



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

*“Análisis de fosforilación en eIF3f humano
por CDK1/Ciclina B.”*

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

Maestro en Ciencias de la Salud

QUE PRESENTA:

Q.F.B. César Adrián Gómez Correa

ASESOR DE TESIS:

D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza

COASESOR DE TESIS:

D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván

Apoyado por U.M.S.N.H. C.I.C. 2012-2013
MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2013



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular Humana y el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección de la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza y la co-dirección del D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván. El trabajo de Investigación fue parcialmente apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2011-2013), así como por la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H. (2012-2013).

Índice de Contenido

Lista de Abreviaturas	1
Capítulo I - Introducción.....	2
Capítulo II - Marco Teórico	3
2.1 - Regulación del ciclo celular	4
Ciclinas y Cinasas dependientes de Ciclinas.....	5
Primer punto de control – transición G1/S.....	6
Segundo punto de control – transición G2/M	7
Puntos de control mitóticos	7
2.2 - Expresión génica	7
Niveles de regulación de la expresión génica en eucariotes.....	8
Síntesis de proteínas en eucariotes	9
Modificaciones postraduccionales.....	12
Fosforilación.....	13
2.3 - Características del complejo eIF3	14
2.4 - eIF3f	15
2.5 - Pregunta de investigación.....	17
Capítulo III - Justificación	17
Capítulo IV - Hipótesis	18
Capítulo V - Objetivo General	18
Capítulo VI - Objetivos Particulares	18
Capítulo VII - Materiales y métodos.....	19
7.1 - Estrategia experimental general.	19
7.2 - Material.....	20
Cepas y plásmidos	20

Medio de crecimiento para E .coli.....	21
7.3 - Análisis Bioinformático.....	22
Herramientas utilizadas para la predicción de sitios.	22
7.4 - Mutagénesis de sitio dirigido.....	23
Diseño de la mutación puntual.	23
Diseño de oligonucleótidos.	24
Ensayo de PCR.....	24
Electroforesis en gel de agarosa	25
Extracción de ADN por técnica de Fenol Cloroformo.....	26
Ensayo de digestión de los plásmidos no mutados con la enzima Dpn I.	27
Limpieza con kit minElute de Quiagen.	27
7.5 - Transformación Bacteriana	27
Transformación por Electroporación.....	28
Transformación por Golpe Térmico.....	29
7.6 - Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina (MINI-prep)	30
Preparación de muestras para secuenciación.....	31
Sistema de transcripción y traducción in vitro.	31
Ensayo de fosforilación.	31
Revelado en placa sensible a radiación.	32
Capítulo VIII - Resultados	33
8.1 - Análisis Bioinformático.....	33
Obtención de la secuencia de eIF3f.....	33
Oligonucleótidos diseñados.....	37
8.2 - Obtención de las mutantes.....	37
8.3 - Análisis de fosforilación.....	41
Capítulo IX – Discusión.....	42
Capítulo X - Conclusión	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Condiciones iniciales; ciclos de la PCR.....	25
Tabla 2. Sitios de modificación postraduccional candidatos	34
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados	36
Tabla 5. Secuencias conocidas del motivo Cy	37

Índice de Figuras

Figura 1. Complejos enzimáticos CDK/Ciclina.....	6
Figura 2. Proceso de traducción o síntesis de proteínas.....	12
Figura 3. Esquema de fosforilación del un aminoácido.....	14
Figura 4. Propuesta del modelo de eIF3 por Zhou en 2008.....	17
Figura 5. Estrategia Experimental General.....	19
Figura 6. pBluescrip II SK (+).	20
Figura 7. pRCE021 plásmido.....	21
Figura 8. Código genético	24
Figura 8. Predicción de los sitios de modificaciones postraduccionales de eIF3f.....	35
Figura 9. Miniprep de diferentes colonias de las construcciones.....	39
Figura 10. Fosforilación in vitro de eIF3f.....	42
Figura 11. Autoradiograma que muestra la fosforilación en diversas subunidades del complejo eIF3 de células HeLa.....	44

Índice de Secuencias

Secuencia 1. Secuencia de nucleótidos de cADN de eIF3f humano.....	33
Secuencia 2. Secuencia de aminoácidos de eIF3f humano	34
Secuencia 3. Sitios posibles a ser fosforilados	36
Secuencia 4. Datos de secuenciación de la muestra Sermut1	40

Secuencia 5. Muestra de la mutación en Thr-255.....	40
Secuencia 6. Muestra de la mutación en “Cy motif”	41
Secuencia 7. Muestra de la mutación en Ser-258.	41

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
MPN	Mpr1p and Pad1p N-terminal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cAMP	Adenosin Mono fosfato cíclico
ATP	AdenosinTrifosfato
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Dpn I	Enzima de restricción DpnI de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELM	Eukaryotic Linear Motif
eIF3f	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i>
ExpPASy	ExpertProteinAnalysisSystem
g	Gramos
h	Hora
L	Litros
Medio LB	Medio Luria Bertani
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
ng	Nanogramos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reacción de la cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
s	Segundos
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics

Capítulo I - Introducción

La expresión génica es regulada a distintos niveles, desde la estructura de la cromatina hasta las modificaciones postraduccionales. Un factor en el desarrollo del cáncer es la alteración en la expresión de genes involucrados en la proliferación y/o muerte celular. La subunidad f del factor eucariótico de iniciación 3 tiene una función moduladora en el inicio de la traducción y en la progresión del ciclo celular. Estudios sobre el nivel de expresión eIF3f en muestras tisulares de neoplasias malignas sugieren su incidencia en la oncogénesis. Sin embargo, aún se desconoce la actividad de eIF3f con respecto a las modificaciones postraduccionales que adquiere. Para la progresión del ciclo celular es necesario se cumplan condiciones como biomasa, suficiencia energética, y terminación correcta de la replicación y mitosis; mismas que son verificadas en los puntos de control del ciclo celular (G1/S, G2/M, metafase y anafase). El componente clave de la transición G2/M es el factor promotor de la mitosis, formado por la subunidad catalítica Cdk1 y su regulador positivo la Ciclina B, complejo que tiene acción de fosforilación en los residuos de serina o treonina de diversas proteínas, lo que modula la actividad de éstas. Dado que eIF3f se expresa en la transición G2/M del ciclo celular, el objetivo de este trabajo es identificar el o los sitios de fosforilación en eIF3f por complejos Cdk1/Ciclina B. Para lograr el objetivo se realizó un análisis bioinformático para identificar los posibles sitios de fosforilación por Cdk1/Ciclina B; se diseñarán oligonucleótidos con mutaciones puntuales en los codones que codifiquen para los aminoácidos susceptibles a fosforilación; se realizó una mutagénesis sitio dirigida a un plásmido que contiene la secuencia codificante del gene eIF3f, y dichas construcciones fueron verificadas por secuenciación. Se generaron las distintas proteínas de eIF3f (nativa y mutadas) a través de la transcripción y traducción *in vitro*; éstas se sometieron a un ensayo de fosforilación con el complejo Cdk1/Ciclina B, utilizando como sustrato [γ ³²P] ATP, lo cual permitió elucidar los sitios de fosforilación en eIF3f. Los datos obtenidos por el análisis bioinformático arrojaron que existen altas probabilidades que la treonina 255 y la serina 258 de eIF3f sean fosforilados por el complejo Cdk1/Ciclina B; además, se encontró una secuencia que tiene características del motivo denominado Cy o RXL y que es de unión a ciclinas, por lo cual se consideró incluirlo en el proyecto. Se diseñaron diversos oligonucleótidos (Sermut, Thrmut, Stmut y Cymut) para la mutagénesis sitio dirigida que modifican aminoácidos específicos de eIF3f: los sitios de fosforilación Thr-255 por

Ala y Ser-258 por Gli; y en el motivo Cy, Arg-306 por Leu y Leu-308 por Val. Los plásmidos obtenidos de la mutagénesis se utilizaron para la transformación por electroporación de células de *E. coli* DH5 α ; se aislaron colonias resistentes a ampicilina, se purificaron los plásmidos por MiniPrep y por columna, y se enviaron a secuenciar para determinar el éxito de la mutagénesis. Una vez identificados los plásmidos con las mutaciones puntuales de interés se procedió a realizar el ensayo de transcripción y traducción acopladas, el ensayo de fosforilación con marca radioactiva, la electroforesis en gel SDS-PAGE y el revelado en placa sensible a la radiación.

Capítulo II - Marco Teórico

La célula inicia la vida a partir de la división celular de una célula preexistente a través de un proceso denominado ciclo celular, que describe una secuencia de etapas por las que cronológicamente va pasando la célula, hasta que se produce la división, pasando de una división celular a la siguiente. El mecanismo tiene como objetivo asegurar que las células hijas contengan la información específica de la especie e implica los procesos de crecimiento celular, la replicación del ADN y la división celular (Alberts et al. 2002).

En las células eucariotas, la progresión a través del ciclo celular está controlada por una serie de proteínas y moléculas de tipo interno, como las ciclinas, las proteinquinasas y los inhibidores de proteinquinasas (su síntesis y función se dan dentro de la célula) o de tipo externo, como los factores de crecimiento y las hormonas (su síntesis se cumple extracelularmente y su función se produce a través del proceso de transducción de señales). Los procesos coordinados por estas moléculas es el crecimiento celular, la replicación del ADN y la correcta división celular (Alberts et al. 2002).

Estos procesos implican, a su vez, la regulación de la expresión génica de las moléculas participantes. La expresión de los genes eucariontes es regulada a diferentes niveles: compactación de la cromatina, la transcripción, el procesamiento del ARN transcrito, el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, la degradación del ARNm, el inicio de la traducción, las modificaciones postraduccionales y la actividad de las proteínas (activación, inactivación, degradación).

El ARN transcrito primario es procesado y se convierte en un ARN maduro (ARNm) que es transportado al citoplasma, donde es traducido a proteína. En todos los organis-

mos se requiere una serie de procesos para que el mensaje lineal o unidimensional del polipéptido, se transforme a un mensaje tridimensional, que es la estructura responsable de su función. Estos procesos, recogidos de forma conjunta bajo el término de maduración o modificación postraducciona, constituyen la parte final de la modulación proteínica. La maduración postraducciona es esencial en todo momento y circunstancia de la célula eucariota. Cada compartimento subcelular requiere proteínas diferentes para realizar sus variadas funciones: actividad catalítica de reacciones en todas las vías metabólicas, función estructural en la membrana celular, transporte o almacén de moléculas e iones, función motora, transmisión de señales intra- e intercelulares, o regulación de la expresión génica (Luque y Herráez 2001).

Diversos aminoácidos del polipéptido, siempre en posiciones específicas, sufren reacciones de modificación química catalizadas enzimáticamente. Es frecuente la adición de determinados grupos (como acetilo, carboxilo, fosfato, hidroxilo o metilo) a la cadena lateral de aminoácidos, modificándolos. La fosforilación es la modificación más frecuente, actuando casi siempre de forma reversible (fosforilación-desfosforilación) como un mecanismo modulador de la actividad de la proteína. Afecta al grupo –OH de la serina, treonina y tirosina, es catalizada por proteínas cinasas, con hidrólisis de ATP, y produce un incremento notable en la carga de la proteína (Luque y Herráez 2001).

2.1 - Regulación del ciclo celular

Diferentes puntos de control a lo largo del ciclo celular logran que la división celular sea regulada con precisión; este control se da a nivel transcripcional, traduccional o postraducciona. Los complejos de cinasas dependientes de ciclinas y las ciclinas son los más estudiados en el control del ciclo celular. Los puntos de control se definen como los instantes del ciclo celular eucarionte en los que puede detenerse la progresión hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada puede producirse daño genético y/o celular. Los procesos moleculares que regulan la replicación cromosómica y la división celular son similares en todas las células eucariotas (Farias y Pardo 2005).

Durante la primer fase del intervalo G1 se presenta el primer punto de control del ciclo celular, denominado START (en levadura) o “punto de restricción” (en células animales), tomando en consideración estímulos externos e internos (Stein et al. 2000). En la

última etapa de la interfase, en la fase G₂, se da un segundo punto de control cuyo objetivo es asegurar que la célula no se divida hasta que los eventos previos necesarios hayan concluido (Stein et al. 2000). Durante la transición de la metafase a la anafase, se presenta el primer punto de control de la mitosis que verifica el adecuado ensamblaje del huso mitótico. Un segundo punto de control se da durante la telofase, el objetivo de este punto es asegurar la posición correcta del huso central donde se posicionará el anillo contráctil durante la citocinesis (Nigg 2001).

Ciclinas y Cinasas dependientes de Ciclinas

La progresión a través de estos puntos de control es mediada por la activación secuencial de complejos heterodiméricos de proteínas cinasas conocidos como cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estos complejos CDKs constan de una subunidad catalítica CDK, y una reguladora denominada ciclina. Cada CDK puede asociarse con distintas ciclinas lo que determina qué proteína será fosforilada por el complejo a partir del cambio conformacional que produzca la interacción CDK/ciclina (Kitazono et al. 2001). Todas las ciclinas comparten una región altamente conservada de aproximadamente 100 aminoácidos, denominada “caja de ciclinas” (Morgan 1996). Mecanismos transcripcionales y postranscripcionales son los responsables de la regulación de los niveles de ciclina en la célula mediante su fosforilación, hasta ser degradadas rápidamente por el proteosoma en fases específicas del ciclo celular (Farías y Pardo 2005).

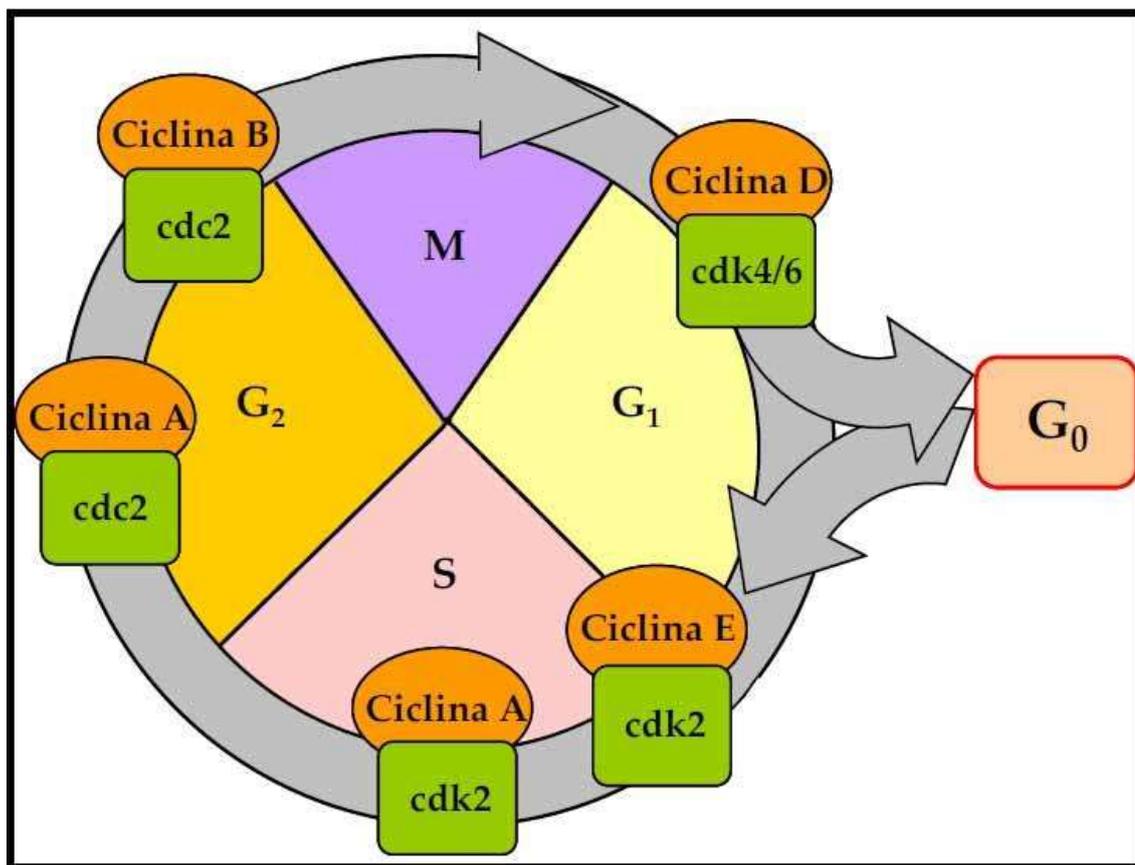


Figura 1. Complejos enzimáticos CDK/Ciclina. Regulan la progresión del ciclo en las diferentes fases y transiciones del ciclo celular.

