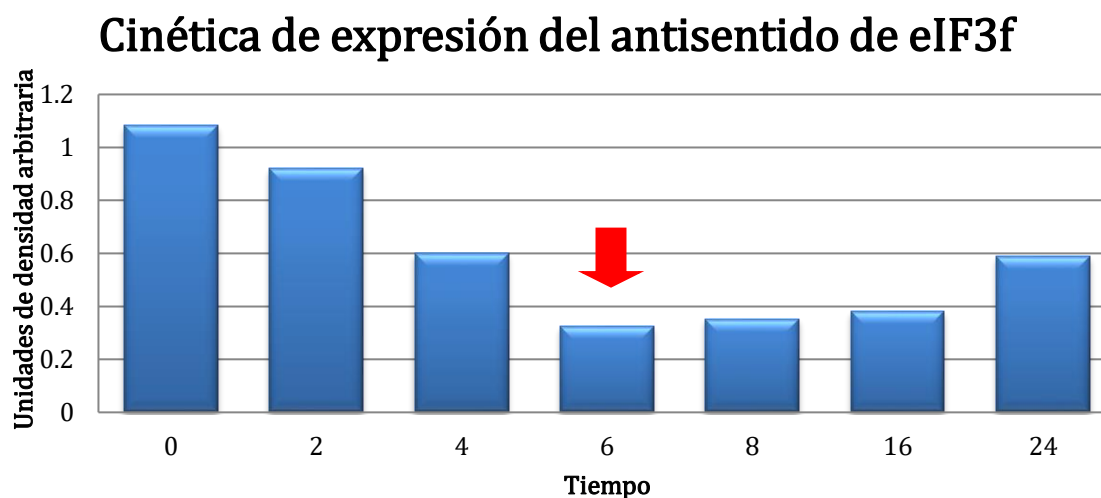


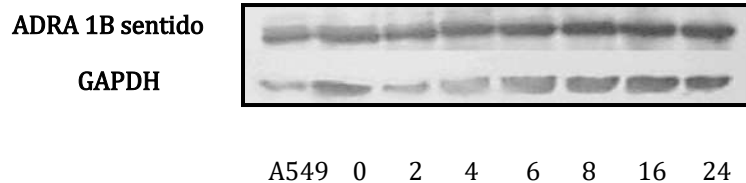
Gráfico 8.5. **Cinética de expresión del antisentido de eIF3f.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA de eIF3f entre las UDA de GAPDH, el cociente es el que se graficó. La flecha roja indica el pico máximo de silenciamiento de la construcción antisentido de eIF3f.

Interpretación del gráfico 8.5

El gráfico 8.X presenta la cinética de expresión de la construcción antisentido de eIF3f. Observamos que a partir de las 2 horas la expresión del antisentido comienza a tener efecto sobre la concentración inicial de proteína disminuyendo gradualmente hasta llegar a un silenciamiento máximo a las 6 horas después de la inducción con mifepristona ($1\mu\text{M}$), en este punto el silenciamiento alcanza hasta un 70% con respecto al tiempo cero (control). Después del tiempo 6, aún se observan niveles muy bajos de la proteína eIF3f y esto permanece, con un ligero incremento, por 10 horas más después del punto máximo de silenciamiento. Nuevamente se hace referencia al trabajo realizado por Higadera y Pardo en 2010 donde se demostró que el silenciamiento de eIF3f activa mecanismos de apoptosis en la célula al cabo de 24 horas.

7.3 Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B.

Resultados de Western Blot



Fotografía 8.18. **Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B.** Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa) para normalizar la carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-eIF3f 1:2000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:3000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Después del revelado, procedimos a determinar la intensidad de las bandas con el programa Kodak Digital Science DC120, los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8.7. Resultado de la cinética de expresión del sentido de ADRA 1B.

