



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN ECTÓPICA Y DEL
SILENCIAMIENTO DE eIF3f EN CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO (A549)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

M. en B. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA

ASESOR:

D. en C. MARCO AURELIO PARDO GALVÁN

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D. C. MARCO AURELIO PARDO GALVÁN.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UMSNH Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	SUMMARY	3
III.	INTRODUCCIÓN	5
III.1	Ciclo Celular	5
III.1.1	Fases del ciclo celular	6
III.1.2	Puntos de Control del Ciclo Celular	7
III.2	Síntesis de Proteínas en Eucariontes	9
III.3	Muerte Celular	11
III.3.1	Tipos de Muerte Celular	12
III.3.1.1	Apoptosis	12
III.3.1.2	Autofagia	13
III.3.1.3	Necrosis y Necroptosis	13
III.3.1.4	Piroptosis	14
III.3.1.5	Paraptosis	14
III.3.1.6	Catástrofe Mitótica	15
III.3.1.7	Mitoptosis	15
III.4	Características del eIF3	15
III.5	eIF3f	16
III.6	Justificación	18
IV.	HIPÓTESIS	19
V.	OBJETIVOS	20
V.1	OBJETIVO GENERAL	20
V.2	OBJETIVOS PARTICULARES	20

VI.	RESULTADOS	21
	CAPÍTULO I	21
	Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability.	22
VII.	DISCUSIÓN	71
VIII.	PERSPECTIVAS	81
IX.	BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	82

I. RESUMEN

El presente trabajo consiste en alterar, a través de su silenciamiento y sobre-expresión, la función del gen eIF3f (subunidad f del factor eucariótico de iniciación 3) y evaluar su efecto celular. El gen eIF3f forma parte del complejo multiproteico eIF3, el cual tiene una función importante en el inicio de la traducción (Benne y Hershey 1978). Originalmente se observó que la expresión transcripcional del gen eIF3f de frijol (*Phaseolus vulgaris*) estaba relacionada a la división celular (Llanderl-Mendoza 2003). Resultados del laboratorio mostraron que la expresión del gen eIF3f de frijol en células meristemáticas de tabaco TBV-2 está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular, y que es esencial para la progresión del mismo (Llanderl-Mendoza 2003). Resultados recientes sugieren que es un regulador negativo de la traducción y que tiene una función en la señalización apoptótica (Shi *et al.* 2006). Por lo anterior, se consideró interesante investigar si cambios en los niveles de expresión del gen eIF3f tiene un efecto sobre la proliferación de células humanas. Se investigó el efecto de la expresión ectópica y del silenciamiento del gen eIF3f sobre el crecimiento de células provenientes de un adenocarcinoma pulmonar de humano (línea celular A549), con el fin de reunir evidencia que indiquen su relevancia en la división celular y su posible uso en terapia génica contra el cáncer. Se encontró que en cultivos quiescentes, bloqueados en G0 por limitación de suero, los niveles de expresión del gen eIF3f están abatidos, en comparación con cultivos en crecimiento. Para determinar el perfil de expresión del gen eIF3f humano durante el ciclo celular, se sincronizaron células A549 en la fase S mediante la adición al cultivo de agentes inhibidores de la progresión del mismo en esta fase (afidicolina o hidroxiaurea), se liberó al cultivo del agente inhibidor y se tomaron muestras a distintos tiempos y durante 24 horas para determinar el índice mitótico, así como las concentraciones del ARNm y la proteína de eIF3f. Tanto el perfil de expresión del ARNm como el de la proteína de eIF3f humano mostraron ser idénticos. Se encontró que el perfil de expresión del gen eIF3f humano es parecido al de plantas en cuanto a que oscila durante el ciclo celular; pero en plantas presenta un máximo de expresión en la transición G2/M, mientras que en humanos presenta este máximo y otro más en la fase S. Estos datos se corroboraron mediante la determinación de la actividad del promotor del gen eIF3f fusionado transcripcionalmente al gen reportero de luciferasa, en las fases G0, M y S. El efecto de la expresión ectópica y del silenciamiento del

gen eIF3f se determinó mediante la transfección de cultivos con construcciones genéticas que contienen la secuencia que codifica para la proteína de eIF3f (sentido) o la secuencia que codifica un anti-mensajero del gen eIF3f (antisentido). Por Western Blot se verificó el nivel de expresión de la proteína del eIF3f y de la caspasa-9 (cisteinil-aspartato proteasa 9), siendo éste un indicador de MCP dependiente de la vía de las caspasas que confluyen en mitocondria. También se determinó el índice de células viables, células apoptóticas y células necróticas. Se observó que tanto el silenciamiento como la expresión ectópica del gen eIF3f inducen MCP independiente de la vía de las caspasas mitocondriales. El tipo de muerte ocasionada por la expresión ectópica del gen eIF3f mostró características distintivas al tipo de muerte observada al silenciar la expresión de eIF3f. El efecto de la expresión ectópica del gen eIF3f se observa después de 24 horas, mientras que al silenciar la expresión del gen eIF3f el efecto es inmediato y más drástico. Esto sugiere que en cada caso se afectan vías de señalización distintas. El efecto de la expresión ectópica del gen eIF3f fue similar al reportado en células humanas A375 por Shi *et al.* (2006); sin embargo, no reportan información sobre el efecto del silenciamiento del gen eIF3f en cultivos en crecimiento. Para corroborar estos resultados se diseñaron pequeños ARNs de interferencia (ARNi), específicos al mensajero del gen eIF3f. Se evaluó el efecto de los ARNi sobre la proliferación y se determinó que la viabilidad del cultivo disminuye en más del 50 %, 24 horas posteriores a la transfección, y un 60 % de la población celular adherente se encuentra en estado apoptótico después de 48 horas. Los resultados son similares a los observados con ARN antisentido, pero más eficientes en cuanto a que disminuye en más del 50 % el efecto citotóxico por la introducción de ácido nucleico a la célula. Estos resultados proveen evidencia que relacionan al proceso de traducción, la división celular y MCP, y permiten plantear la posibilidad de su uso terapéutico contra el cáncer.