Primer punto de control – transición G1/S

En presencia de una cantidad suficiente de sustratos, las células en G₁ con una masa crítica adecuada, inician la replicación y se preparan para la división subsiguiente; en levadura, cuando la célula se encuentra lista para entrar en el nuevo ciclo, el complejo CDC28/CLN3 dispara la transcripción de los genes CLN1 y CLN2 (se encuentran muy elevados en G₁), los que a su vez participan en la activación de genes específicos necesarios para la replicación del ADN. La unión de CLN1 y CLN2 con CDC28 permite la entrada y salida a G₀. CLN1 y CLN2 fosforilan y activan al factor de transcripción SBF; dicho factor es responsable de la activación de 235 genes durante la transición G₁/S (Farías y Pardo 2005, Horak et al. 2002).

Las CDKs presentes y encargadas de la regulación de la fase G₁, así como la transición G₁/S, pueden ser moduladas por reguladores negativos o inhibidores de las cinasas CDKs (CKIs). En levadura existen dos proteínas inhibitorias: Far1, que actúa sobre los

complejos CDC28/CLN2 y p40Sic1 sobre CDC28/CLN5 (Farías y Pardo 2005, Sherr y Roberts 1999).

Segundo punto de control – transición G2/M

Distintos controles (tiempo, biomasa, velocidad de crecimiento y terminación de la replicación del material genético) son considerados en este punto de control. El componente clave de esta fase en todos los eucariontes es el factor promotor de la mitosis, o MPF, formado por la subunidad catalítica p34^{cdc2} y su regulador positivo, la ciclina B (Uversax et al. 2003).

Una vez formado el factor promotor de la maduración (MPF), requiere ser fosforilado en el residuo de Tre161 por CAK. Sin embargo, para evitar una entrada prematura en mitosis, el complejo es mantenido en estado inactivo mediante su fosforilación en Tre14 por la cinasa Myt1 y en la Tir15, por la cinasa Wee1. Una vez verificada la completa y correcta replicación y la presencia de todos los componentes necesarios para la mitosis, el MPF es desfosforilado en Tre14 y Tir15 por la fosfatasa Cdc25, misma que requiere ser fosforilada por el MPF para ser activa, teniendo así lugar la mitosis. (Farías y Pardo 2005)

Puntos de control mitóticos

Una vez que la célula ha proseguido a través de G2/M entra en el ciclo mitótico, cuya progresión se controla por dos mecanismos postraduccionales: la fosforilación y la proteólisis de proteínas. De manera general, el ciclo mitótico puede ser definido por tres transiciones que involucran al factor MPF (CDK1/ciclina B). En la primera transición, la ciclina B en unión con cinasas Polo activan al MPF e inicia la profase; posteriormente MPF activa el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina, provocando la destrucción de la ciclina B y el inicio de la anafase; y finalmente esta maquinaria de destrucción de la ciclina B es apagada y el ciclo celular es reiniciado. (Farías y Pardo 2005)

2.2 - Expresión génica

Un gene no se traduce directamente a una proteína, se expresa mediante la producción de un ARN mensajero (RNAm, *Messenger RNA*), que es un ácido nucleico intermedio utilizado para sintetizar proteína.

El ARN mensajero se sintetiza por el mismo proceso de apareamiento complementario de bases utilizado para replicar ADN, con la importante diferencia de que corresponde

sólo a una cadena de ADN de doble hélice. La secuencia de ARNm es complementaria de la secuencia de una cadena de ADN y que es idéntica (excepto por el remplazo de T por U) a la otra cadena de ADN. El proceso por el cual un gene da lugar a una proteína se llama expresión génica (Lewin 2007).

La visión global del control de la expresión génica es especialmente difícil en eucariotas en general, y en organismos pluricelulares en particular. Es complicado entender el hecho de que las células de organismos complejos, procedentes del desarrollo de una misma célula (el cigoto) y conteniendo un ADN idéntico, sean capaces de expresar funciones tan diferentes y únicas en cada órgano o tejido particular (Luque y Herráez 2001).

Niveles de regulación de la expresión génica en eucariotes

La expresión de los genes de un organismo superior puede ser regulada a distintos niveles. Desde el punto de vista patológico, es importante resaltar que la alteración de cualquiera de los pasos implicados en la expresión génica puede causar enfermedades.

El control pre-transcripcional se refiere a la accesibilidad del ADN para llevar a cabo la transcripción y puede implicar procesos como la condensación de la cromatina así como la metilación del ADN.

El siguiente nivel de control es el proceso de transcripción que se regula a través de la frecuencia ò velocidad de inicio de la transcripción (que implica encontrar puntos de inicio accesibles, presencia de factores de transcripción, y la eficacia de los promotores), asimismo la velocidad de la elongación del RNA también puede ser regulada y finalmente la eficacia de terminación de la transcripción forma parte de este nivel de control. En la fase postranscripcional encontramos el procesamiento de RNA, que es regulado en los pasos de corte y empalme así como que puede ser propenso el RNA a modificaciones ò el proceso conocido como maduración alternativa. Lo anterior se entiende como el procesamiento del RNA también el transporte del RNA es un nivel de regulación, tal que, la selección de qué RNAs son transportados sea fundamental en los procesos de control, así como el posible transporte activo a través de los poros. Una vez que el RNA se ha sintetizado y fue transportado surge un nuevo nivel de control, que es la de degradación del RNA así como la estabilidad de RNA maduro.

En el proceso de la traducción o síntesis de proteínas es la frecuencia y/o velocidad de inicio de la traducción un nivel más de regulación, en esta etapa es donde se lleva a cabo la selección de qué RNAs son traducidos, y depende en gran medida de la eficacia de los complejos de iniciación. Otro momento donde es regulada la expresión génica es en la velocidad de elongación del polipéptido y la eficacia de terminación de la traducción. Una vez que las proteínas fueron sintetizadas hay un nuevo nivel de control que es en cuanto a las modificaciones postraduccionales y finalmente el control de actividad de las proteínas y su degradación (Luque y Herráez 2001).

Síntesis de proteínas en eucariontes

Uno de los mecanismos celulares que está estrechamente relacionado con el flujo de la información genética es la traducción. Este proceso permite que, en último término, la información almacenada en las moléculas de ADN, y a través de un intermediario de ARN, se traduzca a proteínas, produciendo así los componentes necesarios para realizar los distintos procesos celulares. (Lewin 2007)

La síntesis proteínica o traducción de los ARNm tiene lugar en los ribosomas. Los ribosomas son estructuras subcelulares donde se lleva a cabo la producción de proteínas dentro de las células. Los ribosomas eucariontes están formados por dos subunidades, la pequeña 40S integrada por alrededor de 33 proteínas ribosomales y el ARNr 18S, y la subunidad grande 60S que está compuesta de 49 proteínas ribosomales y de 3 ARNr (28S, 5S y 5.8S), que al acoplarse y formar el ribosoma funcional (80S) dejan entre ambas un conducto por el cual se desliza el ARNm. (Lewin 2007)

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteínicos que actúan en concierto con factores accesorios para “traducir” la información genética del ARNm a proteína. El proceso dinámico de la traducción del ARNm es usualmente dividido en tres fases: iniciación, elongación y terminación. En la fase de iniciación se ensambla el ribosoma con el ARN de transferencia iniciador. Posteriormente tiene lugar la fase de elongación, donde se forman los enlaces peptídicos en el centro catalítico del ribosoma y finaliza en la fase de terminación. (Mathews et al. 2007)

La fase de iniciación traduccional es el principal punto de control en la expresión génica relacionada a la síntesis de proteínas, regulando su velocidad. Dependiendo de su funcionalidad, estado o respuesta al estrés, la célula puede regular 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-ARN^{ti}Met), 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).

En la síntesis de proteínas intervienen un gran número de factores que van a coordinar varios pasos simultáneos uniéndose directa o indirectamente a alguna subunidad ribosomal, al primer ARN^t o al propio ARNm (Merrick 2003). Existen varios puntos de control traduccional, entre los que destacan: la regulación de la actividad por los factores de iniciación eIF2 y eIF4F (complejo formado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A). En el caso de eIF2, cinasas específicas lo fosforilan, excluyéndolo de la ruta de inicio de la síntesis de proteínas. Por otra parte, la regulación de eIF4F está determinada por la disponibilidad de la subunidad eIF4E, la cual tiene el potencial de unirse tanto a eIF4G como a la proteína de unión a eIF4E (4E-BP). La capacidad de 4E-BP de unirse a eIF4E es regulada por su estado de fosforilación y, en general, la fosforilación de 4E-BP inhibe su capacidad de unirse a eIF4E (Merrick 2003). En mamíferos, la cinasa Mnk1 fosforila el eIF4E, lo cual promueve su asociación con eIF4G.

Otra forma de regulación del inicio de la síntesis de proteínas, que es activada en condiciones de suficiencia nutricional y energética, y en presencia de mitógenos, es mediante las vías de señalización de las proteínas cinasas mTOR (proteína blanco de rapamicina de mamíferos) y S6K (cinasa de la proteína ribosomal S6), las cuales regulan los estados de fosforilación de las proteínas 4E-BPs y la proteína ribosomal S6, respectivamente. La proteína 4E-BP se une al eIF4E bloqueando su unión con el eIF4G; la fosforilación de esta proteína promueve su disociación del eIF4E, permitiendo que se una al eIF4G (Merrick 2003, Holz et al. 2005).

El factor de iniciación 3 (eIF3) que se encuentra formando parte del complejo de iniciación 43S, es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas (Hall et al. 2004). eIF3 sirve como andamio entre el ARNm y la subunidad ripo-

somal 40S interactuando físicamente con eIF4F (Pestova et al. 2002). Una vez que se ha colocado el complejo de inicio 43S sobre el ARNm, se desliza sobre el transcrito en busca del codón de inicio de la traducción y al encontrarlo se coloca el primer ARNt sobre éste.

El factor de iniciación 5 (eIF5) unido a la subunidad ribosomal 40S hidroliza el GTP unido a eIF2, de tal manera que se estimula la disociación del complejo de preiniciación 43S, liberando al eIF2-GDP y al eIF3. El factor de iniciación 1 (eIF1) y eIF1A actúan sinérgicamente mediando el ensamblaje del ARNt en el codón de inicio (Korneeva et al. 2000). Una vez liberado el factor eIF3, se une la subunidad ribosomal mayor 60S a la subunidad ribosomal menor 40S, formándose el ribosoma funcional 80S y continuando con la elongación de la cadena peptídica.

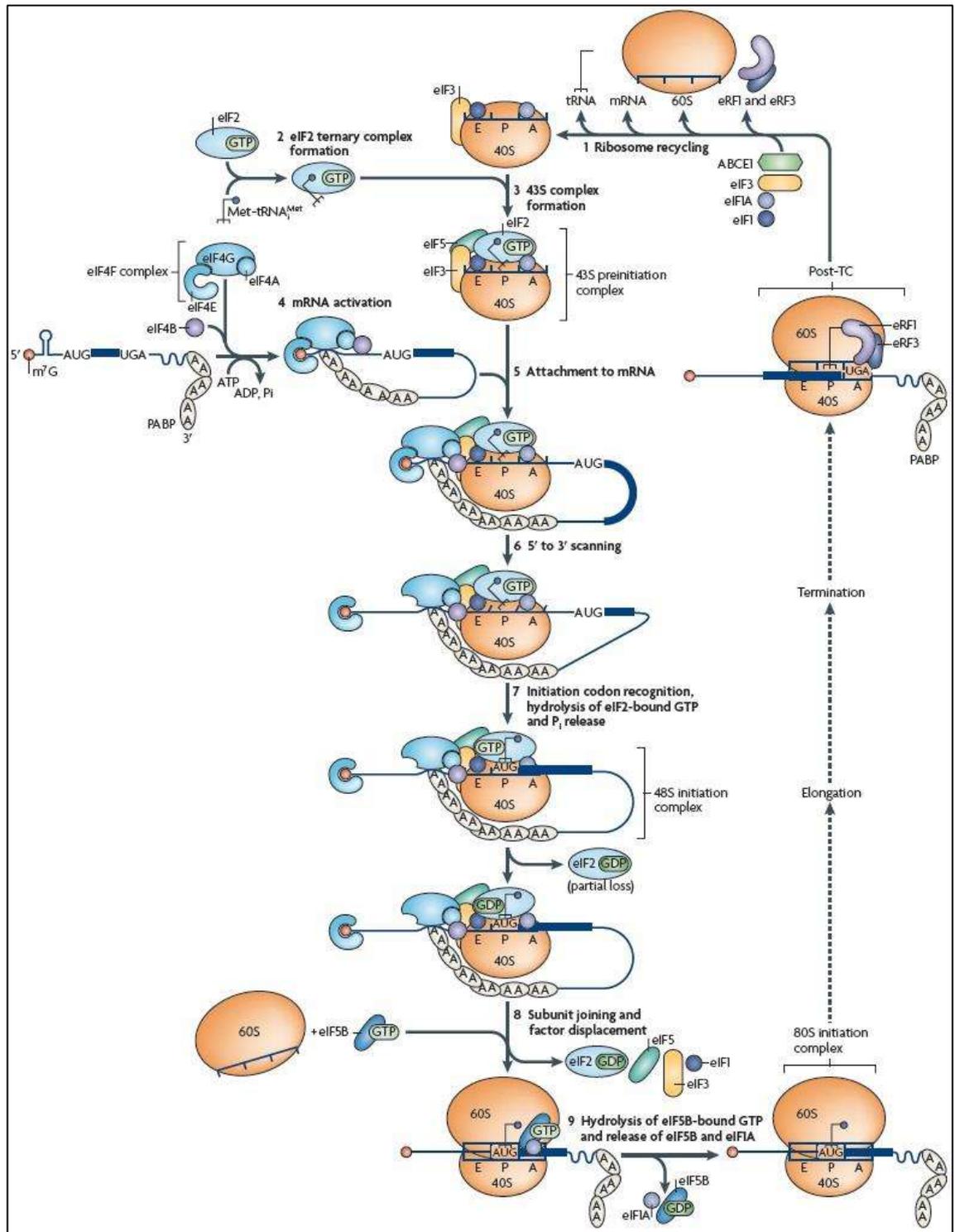


Figura 2. Proceso de traducción o síntesis de proteínas en eucariotes. (Jackson et al. 2010)

Modificaciones postraduccionales.

La síntesis proteínica no termina con la liberación del polipéptido del complejo de traducción, sino que en todos los organismos se requiere una serie de procesos para que el

mensaje lineal o unidimensional del polipéptido (secuencia de aminoácidos determinada por la secuencia de nucleótidos del ARNm) se transforme en un mensaje tridimensional, la estructura nativa de la proteína responsable de su función (Luque y Herráez 2001).

Estos procesos recogidos de forma conjunta bajo el termino **maduración o modificación postraduccional**, constituyen el colofón de la síntesis proteínica, que a veces se considera la quinta fase de la traducción, después de la activación del aminoácido, iniciación, elongación y terminación.

La maduración postraduccional es esencial en todo momento y circunstancia de la célula eucariótica. Cada compartimento subcelular requiere proteínas diferentes para sus variadas funciones: actividad catalítica de reacciones en todas las vías metabólicas, papel estructural en la membrana celular, transporte o almacén de moléculas e iones, función motora muscular, transmisión de señales intra- e inter celular, regulación de la expresión génica, etc.