	ADRA 1B	GAPDH	ADRA 1B/GAPDH
f0	41349	32539	1.271
f2	32399	11363	2.851
f4	29980	16352	1.833
f6	42950	33671	1.276
f8	42507	37206	1.142
f16	39174	41678	0.940
f24	44870	31446	1.427

De esta cinética se deriva el siguiente gráfico:

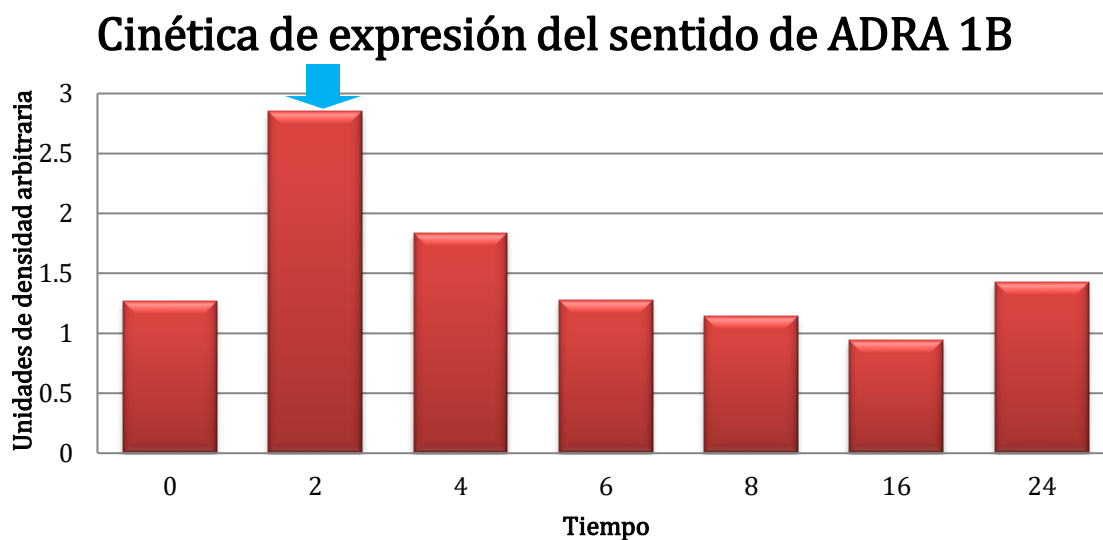


Gráfico 8.6. **Cinética de expresión del sentido de ADRA 1B.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA de ADRA 1B entre las UDA de GAPDH, el cociente es el que se graficó. La flecha azul indica el pico máximo de sobreexpresión de la construcción sentido de ADRA 1B.

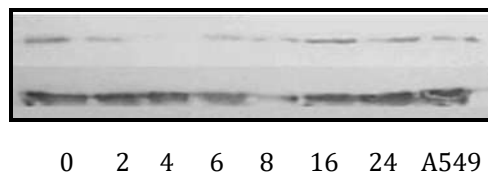
Interpretación del gráfico 8.6

El gráfico 8.X presenta la cinética de expresión de la construcción sentido de ADRA 1B. Observamos que hay un pico máximo de sobreexpresión a las 2 horas después de la inducción con mifepristona ($1\mu\text{M}$) alcanzando hasta un 224% (igual que el sentido de eIF3f) con respecto al tiempo cero (control). Posteriormente la concentración de la proteína vuelve rápidamente a niveles normales. El gráfico muestra que después de las 2 horas la concentración de la proteína desciende rápidamente hasta que se normaliza. Este cambio puede deberse a que la célula activa procesos de degradación para mantener niveles normales de este receptor adrenérgico.

7.4 Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B.

Resultados del Western Blot

ADRA 1Bantisentido
GAPDH



Fotografía 8.19. **Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B.** Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa) para normalizar la carga. Como control interno se utilizó proteína total de A549. Inmunodetección primaria: conejo anti-ADRA 1B 1:2000 y ratón anti-GAPDH 1:2500. Inmunodetección secundaria: cabra anti-conejo 1:3000 y cabra anti-ratón 1:5000. Después, las membranas se trataron con solución de luminol 1:1. Se detectó la señal en placa para revelado.