II. SUMMARY

In the present work we investigated the down and up-regulation of the function of the gene coding for the subunit f of the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3f) and evaluated its cellular effect. The eIF3f gene plays an important role in the initiation of translation (Benne y Hershey 1978). We originally found that the transcriptional expression of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) eIF3f gene was related to cell division. Laboratory results showed that expression of the eIF3f bean gene in meristematic tobacco cells TBV-2 is circumscribed to the G2/M transition of the cell cycle, and that it is essential for the progression of the cell cycle. Recent results suggest that eIF3f is a negative regulator of translation and has a role in apoptotic signaling (Shi *et al.* 2006). Therefore, it was interesting to investigate if deregulation of eIF3f expression had an effect on human cell proliferation. We investigated the effect of ectopic expression and silencing of eIF3f gene on cellular growth of a human lung adenocarcinoma (cell line A549) with the objective of gathering evidence that indicated its importance in cell division and its possible use in gene therapy against cancer. We found that in quiescent cultures, arrested in G0 by serum limitation, the levels of expression of eIF3f are lowered, compared to proliferating cultures. To determine the expression profile of human eIF3f gene during the cell cycle, A549 cells were synchronized and samples were taken after arrest release (mitotic index, RNA and protein). Expression profiles of both the mRNA and the protein of human eIF3f showed the same cyclic outline. It was found that the expression profile of human eIF3f is similar to that of plants, as it oscillates along the cell cycle; however, in plants only one expression peak is reached during the G2/M transition, while in humans this peak is present together with another peak during the S phase. This was corroborated by quantifying, in phases G0, M and S, the activity of the eIF3f promoter by transcriptionally fusing it to the reporter gene of luciferase. The effect of ectopic expression and silencing of eIF3f was determined by transfection of cultures with genetic constructs having the coding sequence of the protein eIF3f (sense) or the sequence coding for the anti-messenger of eIF3f (antisense). By means of a Western Blot analysis, the level of expression of eIF3f and of caspase-9 (cysteinil-aspartate protease 9) was determined, the latter being an indicator of programmed cell death in the path of the caspases (apoptosis) that converge in the mitochondria. In addition, the index of viable cells, apoptotic cells and necrotic cells was

determined. It was observed that both silencing and ectopic expression of eIF3f induce apoptosis independently of the mitochondrial caspases pathway. The type of death caused by ectopic expression of eIF3f showed differences from death caused by silencing the expression of eIF3f. The effect of ectopic expression of eIF3f is observed after 24 hours, while silencing eIF3f causes an immediate and more drastic effect, which suggests that in each case different signaling pathways are affected. The effect of ectopic expression of eIF3f was similar to that reported in human A375 by Shi *et al.* (2006); however, the authors do not provide information regarding the effect of eIF3f silencing in growing cultures. In order to corroborate these results, small interference RNAs (siRNA) specific for the messenger of eIF3f were designed. The effect of the siRNAs on cell proliferation was evaluated and it was determined that the viability of the culture decreases in more than 50 %, 24 hours after transfection, and 60 % of the adherent cell population is found in an apoptotic state after 48 hours. The results are similar to those observed with antisense RNA, but more efficient in that it reduces the cytotoxic effect due to the use of longer nucleic acid fragments during transfection. These results provide evidence relating the processes of translation, cell division and apoptosis, and opens the possibility of its use as a therapeutical agent against cancer.

III. INTRODUCCIÓN

Uno de los principios fundamentales de la Biología Molecular y Celular es el que indica que toda propiedad y acción de cualquier célula está determinada por el conjunto de genes expresados en ella. En eucariontes, la regulación de la expresión génica es multifactorial y comprende varios niveles como son el control de la presencia y abundancia del transcrito, su procesamiento, su transporte al citoplasma, velocidad de traducción, así como la activación y estabilidad de su producto. La combinación particular de estos niveles de regulación (expresión diferencial) le confiere a la célula características únicas y define su tipo y función. En organismos pluricelulares, una característica esencial para su existencia es la ejecución precisa de decisiones diferenciales que permitan que un gen particular se exprese en una célula, en tiempo, espacio y adundancia correctos. Así, en la actualidad, todo gen se considera relacionado al ciclo celular si y solo si su expresión es diferencial durante el ciclo celular en comparación al estado de reposo (no proliferativo).

III.1 Ciclo Celular

El ciclo celular de eucariontes es el conjunto de eventos responsables de la duplicación de la célula y está definido por el periodo que ocurre entre dos divisiones mitóticas (Lewin 2007). El ciclo celular se ha dividido en cuatro fases diferentes: G1 (G de gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (gap 2) y M (mitosis), y consiste en una cascada de eventos genéticos y bioquímicos finamente regulados en tiempo y espacio por puntos de control. La eliminación de los puntos de control puede resultar en muerte celular, distribución incorrecta de los cromosomas u otros orgánulos o incremento en la susceptibilidad a perturbaciones ambientales (Hartwell *et al.* 1989, Paulovich *et al.* 1997).

Los eventos del ciclo celular están ordenados en rutas dependientes, en las cuales la iniciación de un evento tardío depende de la terminación de eventos tempranos (Hartwell *et al.* 1989). Por lo mismo, cada célula es el producto de un ciclo celular, el cual comprende la secuencia ordenada de los eventos $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$, donde una célula eucarionte duplica sus cromosomas y se divide en dos células. La célula transcurre por dos grandes etapas: la división

celular (fase M) y la interfase, que comprende las fases G₁, S y G₂ (Buchanan *et al.* 2000, Morgan 2007) y es el lapso más prolongado del ciclo celular.

III.1.1 Fases del Ciclo Celular

Fase G₁. Durante la fase G₁ se sintetizan materiales, como ARN y proteínas. Es un periodo funcional durante el cual la célula se prepara para la fase S y responde a factores extracelulares, los cuales determinan si una célula continúa el ciclo o no. La célula puede entrar a la fase G₁ por inducción a partir de la fase G₀ o por entrada directa al término de una división previa. Durante G₁ se sintetizan las proteínas requeridas para la duplicación del ADN y proteínas de complejos reguladores proteicos. En la fase G₁ tardía existe lo que en levaduras se conoce como “START” y en mamíferos “Punto de Restricción”, que es el punto donde la célula censa si tiene la masa celular y los nutrientes necesarios para soportar el ciclo y así pasar a la fase S. En el caso de los mamíferos, los reguladores claves para la progresión de G₁ incluyen 3 ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) que forman holoenzimas con las cinasas dependiente de la ciclina (Cdks, por sus siglas en inglés) Cdk4 o Cdk6; y la Ciclina E que se une a la cinasa Cdk2. El término de la fase está marcado por el inicio de la replicación (Pardee 1989, Morgan 2007).