La variabilidad en cuanto a condiciones y circunstancias particulares en cada tipo celular y la amplitud y complejidad de los procesos implicados en la modificación postraduccional hacen difícil su descripción. Los tres primeros procesos tienen lugar generalmente de forma simultánea.

1. Tráfico o destino de las proteínas hacia diferentes localizaciones, subcelulares o extracelulares para llevar a cabo su función.
2. Maduración o procesamiento del polipéptido. Es el aspecto esencial de la modificación postraduccional. Comprende modificaciones químicas de los aminoácidos o eliminación de fragmentos del polipéptido.
3. Plegamiento correcto del polipéptido hasta alcanzar su conformación biológica activa. Requiere, en muchos casos, una maduración previa por modificación química, con lo que el plegamiento y maduración están íntimamente ligados.
4. Es entonces, una vez que la proteína ha llegado a su destino y cumplido su misión, cuando se debe describir también su catabolismo, su degradación hasta aminoácidos.

Fosforilación

Es frecuente la adición de determinados grupos químicos (como acetilo, carboxilo, fosfato, hidroxilo o metilo) a la cadena lateral de aminoácidos o a los extremos amino- o

carboxilo- terminales. La fosforilación es quizás la modificación más frecuente, actuando casi siempre de forma reversible (fosforilación-desfosforilación) como un mecanismo regulador de la actividad de la proteína (regulación por modificación covalente). Afecta el grupo –OH de Ser, Thr y Tyr, estando catalizada por proteína quinasa, con hidrolisis de ATP. Produce un incremento notable en la carga negativa de la proteína. La reacción opuesta, de desfosforilación, la catalizan proteínas fosfatasa. En ambos casos, se trata de una reacción estrictamente postraduccional, que tiene lugar en el citosol después de que se ha completado la síntesis y el plegamiento de la proteína (Luque y Herráez 2001).

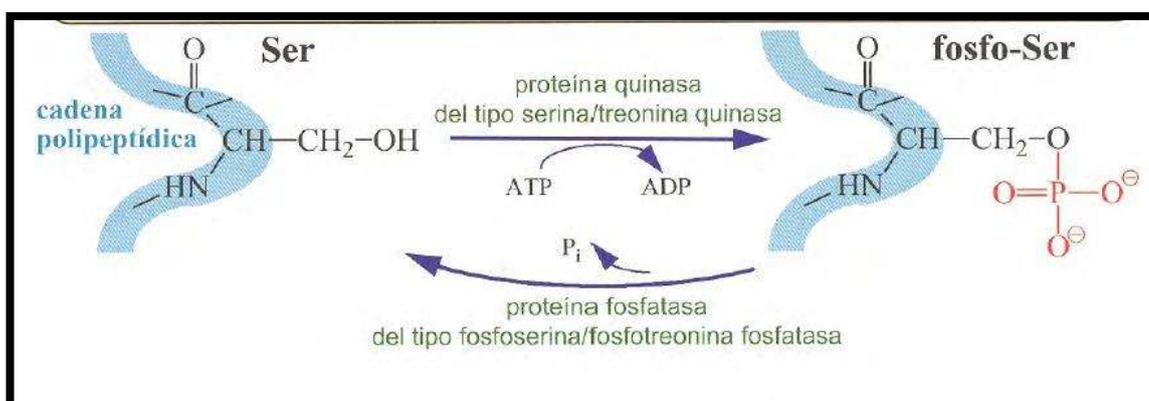


Figura 3. Esquema de fosforilación del un aminoácido por la proteína serina/treonina quinasa, donde se cataliza la unión covalente del γ -fosfato al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de los residuos serina/treonina del sustrato. (Luque y Herráez 2001).

2.3 - Características del complejo eIF3

El factor de iniciación 3 (eIF3) es un complejo proteínico con una masa aproximada a los 700 kDa que se encuentra formando 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, desde 28 hasta 170 kDa. En el año 2001, para eliminar la confusión entre la comparación de las subunidades de eIF3 entre las diferentes especies, una nomenclatura unificada fue propuesta por Browning y colaboradores (Browning et al. 2001). Las subunidades del complejo son denominadas desde entonces 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) (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 ha sido purificado en diversas especies eucariontes, entre los que se incluyen mamíferos, plantas y levaduras, de los cuales se han obtenido distintos números de subunidades dependiendo del organismo de donde se extrajo. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* el eIF3 consta de 5 subunidades; eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i. Se propone que estas cinco subunidades, que están conservadas en todas las especies eucariontes, forman el corazón catalítico y que el resto tiene 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 solo tres de estas cinco subunidades (eIF3a, b, c) y tres subunidades no conservadas (eIF3e, f, 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.

2.4 - eIF3f

El gene 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 la proteína de asociarse a complejos multiproteínicos, 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.

El gene eIF3f es un gene antiguo y monogénico en la mayoría de las especies, y su organización génica varía. Por ejemplo, el gene eIF3f de levadura de fisión no contiene intrones, en nemátodos lo conforman 4 exones, el de insectos contiene 3 exones, el de plantas 6 exones y en mamíferos está organizado en 8 exones distribuidos en aproximadamente 9 kilobases (Hernández 2005).

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteínica (Higareda et al. 2003, Shi et al. 2006), por lo que se considera un modulador del proceso. Formando parte de eIF3,

eIF3f es capaz de interactuar con proteínas diferentes a las de este complejo multiproteínico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la cinasa ribosomal S6K1 interactúa con eIF3f a través del dominio MPN. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la cinasa mTOR interacciona con eIF3f a través del dominio señalizador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés) y mTOR fosforila a 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 se le encuentra también interactuando establemente con proteínas involucradas con procesos diferentes a los del complejo eIF3 y la síntesis proteínica. Por ejemplo, recientemente se reportó que eIF3f se relaciona físicamente con la proteína TRC8, que es una ubiquitin-E3 ligasa, la cual sensa los niveles exógenos de colesterol y se localiza en el retículo endoplásmico (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 suyo rico en residuos de leucina, con el dominio MPN de eIF3f. El dominio MPN de eIF3f humano abarca del aminoácido 90 hasta el 248; sin embargo, posee un dominio en sus primeros 90 aminoácidos con un contenido de aminoácidos peculiar, con un 60% de prolinas y alaninas (dominio poly PA). Aunque aún se desconoce su función, se sabe que este dominio interactúa con la proteína cinasa relacionada a la apoptosis Cdk11p46 y ésta con la proteína 9G8, perteneciente a la familia de proteínas ricas en serina y arginina (proteínas SR) que agrupa factores de corte y empalme durante la edición del extremo 3' del pre-ARNm del virus HIV, impidiendo su procesamiento (Valente et al. 2009). En este sentido, un reporte previo indica que en células de melanoma humano A375 en estado apoptótico, la Cdk11p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio polyPA (Shi et al. 2006). Por otro lado, existe evidencia de que el sobreexpresar al gene 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. Se ha descrito que eIF3f se poliubiquitina y se degrada a través del proteosoma 26S (Lagirand-Cantaloube et al. 2008). Así también, se fortalece la posibilidad de que la función o funciones del gene eIF3f estén relacionadas al crecimiento y la división celular debido a que en células de tabaco TBY-2 la expresión transcripcional del gene eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular (Higareda et al. 2003, Llanderal-Mendoza 2003) y en células humanas A549 la expresión transcripcional y traduccional

del gene eIF3f están circunscritas a las transiciones G2/M y G1/S del ciclo celular (Higareda y Pardo 2010).

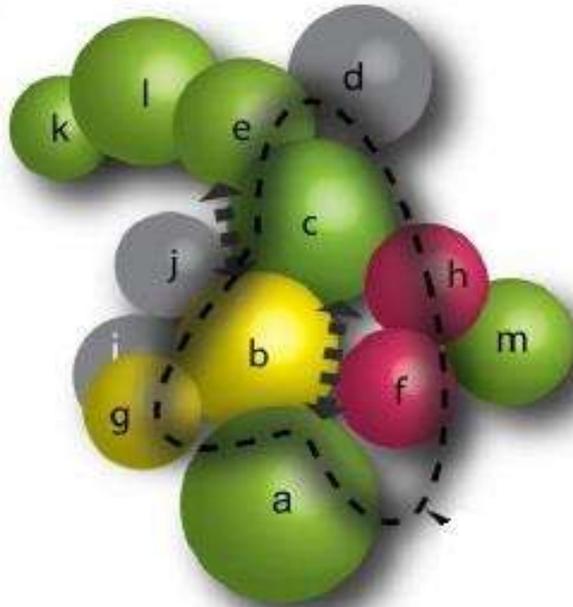


Figura 4. Propuesta del modelo de eIF3f por Zhou en 2008. Se muestra la forma en la que se organizan las subunidades, coloreadas de acuerdo a los dominios que contiene. Dominios PCI (verdes), dominios MPN (rojo), que contienen motivos de reconocimiento de RNA (amarillo).

2.5 - Pregunta de investigación

¿Es eIF3f fosforilada por Cdk1/ciclina B?

Capítulo III - Justificación

Sabemos que eIF3f es una proteína poli-funcional, moduladora de la síntesis de proteínas y esencial para la proliferación celular. Dado que su perfil de expresión bifásico es único, con uno de sus máximos de expresión en la transición G2/M, donde el complejo Cdk 1/ciclina B actúa, es de suma importancia conocer si dicho complejo fosforila a eIF3f, ya que se desconoce su actividad con respecto a las modificaciones postraduccionales que adquiere.

Capítulo IV - Hipótesis

- ◆ La actividad de eIF3f es modulada por el complejo Cdk1/CycB durante la transición G2/M del ciclo celular.

Capítulo V - Objetivo General

- ◆ Identificar los sitios involucrados en la fosforilación de eIF3f por complejos Cdk1/CycB.

Capítulo VI - Objetivos Particulares

- ◆ Determinar si eIF3f es fosforilado por el complejo Cdk1/CycB.
- ◆ Mediante la generación de mutaciones puntuales en sitios putativos involucrados en la fosforilación por el complejo Cdk1/CycB, determinar si eIF3f es afectada en la capacidad de ser fosforilada.

Capítulo VII - Materiales y métodos.

7.1 - Estrategia experimental general.

Para poder determinar si eIF3f es fosforilado por el complejo CDK1 / ciclina B y en qué sitios son llevadas a cabo estas modificaciones se desarrolló la siguiente estrategia experimental: Primero, para poder saber qué sitios de eIF3f son susceptibles a ser fosforilados se realizó un análisis bioinformático con diferentes herramientas que se encuentran disponibles “en línea” en Internet y posteriormente se diseñaron oligonucleótidos para generar mutaciones puntuales en la secuencia del gene de eIF3f con el fin último de cambiar el codón que codifica a un aminoácido que puede ser fosforilado por otro que no lo sea. Una vez diseñados estos oligonucleótidos, se generaron los plásmidos con la mutación dirigida, se purificó y se verificó por secuenciación; posteriormente, se sintetizó la proteína mediante un ensayo de transcripción y traducción acopladas. Las distintas proteínas con las diversas mutaciones se utilizaron para hacer el ensayo de fosforilación con ATP marcado radiactivamente (fosforo- γ^{32}) y luego se expuso a una placa sensible a radiación para determinar los resultados.

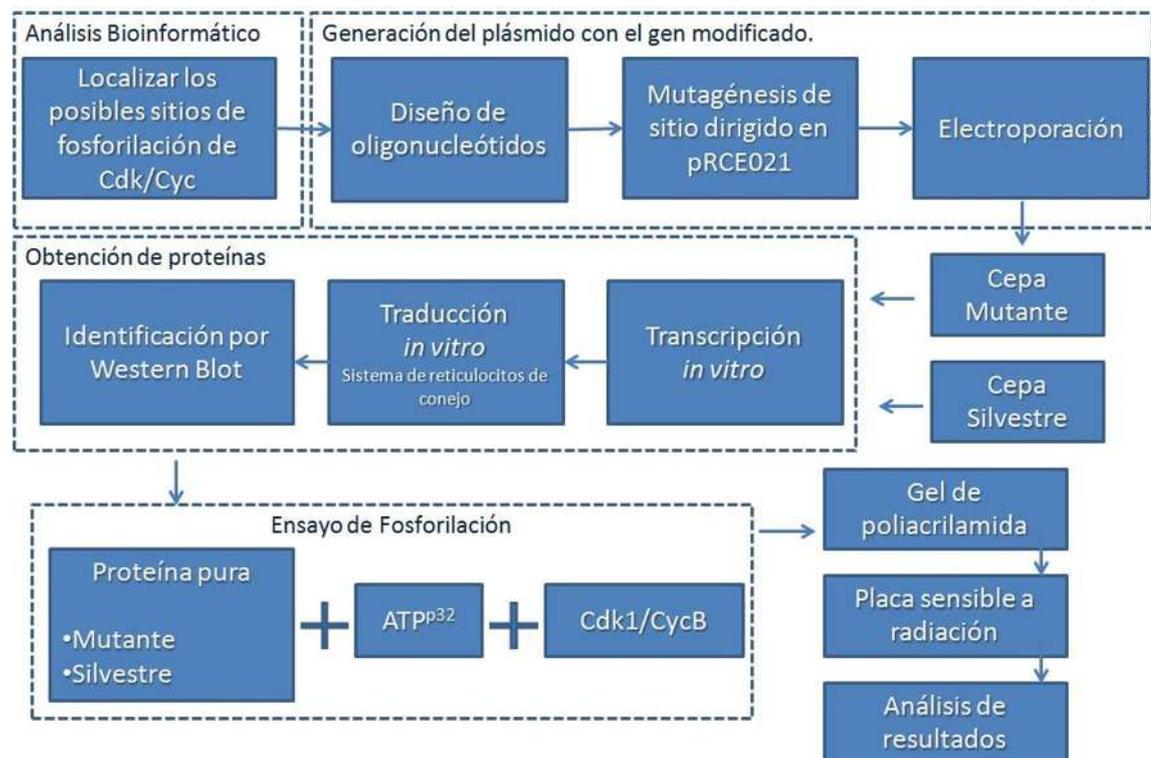


Figura 5. Estrategia Experimental General.

7.2 - Material

Cepas y plásmidos

Como cepas receptoras se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* JM101 y DH5 α .

Para la sobreexpresión en *E. coli* se utilizó el vehículo pBluescript SK, al cual en trabajos previos se le insertó la secuencia codificante del gene de eIF3f del cromosoma 11, a dicha construcción se le denominó pRCE021 (Figura 6).