Después del revelado, procedimos a determinar la intensidad de las bandas con el programa Kodak Digital Science DC120, los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8.8. Resultado de la cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B.

	ADRA 1B	GAPDH	ADRA 1B/GAPDH
f0	9720	34167	0.284
f2	3685	31028	0.119
f4	500	29150	0.017
f6	3547	26744	0.133
f8	2980	7723	0.386
f16	9823	30872	0.318
f24	6140	38728	0.159

De esta cinética se deriva el siguiente gráfico:

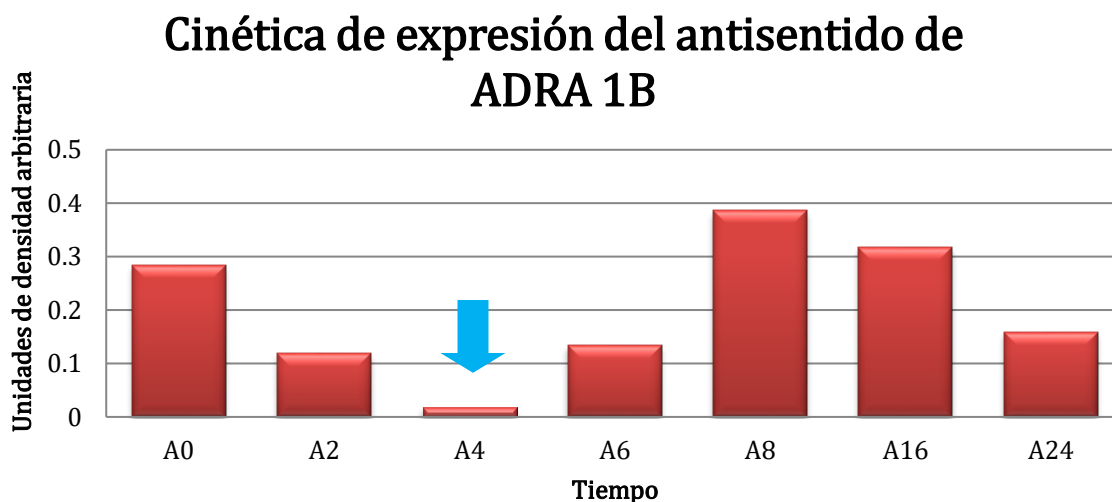


Gráfico 8.7. **Cinética de expresión del antisentido de ADRA 1B.** El gráfico se obtuvo dividiendo las UDA de ADRA 1B entre las UDA de GAPDH, el cociente es el que se graficó. La flecha azul indica el punto máximo de silenciamiento de la construcción antisentido de ADRA 1B.

Interpretación del gráfico 8.6.

El gráfico 8.X presenta la cinética de expresión de la construcción antisentido de ADRA 1B. Observamos que a partir de las 2 horas la expresión del antisentido comienza a tener efecto sobre la concentración de proteína inicial disminuyendo un 50% aprox. hasta llegar a un silenciamiento máximo (94% menos con respecto al tiempo cero) a las 4 horas después de la inducción con mifepristona (1 μ M). A partir del tiempo 6, observamos que la concentración de la proteína comienza a aumentar hasta sobrepasar las concentraciones del control (tiempo 8), sin embargo el antisentido se sigue produciendo lo que hace que las concentraciones disminuyan de nuevo. Esta cinética tiene un *comportamiento* similar a la del sentido de eIF3f en donde la célula *dispara* procesos de degradación para regular las altas concentraciones de esa proteína; de no hacerlo la célula muere. En este caso, la célula podría activar súbitamente la transcripción de ADRA 1B al sensor niveles mínimos de la proteína. No se tienen registros de los efectos del silenciamiento de ADRA 1B en la célula, sin embargo estos datos nos dicen que pudiera tener un papel más significativo en cuanto a la fisiología celular.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