Fase S. Durante la fase S se produce la replicación del ADN y es definida como el tiempo que tarda la célula en duplicarlo. Hay algunas proteínas que son sintetizadas en esta fase, como las histonas, proteínas no histonas cromosomales y proteínas reguladoras de la fase G₂ (Norbury *et al.* 1992, Morgan 2007).

Fase G₂. Durante esta fase la información es integrada para determinar si la célula está lista para entrar a la fase M. Una de sus características principales es la elevada tasa de síntesis de proteínas necesarias para la mitosis. Es al final de esta fase cuando se da la activación del factor promotor de la mitosis (MPF, por sus siglas en inglés), el cual está compuesto por Ciclina B y una cinasa dependiente de la ciclina (Cdk) (Norbury *et al.* 1992, Paulovich *et al.* 1997, Morgan 2007).

Fase M. La fase M es el periodo más corto del ciclo celular, durante el cual tiene lugar la mitosis (Morgan 2007). Representa la fase más drástica de todo el ciclo, en donde la mayoría de las estructuras celulares sufren reorganizaciones (Nigg 2001) y termina con la repartición equitativa del material genético en las dos células hijas. En esta fase, el MPF

induce cambios en la dinámica de los microtúbulos, incluyendo la inducción de la formación del huso mitótico, condensación de los cromosomas y ruptura de la envoltura nuclear (Norbury *et al.* 1992). Los eventos que la constituyen son profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (King *et al.* 1994, Nigg 2001, Morgan 2007).

Fase G₀. En esta fase las células se encuentran en un estado especializado y no proliferativo. La mayoría de las células de un organismo, en un momento determinado, se encuentran en G₀. Algunas células, como las musculares o las neuronas, permanecen en G₀; otras células, como los hepatocitos, abandonan esta fase para volver a entrar al ciclo celular antes del punto de restricción en G₁ en respuesta a un estímulo como un daño al hígado (Pardee 1989, Lewin 2007).

III.1.2 Puntos de 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. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos cuatro puntos de control bien definidos. Los dos puntos de control principales se sitúan en las transiciones G₁/S y G₂/M, mientras que los dos puntos de control restantes se localizan en la mitosis, entre la metafase y anafase y entre la anafase y telofase (Lodish *et al.* 2005, Morgan 2007).

En los diferentes puntos de control intervienen dos tipos de proteínas, las ciclinas (Cyc) y las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), que se asocian formando complejos Cdk-Cyc para controlar la actividad del ciclo celular. El nombre de ciclinas se debe a que su concentración en la célula fluctúa de acuerdo con la etapa del ciclo celular. Existen numerosas ciclinas, pero en general se clasifican en ciclinas de la fase G₁ o ciclinas de inicio (tipo D y E) y ciclinas mitóticas (tipo A y B). Las Cdks (en mamíferos Cdk1 a 9) son una familia de proteínas que fosforilan residuos de serina y treonina de proteínas sustrato específicas; sin embargo, sólo pueden ejercer esa actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina. De acuerdo con ello, se considera que en el complejo activo Cdk-Cyc la Cdk es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora. A diferencia de las ciclinas, las concentraciones

de las Cdks no varían de forma importante durante el ciclo celular (Morgan 1997, Morgan 2007).

El primer punto de control que se encuentra en la transición G₁/S se conoce como INICIO (*START*) en levaduras de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*) y punto de restricción o R en animales. Es el único punto que responde tanto a condiciones ambientales (nutrientes, temperatura, sales), como a señales internas de crecimiento celular (hormonas, factores de crecimiento) y a la integridad del ADN.

El segundo punto de control ocurre en la transición G₂/M y se regula por el estado de fosforilación del complejo Cdk-Cyc B (MPF). En eucariontes multicelulares, la cinasa nuclear Wee1 fosforila el residuo inhibidor T14, mientras que la cinasa homóloga Myt1 fosforila los residuos T14 y Y15 de la Cdk del MPF. Otra cinasa, denominada cinasa activadora de Cdk (CAK), fosforila un residuo de serina o treonina (S/T 160 en animales y T161 en levaduras) en la subunidad Cdk del MPF. Cuando los tres residuos están fosforilados el complejo MPF es inactivo. Por otro lado, las isoformas de la fosfatasa Cdc25 (Cdc25a, b y c) controlan la activación específica de distintos complejos Cdk-Cyc, desfosforilando los residuos T14 y Y15 en eucariontes multicelulares (Morgan 2007). La ausencia de Cdc25c en el núcleo deja al complejo MPF en un estado inactivo y la célula se detiene en G₂ (Lodish *et al.* 2005).

El tercer punto de control del ciclo celular se ejerce durante la transición metafase/anafase y asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en el plano ecuatorial. El complejo promotor de la anafase (APC, por sus siglas en inglés; también llamado APC/ciclosoma o APC/C) es una ligasa de ubiquitina formada por al menos 11 subunidades proteicas en los vertebrados. El complejo APC^{Cdc20} se activa en esta transición, después de la síntesis de Cdc20/Fizzy (Cdc20/FZ) en la parte tardía de G₂. Cuando este último se une con el APC, el complejo enzimático poli-ubiquitina el inhibidor de la anafase llamado securina. La poli-ubiquitinación y la destrucción de la securina al final de la metafase libera una proteasa activa que se conoce como separasa, la cual degrada la subunidad Scc1 de las moléculas de cohesina que mantienen unidas las cromátidas hermanas, estableciendo la anafase (Lodish *et al.* 2005).

El cuarto y último punto de control posibilita a la célula para iniciar un nuevo ciclo de división. Cerca del final de la mitosis, Cdc20/FZ es degradada y un factor de especificidad alternativo, Cdh1/FZR (Cdh1/ proteína relacionada a Fizzy), toma el control de la selección

del sustrato de APC. Cuando Cdh1/FZR se une con APC, el complejo APC^{Cdh1} poliubiquitina las ciclinas mitóticas, las cuales son degradadas por el proteosoma 26S y la célula puede proseguir hacia la telofase y la citocinesis (Murray 2004, Lodish *et al.* 2005).

III.2 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 proteica 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 ribonucleoproteicos que actúan en concierto con factores accesorios para “traducir” la información genética del ARNm a proteína. El proceso dinámico de 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 genética 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 “eIFs” (Mathews *et al.* 2007).