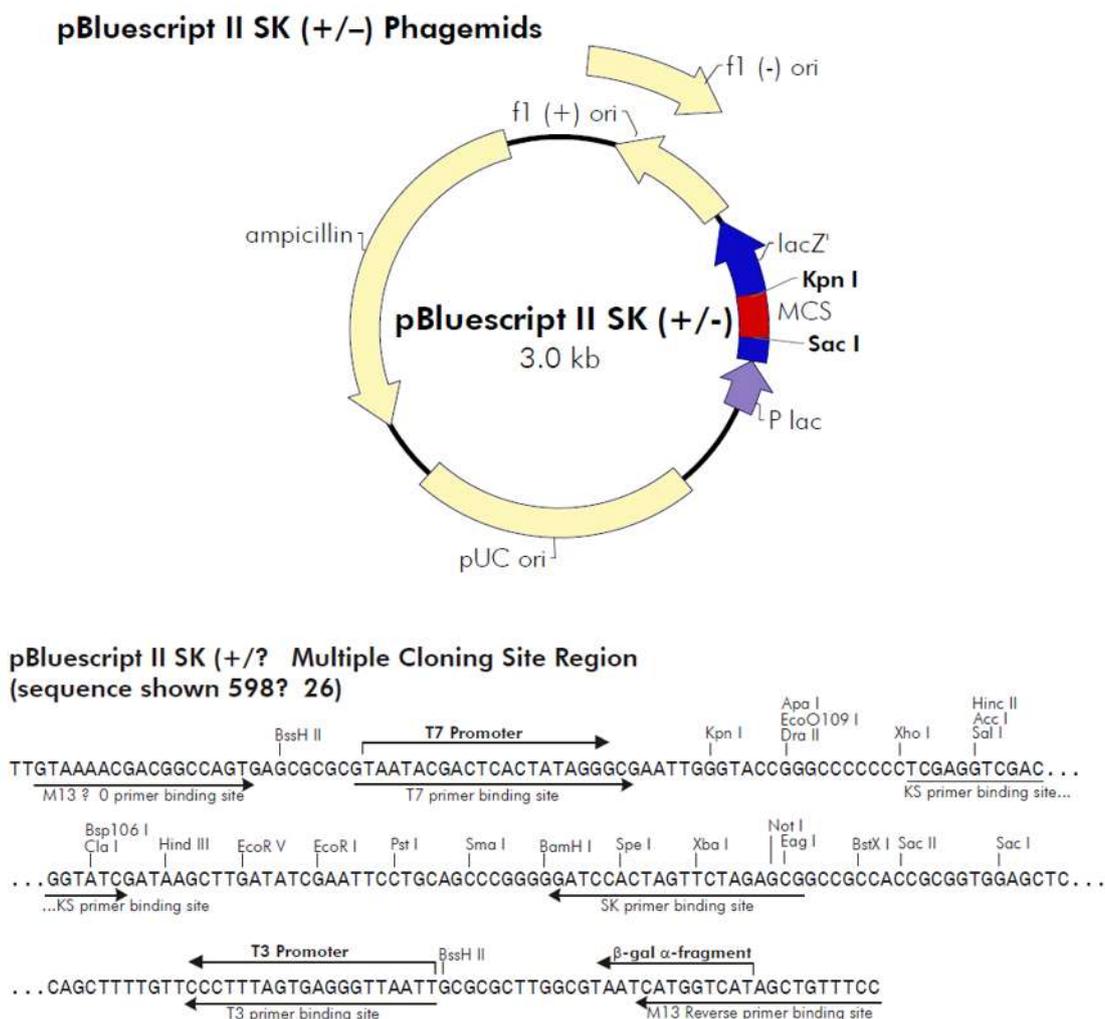


Figura 6. pBluescrip II SK (+) Stratagene Cat. No. 212205 Plásmido al cual se le insertó una copia del cDNA del gene de eIF3f bajo el promotor T3.

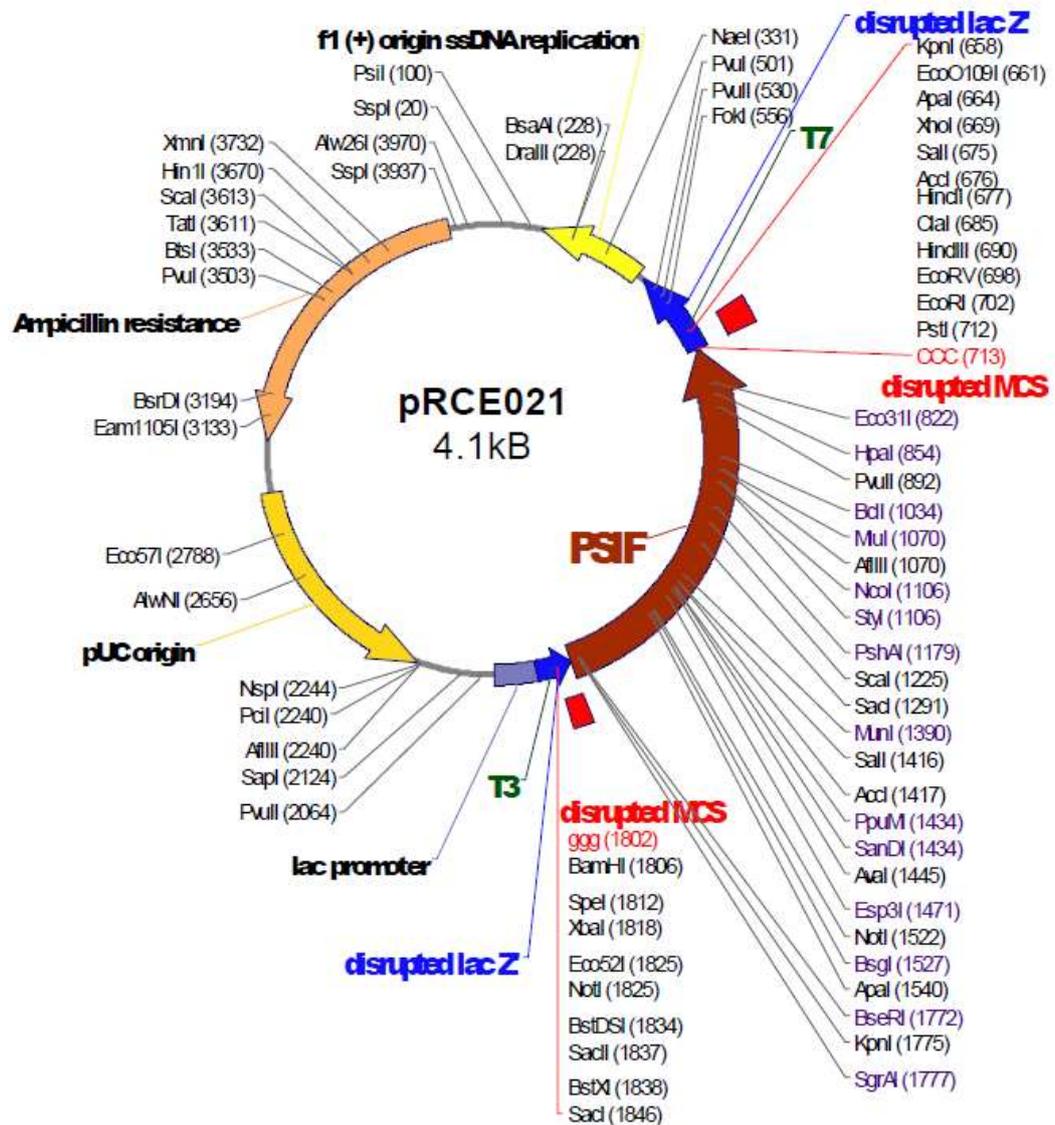


Figura 7. pRCE021 plásmido que contiene una copia del cDNA del gene de eIF3f de humano del cromosoma 11 bajo el promotor T3. f1(+), origen de replicación de fago filamentoso; ColE1, origen de replicación en *E. coli*; gene de LacZ; MCS, sitio de clonación múltiple y un gene de resistencia a ampicilina (Higareda, Pardo 2010).

Medio de crecimiento para *E. coli*

El medio de cultivo LB (Luria Bertani) fue utilizado para crecer las cepas de *E. coli* (Sambrook y Russell 2001). Para su preparación se disuelven 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio en ≈ 900 mL de agua desionizada; se afora la solución a 1 L y se esteriliza por 15 min a 120° C en autoclave. Para obtener medio sólido se adicionan 15 g/L de agar antes de aforar y esterilizar.

Como antibiótico de selección de las cepas transformantes se empleó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL para el medio sólido y de 50 µg/mL para el medio líquido a partir de una solución stock a 100 mg/mL.

7.3 - Análisis Bioinformático.

Mediante un análisis bioinformático se determinó cuáles aminoácidos de eIF3f son susceptibles a ser fosforilados por el complejo CDK1 / ciclina B.

La secuencia de aminoácidos de una proteína, también llamada estructura primaria, puede ser determinada fácilmente desde la secuencia de nucleótidos del gene que la codifica. En la inmensa mayoría de los casos, esta estructura primaria determina únicamente una estructura de la proteína en su ambiente nativo. El conocimiento de esta estructura es vital para entender la función de la proteína (Hegyi, Gerstein. 1999). Una solución general viable para la predicción de las estructuras de las proteínas permanece todavía como un problema abierto. Por ahora, la mayoría de los esfuerzos han sido dirigidos hacia heurísticas que funcionan la mayoría de las veces (Moult 2005). Una de las ideas clave en bioinformática es la noción de homología. En la rama genómica de la bioinformática, se usa la homología para predecir la función de un gen: si la secuencia del gene A, cuya función es conocida, es homóloga a la secuencia del gene B, cuya función es desconocida, puede inferirse que B podría compartir la función de A (Pellegrini et al 1999). En la rama estructural de la bioinformática, la homología se usa para determinar que partes de una proteína son importantes en la formación de la estructura y en la interacción con otras proteínas.

Herramientas utilizadas para la predicción de sitios.

Se utilizaron las herramientas de la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) para obtener la secuencia de la proteína, así como diversos programas “en línea” para analizar secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, es decir, a nivel de cadena de ADN como estructura peptídica. Dichos programas son ExPASy y ELM, entre otros. Analizando estas estructuras se determinaron los sitios posibles a ser fosforilados por el complejo CDK1 / ciclina B para, entonces, determinar sobre qué nucleótido se realiza la mutagénesis sitio dirigida.

7.4 - Mutagénesis de sitio dirigido.

La mutagénesis de sitio dirigido es una técnica de biología molecular utilizada para crear mutaciones puntuales en una cadena de ADN por medio de una reacción de la cadena de la polimerasa con oligonucleótidos que contengan la mutación. El cebador debe hibridar con la molécula simple (unicatenaria) de ADN que contiene el gene de interés. Utilizando una ADN polimerasa, se elonga la cadena (el fragmento unicitenario más el cebador) incorporando la mutación al ADN y formando una molécula de ADN completa bicatenaria. Dicha doble cadena de ADN puede ser introducida en una célula hospedadora y clonada.

Diseño de la mutación puntual.

El proceso conocido como traducción o síntesis de proteínas es posible gracias a que la maquinaria de traducción tiene la propiedad de reconocer las secuencias de ARN en forma de codones, los codones son un conjunto de tres nucleótidos consecutivos en la estructura de la cadena, que pueden tener a cualquiera de los cuatro nucleótidos (A, T, C, G para el ADN ó A, U, C, G para el ARN) y en cualquier orden. Es así que la cantidad de codones posibles es 64, que codifican para 20 aminoácidos. Ya se conoce con precisión a que aminoácido codifica cada codón, y esta información en el área de la biología le es comúnmente llamado código genético. Conociendo el código genético es que se puede elaborar una estrategia de mutación. A partir del codón que codifica para el aminoácido en estudio se puede realizar *a priori* un modelo de la secuencia donde se cambien las bases (regularmente una base) de tal manera que el codón generado codifique a otro aminoácido con distintas propiedades que al aminoácido en estudio, y haciendo el análisis de las diferencias encontradas, determinar la posible relevancia del aminoácido.

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } SER UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } UGG } Trp	U C A G
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thy ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G

Figura 8. Código genético, los diferentes codones codifican para un aminoácido diferente.

Diseño de oligonucleótidos.

En base al código genético, se modificaron los codones que codifican para los aminoácidos que son susceptibles a ser fosforilados, por codones que codifican a otros aminoácidos que no sean capaces de fosforilarse; por ejemplo, los codones que codifican para el aminoácido serina son: UCU, UCC, UCA, UCG, AGU y AGC a los cuales si se les cambia cualquiera de las tres bases que componen el codón y se genera un codón diferente a los mencionados se puede obtener un aminoácido que no sea capaz de fosforilarse. De esta manera

Ensayo de PCR.

Con cada par de los oligonucleótidos diseñados, se genera un plásmido mutante a partir del plásmido pRCE021, el cual es una construcción que procede del vehículo pBluescript que contiene: la secuencia codificante del gene de eIF3f flanqueada por sitios promotores para las ARN polimerasas T3 y T7, al gene de resistencia a ampicilina, etc. La

reacción se lleva a cabo con la polimerasa de ADN Pfx (Invitrogen) en las siguientes condiciones.

	Temperatura	Tiempo
	94 °C	4 minutos
30 ciclos	94 °C	20 segundos
	55 °C	40 segundos
	72 °C	4 minutos
	72 °C	7 minutos

Tabla 1. Condiciones iniciales; ciclos de la PCR.

Plásmido pRCE021.

Se utilizó como templatado para las mutagénesis el plásmido pCRE021 Figura 7 (ver página 21) el cual fue construido en un trabajo previo (Higareda, Pardo 2010). El plásmido contiene la secuencia de nucleótidos que codifican para una proteína funcional de eIF3f, secuencia de ADNc que fue obtenida por medio de una transcriptasa reversa a partir de ARNm y que posteriormente fue insertado en el plásmido comercial pBluescript SK+ (Stratagene Cat. No. 212205) en el sitio de corte para la enzima de restricción SmaI. Esta construcción contiene a la secuencia codificante de la proteína eIF3f bajo el promotor de fagos T3 y que es flanqueada por el extremo 3' por la secuencia del promotor T7, que servirá para hacer el ensayo de secuenciación; además, contiene al gene de resistencia AMP, que codifica para β -galactosidasa y un origene de replicación, entre otras características.

Electroforesis en gel de agarosa

Las distintas muestras de ADN aislado fueron analizadas por electroforesis, utilizando agarosa al 1% disuelta por calor en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 6.8). Una vez tibia la solución se agregaron 5 μ L de bromuro de etidio (0.05 μ g/mL), se vació en una camilla del tamaño requerido y se le colocó un peine. Al concluir la polimerización del gel se retiró el peine, se pasó a una cámara de electroforesis y se llenó ésta con amortiguador TAE 1X.

A las muestras a correr se les agregó colorante de carga 6X (1 μ L/5 μ L de muestra), el cual contiene 40% de sacarosa, 0.25 g de azul de bromofenol y 0.25 g de xilencianol en 10 μ L de agua desionizada estéril. Una vez colocada la muestra con colorante en el contenedor formado por el peine, se realizó el corrimiento a 80 voltios y, finalmente, se examinó colocando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. Para las muestras de ADN que posteriormente serían purificadas del gel, se realizó un gel de agarosa al 0.8% y se utilizó una voltaje de 70 voltios. Posteriormente, el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 1 min.

Extracción de ADN por técnica de Fenol Cloroformo.

Se mide el volumen de la muestra y se coloca en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL (en caso de que sea muy poca la muestra es necesario agregar agua tri-destilada estéril con el fin de que en los pasos posteriores se puedan separar fácilmente las fases); se agrega un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:24:1. Se agita vigorosamente en Vórtex durante 30 segundos y se centrifuga a velocidad máxima (16,000 g) durante cinco minutos. En este paso se observan en el tubo eppendorf dos fases, se toma con una punta de 200 μ L la fase acuosa y se coloca en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL; se mide el volumen y se agrega un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se agita vigorosamente en Vórtex durante 30 segundos y se centrifuga a velocidad máxima durante cinco minutos. Nuevamente se observan dos fases en el tubo eppendorf, se extrae la fase acuosa y se coloca en un nuevo tubo; se mide el volumen y se agrega 0.1 volumen de una solución de acetato de sodio 3 M con el propósito de que la solución final quede a 0.3 M de acetato de sodio. Se mezcla ligeramente invirtiendo el tubo eppendorf. Se agrega 2.5 volumen de etanol absoluto y se centrifuga ligeramente por 10 segundos. Se coloca a -20° C durante 14 horas. Pasado ese tiempo, se centrifuga a velocidad máxima durante seis minutos, en este paso es posible que se pueda observar una pastilla con los ácidos nucleicos; se extrae con una jeringa el alcohol, teniendo cuidado de no tomar la pastilla; se agrega el mismo volumen de alcohol etílico 70%, se mezcla ligeramente, se centrifuga por cinco minutos y se vuelve a retirar el alcohol con una jeringa; y se coloca el tubo con la pastilla en la campana de extracción durante diez minutos con el fin de que la pastilla quede libre de alcohol. Finalmente, se agrega agua y se agita vigorosamente con el fin de disolver la pastilla.