- ✓ La construcción sentido de eIF3f presenta un pico máximo de sobreexpresión a las 4 horas después de la inducción con mifepristona 1 μ M.
- ✓ La construcción antisentido de eIF3f presenta un efecto de máximo silenciamiento de la expresión a las 6 horas después de la inducción con mifepristona 1 μ M.
- ✓ La construcción sentido de ADRA 1B presenta un pico máximo de sobreexpresión a las 2 horas después de la inducción con mifepristona 1 μ M.
- ✓ La construcción antisentido de ADRA 1B presenta un efecto de máximo silenciamiento de la expresión a las 4 horas después de la inducción con mifepristona 1 μ M.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA

Se lograron construir líneas celulares estables que expresan de manera inducible a los genes eIF3f y ADRA 1B en sentido y antisentido en células humanas A549.

~Perspectiva~

El uso experimental de una línea celular estable que exprese de manera inducible eIF3f y ADRA 1B permitirá un avance sustancial en los métodos de estudio de la expresión de estos dos genes *in vivo*. Notables avances se prevén también en cuanto a calidad se refiere, ya que una línea celular con estas características tiene innumerables ventajas para el laboratorio de Biología Molecular considerando los antecedentes expuestos en este trabajo, entre las que destacan:

- ⊕ **Tiempo.** Al ser una línea celular estable, es decir permanente, las transfecciones transitorias con eIF3f y ADRA 1B ya no serán necesarias en caso que se requiera trabajar con estos dos genes, lo que favorece particularmente a acelerar el proceso de experimentación considerando que los periodos de incubación de cultivos celulares humanos son largos (3-4 semanas) comparados con cultivos ordinarios de células bacterianas u hongos (24 hrs).
- ⊕ **Dinero.** Ligado al beneficio de acortar los tiempos de experimentación, al hacer uso de una línea celular estable es evidente que el costo de materiales y reactivos que se requieren para realizar transfecciones transitorias continuamente, se ve minimizado significativamente, (éstas ya no serán necesarias para eIF3f y ADRA 1B) y aunque pudiera parecer poco, también la carga de trabajo experimental disminuye lo cual siempre es benéfico para el experimentalista.
- ⊕ **Calidad.** Además de ser una línea celular estable, otra ventaja es que la expresión de los genes es inducible lo que significa que el experimentalista podrá manejar como más le convenga la expresión genética según el objetivo del experimento. La estabilidad le confiere otro punto a favor ya que la expresión de los genes es continua, es decir no disminuye hasta se desee detener el proceso de expresión genética, mientras que en una transfección transitoria la expresión del gen cada vez es menor debido ya que el plásmido se va perdiendo en cada generación de células.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 2004. *Biología Molecular de la célula*. 4ta edición. Barcelona: Omega S.A.
- Allen L.F. Lefkowitz R.J., Caron M.G. Cotecchia S. 1991. *G-protein-coupled receptor genes as proto-oncogenes: constitutively activating mutation of the $\alpha 1B$ -adrenergic enhances mitogenesis and tumorigenocity*. Medical Sciences. 88:11354-11358.
- Aravind L., Ponting C.P. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and regulation. *Protein Sci.* 7(5): 1250-1260.
- Asano K., Vornloncher H.P., Ritcher-Cook N.J., Merrick W.C., Hinnebusch A.G., Hershey J.W. 1997. *Structure of cDNAs encoding human eukariotic initiation factor 3 subunit. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly*. J Biol Chem. 272(43):27042-52.
- Avers J.C., 1991. *Biología Celular*. 2da edición. Editorial Iberoamericana. Pag 3-26.