La iniciación de la traducción comprende cuatro pasos subsecuentes: (I) formación del complejo de preiniciación 43S el cual incluye la subunidad ribosomal pequeña (40S), los

factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 y eIF5, y el ARN de transferencia iniciador (Met-ARNt_i^{Met}); (II) el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5' cap del ARNm; (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 ARNt o al propio ARNm (Merrick 2003). Existen varios puntos de control traduccional, entre los que destacan dos: 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 esta 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-BPs 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, que 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 ribosomal 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 al 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.

III.3 Muerte Celular

La división celular y la diferenciación son procesos claves y altamente regulados durante el desarrollo de los mamíferos, y en donde los eventos de apoptosis son indispensables para que dicho desarrollo se dé correctamente. Existe evidencia de que un mal funcionamiento en este proceso natural de Muerte Celular Programada (MCP) está asociado con enfermedades como cáncer, V.I.H.-SIDA, rechazo de transplantes, autoinmunidad, embolias, enfermedades del corazón, enfermedades degenerativas, etc (Wu *et al.* 2001).

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo, por lo que su estudio es primordial. La nomenclatura utilizada en relación a la muerte celular ha sido confusa. Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue hecho por Schweichel *et al.* (1973), quienes identificaron 3 tipos de muerte celular (Tipo 1, 2 y 3). La tipo 1 (Apoptosis) se manifiesta por la condensación nuclear y reducción del volumen celular (picnosis), con reducción del volumen citoplasmático, fragmentación celular tardía y fagocitosis. La tipo 2 o degeneración autofágica (Autofagia), se caracteriza por la vacuolización autofágica del citoplasma. La tipo 3 o muerte citoplasmática (Necrosis), se caracteriza por una desintegración general, con pérdida de los organelos. Algunos sugieren, que las distintas morfologías solo reflejan los distintos tipos celulares y distintos estímulos iniciales.

Leist *et al.* (2001) han propuesto un modelo descriptivo, el cual clasifica la muerte celular en 4 subclases según su morfología nuclear. La apoptosis (1) es definida por una cromatina condensada en figuras compactas, a menudo globulares o con forma de media luna.

Levemente diferente es la MCP Apoptosis-símil (2), que se caracteriza por una cromatina condensada más laxamente. En contraste, la MCP necrosis-símil (3) no presenta condensación de la cromatina, sino que su apariencia va desde una cromatina agrupada a una con gránulos laxos, mientras que la necrosis (4) se caracteriza por el edema celular con ruptura de la membrana.

A pesar de los numerosos modelos propuestos y las numerosas vías moleculares estudiadas para categorizar las distintas formas de MCP, las definiciones son excluyentes y artificiales, ya que la sobreposición es un hecho común, como por ejemplo en la muerte neuronal inducida por isquemia, donde se ha demostrado la activación de marcadores de apoptosis y de necrosis al mismo tiempo (Hara *et al.* 2007), lo que muestra que más de un programa de muerte celular es activado por una misma noxa (elemento que actúa sobre el organismo afectando su salud). Esto ha llevado a pensar que el fenotipo dominante estará dado por la velocidad relativa del programa de muerte. Actualmente se busca comprender las vías moleculares utilizadas por los distintos programas y encontrar marcadores moleculares específicos para identificar cada tipo de muerte celular (De Toro 2006).

Debido a los numerosos modelos propuestos y la convergencia de vías de muerte celular, se formó un Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) que propuso un criterio unificado para definir y describir el tipo de muerte celular, el cual publicó en el 2005 (Kroemer *et al.* 2005), y mismo que fue revisado y actualizado en el 2009 (Kroemer *et al.* 2009). Respetando el criterio de NCCD, a continuación se definen algunos tipos de muerte celular.

III.3.1 Tipos de Muerte Celular

III.3.1.1 Apoptosis

Apoptosis es un tipo de muerte celular que se acompaña de una reducción del volumen celular (picnosis), con retracción de los seudópodos (si los hay), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (cariorexis), con escasos o nulos cambios ultraestructurales en los orgánulos citoplasmáticos, y la presencia de burbujas en la membrana plasmática (sin la pérdida de su integridad hasta que el proceso llega a las últimas fases del proceso de muerte). El término apoptosis debe aplicarse exclusivamente a eventos de muerte celular que ocurren mientras se manifiestan varias de las características morfológicas que acompañan a este

proceso. La fragmentación del ADN es utilizada con frecuencia como coadyuvante para definir apoptosis, pero la apoptosis puede ocurrir sin la fragmentación oligonucleosomal e incluso sin la activación de caspasas, aunque esta última activación puede ser necesaria para obtener la morfología apoptótica (Kroemer *et al.* 2005, De Toro 2006, Kroemer *et al.* 2009).

III.3.1.2 Autofagia

La palabra autofagia deriva del griego comer (fagia) uno mismo (auto), o sea auto digestión. Este es un proceso altamente conservado en la evolución, que ocurre en virtualmente todas las células eucariotas, desde las levaduras a los mamíferos, como parte de su desarrollo normal (Klionsky 2005). Es un proceso en el cual citoplasma y orgánulos son secuestrados en vesículas con membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y reciclaje de macromoléculas. Así como el recambio proteico esta mediada por ubiquitinación y degradación por el proteosoma, el recambio de grandes proteínas y orgánulos, es atribuido parcialmente a la autofagia (Shintani *et al.* 2004). Solo en los últimos años se ha empezado a comprender su bioquímica mediante el estudio en levaduras, identificándose los genes relacionados a este evento (AuTophagy-related genes o ATG) (Kroemer *et al.* 2005, De Toro 2006, Kroemer *et al.* 2009).

A nivel de membrana, existen moléculas que actúan como sensores del medio extracelular, activando vías reguladoras intracelulares. Uno de estos sensores es la proteína blanco de rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) (Kamada *et al.* 2004), la cual inhibe la autofagia en un medio rico en nutrientes. La autofagia también tiene funciones homeostáticas y de biosíntesis, por ejemplo en condiciones en las cuales los peroxisomas no son necesitados, son degradados a través de un tipo específico de autofagia denominado pexofagia (Iwata *et al.* 2006).

III.3.1.3 Necrosis y Necroptosis

La necrosis o necroptosis es un tipo de muerte celular sin signos de apoptosis o autofagia. La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos. Entre ellos hay sinergia, ya que la alteración de

uno produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cuál ocurre primero (Kroemer *et al.* 2005, De Toro 2006, Kroemer *et al.* 2009).