Ensayo de digestión de los plásmidos no mutados con la enzima Dpn I.

Una vez amplificados los plásmidos provenientes de pRCE021, es necesario separar los plásmidos que han sido sintetizados de los plásmidos originales, se utilizó la enzima de restricción Dpn I la cual tiene la capacidad de cortar en aquellas cadenas de ADN que tiene sitios con metilaciones ($5^{\text{G}}\text{A}/\text{TC}^{\text{3}}$), que son aquellos que se sintetizaron por replicación en la bacteria *E. coli* y no por síntesis en el ensayo de PCR. La reacción de digestión se realiza durante 3 horas a 37°C.

Limpieza con kit minElute de Quiagen.

Posterior a la digestión con la enzima Dpn I, el plásmido sintetizado se limpia siguiendo las indicaciones del proveedor: se añaden 300 µL de Buffer ERC a la muestra y se mezcla con la punta para micropipeta, se coloca la mezcla en una columna MinElute, se centrifuga a velocidad máxima durante un minuto, y se descarta la solución que quedó en el fondo del tubo recolector. Se añaden 750 µL de Buffer PE a la columna minELute y se centrifuga por un minuto, nuevamente se descarta la solución que quedó en el fondo del tubo recolector y centrifuga una vez más por un minuto para quitar el etanol residual del Buffer PE. Se desecha el tubo recolector y la columna se pasa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL sin tapa. Para eluir el ADN se añaden 10 µL de agua tridestilada estéril (agregar con punta en el centro de la columna pero sin tocarla); una vez hecho esto, esperar un minuto a que la columna se impregne bien y, posteriormente, se centrifuga por un minuto a velocidad máxima; finalmente se pasa la solución que quedó en el fondo del tubo eppendorf a un nuevo tubo debidamente rotulado.

7.5 - Transformación Bacteriana

En biología molecular, transformación es la alteración genética de una bacteria resultante de la absorción directa, incorporación y expresión del material genético exógeno (ADN exógeno). La transformación ocurre de forma natural en algunas especies de bacterias, aunque también se puede efectuar por medios artificiales. La transformación es uno de los tres procesos por los que el material genético exógeno se puede introducir en una célula bacteriana. Los otros dos son la conjugación y la transducción. A la transformación de células eucariotas se le llama transfección.

El término transformación es también usado, de manera más general, para describir mecanismos de transferencia de ADN o ARN en biología molecular.

Transformación por Electroporación.

Para introducir el plásmido con la mutación deseada en las células de *E. coli* (DH5 α y JM101) es necesario generar células electro-competentes, para ello las células son tratadas con glicerol al 10%. Para la electroporación se toman 100 μ L de células al 10% de glicerol con <1 μ L del plásmido (<50 ng/ μ L), se someten a una descarga de 2000 volts en el electroporador y se incuban por una hora en un mL de medio LB; posteriormente, se distribuye en medio LB Agar con 100 μ g/ μ L de ampicilina, y se incuban a 37°C por 24 horas. De esta manera se seleccionan las bacterias que contienen el plásmido pRCE021 ya que les confiere resistencia a ampicilina.

Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *E. coli* de las cepas JM101 y DH5 α que permiten la transformación por electroporación se obtuvieron mediante el siguiente protocolo. Se sembró un inóculo de la cepa en medio LB sólido y se incubó a 37°C durante 12 hrs. De este cultivo se tomó una asada en 5 mL de medio LB líquido, dando las mismas condiciones de incubación. Posteriormente, el cultivo obtenido se vació en 1 L de medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 600 nm. Obtenida la densidad, el cultivo fue vaciado en 4 botellas para centrifuga de 250 mL y se centrifugó 15 min/ 4000 rpm / 4°C. El sobrenadante obtenido fue desechado y la pastilla se resuspendió en agua desionizada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente 15 min/ 4000 rpm / 4°C, y la pastilla de sólo dos botellas se resuspendió con agua desionizada estéril y fría pasándolo, posteriormente, a las dos botellas restantes. Se repitió el ciclo de centrifugación y la pastilla obtenida se resuspendió en 3 mL de glicerol al 10%. De la mezcla se tomaron alícuotas de 80 μ L en tubos eppendorf y se guardaron a -80°C (modificado de Sambrook y Russell 2001). Todo el experimento se realizó bajo condiciones estériles y manteniendo las células a 4°C.

Procedimiento de electroporación

Una vez limpia la muestra de ADN, se utilizan 2 μ L que se agregan a las células electrocompetentes DH5 α ó JM101, se deja reposar por 45 segundos en hielo, y se colocan las células en celdas para electroporador con cuidado de no generar burbujas de aire. La electroporación se lleva a cabo con una descarga de 2000 volts y posteriormente se recuperan las células en medio LB sin ampicilina con agitación moderada (150 rpm), durante una hora. Se añaden 200 μ L del medio LB a una caja con medio LB Agar; el resto

se centrifuga por 30 s, se desecha el sobrenadante, se resuspende en 200 μ L de medio LB hasta que quede homogéneo, y finalmente se agregan a una caja de medio LB.

Transformación por Golpe Térmico.

Las bacterias hospederas son pre-tratadas con agentes que aumentan su permeabilidad membranal, como es el aumento de la temperatura. Los iones como el Ca^{2+} , disminuyen la repulsión de cargas eléctricas entre los nucleótidos y la membrana, facilitando la entrada del plásmido al interior de la célula.

Preparación de células para transformación por Golpe Térmico.

Se tomó una azada de la cepa DH5 α de E. coli, se distribuyó en medio LB agar y se incubó toda la noche a 37°C. Se seleccionó una colonia joven (que tuviera un diámetro menor al resto) y se inoculó en 2 mL de medio LB para incubarlo toda la noche a 37°C en agitación a 150 rpm; al día siguiente, el cultivo se inoculó en un matraz de un litro con 200 mL de medio LB y se mantuvo a 37°C con agitación de 150 rpm el tiempo necesario (\approx 2.5 h) para alcanzar una $A_{620} = 0.35-0.40$. Una vez alcanzado el crecimiento necesario, se incubó 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 4,600 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 mL de solución Tfb1 (Cloruro de Potasio 100 mM, Cloruro de Manganeso 50 mM, Acetato de Potasio 30 mM, Cloruro de Calcio 10 mM, Glicerol al 15%, pH a 5.8) estéril a 4°C. Se incubó 20 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min a 4°C; se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 mL de solución Tfb2 (Cloruro de Calcio 100mM, MOPS 75mM, Cloruro de Potasio 10mM, Glicerol al 15%, pH a 6.5) estéril fría, y se distribuyó en alícuotas de 100 μ L en tubos eppendorf de 1.5 mL. Finalmente se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Procedimiento de golpe térmico

Sacar las células del ultracongelador y colocarlas inmediatamente en hielo, esperar 5 min para que se descongelen, agregar entre 5 y 10 μ L del producto de la digestión limpio (plásmido de interés), mezclar suavemente y esperar 15 min incubando las células en hielo. Transcurrido ese tiempo, colocar los tubos eppendorf en el termobañó (previamente puesto a 42°C) durante 45 s, e inmediatamente después colocar los tubos a 0°C

(agua con hielo) por un tiempo mínimo de 3 min; posteriormente, en campana de flujo laminar adicionar 900 µL de medio LB al tubo eppendorf, mezclar suavemente con la punta y pasar todo el contenido a un tubo de ensaye, para incubar a 37°C durante una hora. Se añaden 200 µl del producto de la incubación a una caja con medio LB agar; el resto se centrifuga por 30 s, se desecha el sobrenadante, se resuspende en 200 µL de medio LB hasta que quede homogéneo, y finalmente se agregan a una caja con medio LB.

7.6 - Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina (MINI-prep)

La purificación se lleva a cabo por la técnica llamada miniprep, la cual consiste en romper las células con choque alcalino de manera que sólo permeé el ADN plasmídico. Para ello, se toma un volumen (5 mL) de un cultivo crecido en medio LB líquido con el antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/mL) y se centrifuga por 30 s a 13,000 rpm. Después, se resuspende la pastilla que se haya formado y se expone la suspensión a una solución de resuspensión (5 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris·HCl pH 8, RNasa 40 µg/mL) a 4°C. Se agita suavemente en Vórtex y se adicionan 300 µl de una solución fresca de lisis (0.2 N de NaOH y 1% de SDS), mezclando por inversión el tubo y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente. Esta solución solubiliza en parte la membrana externa de las bacterias, lo que produce la liberación del contenido celular de éstas: ADN cromosómico y plasmídico desnaturalizados, ARN y proteínas. Transcurrido el tiempo, se agregan 300 µL de solución neutralizante (60 mL de una solución de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua desionizada), dejando en hielo por 10 min lo cual neutraliza todo el debris celular y provoca la rápida renaturalización del ADN plasmídico, que queda en suspensión, mientras que el cromosómico y el resto de componentes celulares se precipitan ayudados por la alta concentración de sales. Finalmente, se centrifuga la mezcla durante 15 min a 14,000 rpm a 4°C para aislar el sobrenadante, rico en el ADN plasmídico y en ARN, el cual deberá ser eliminado mediante una ribonucleasa (RNasa A 40ng/mL).

La purificación continúa añadiendo un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, centrifugando para separar la fase acuosa, a la cual se le añade un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifuga nuevamente para recuperar el ADN de la fase acuosa posterior a la adición de 2 veces su volumen de

etanol absoluto, de esta manera el ADN precipita y puede aislarse (ver detalles en “Extracción del ADN por técnica de Fenol Cloroformo” en la página 26).

Preparación de muestras para secuenciación.

Las muestras se enviaron a la compañía ELIM BIOPHARM para el ensayo de secuenciación, para lo cual los plásmidos que habían sido aislados ahora fueron purificados por columnas del kit MiniElute (Quiagen) y posteriormente llevados a una concentración > 50ng/μL (100ng/μL lo ideal), y se envió mínimo 10 μL por muestra.

Sistema de transcripción y traducción in vitro.

Una vez que obtenidos los plásmidos con las mutaciones deseadas (previamente habrán de secuenciarse para determinar el punto exacto de la mutación) se procede a hacer un ensayo de transcripción y traducción *in vitro* utilizando el sistema de lisados de reticulocitos acoplado con el promotor T3 y T7 (TnT PROMEGA Cat No. L5010) con la ARN polimerasa T3 de la siguiente manera: para 50 μl de reacción se utiliza 25 μl de lisado de reticulocitos, 2 μl de buffer de reacción 25X, 1 μl de polimerasa de ARN T3, 1 μl de mezcla de aminoácidos, 1 μl de inhibidor de ribonucleasas (RNasin 40u/ μl), 1 μg de la construcción con la mutación dirigida. Se deja reaccionar por 90 min a 30° C.

Ensayo de fosforilación.

Las proteínas obtenidas se someten a un ensayo de fosforilación para determinar si las mutaciones generadas tienen efecto sobre la acción de las cinasas; para ello, en el ensayo se utiliza la enzima Cdk1/CycB y como sustrato [γ ³²P] ATP, el cual nos permite identificar si se lleva a cabo o no la fosforilación. Una vez realizado el ensayo, se corren las proteínas en un gel de poliacrilamida y se visualiza el resultado en una placa sensible a radiación.

Para preparar la reacción se utiliza 25 μl de lisado de reticulocitos de conejo, 25 μl de Buffer de fosforilación (100mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 4 mM DTT, 0.02% Brij 35 pH 7.5 a 25° C) al que se le adiciona; 200 μM de ATP, 10 μCi de [γ ³²P] ATP, todas las cantidades son para la concentración final. Del complejo Cdk1/Ciclina B (20 U/μL) se toma 1 μL y se diluye en 4 μL de agua desionizada estéril; de esta dilución se toma 1 μL para cada reacción de fosforilación. Finalmente, a un duplicado de cada reacción de fosforilación, se le adiciona olomoucina a una concentración final de 500

μM partiendo de una solución a 10 mM. Las reacciones se incuban 30 min a 30°C. La reacción se detiene adicionando Buffer de corrida 1X SDS-PAGE.

Revelado en placa sensible a radiación.

Para poder apreciar el resultado del ensayo de fosforilación es necesario correr las muestras en un gel de poliacrilamida con la intención de separar las proteínas por su peso molecular y a la vez desechar los residuos de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP que no se haya integrado a ninguna proteína, el gel se preparó al 10% (4 mL de H_2O , 3.3 mL de acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 μL de SDS al 10%, 100 μL de persulfato de amonio al 10%, 4 μL de TEMED)

Una vez que las muestras en el gel corren lo suficiente (≈ 1.5 h) se procede a revelar en una placa sensible a radiación (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film Cat. No. 11 666 916 001) ...

Capítulo VIII - Resultados

8.1 - Análisis Bioinformático

Obtención de la secuencia de eIF3f

Se utilizó la secuencia de nucleótidos del gen “*Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F*” (eIF3f) con número de acceso NM_003754 en la base de datos “Human Genomic plus transcript (Human G + T)” de “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” se realizó un Blast. El programa Blast compara la secuencia de nucleótidos (o aminoácidos) con secuencias de bancos genómicos (o proteómicos) de los diferentes organismos reportados.

```

1 ATTTCCGCTT CCGCCTCCTT CTTTCTCGAC AAGATG GCCA CACCGGCGGT ACCAGTAAGT
61 GCTCCTCCGG CCAAGCCAAC CCCAGTCCCG GCGGCGGCC CAGCCTCAGT TCCAGCGCCA
121 ACGCCAGCAC CGGCTGCGGC TCCGGTTCCC GCTGCGGCTC CAGCCTCATC CTCAGACCCT
181 GCGGCAGCAG CGGCTGCAAC TGCGGCTCCT GGCCAGACCC CGGCCTCAGC GCAAGCTCCA
241 GCGCAGACCC CAGCGCCCGC TCTGCCTGGT CCTGCTCTTC CAGGGCCCTT CCCC GGCGGC
301 CGCGTGGTCA GGCTGCACCC AGTCATTTTG GCCTCCAT TG GACAGCTA CGAGAGACGC
361 AACGAGGGTG CTGCCCGAGT TATCGGGACC CTGTTGGGAA CTGTTCGACAA ACACCTCAGTG
421 GAGGTCACCA ATTGCTTTTC AGTGCCGCAC AATGAGTCAG AAGATGAAGT GGCTGTTGAC
481 ATGGAATTTG CTAAGAATAT GTATGAACTG CATAAAAAAG TTTCTCCAAA TGAGCTCATC
541 CTGGGCTGGT ACGCTACGGG CCATGACATC ACAGAGCACT CTGTGCTGAT CCACGAGTAC
601 TACAGCCGAG AGGCCCCCAA CCCCATCCAC CTCACTGTGG ACACAAGTCT CCAGAACGGC
661 CGCATGAGCA TCAAAGCCTA CGTCAGCAT TTAATGGGAG TCCCTGGGAG GACCATGGGA
721 GTGATGTTCA CGCCTCTGAC AGTGAAATAC GCGTACTACG ACACCTGAAC CATCGGAGTT
781 GACCTGATCA TGAAGACCTG CTTTAGCCCC AACAGAGTGA TTGGACTCTC AAGTACTTG
841 CAGCAAGTAG GAGGGGCATC AGCTCGCATC CAGGATGCC TGAGTACAGT GTTGAATAT
901 GCAGAGGATG TACTGTCTGG AAAGGTGTCA GCTGACAATA CTGTGGGCCG CTTCTGATG
961 AGCCTGGTTA ACCAAGTACC GAAAATAGTT CCCGATGACT TTGA GACCAT GCTCAACAGC
1021 AACATCAATG ACCTTTTGTG GGTGACCTAC CTGGCCAACC TCACACAGTC ACAGATTGCA
1081 CTCAATGAAA AACTTGTAAG CCTGTGAATG GACCCCAAGC AGTACACTTG CTGGTCTAGG
1141 TATTAACCCC AGGACTCAGA AGTGAAGGAG AAATGGGTTT TTTGTGGTCT TGAGTCACAC
1201 TGAGATAGTC AGTTGTGTGT GACTCTAATA AACGGAGCCT ACCTTTTGTG AATTAATAAAA
1261 AAAAAAAAAA AA

```

Secuencia 1. Secuencia de nucleótidos de cADN de eIF3f humano NM_003754.