B

- Bork E., 1965. *La célula, clave de la vida*. 1ra edición. Editorial Limusa-Wiley.
- Burks E.A., Bezerra P.P., Le H., Gallie D.R., Browning K.S. 2001. *Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit*. J Biol Chem. 276(3): 2122-31.

C

- Castillo Ureta, H., Barrera Saldaña, H. A., & Martínez Rodríguez, H. G. (2004). *El sistema génico inducible por tetraciclina permite la producción regulada de proteínas con potencial terapéutico*. Revista de investigación clínica, 56(6), 748-755.
- Clark A.R., Docherty K., 1993. *Negative regulation in eukaryotes*. Biochem J 15:521-541.
- Cotecchia S. 2010. *The $\alpha 1$ -adrenergic receptor: diversity of signaling networks and regulation*. J Recept Signal Transduct Res. 30(6):410-9.

D

- Duffy J.B. 2002. *GAL4 System in Drosophila: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife*. Wiley-Liss, Inc.

F

- Fan H., Penman S. 1970. *Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II Inhibition of protein synthesis at level of initiation during mitosis*. Journal of Molecular Biology. 50(3):655-670.

G

- Giniger, E., Varnum, S. M., & Ptashne, M. (1985). *Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast*. Cell, 40(4), 767-774.
- Guimarães S. Morua D. 2001. *Vascular adrenoceptors: an update*. Pharmacol Rev. 53(2):319-56.

-
- González-Cabrera P., Shi T., Yun J., Mccune D.F., Rorabaugh B.R., Pérez D.M. 2004. *Differential Rregulation of the Cell Cycle by α 1-Adrenergic Receptor Subtypes*. Endocrinology. 145(11):5157-5167.
 - Gómez-Correa C.A. 2013. *Análisis de fosforilación en eIF3f humano por CDK/Ccilina B*. Trabajo para optar por el título de Maestro en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Faculta de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.
 - Gutiérrez-Fernández M.J., Higadera-Mendoza A.E., Pardo-Galván M.A. 2015. *The eukariotic translational initiation factor 3f (eIF3f) interacts physically with the alpha 1B-adrenergic receptor and stimulates adrenoceptor activity*. J BMC Biochemistry.
 - Goodman & Gilman. 2007. *Neurotransmisión. Sistema Nervioso autónomo y motor somático. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial McGraw-Hill. Pag. 167-170.

H

- Hall M.N., Raff M.C. y Thomas G. 2004. *Cell growth: control of size*. Vol. 42. Cold Spring Harbor Monograph Series. CSHL Press. China. Pag.652.
- Harris T.E., Chi A. Shabanowitz J., Hunt D.F., Roads R.E., Lawrence J.C. 2006. *mTOR-dependet stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin*. EMBO J. 25(8):1659-68.
- Higareda-Mendoza A.E., Farias A., Llanderal J., Méndez A., Pardo-Galván M.A. 2003. *A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition*. Miami Nature Biotechnology Short Reports 14:111.
- Higareda-Mendoza A.E., Pardo-Galván M.A. 2010. *Expression of human eukariotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability*. Cell Division 5:10.
- Holz M.K., Ballif B.A., Gygi S.P., Blenis J. 2005. *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell. 123(4):569-80.
- Hutchis C. 1994. *Three-dimentional models of the D1 and D2 dopamine receptors*. Endocrinology Journal. 2:7-23.

J

- Jackson J.R., Hellen C.U. y Pestova T.V. 2010. *The mechanism of eukariotic translation initiation and principles of its regulation*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11:113-127.

K

- Karp G., 2005. *Biología Celular y Molecular Conceptos y Experimentos*. 4ta Edición. McGraw Hill Interamericana.