Recientemente han aparecido indicios de otra ruta necrótica regulable (Degterev *et al.* 2005). En la muerte celular estimulada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), con una inhibición previa de caspasas, la muerte celular no es evitada, pero adquiere una morfología necrótica, siendo denominada necroptosis. (Kroemer *et al.* 2005, De Toro 2006, Kroemer *et al.* 2009).

III.3.1.4 Piroptosis

La piroptosis es una ruta de muerte celular dependiente únicamente de la caspasa-1. Esta caspasa no está involucrada en la muerte celular apoptótica y su función es procesar los precursores de las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-18, activándolos (De Toro 2006). Esta activación de la caspasa-1 lleva a la fragmentación del ADN y a la lisis celular, ambas por vías diferentes. La fragmentación del ADN es realizada por una nucleasa activada por caspasa-1 que no involucra la degradación del inhibidor de deoxiribonucleas activada por caspasas (ICAD, por sus siglas en inglés), que junto al reordenamiento del citoesqueleto de actina, son eventos requeridos para la formación de poros de membrana. En consecuencia, la disipación de los gradientes iónicos celulares lleva a un flujo de agua, con tumefacción celular y lisis osmótica, liberando las citocinas activadas por la caspasa-1 (Sperandio *et al.* 2000). Para algunos investigadores la piroptosis no es más que una muerte de tipo necrótica dependiente de la caspasa-1 (De Toro 2006).

III.3.1.5 Paraptosis

La paraptosis ha sido recientemente caracterizada como la vacuolización citoplasmática asociada con el aumento del volumen mitocondrial y del retículo endoplasmático (Sperandio *et al.* 2004), el cual no responde a la inhibición de las caspasas y no existe formación de cuerpos apoptóticos u otras características morfológicas de ésta. Es mediada por la proteína cinasa activada por mitógenos (MAKP) (Russel *et al.* 1986, Wang *et al.* 2004). Es posible inhibir la paraptosis por medio de la proteína AIP1/Alix, que interactúa con otra relacionada a muerte, ligante de calcio denominada ALG-2, sugiriendo que este tipo de muerte es totalmente distinta de la apoptosis. Hasta el momento existen pocos reportes

relacionados con la paraptosis, en comparación con los otros tipos de MCP, por lo que su bioquímica y regulación son aún desconocidas (De Toro 2006).

III.3.1.6 Catástrofe Mitótica

La catástrofe mitótica es una forma de muerte celular que resulta de una mitosis anormal, formándose células con múltiples micronúcleos y cromatina no condensada (Roninson *et al.* 2001). Se produce por fallas en los sistemas de verificación del ciclo celular, ya que fallan en detener la mitosis antes o durante el proceso, permitiendo una segregación aberrante de los cromosomas, lo que determina la activación de una apoptosis defectuosa y la muerte celular (Castedo *et al.* 2004). Es posible distinguir dos subtipos: primero, la catástrofe mitótica puede llevar a la muerte celular durante o muy cercano a la metafase, de manera independiente de p53, y el segundo ocurre cuando la mitosis ha fallado y se activa el punto de verificación de poliploidía (Kroemer *et al.* 2005, De Toro 2006, Kroemer *et al.* 2009).

III.3.1.7 Mitoptosis

La mitoptosis es el suicidio de las mitocondrias debido a sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se postula que es la manera que tienen las células para deshacerse de las mitocondrias cuando existe un gran daño (De Toro 2006). El mecanismo consiste en la sobreproducción de ROS, lo que lleva a la disipación de la diferencia de voltaje, con lo que se detiene el transporte proteico mitocondrial dependiente de voltaje, que conduce a la destrucción de la mitocondria (Lum *et al.* 2005). Además, se produce la degradación del ADN mitocondrial inducido por ROS (De Toro 2006).

Una masiva mitoptosis desencadena una MCP por liberación masiva de proteínas mitocondriales, y el bloqueo de la vía apoptótica ha demostrado que las células siguen produciendo energía a través de la autofagia de sus propias mitocondrias (Lum *et al.* 2005). Es por esto que la mitoptosis más parece un paso dentro la apoptosis.

III.4 Características del eIF3

El factor “eIF3” es un complejo proteico con una masa aproximada a los 700 kDa. En mamíferos consta de hasta 13 subunidades no idénticas que varían de tamaño, desde 28 hasta

170 kDa, y son denominadas como: eIF3a (p170), eIF3b (p116), eIF3c (p110), eIF3d (p66), eIF3e (p48), eIF3f (p47), eIF3g (p44), eIF3h (p40), eIF3i (p36), eIF3j (p35), eIF3k (p35), eIF3l (p28), eIF3m (GA17) (Burks *et al.* 2001). Como se mencionó anteriormente, eIF3 interviene en la disociación del ribosoma funcional 80S, en las subunidades 40 y 60S, se une a la subunidad menor del ribosoma en ausencia de otros factores; estimula la unión del complejo ternario al ARNm y a la subunidad ribosomal 40S. Asimismo, eIF3 es de gran importancia para la restauración del ribosoma funcional 80S en el codon 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, las cuales, en un principio se denominaron de acuerdo al peso molecular como; p110, p90, p93, p33, y p39; estas subunidades son homólogas a las proteínas p170, p116, p110, p44 y p36 respectivamente del eIF3 de mamíferos (Asano *et al.* 1997, Akiyoshi 2001) y recientemente se cambió su denominación a: eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i (Browning *et al.* 2001). Se propone que estas cinco subunidades 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 *et al.* (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.

III.5 eIF3f

El gen eIF3f (p47) es un gen antiguo y monogénico en la mayoría de las especies, y su organización génica varía. Por ejemplo, el gen eIF3f de levadura de fisión no contiene intrones; en nemátodos lo conforma 4 exones; el de insectos 3 exones; el de plantas 6 exones y en mamíferos esta organizado en 8 exones distribuidos en aproximadamente 9 kilobases (Hernández-Soto 2005).

El gen eIF3f 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) en el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind *et al.* 1998). Así también, la característica particular de cada proteína la determinaría su extremo carboxilo terminal.

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro*, muestran que eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica (Higareda *et al.* 2003, Shi *et al.* 2003), 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 multiproteico. 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 interacción 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 proteica. 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 *et al.* (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 prolina y alaninas (dominio poly PA). Aunque aun 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.* 2003). Por otro lado, existe evidencia de que el sobre-expresar al gen eIF3f afecta al crecimiento celular e induce apoptosis, como fue reportado por Shi *et al.* (2006) en la línea celular A375 y por Llanderal-Mendoza (2003) en células de tabaco TBV-2. Se ha descrito que eIF3f se poli-ubiquitina 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 gen eIF3f estén relacionadas al crecimiento y la división celular debido a que en células de tabaco TBV-2 la expresión transcripcional del gen eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular (Higareda *et al.* 2003, Llanderal-Mendoza 2003).