Predicciones de sitios involucrados.

El gen eIF3f (NM_003754) contiene 8 exones que codifican para la proteína funcional la subunidad f del factor de iniciación 3. El gen posee una región MPN la base de datos Human G + T indica un sitio de fosforilación en los nucleótidos 805 - 807 que codifican para el aminoácido serina, esta información se complementara con los análisis posteriores.

```

1 MATPAVPVSA PPATPTPVPA AAPASVPAPT PAPAAAPVPA AAPASSSDPA AAAAAATAAPG
61 QTPASAQAPA QTPAPALPGP ALPGPFPGGR VVRLHPVILA SIVDSYERRN EGAARVIGTL
121 LGTVDKHSVE VTNCFVSPHN ESEDEVAVDM EFAKNMYELH KKVSPNELIL GWYATGH DIT
181 EHSVLIHEY Y SREAPNPIHL TVDTSLQNGR MSIKAYVSTL MGVPGRMTMGV MFTPLTVKYA
241 YYDTERIGVD LIMKTCFSPN RVIGLSSDLQ QVGGASARIQ DALSTVLQYA EDVLSGKVSA

```

301 DNTVGRFLMS LVNQVPKIVP DDFETMLNSN INDLLMVTYL ANLTQSQIAL NEKLVNL

Secuencia 2. Secuencia de aminoácidos de eIF3f humano. Son 356 aminoácidos los que conforman la proteína de eIF3f en humanos.

Una vez obtenida la secuencia de aminoácidos que codificó el gen eIF3f se realizó el análisis con dos herramientas diferentes de análisis de secuencias; un servidor del instituto Suizo de Bioinformático (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) denominado ExPASy (Expert Protein Analysis System) del cual se obtuvieron los siguientes resultados; 11 sitios de fosforilación de los cuales uno es por cAMP, cinco por PKC y cinco por CK2, tres sitios de miristilación y dos sitios de glicosilación (**Tabla 2**). El criterio para hacer el análisis se basa en el análisis de la actividad de CK2 en diferentes proteínas (REF).

Tipo de modificación		Sitio Secuencia
Fosforilación	cAMP	161 - 164: KKvS
	PKC	212 - 214: SiK
		236 - 238: TvK
244 - 246: TeR		
276 - 278: SaR		
295 - 297: SgK		
CDK2	45 - 48: SssD	
	101 - 104: SivD	
	142 - 145: SedE	
	164 - 167: SpnE	
	175 - 178: TghD	
Glicosilación		140 - 143: NESE
		342 - 345: NLTQ
Miristilación		60 - 65: GQtpAS
		118 - 123: GT11GT
		273 - 278: GGasAR

Tabla 2. Sitios de modificación postraduccionales candidatos (ExPASy Prosite).

La segunda herramienta de análisis es Eukaryotic Linear Motif (ELM) es un recurso de predicción de sitios, se obtuvieron varios sitios probables de fosforilación por distintas proteínas («ELM - EIF3F_HUMAN» 2013) entre las cuales destaca CDK1 que tiene su

efecto en la secuencia de aminoácidos “TCFSPNR” ubicada en 255-261. De la misma manera se reconoció una región consenso de interacción a la ciclina en los aminoácidos “RFLM” 306-309 lo que incrementa la acción de fosforilación de las CDK’s. Estas predicciones se llevan a cabo por un algoritmo que se basa en modificaciones postraduccionales en otras proteínas del banco de datos.

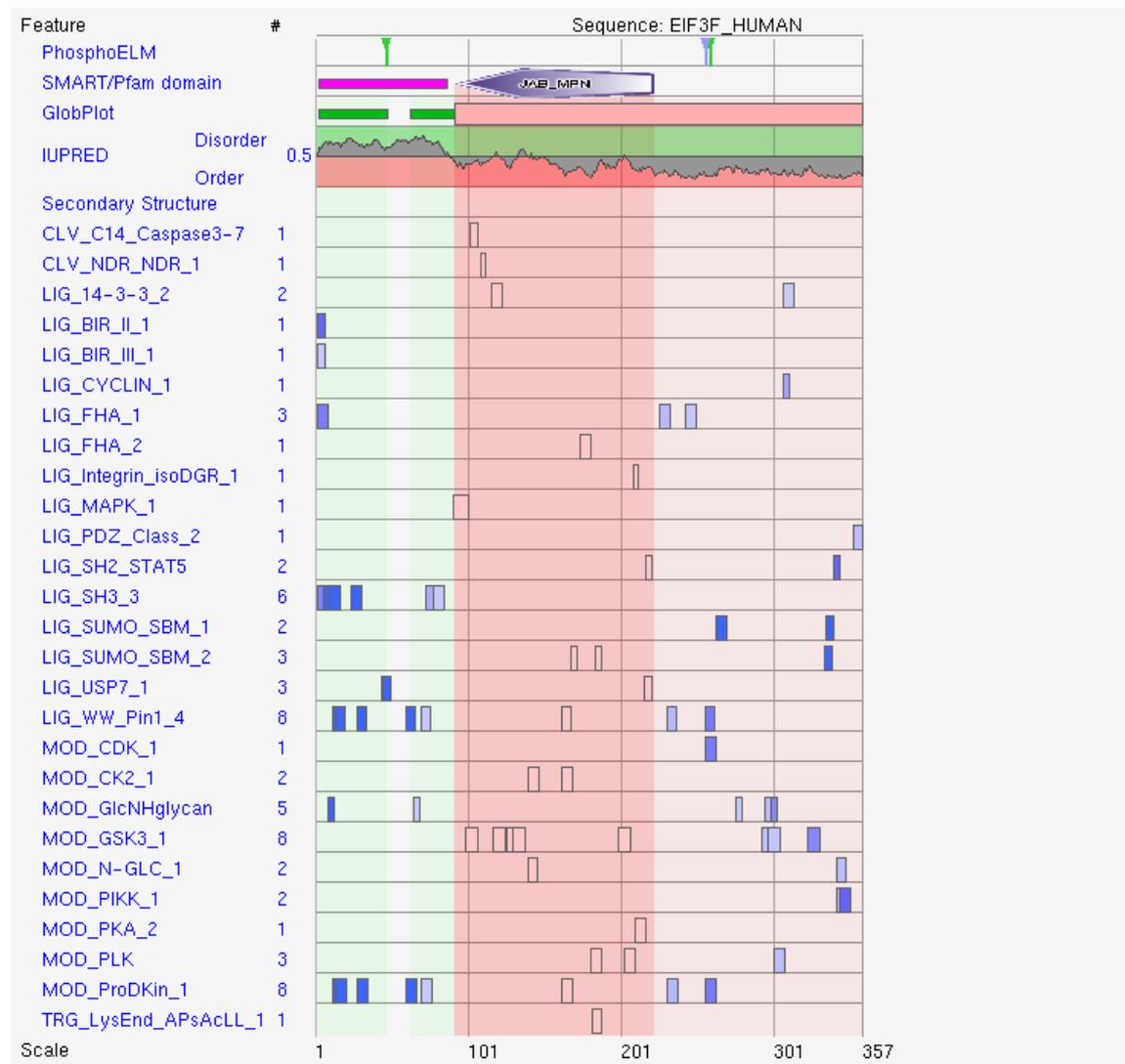


Figura 9. Predicción de los sitios de modificaciones postraduccionales de eIF3f del sitio ELM donde se muestra las dos fosforilaciones en Thr-255 y Ser-258 así como el sitio de unión a ciclina.

Secuencia de aminoácidos indicando los sitios de fosforilación por CDK’s y sitios de unión a ciclina.

```

1 MATPAVPVSA PPATPTPVPA AAPASVPAPT PAPAAAPVPA AAPASSSDPA AAAAATAAPG
61 QTPASAQAPA QTPAPALPGP ALPGPFPGGR VVRLHPVILA SIVDSYERRN EGAARVIGTL
121 LGTVDKHSVE VTNCFSVPHN ESEDEVAVDM EFAKNMYELH KKVSPNELIL GWYATGHGIT
181 EHSVLIHEY SREAPNPIHL TVDTSLQNGR MSIKAYVSTL MGVPGRMTMGV MFTPLTVKYA
241 YYDTERIGVD LIMKTTCFSPNRRVIGLSSDLQ QVGGASARIQ DALSTVLQYA EDVLSGKVSA
    
```

301 DNTVGRFLMS LVNQVPKIVP DDFETMLNSN INDLMLVTYL ANLTQSQIAL NEKLVNL

Secuencia 3. Sitios posibles a ser fosforilados por diversos sistemas de predicción.

	Nucleótidos	Aminoácidos	TM °C
Secuencia original	5'-G.AAG. <u>ACC</u> .TGC.TTT. <u>AGC</u> .CCC.AAC.AGA-3'	<u>K</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>R</u>	
Sermut	5'-G.AAG.ACC.TGC.TTT. <u>G</u> GC.CCC.AAC.AGA-3'	KTCF <u>G</u> PNR	67.8
Antisermut	5'-TCT.GTT.GGG. <u>G</u> CC.AAA.GCA.GGT.CTT.C-3'	KTCF <u>G</u> PNR	67.8
Thrmut	5'-G.AAG. <u>G</u> CC.TGC.TTT.AGC.CCC.AAC.AGA-3'	<u>K</u> ACFSPNR	67.8
Antithrmut	5'-TCT.GTT.GGG.GCT.AAA.GCA. <u>G</u> GC.CTT.C-3'	<u>K</u> ACFSPNR	67.8
Stmut	5'-G.AAG. <u>G</u> CC.TGC.TTT. <u>G</u> GC.CCC.AAC.AGA-3'	<u>K</u> ACF <u>G</u> PNR	69.5
Antistmut	5'-TCT.GTT.GGG. <u>G</u> CC.AAA.GCA. <u>G</u> GC.CTT.C-3'	<u>K</u> ACF <u>G</u> PNR	69.5
Secuencia original	5'-GGC. <u>CG</u> C.TTC. <u>C</u> TG.ATG.AGC.CTG.GTT.AAC-3'	<u>G</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u>	
Cycmut	5'-GGC. <u>C</u> TC.TTC. <u>G</u> TC.ATG.AGC.CTG.GTT.AAC-3'	<u>G</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u>	69.1
Anticycmut	5'-GTT.AAC.CAG.GCT.CAT. <u>C</u> AC.GAA. <u>G</u> AG.GCC-3'	<u>G</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u>	69.1

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados. Se muestran las secuencias y sus respectivas modificaciones; subrayado en negro: los oligonucleótidos o aminoácidos de la secuencia original que serán modificados, subrayado en rojo: los oligonucleótidos que se utilizarán para generar las mutaciones puntuales y a su vez los aminoácidos generados por las mutaciones.

Cy motif						
E2F1	K	R	R	L	D	L
E2F2	K	R	K	L	D	L
E2F3	K	R	R	L	E	L
p107	K	R	R	L	F	G
p130	K	R	R	L	F	V
Cdc6	G	R	R	L	V	F
Myt1	P	R	N	L	L	S
Cdc25a	P	R	R	L	L	F
p57	C	R	S	L	F	G
p27	C	R	N	L	F	G
p21 (N)	C	R	R	L	F	G
p21 (C)	K	R	R	L	I	F
HPV18 E1	K	R	R	L	F	T
SSeCKS (1)	L	K	K	L	F	S
SSeCKS (2)	L	K	K	L	S	G
b3-endonexin	K	R	S	L	K	L

Tabla 4. Secuencias conocidas del motivo Cy (Wohlschlegel JA. 2001).

Oligonucleótidos diseñados.

Una vez identificados los sitios de posible fosforilación por Cdk1/CycB se diseñaron oligonucleótidos con el cambio de un nucleótido para generar una mutación puntual, con el objetivo de cambiar el codón que codifica a un aminoácido que es propenso a ser fosforilado, por otro aminoácido que sea lo más neutral posible. Se tomó en consideración la longitud, la temperatura de alineamiento, su estabilidad (posible formación de estructuras secundarias), buscar que el oligonucleótido no contenga "strings" de más de una base, y se evitó 3 o más guaninas o citosinas consecutivas. Los oligonucleótidos diseñados se nombraron de la siguiente manera; "sermut" y "antisermut" (que genera el cambio del aminoácido Serina-258 a Glicina), "thrmut" y "antithrmut" (que genera el cambio del aminoácido Treonina-255 a Alanina), "stmut" y "antistmut" (que genera los dos cambios de los oligonucleótidos anteriores, Serina-258 y Treonina-255 a Glicina-258 y Alanina-255), estudios previos (Takeda, Wohlschlegel, y Dutta 2001; Wohlschlegel et al. 2001) han identificado a un motivo denominado "cy" o "RXL" (**Tabla 4**) que presenta gran similitud para los aminoácidos encontrados en 306 al 309 de la proteína eIF3f por lo tanto las mutaciones dirigidas para estos sitios se diseñaron con el propósito de romper la naturaleza del motivo encontrado, es así que "cycmut" y "anticycmut" genera el cambio del aminoácido Arginina-306 por Leucina y Leucina-308 por valina.

8.2 - Obtención de las mutantes

Una vez que se han diseñado los oligonucleótidos específicos para generar cada mutación puntual, se procedió a estandarizar el protocolo se realizó la PCR con las condiciones indicadas anteriormente, se realizó la digestión con DpnI a 37°C durante tres horas, la transformación bacteriana, el aislamiento y purificación del plásmido y finalmente la muestra se mando a secuenciar. Los resultados obtenidos muestran diversos sitios donde el oligonucleótido se insertó en la secuencia en cada una de las cuatro construcciones (**Secuencia 4**), este fue un resultado que impide que la proteína se forme de la manera adecuada, por lo tanto el experimento no se puede realizar. La presencia de múltiples inserciones de la secuencia del oligonucleótido sugiere que la concentración de estos es muy elevada, por lo que se estableció disminuir la concentración de 20 pM que era ini-

cialmente a 5 pM se realizaron los procedimientos mencionados anteriormente para obtener las muestras por quintuplicado que se mandaron a secuenciar. Los resultados obtenidos con estas condiciones fueron los siguientes; para la construcción Sermut una muestra no presentó la mutación, en las otras cuatro se observa presencia de múltiples inserciones del oligonucleótido. La construcción Thrmut en las cinco muestras fue exitosa la mutación puntual (Secuencia 5). La construcción Stmut en dos muestras hay múltiples inserciones de oligonucleótidos, en las tres restantes no hubo mutación. Y finalmente en la construcción Cymut en tres muestras no hay mutación y en dos la mutación fue exitosa (Secuencia 6). Es así que modificando las condiciones se lograron obtener exitosamente dos construcciones de las cuatro establecidas. Debido a lo anterior se determino modificar las condiciones para los casos que no fueron exitosos (Sermut y Stmut) por lo que para evitar la presencia de muestras donde no hay mutación se estableció aumentar el tiempo de digestión con la enzima DpnI de tres horas que era inicialmente a 12 horas, la de concentración de oligonucleótidos permaneció en 5 pM. Se realizaron los experimentos por quintuplicado, los resultados de la secuenciación mostraron que en los cinco casos no se presento la mutación, todas las construcciones fueron completamente idénticas a eIF3f, lo cual puede sugerir que la digestión no se llevo a cabo completamente, por lo tanto se decidió por disminuir la concentración de templado en la PCR que originalmente era de 125 ng a 20 ng, para la siguiente repetición de este proceso se realizo por quintuplicado, sin obtener resultados positivos, es por ello que se tomo la decisión de diseñar nuevos oligonucleótidos con secuencias más largas para las mutantes que aun no se obtenían (Sermut y Stmut). Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 5 que se denominaron Sermut2 y Stmut2. Para los siguientes ensayos se repitieron las condiciones de PCR y digestión del ensayo cuando salieron positivas las mutantes para Thrmut y Cymuy (Oligonucleótidos 5pM y 12 horas incubando con DpnI). Con los nuevos oligonucleótidos diseñados se mandaron a secuenciar cinco muestras de cada una de las construcciones faltantes, y solo una construcción “Sermut” tubo la mutación diseñada (Secuencia 7), en este punto del experimento fue posible distinguir en los geles de agarosa de la electroforesis el corrimiento a diferentes pesos de los oligonucleótidos que tenían múltiples sitios de mutación (Figura 10), esto nos permitió en los siguientes ensayos seleccionar los plásmidos de cepas con múltiples oligonucleótidos de los que no lo tienen y hacer más eficaz el experimento. Para obtener la última mutante (STmut) se planteo una nueva estrategia que consistió en hacer tres ensayos de PCR consecutivos, y que en el segundo y tercer ensayo se tomara como molde el

producto del PCR anterior, con el fin de diluir la cantidad del ADN sin mutación. Se tomo en cuenta las concentraciones de ADN inicial y del producto de cada PCR para poder establecer el protocolo de manera adecuada, sumado a esto se estableció disminuir la cantidad de oligonucleótidos de 5pM a 0.5pM para así evitar la incorporación de múltiples oligonucleótidos en la secuencia.