L

- Lagirand-Cantaloube J., Offner N., Csibi A., Leibovitch M.P., Batonnet-Pichon S., Tintignac L.A., Segura C.T., Leibovitch S.A. 2008. *The initiation factor eIF3-f is a major target for Artrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy*. EMBO Journal 27(8):1266-1276.
- Laughon, A. L. L. E. N., & Gesteland, R. F. (1984). *Primary structure of the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene*. Molecular and cellular biology, 4(2), 260-267.
- Lee J.P., Brauweiler A., Rudolph M., Hooper J.E., Drabkin H.A., Gemmill RM. 2010. *The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways*. Molecular Cancer Res. 8(1):93-106.
- Lehninger A., 2005. *Bioquímica*. 2da edición. Ediciones Omega.
- Lewis B., 1991. *Genes Tomo I y II*. 2da edición. Editorial Revesté.
- Liao Y., Hung M.C. 2010. *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am. J. Transl. Res. 2(1):19-42.
- Luque J., Herráez A., 2008. *Texto ilustrado de Biología Molecular y Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. 1ª ed. Editorial Elsevier. Barcelona. España.

M

Miller, J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

O

- Ogbourne S., Antalis T.M., 1998. *Transcriptional control and role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes*. Biochem J 331: 1-14.

P

- Pestova T.V., Hellen C.U. 2000. *The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis*. Cell. Mol. Life Sci. 57(4):651-74.
- Pestova T.V., Kolupaeva V.G. 2002. *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection*. Genes Dev. 16(22):2906-22.
- Pin J.P., Galvez T., Prézeau L. 2003. *Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors*. Pharmacol Ther 98, 325-354.
- Pérez-Sala Gozalo M. D., 2012. *Modificaciones postraduccionales de proteínas: mecanismos de acción en el control de su actividad*. SEBBM. Divulgación la ciencia al alcance de todos.

R

- Recillas T.F. y Escailla A.M., 2004. *Participación de la cromatina en la regulación de la expresión génica*. Mensaje Bioquímico. Vol.XVIII, 173-201.

S

-
- Schmitz, M. L., Baeuerle, P.A. 1991. *The p65 Subunit is Responsible for the Strong Transcription Activating Protein of NF-kappa B*. EMBO J. 10, 3805-3817.
 - Shanmugasundaram K., Block K., Nayak B.K., Livi C.B., Venkatachalam M.A., Sudarsh S. 2010. *PI3K regulation of the SKP-2/p27 axis through mTORC2*. Oncogene. 32(16):2027-36.
 - Shi J., Kahle A., Hershey J.W., Honchak B.M., Warneke J.A., Leong S.P., Nelson M.A. 2006. *Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells*.
 - Strader C.D., Fong T.M., Tota M.R., Underwood D., Dixon R.A. 1994. *Structure and function of G protein-coupled receptors*. Annu Rev Biochem.63:101-132.
 - Strittmatter F., Walther S., Roosen A., Rutz B., Schlenker B., Limmer S., Waidelich R., Stief C.G., Gratzke C., Hennenberg M. 2012. *Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate*. Life Sci. 90(11-12):446-53.

T

- Toews M.L., Prinster S.C., Schulte N.A. 2003. *Regulation of alpha-1B adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability*. Life Sci. 74(2-3):379-89.

V

- Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M. J., McDonnell, D. P., & O'Malley, B. W. (1992). *The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor*. Cell, 69(4), 703-713.
- Veulens de la nuez A., Rodríguez R. 2009. *G Protein-coupled receptors as targets for drugs desing*. Biotecnologia Aplicada. Vol. 26, No. 1.

W

- Waldrop B.A., Mastalerz D., Piascik M.T. Post G.R. 2002. *Alpha (1B)-and alpha (1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblast*. Journal Pharmacol Exp. Ther. 300(1):83-90.
- Wang, Y., O'Malley, B. W., & Tsai, S. Y. 1994. *A regulatory system for use in gene transfer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(17), 8180-8184.
- Wang, Y., Xu, J., Pierson, T., O'malley, B. W., & Tsai, S. Y. 1997. *Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator*. Gene therapy, 4(5), 432-441.

NOTAS

NOTAS