Con estos antecedentes, nos preguntamos si la expresión del gen eIF3f humano está relacionada al ciclo celular y si su silenciamiento o sobre-expresión desregula la proliferación celular de células de cáncer pulmonar humano (A549).

III.6 Justificación

Los antecedentes de eIF3f sugieren que es una proteína polifuncional e importante en el proceso de síntesis de proteínas y en la proliferación celular, por lo que el conocimiento de su función(es) molecular y celular, así como de su regulación génica, nos permitiría profundizar en el entendimiento de aquellos factores que intervienen o controlan a estos dos eventos fundamentales a la célula. El silenciamiento de la expresión del gen eIF3f nos hablaría de su esencialidad y nos daría información precisa acerca de la respuesta celular ante este insulto celular. Esta información nos diría si eIF3f es viable como blanco terapéutico en terapia génica contra padecimientos como el cáncer. De la misma manera, su sobre-expresión nos diría si su presencia y abundancia durante el ciclo celular es una condicionante para la progresión del mismo.

IV. HIPÓTESIS

La expresión del gen eIF3f es dependiente del ciclo celular y su desregulación afecta la proliferación de la línea celular humana de adenocarcinoma pulmonar A549.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión del gen eIF3f humano está relacionada al ciclo celular y, de ser así, si un cambio en el nivel y/o perfil de expresión afecta la proliferación de la línea celular humana de adenocarcinoma pulmonar A549.

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si la expresión del gen eIF3f está relacionada con la proliferación de células A549.
- Determinar el perfil de expresión del gen eIF3f durante las distintas fases del ciclo celular.
- Evaluar el efecto de la expresión ectópica del gen eIF3f sobre la proliferación de células A549.
- Evaluar el efecto del silenciamiento del gen eIF3f sobre la proliferación de células A549.

VI. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Cell Division

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability

Cell Division 2010, **5**:10 doi:10.1186/1747-1028-5-10

Ana E Higareda-Mendoza (higareda@umich.mx)
Marco A Pardo-Galvan (mapardo@umich.mx)

ISSN 1747-1028

Article type Research

Submission date 22 October 2009

Acceptance date 13 May 2010

Publication date 13 May 2010

Article URL <http://www.celldiv.com/content/5/1/10>

This peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Cell Division* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Cell Division* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.celldiv.com/info/instructions/>

For information about other BioMed Central publications go to

<http://www.biomedcentral.com/>

Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability

Ana E Higareda-Mendoza¹, Marco A Pardo-Galván^{2§}

¹División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr.

Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia,

Michoacán, México

²Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Químico-

Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán,

México

§Corresponding author

Email addresses:

AEHM: higareda@umich.mx

MAPG: mapardo@umich.mx

Abstract

Background

Transcriptional and postranslational regulation of the cell cycle has been widely studied. However, there is scarce knowledge concerning translational control of this process. Several mammalian eukaryotic initiation factors (eIFs) seem to be implicated in controlling cell proliferation. In this work, we investigated if the human eIF3f expression and function is cell cycle related.

Results

The human eIF3f expression has been found to be upregulated in growth-stimulated A549 cells and downregulated in G0. Western blot analysis and eIF3f promoter-luciferase fusions revealed that eIF3f expression peaks twice in the cell cycle: in the S and the M phases. Deregulation of eIF3f expression negatively affects cell viability and induces apoptosis.

Conclusions

The expression pattern of human eIF3f during the cell cycle confirms that this gene is cell division related. The fact that eIF3f expression peaks in two cell cycle phases raises the possibility that this gene may exert a differential function in the S and M phases. Our results strongly suggest that eIF3f is essential for cell proliferation.

Background

The initiation of translation in eukaryotes is a complex and multi-step process involving many translation initiation factors (eIFs). It is the rate-limiting and a major regulation step of mRNA translation. Translation initiation factor 3 (eIF3) is the largest of these factors and is involved in a number of different aspects of the initiation phase. eIF3 forms a stable complex with the 40S ribosomal subunit, which prevents premature association with the 60S subunit, binds the ternary complex eIF2-

GTP-Met-tRNA to the 40S subunit [1] and promotes mRNA binding through interactions with the eIF4G subunit of the cap binding complex. Mammalian eIF3 has been purified [2] and consists of at least 13 non-identical subunits with molecular masses ranging from 35 to 170 kDa [3, 4], but their individual functions have not been determined. The eIF3 subunit composition varies according to the organism, the simplest eIF3 subunit conformation (six subunits) [5], being identified in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and the highest in humans (thirteen subunits from eIF3a to eIF3m) [6]. It has been shown that purified eIF3 complex from *S. cerevisiae* containing five subunits (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g and eIF3i) can replace mammalian eIF3 in an in vitro assay for initiation [7]. This indicates a strong conservation of function of these subunits in eukaryotes, which form an active “core”, with additional subunits that vary according to the organism, which may or may not be present in other eukaryotic eIF3s. For instance, eIF3j is present in mammals and yeast, but is lacking in plants [5]; eIF3d, eIF3e, eIF3f and eIF3h are present in mammals, plants and in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, but is absent in *S. cerevisiae*. It is proposed that distinct subclasses of eIF3 complexes, containing different combinations of core and non-core subunits, may regulate the translation of specific subsets of mRNAs [8]; as well as other suggested eIF3 activities [9].

eIF3f is a member of the Mov34 family. Members of this family contain an Mpr1/Pad N-terminal (MPN) motif and are involved in different cellular processes such as translation, transcription and proteasome regulation [10]. Although the role of eIF3f in the eIF3 complex has not been defined, shut-off experiments in *Schizosaccharomyces pombe* showed that in a long-term period, eIF3f is essential for viability, and that depleting this gene markedly decreases global protein synthesis. [8]. It has also been suggested that eIF3f might be involved in muscle cell size [11]. *In*

in vitro studies using rabbit reticulocyte translation system indicate that in mammalian cells eIF3f is a negative regulator of translation [12, 13]. Ectopic expression of this gene inhibits translation and overall cell protein synthesis in human A375 cells [13]. Shi *et al.* [13] also report that eIF3f is downregulated in several human tumours, and that its overexpression inhibited cell proliferation in melanoma and pancreatic cancer cells, inducing them to enter apoptosis.