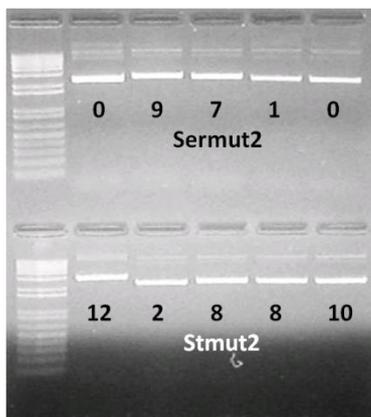


Figura 10. Miniprep de diferentes colonias de las construcciones de Sermut2 y Stmut2, el número debajo de cada banda indica el número de veces que se insertaron los oligonucleótidos, se puede apreciar que el corrimiento de cada banda es proporcional al número de veces que se insertó el oligonucleótido, es decir que las bandas donde hay mayor numero de inserciones corrieron más lento, lo que se aprecia como bandas más pesadas.

	Nucleótidos	Aminoácidos	TM °C
Secuencia original		K <u>T</u> C <u>F</u> S <u>P</u> NR	
Sermut2	5' GATCATGAAGACCTGCTTT <u>G</u> GCCCCAACAGAGTGATTG 3'	KTCF <u>G</u> PNR	81.2
Antisermut2	5' CAATCACTCTGTTGGGGC <u>C</u> AAAGCAGGTCTTCATGATC 3'	KTCF <u>G</u> PNR	81.2
Stmut2	5' GATCATGAAG <u>G</u> CCTGCTTT <u>G</u> GCCCCAACAGAGTGATTG 3'	K <u>T</u> CF <u>G</u> PNR	81.2
Antistmut	5' CAATCACTCTGTTGGGGC <u>C</u> AAAGCAGG <u>C</u> CTTCATGATC 3'	K <u>T</u> CF <u>G</u> PNR	81.2

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la mutación de Ser-258 y para la construcción con la doble mutación Thr-255 y Ser-258, con mayor numero de bases que los oligonucleótidos anteriores.

```

1  NNNCCNNNNN  NGNNNNNTN  NNNNNNNNN  NNNNNNNNTN  NNNNNNNNN  NNNNNNNNN
61  ANNAGATTNN  NNANNTGANN  NNGNNGTNN  NTGNNNTNG  NNNNNNNNT  NNTNNNGCN
121 NAAAAAANNT  TTNTCCAANG  AGNTNATTC  TNGGNTGGTA  NNNANGGNN  ATGACATCNC
181 AGAGCNTNT  GTGCTGANCC  ANGAGTACTN  CANNNGAGAG  GCCCCCAACC  CCNNNNCTCA
241 CTGTGGACAC  AAGNNTCCAN  AACGNCCGCA  TGAGCNTCAA  ANNNACGTCA  GCACHTTAAT
301 GGGAGTCCCT  GGGAGGACCA  TGGGAGTGAT  GTTCACGCCT  CTGACAGTGA  AATACGCGTA
361 NTACGACACT  GAACGCATCG  GAGTTGACCT  GATCATGAAG  ANTGCTTTGG  CCCCCAACAGA
    
```

```

421 AGANNGCTTT GGCCCAACG AAGACNTGCT TTGGCCCAA CAGAAGACNT GCTTTGGCCC
481 CAACAGAAGA NNGCTTTGGC CCCAACGAAG ACNTGCTTTG GCCCAACAG AGACNTGCT
541 TTGGCCCAA CAGACCTGCT TTGGCCCAA CAGAAGACCT GCTTTGGCCC CAACAGAAGA
601 CCTGCTTTGG CCCAACAGA AGACCTGCTT TGGCCCAAC AGAAGACCTG CTTTGGCCCC
661 AACAGAAGAC CTGCTTTGGC CCCNNCAGA GACCTGCTTT GGCCCAACA GAGACCTGC
721 TTTGGCCCAA ACGAAGACCT GCTTTGGCCC CAACAGAAGA CCTGCTTTGG CCCAACAGA
781 AGACCTGCTT TGGCCCAAC AGAAGACCTG CTTTGGCCCC AACAGGAAGA CCTGCTTTGG
841 CCCAACAGA AGACCTGCTT TGGCCCAAG AAGACCTGCT TTGGCCCAA CAGAGTGATT
901 GGACTCTCAA GTGACTTGCA GCAAGTAGGA GGGGCATCAG CTCGCATCCA GGATGCCCTG
961 AGTACAGTGT TGCAATATGC AGAGGATGTA CTGTCTGGAA AGGTGTCAGC TGACAATACT
1021 GTGGGCCGCT TCCTGATGAG CCTGGTTAAC CAAGTACCGA AAATAGTTCC CGATGACTTT
1081 GAGACCATGC TCAACAGCAA CATCAATGAC CTTTTGATGG TGACCTACCT GGCCAACCTC
1141 ACACAGTCAC AGATTGCACT CAATGAAAA CTTGTAAACC TGTGAGGGCT GCAGGAATTC
1201 GATATCAAGC TTATCGATAC CNTCGACCNC NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN

```

Secuencia 4. Datos de secuenciación de la muestra Sermut1. Se muestran los múltiples sitios en los que se insertó el oligonucleótido Antisermut (5'GAAGACCTGCTTTGGCCCAACAGA3') la secuencia muestra el antisentido de la construcción ya que el ensayo de secuenciación se realizó con el primer de T7 que en la construcción se encuentra al finalizar la secuencia del gen. En amarillo y azul se muestra la secuencia del oligonucleótido, en verde los nucleótidos que se solapan entre cada secuencia de oligonucleótidos.

```

>AH_290470-506_B101_T7-forward_F08.ab1
1 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN CNCGAGGTCG ACGGTATCGA TAAGCTTGAT ATCGAATTC
61 TGCAGCCCTC ACAGGTTTAC AAGTTTTTCA TTGAGTGCAA TCTGTGACTG TGTGAGGTTG
121 GCCAGGTAGG TCACCATCAA AAGGTCATTG ATGTTGCTGT TGAGCATGGT CTCAAAGTCA
181 TCGGGAAC TAATTCGGTAC TTGGTTAACC AGGCTCATCA GGAAGCGGCC CACAGTATTG
241 TCAGCTGACA CCTTCCAGA CAGTACATCC TCTGCATATT GCAACACTGT ACTCAGGGCA
301 TCCTGGATGC GAGCTGATGC CCCTCCTACT TGCTGCAAGT CACTTGAGAG TCCAATCAC
361 CTGTTGGGGC TAAAGCAGGC CTTCATGATC AGGTCAACTC CGATGCGTTC AGTGTCTGAG
421 TACGCGTATT TCACTGTCTG AGGCGTGAAC ATCACTCCCA TGGTCCCTCC AGGGACTCCC
481 ATTAAGTGC TGACGTAGGC TTTGATGCTG ATGCGGCCGT TCTGGAGACT TGTGTCCACA
541 GTGAGGTGGA TGGGGTTGGG GGCTCTCGG CTGTAGTACT CGTGGATCAG CACAGAGTGC
601 TCTGTGATGT CATGGCCCGT AGCGTACCAG CCCAGGATGA GCTCATTTGG AGAAACTTTT
661 TTATGCAGTT CATAATATTT CTTAGCAAAT TCCATGTCAA CAGCCACTTC ATCTTCTGAC
721 TCATTGTGCG GCACTGAAAA GCAATTGGTG ACCTCCACTG AGTGTGTTGC GACAGTTCCC
781 AACAGGGTCC CGATAACTCG GGCAGCACCC TCGTTGCGTC TCTCGTAGCT GTCCACAATG
841 GANGCCAAA TGACTGGGTG CAGCCTGACC ACGCGGCCGC CGGGGAAGGG CCCTNNANAN
901 CNNACCAGG ANAGCGGGCG CTGGGTCCTG CGCTGGANCT TCGGCTGAGG CCGGGCTCTG
961 GCCAGGANC NCAGTTGCAG CCGCTGCTGC CNCAGNCTG AGGATGAGCT GGAGCCGCAN
1021 CGGGAACCG ANCCGCANCC GNTGCTGGCG TGGCNCTGNA CTGAGCTGGG NNNNNNNNNN
1081 NTGGGTTGCG NNNNNGANN CTTANTGNCC NNCGNNNNG CNTCNTGNNN NAAGGNNNTN
1141 CNNNTNNNN ANNGCCNNCN CCNNNNNNGN NNNCNGNTTN GNNNNNNNNN NGNNNNNNNN
1201 NNNNNNNNCN NNNNNNNNNT NNNNNNNNNA ANNNNNCINN NNNNNANTTN NNNNNNNN

```

Secuencia 5. Muestra de la mutación en Thr-255 donde se aprecia la inserción correcta de la mutación, se indica en amarillo la zona que representa al oligonucleótido antiThrmut (5'-TCTGTTGGGGCTAAAGCAGGCCTTC-3') en verde el oligonucleótido que fue remplazado.

```

>AH_290470-519_D104_T7-forward_H01.ab1
1 NNNNNNNNNC GNGTCGACGG TATCGATAAG CTTGATATCG AATTCCTGCA GCCCTCACAG
61 GTTTACAAGT TTTTCATTGA GTGCAATCTG TGAAGTGTGT AGGTTGGCCA GGTAGGTCAC
121 CATCAAAGG TCATTGATGT TGCTGTTGAG CATGGTCTCA AAGTCATCGG GAACTATTTT

```

```

181 CGGTACTTGG TTAACCAGGC TCATCAGAA GAGGCC CACA GTATTGTCAG CTGACACCTT
241 TCCAGACAGT ACATCCTCTG CATATTGCAA CACTGTACTC AGGGCATCCT GGATGCGAGC
301 TGATGCCCCT CCTACTTGCT GCAAGTCACT TGAGAGTCCA ATCACTCTGT TGGGGCTAAA
361 GCAGGTCTTC ATGATCAGGT CAACTCCGAT GCGTTCAGTG TCGTAGTACG CGTATTTTAC
421 TGTCAGAGGC GTGAACATCA CTCCCATGGT CCTCCCAGGG ACTCCCATTA AAGTGCTGAC
481 GTAGGCTTTG ATGCTCATGC GGCCGTTCTG GAGACTTGTG TCCACAGTGA GGTGGATGGG
541 GTTGGGGGCC TCTCGGCTGT AGTACTCGTG GATCAGCACA GAGTGCTCTG TGATGTCATG
601 GCCCGTAGCG TACCAGCCCA GGATGAGCTC ATTTGGAGAA ACTTTTTTAT GCAGTTCATA
661 CATATTCTTA GCAAATTTCCA TGTCAACAGC CACTTCATCT TCTGACTCAT TGTGCGGCAC
721 TGAAAAGCAA TTGGTGACCT CCACTGAGTG TTTGTTCGACA GTTCCCAACA GGGTCCCAGT
781 AACTCGGGCA GCACCCTCGT TGCGTCTCTC GTANCTGTCC ACAATGGAGG CCAAATGAC
841 TGGGTGCAGC CTGACCACGC GGCCGCCGGG GAAGGGCCCT GGAAGANCNN ACCAGGCAGA
901 NCGGGCGCTG GGGTCTGCGC TGGANCTTGC GCTGAGGCCG GGGTCTGGCC AGGAGCCGCA
961 NTTGCAGCCG CTGCTGCNCA GGGTCTGANA TGANCTGGAN CCGCANCGGN ACCGGANCCG
1021 CAGCCGGNGC TGGCGTTGNN CTGNACTGNN NTGGGCNCCG CCGGNNTGGG GTNGCNNNNN
1081 NNNACNANTA NNGNACNNC GGNTGGNNAT CTTGNCNNNN GGNNCNNNNN NNNNNNNNNN
1141 NCCNCCNNNN NNGNANNCCN TTNNNCNNNN GAGNNNNNNN NNNNNNNNAN ANNNNNNNN

```

Secuencia 6. Muestra de la mutación en “Cy motif” donde se aprecia la inserción correcta de la doble mutación, se indica en amarillo la zona que representa al oligonucleótido antiCymut (5`- GTTAACCAGGCTCATCAGGAAGAGGCC -3`) en verde los oligonucleótidos que fue remplazado.

>AH_309062-505_M105_T7-forward_E09.ab1

```

1 NNNNNNNNCN NCGAGGTCGA CGGTATCGAT AAGCTTGATA TCGAATTCCT GCAGCCCTCA
61 CAGGTTTACA AGTTTTTCAT TGAGTGCAAT CTGTGACTGT GTGAGGTTGG CCAGGTAGGT
121 CACCATCAAA AGGTCATTGA TGTTGCTGTT GAGCATGGTC TCAAAGTCAT CGGGAACAT
181 TTTTCGGTACT TGGTTAACCA GGCTCATCAG GAAGCGGCC ACAGATTGT CAGTGACAC
241 CTTTCCAGAC AGTACATCCT CTGCATATTG CAACACTGTA CTCAGGGCAT CCTGGATGCG
301 AGCTGATGCC CCTCCTACTT GCTGCAAGTC ACTTGAGAGT CCAATCAC TC TGTGGGGCC
361 AAAGCAGGTC TTCATGATCA GGTCAACTCC GATGCGTTCA GTGTCGTAGT ACGCGTATTT
421 CACTGTCAGA GCGTGAACA TCACTCCCAT GGTCTCCCA GGGACTCCCA TTAAAGTGCT
481 GACGTAGGCT TTGATGCTCA TGCGGCCGTT CTGGAGACTT GTGTCCACAG TGAGGTGGAT
541 GGGGGTTGGG GGCCTCTCGG CTGTAGTACT CGTGGATCAG CACAGAGTGC TCTGTGATGT
601 CATGGCCCCG AGCGTACCAG CCCAGGATGA GCTCATTGG AGAAACTTTT TTATGCAGTT
661 CATAATATT CTTAGCAAAT TCCATGTCAA CAGCCACTTC ATCTTCTGAC CATTGTGCG
721 GCACTGAAAA GCAATTGGTG ACCTCCACTG AGTGTTTGTG GACAGTTCCC AACAGGGTCC
781 CGATAACTCG GGCAGCACCC TCGTTGCGTC TCTCGTAGCT GTCCACAATG GAGGCCAAAA
841 TGACTGGGTG CAGCCTGACC ACGCGGCCG CCGGGAAGGG CCCTGGAAGA GCAGGACCAG
901 GCAGAGCGGG CGCTGGGGTC TGCGCTGGAG CTTGCGCTGA GGCCGGGGTC TGGNCAGGAN
961 CCGCAGTTGC AGCCGCTGCT GCCGCAGGNC TGANNTGANC TGNANCCGCA NCGGGANCGN
1021 ANCNANCAN NNGCTGNGTT GCGCTGAAC TGAGNTGGNN NCGNCCNGGN CTGGGGNNGC
1081 NNNNNNNNNN ANNNNTNCNN NNCNNNNNNN NNATCNTNNN NNAGGGNTNC NCTANNNNNN
1141 NNNNNNNNNC NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNGNNN NNNNNNNNTG NNNNNNNNNN
1201 GNNANANCNN NNNN

```

Secuencia 7. Muestra de la mutación en Ser-258 donde se aprecia la inserción correcta de la mutación, se indica en amarillo la zona que representa al oligonucleótido antiThr-mut (5`-TCTGTTGGGGCCAAAGCAGGCCTTC-3`) en verde el oligonucleótido que fue remplazado.