Together, these previous findings suggest that eIF3f may be involved in the regulation of cell growth and proliferation. In the present study, we investigated the role of human eIF3f in cell cycle control. We report that eIF3f expression is related to A549 dividing cells and, that the expression profile of eIF3f during cell cycle is biphasic with one maximum expression peak in the early S phase and a second during mitosis. We show that eIF3f is essential for cell proliferation and its absence induces the cell to enter apoptosis.

Results

Human eIF3f expression is cell growth related

Modulation of serum concentration in cell culture media is a method that has been widely used to study regulatory mechanisms that control cell proliferation, which depends on microenvironmental signals such as the concentration of growth factors [14]. To induce cells to enter a non-dividing state (G0) by serum deprivation, A549 cells were grown according to Tzen *et al.* [14]. eIF3f protein abundance was determined by a Western blot experiment using a rabbit anti-eIF3f polyclonal antibody. Results are presented in Figure 1A (see additional file 1: Original Western blots for the data used in Figure 1A). As shown, eIF3f protein increased over two-fold in serum stimulated cells when compared to G0 cells. To confirm this data, G0 and serum stimulated cells were transiently transfected with a plasmid containing a

luciferase reporter gene driven by the first kilobase of the human active eIF3f promoter (see section below). Results of three independent assays in serum-stimulated cells showed that luciferase activity increased in the same extent as that of the eIF3f protein when compared to G0 cells (Figure 1B). These results confirm that, in A549 cells, eIF3f expression is related to cell growth.

A second eIF3f copy is present in human chromosome 2 and it is not transcriptionally active in A549 and 293-H human cells

Kojima and Okada [15] identified several potential 5'-inverted retrocopies, including eIF3f, and suggest that mRNA retrotransposition coupled with 5' inversion may be a mechanism to generate new genes distinct from parental genes. The human genome contains two complete coding sequences for eIF3f: one is located at chromosome 11 and contains 7 introns, and chromosome 2 contains a second intronless copy. There is a 97% identity between both coding sequences, which makes it difficult to differentiate between both putative mRNAs. Since the presence or abundance of eIF3f protein is an important parameter in the present study, we investigated which of these (or both) sequences are transcriptionally active, because of their probable contribution in overall eIF3f protein content. One kilobase upstream of the putative translation initiation site of each coding sequence was fused to the promoterless luciferase gene of pGL3 vector. A549 and 293-H cells were transfected with the above-mentioned genetic constructs and with the empty vector pGL3 as control, and luciferase activity was determined. The results of this experiment, shown in Figure 2, clearly demonstrate that the promoter of the chromosome 11 intron-containing eIF3f coding sequence is transcriptionally active in both cell lines, and that the promoter of the intronless coding sequence is not active in either one of them. We consider this approach as being the most direct method to determine promoter activity, since luciferase activity is highly sensitive and there is no endogenous luciferase activity.

Human eIF3f expression oscillates during cell cycle

Once demonstrated that eIF3f expression is related to proliferation in A549 cells, we investigated its expression profile during the cell cycle. To evaluate eIF3f expression during the cell division process, eIF3f mRNA and protein abundance were determined at different cell cycle phases. A549 cells were synchronized with hydroxyurea (HU). eIF3f protein abundance for each sample was determined by Western blotting (Figure 3A,B). As shown in Figure 3 (see additional file 2: Original Western blots for the data used in Figure 3A, additional file 3: Original Western blots for the data used in Figure 3B, and additional file 4: Original Western blots for the Cyclin B1 data used in Figure 3B), eIF3f protein level peaks twice during the cell cycle: in the early S phase, and in Mitosis. Furthermore, eIF3f mRNA abundance during cell cycle progression was also determined for each sample by Northern blotting (Figure 3C,D) (see additional file 5: Original Northern blots for the data used in Figure 3C, and additional file 6: Original Northern blots for the data used in Figure 3D). These mRNA results show a similar expression pattern as in protein, peaking twice in the G2/M and G1/S transition cell cycle phases. To confirm these results, we evaluated eIF3f gene expression measuring its promoter activity in serum-starved G0 phase, with HU (S phase) and with nocodazole (M phase) treated cells (Figure 4A). Analysis of cell cycle distribution for each pharmacological agent used to arrest cells in the different cycle states is indicated in Figure 4B. Micrographs of mitotic and interphase cells are also represented to clearly distinguish between mitotic and non-mitotic cells using DAPI staining. Evidently, eIF3f promoter activity is upregulated during both cell cycle phases. This result strongly supports the possibility that the eIF3f function or functions are related to cell division.

eIF3f overexpression affects cell viability in alveolar A549 cancer cells and induces apoptosis

We investigated the effect of eIF3f overexpression on alveolar adenocarcinoma cells, by transiently transfecting A549 cells with pFH11S containing a complete eIF3f cDNA, or with empty pMSG vector as control, and monitored its effect on cell viability. eIF3f overexpression was confirmed by Western blot analysis (Figure 5A) (see additional file 7: Original Western blots for the data used in Figure 5A). Cells overexpressing eIF3f show reduced viability (Figure 5B) (see additional file 8: Amplified micrographs for the data used in Figure 5B) and induction of apoptosis (Figure 5C).

Endogenous eIF3f silencing by antisense RNA or siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis in A549 cancer cells

To determine if eIF3f has a role on cell viability, A549 cells were transiently transfected with pFH11A (antisense), or with empty pMSG vector. eIF3f protein level was reduced in the antisense transfected cells with respect to the control as shown in (Figure 6A) (see additional file 9: Original Western blots for the data used in Figure 6A and B). The same effect was observed in siRNA treated cells (Figure 6B) (see additional file 10: Amplified micrographs for the data used in Figure 6C). Cell growth was monitored and, as shown, silencing eIF3f either by antisense or by siRNA significantly decreased cell viability (Figure 6C). Afterwards, using acridine orange and ethidium bromide staining and fluorescence microscopy, we investigated whether the decrease in cell viability by silencing eIF3f is associated with increased apoptosis. We observed significantly increased apoptosis in cells transfected with antisense-eIF3f or siRNA-eIF3f (Figure 6D). These results show that eIF3f silencing affects cell viability and induces apoptosis in A549 cells.