8.3 - Análisis de fosforilación

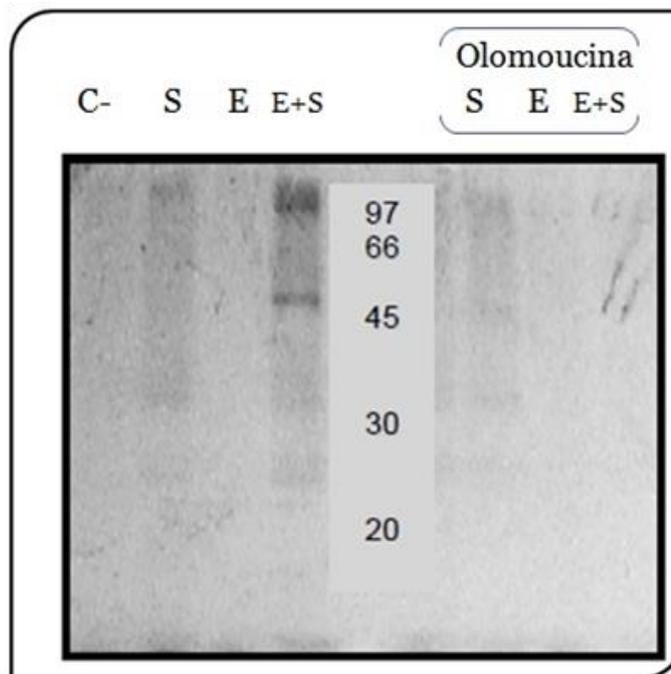


Figura 11. Fosforilación in vitro de eIF3f. Los carriles centrales marcados con números equivalen al marcador de peso molecular en kDa. C-, control negativo; S, reacción de fosforilación que contiene solo el sustrato (eIF3f); E, reacción de fosforilación que solo lleva la enzima (cdk1/ciclina B); E+S, reacción de fosforilación completa. Las mismas condiciones del experimento fueron repetidas en presencia de Olomoucina, un inhibidor selectivo de Cdk1.

Capítulo IX – Discusión

El objetivo central del este trabajo fue determinar si el complejo Cdk1/ciclina B es capaz de fosforilar a la proteína eIF3f de humano, así como establecer con precisión que aminoácidos son fosforilados.

Para llevar a lograr los objetivos se planteó, en primera instancia, determinar los aminoácidos o secuencias de aminoácidos a estudiar, para ello se realizó un análisis bioinformático con las herramientas disponibles de análisis de péptidos: ExPASy, ELM y NCBI. Primeramente el resultado de este análisis fue que el aminoácido Ser-258 es un posible blanco de ser fosforilado, asimismo se incluyó la Thr-255 como objeto de nuestro estudio ya que se encuentra a solo dos aminoácidos de separación de Ser-258, durante las diferentes etapas del desarrollo de esta investigación se realizaron consultas perió-

dicadas a las herramientas bioinformáticas para hacer un seguimiento de los resultados a fin de actualizar el estudio, y se logró observar en una fecha posterior a este análisis que la herramienta ELM predice al sitio Thr-255 como posible blanco de fosforilación, mismo sitio que con anterioridad nosotros decidimos incluir en el estudio, el hecho de que el programa de análisis no haya realizado esta predicción desde el principio y posteriormente la haya considerado, puede ser interpretada como el mejoramiento que se realiza en la heurística de la herramienta. Conjuntamente a estas predicciones el programa ELM predice un sitio entre los aminoácidos 306 al 309 que es posiblemente una región de reconocimiento y unión a la ciclina B, al realizar una investigación en la literatura sobre este sitio, se puede encontrar un par de estudios realizados por el grupo de Wohlschlegel y Takeda en 2001 donde establecen la naturaleza de un motivo proteínico de unión a las ciclinas que denominaron “Cy motif” o “RXL motif”, dicho motivo se encontró que tiene características similares en diferentes proteínas y se constituye por poseer una arginina, seguida de un aminoácido cualquiera y una leucina (**Tabla 4**). En la secuencia de la proteína de eIF3f de humano se encuentra una serie de aminoácidos que presenta las características que indentifican al motivo Cy, por lo cual también se consideró incluirlo dentro del estudio, de esta forma es que se establece cuales aminoácidos son con los que abarca el presente estudio.

Con anterioridad ha habido equipos de trabajo que se han dedicado a hacer estudios en múltiples de proteínas para determinar si son o no son fosforiladas, estudios que no son dirigidos a una proteína en particular, por lo tanto no proponen ninguna ruta o vía de metabólica o de señalización. Entre estos trabajos destacan para nuestro análisis los trabajos realizados por Damoc en 2007 que estudia al complejo eIF3 y los elaborados por Dephoure en 2008 donde estudia 14 265 sitios de fosforilación por medio de espectrometría de masas, ambos estudios proponen la fosforilación de eIF3f en distinto aminoácido, cabe mencionar que a diferencia de nuestra investigación en estos estudios no se establece que cinasa o grupo de cinasas llevan a cabo las fosforilaciones.

Entrando en materia, sabemos que eIF3f es una proteína poli-funcional, moduladora de la síntesis de proteínas y esencial para la proliferación celular. La proteína eIF3f tiene un perfil de concentración (y de expresión de su mRNA) hasta ahora no identificado en otras proteínas ya que presenta dos picos máximos de concentración; un pico en la fase S y otro pico en la transición G2/M. Este comportamiento sugiere ya sea que: tiene una

función que es mediada en dos fases distintas del ciclo celular o es que su papel es diferente a lo largo del ciclo celular, hasta la fecha no hay evidencia clara sobre este hecho.

Dado que el perfil de expresión bifásico de eIF3f es único, con uno de sus máximos de expresión en la transición G2/M, donde el complejo Cdk 1/ciclina B actúa, es de suma importancia conocer si dicho complejo fosforila a eIF3f, ya que actualmente se desconoce su actividad con respecto a las modificaciones postraduccionales que adquiere porque no existen estudios dirigidos a este aspecto; únicamente existe un reporte previo que indica que en células de melanoma humano A375, la Cdk11p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio polyPA (Shi et al. 2003), pero dicho estudio se llevo a cabo en células que fueron llevadas a apoptosis donde las condiciones para entender el funcionamiento de este sistema no son las más convenientes. Además, en el estudio antes mencionado de Dephoure (2008) si bien se estudian las células en la fase G2, es imposible determinar su posible actividad o función si se desconoce que cinasa lleva a cabo dicha modificación postraducciona, por otro lado en el estudio antes mencionado de Damoc (2007) las células HeLa fueron detenidas en G0, privándolas de suero, y posteriormente midiendo en 0, 5, 10, 20, 40 60 min. (**Figura 12**) haciendo imposible determinar en qué fase del ciclo celular es posible que se lleve a cabo la fosforilación.

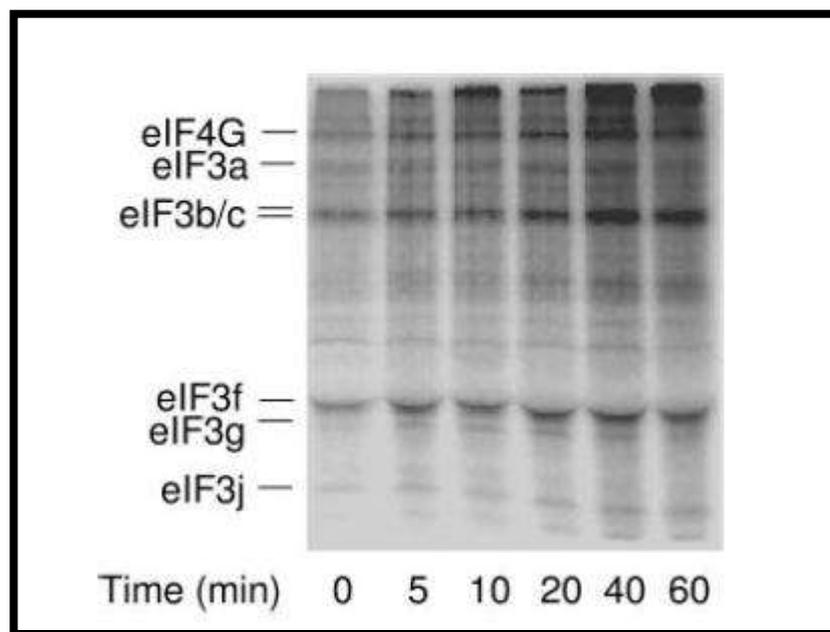


Figura 12. Autoradiograma que muestra la fosforilación en diversas subunidades del complejo eIF3 de células HeLa estimuladas con suero. Las células HeLa fueron tratadas quitando el suero del medio, incubadas con [³²P]ortofosfato y estimuladas con

suero fetal bovino, en diversos momentos después de la estimulación se lisaron, inmunoprecipitaron con anticuerpos-eIF3 y se analizó en SDS-PAGE.

Capítulo X - Conclusión

Capítulo XI – Bibliografía

Alberts B, A. Johnson, J. Lewis et al. 2002. «Molecular Biology of the Cell» 4ª Edición. New York, Estados Unidos: Garland Science. 1616 pp. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>

Aravind L. y C. P. Ponting. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Science* 7: 1250-1260.

Asano K, H. P. Vornlocher, N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick, A. G. Hinnebusch y J. W. B. Hershey. 1997. «Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits». *The Journal of Biological Chemistry* 272: 27042-27052.

Browning, K S, D R Gallie, J W Hershey, A G Hinnebusch, U Maitra, W C Merrick, y C Norbury. 2001. «Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3». *Trends in biochemical sciences* 26: 284.

Burks E. A, P. P. Bezerra, H. Le, D. R. Gallie y K. S. Browning. 2001. Plant Initiation Factor 3 Subunit Composition Resembles Mammalian Initiation Factor 3 and has a Novel Subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 2122-2131.

Damoc E, C. S. Fraser, M. Zhou, H. Videler, G. L. Mayeur, J. W. B. Hershey, J. A. Doudna, C. V. Robinson, J. A. Leary. 2007. «Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry». *Mol. Cell Proteomics*. 6: 1135-1146.

Dephoure N, C. Zhou, J. Villén, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, S. P. Gygi. 2008. «A quantitative atlas of mitotic phosphorylation». *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 10762-10767.

Farias E. A, y M.A. Pardo G. 2005. «Control molecular del ciclo celular eucariótico». *Ciencia Nicolaita*. 42: 37-56.

Hall M. N., M. C. Raff y G. Thomas. 2004. *Cell growth: control of cell size*. Vol. 42. Cold Spring Harbor Monograph Series. CSHL Press. China. 652 pp.

Harris T. E, A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E.R. Rhoads y Jr. J. C. Lawrence. 2006. «mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin». *The EMBO Journal* 25: 1659-1668.

Hernández S. A. 2005. «Análisis estructural del gen y la proteína PSIF en eucariontes superiores». Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 69 pp.

Higareda M. A.E, A. Farias, J. Llanderal, A. Méndez y M. A. Pardo G. 2003. «A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition». *Miami Nature Biotechnology Short Reports* 14: 111.

Higareda M. A.E, y M.A. Pardo G. 2010 «REexseparcrhession of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability». *Cell Div* 5: 10

Holz M. K, B. A. Ballif, S. P. Gygi y J. Blenis. 2005. «mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events». *Cell* 123: 569-580.

Horak E.C, M.N. Luscombe, J. Quian, P. Bertone, S. Piccirillo, M. Gerstein y M. Snyder. 2002. «Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*». *Genes Dev* 16: 3017-3033.

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

Kitazono A.A, G. N.J. Fitz y J.S. Kron. 2001. «Encyclopedia of Life Sciences: Cell cycle: regulation by cyclins». Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. (www/els.net). 1-8.

Korneeva N. L, B. J. Lamphear, F. L. Colby-Hennigan y R. E. Rhoads. 2000. «Mutually Cooperative Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF) 3 and eIF4A to Human eIF4G 1». *The Journal of Biological Chemistry* 275: 41369-41376.

Lagirand-Cantaloube J, N. Offner, A. Csibi, M. P. Leibovitch, S. Batonnet-Pichon, L. A. Tintignac, C. T. Segura y S. A. Leibovitch. 2008. «The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy». *The EMBO Journal* 27: 1266-1276.

Lee J. P, A. Brauweiler, M. Rudolph, J. E. Hooper, H. A. Drabkin y R. M. Gemmill. 2010. The TRC8 Ubiquitin Ligase Is Sterol Regulated and Interacts with Lipid and Protein Biosynthetic Pathways. *Molecular Cancer Research* 8(1): 93-106.

Lewin B. 2007. «Los genes codifican proteínas». P. 23-36. En: *Genes IX*. México: Jones & Bartlett Publishers.

Luque, C. y S. Herráez. 2001. «Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética». Primera Edición. Barcelona, España: ELSEVIER. 469 pp.

Masutani M, N. Sonenberg, S. Yokohama y H. Imataka. 2007. «Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3 ». *The EMBO Journal* 26: 3373-3383.

Mathews M. B, N. Sonenberg y J.W.B. Hershey. 2007. «Translational Control in Biology and Medicine». Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 934 pp.

Merrick W. C. 2003. «Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes». *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31: 378-385.

Morgan D.O. 1996. «The dynamics of cyclin dependent kinase structure». *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 767-772.

Nigg E. A. 2001. Mitosis. En: Zheng Y. (Ed.) *Encyclopedia of Life Sciences*. 1a. ed. John Wiley & Sons, Ltd. USA. <http://www.els.net> [DOI: 10.1038/npg.els.0001356].

Pestova T. V. y C. U. T. Hellen. 2000. «The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis». *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 651-674.

Pestova T. V. y V. G. Kolupaeva. 2002. «The role of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection». *Genes & Development* 16: 2906-2922.

Preiss T. y M. W. Hentze. 2003. «Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation». *Bioessays* 25: 1201 – 1211.

Sambrook J. J, D.D. Russell W. 2001. «Molecular cloning: a laboratory manual». New York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344pp.

Sherr J. C. y J.M. Roberts. 1999. «CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression». *Genes Dev.* 15: 1501-1512.

Shi J, A. Kahle, J. W. B. Hershey, B. M. Honchak, J. A. Warneke, S. P. L. Leona y M. A. Nelson. 2006. «Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells». *Oncogene* 25: 4923-4936.

Stein S. G, M. Montecino, J. Van Wijnen A, J. Stein L, y J. Lian B. 2000. «Nuclear Structure-Gene Expression Interrelationships: Implications for Aberrant Gene Expression in Cancer». *Cancer Research.* 60: 2067-2076.

Uversax A. J, L.E. Woodbury, N.P. Quang, M. Paraz, D.J. Blethrow, K. Shah, M.K. Shokat y O.D. Morgan. 2003. «Targets of the cyclin dependent kinase Cdk1». *Nature* 425:859-864.

Valente S.T, G. M. Gilmartin, C. Mott, B. Falkard y S. P. Goff. 2009. «Inhibition of HIV- 1 replication by eIF3f ». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(11): 4071-4078.

Wohlschlegel, J A, B T Dwyer, D Y Takeda, y A Dutta. 2001. «Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases». *Molecular and cellular biology* 21: 4868-4874.