Discussion

Proper execution of the cell cycle requires the expression and activation of key proteins at specific times. Transcriptional regulation and post-translational modifications, such as phosphorylation and proteolysis, are important for cell-cycle progression and have been studied extensively. However, much less is known about cell-cycle-specific translational control. Nevertheless, important data has been obtained involving initiation of translation, the rate limiting step of the process, in the control of cell proliferation. Expression of eIF4E is commonly elevated in many human cancers and, frequently, it induces cellular transformation, tumorigenesis and metastasis [16, 17] selectively enhancing the translation of mRNAs of potent growth regulatory proteins such as Cyclin D [18].

Several investigations strongly suggest that eIF3 subunits are involved in cell cycle regulation [19]. For example, elevated expression of eIF3a might be associated with oncogenesis in some cancers, and it is possibly implicated in regulating the expression of ribonucleotide reductase [19] and p27 protein [20]. Downregulating the expression of eIF3e by RNAi inhibited mitosis in HeLa cells [21]. Also, it has been reported that eIF3k binds to Cyclin D3, a member of the Cyclin D family that mediates G1 phase progression [22].

Although eIF3f has been implicated in cell proliferation its role in this process has not been elucidated. In the present work we report that the deregulation of the expression of eIF3f markedly affects cell proliferation. eIF3f overexpressing in A549 cells show a significantly increase in apoptosis compared to those transfected with the vector alone (Figure 5). This result is in agreement with that found in melanoma and pancreatic cancer cells [13]. Downregulation of eIF3f expression by antisense-eIF3f markedly increased apoptosis in A549 cells (Figure 6A). To confirm that result, we decided to transfect A549 cells with siRNA-eIF3f as a different and independent

experimental strategy. The results of this experiment were similar to those obtained by antisense-eIF3f (Figure 6B). These results clearly show that eIF3f is essential for the viability of A549 lung adenocarcinoma cells and that silencing of this gene promotes apoptosis; in agreement with this result, we found that downregulation of eIF3f expression in plant cells also induced apoptosis (unpublished data). Our data show that deregulation of eIF3f in A549 cells induce apoptosis by means of a caspase-9 independent pathway (data not shown). Similarly, Shi et al. [13] report that eIF3f overexpression in melanoma and pancreatic cancer cells induce apoptosis through a caspase-3 independent pathway. The fact that both knocking down and ectopically overexpressing eIF3f suppressed cell proliferation and induced apoptosis, suggests that deregulation of eIF3f expression is not tolerated by the cell. This may be explained by the specific expression seen during cell cycle progression. Since the cell cycle progression implies a coordinated and controlled series of events, the increase or decrease in eIF3f expression may affect the coordination of events specific to a cell cycle phase, where it is needed as a negative regulator of translation or required to be absent.

To determine if eIF3f is associated to cell division, we investigated whether there was a difference in eIF3f expression between dividing and G0/G1 arrested cells. A significantly decrease in eIF3f protein was found in G0 cells (Figure 1A), and this result was corroborated measuring eIF3f-promotor activity (Figure 1B). Clearly, eIF3f expression is associated with cell division. Recently, it was reported that eIF3a expression is cell growth-related, unlike the core subunit eIF3b and the non-core subunit eIF3d [23]. Interestingly, eIF3a expression increases during growth in NIH3T cells, in a similar extent as does eIF3f in A549 cells.

We investigated the relationship between eIF3f expression and cell cycle progression. We measured human eIF3f protein abundance and eIF3f promoter activity profile through different cell cycle phases in synchronized A549 cells, as shown in Figure 3. Surprisingly, eIF3f expression oscillates during the cell cycle following a biphasic profile, with one peak in the S phase and another one in the M phase. Recently, it was shown that eIF3a expression peaks in S phase in NIH3T cells [23]. Biphasic translation at G1/S and G2/M is observed in ornithine decarboxylase in HeLa cells [24]. In this case, ornithine decarboxylase mRNA peaks only at G1/S, so at G2/M the control of expression is exerted at the translational level. In fission yeast (*S. pombe*) and plant cells (tobacco BY2 cell line), eIF3f expression peaks once during the cell cycle in the G2 and M phases, respectively (unpublished data), which suggests that the M phase expression peak in human A549 cells represents the original eIF3f function common to eukaryotes, and that the S phase peak in human cells was later acquired. It remains to be elucidated if eIF3f has the same function in both cell cycle phases, as well as if other eIF3 subunits are growth and cell cycle related in A549 cells and in other cell types. Several studies show that eIF3f inhibits protein synthesis [8, 13]. Although the inhibitory effect of eIF3f on translation is robust, it is not a total protein synthesis inhibition: it diminishes protein synthesis by 60-70%, remaining a 30-40%. Our interpretation is that eIF3f is not an inhibitor, but a translational modulator that selects mRNAs at specific cell cycle phase timepoints. This observation is supported by previous studies where *Arabidopsis thaliana* translation initiation factor subunit eIF3h apparently selects specific mRNAs through 5' mRNA leader sequences [25], and *S. pombe* non-core subunits eIF3m and eIF3e define distinct translation initiation factor 3 complexes, translating different sets of mRNAs [8]. Fan and Penman [26] report that protein synthesis is greatly inhibited in the G2/M

and M phase in mammalian cells; in this work we report that eIF3f is expressed in the M phase of the cell cycle, so it is reasonable to suggest that eIF3f contributes to this protein synthesis inhibition observed in the M phase. We speculate that if eIF3f is a protein synthesis modulator, then mRNAs that should not be translated during M cell cycle phase are selected and transcribed during endogenous eIF3f knock down, contributing to apoptosis induction.

Finally, the human genome contains two complete eIF3f gene sequences, one with 7 introns and another one with no introns. The human intron-containing sequence has a similar genetic organization as that in most organisms (data not shown), while the intronless one has characteristics of a retrocopy [15, 27]; both sequences having a 97% identity between them. Retroduplication is commonly thought to generate nonfunctional gene copies, because they are expected to lack regulatory elements that could promote retrocopy transcription. However, different studies have shown that transcription of retrocopies may not be rare [27, 28, 29]. Because there is a second eIF3f expression peak in A549 cells, it was important to know if one or both eIF3f copies were expressed. As Figure 2 shows, when two different human cell lines, A549 and 293-H, were transfected with either copy's promotor, only that of the intron-containing copy of eIF3f was transcriptionally active: thus, the intronless copy is most likely a retropseudogene.

Conclusions

In this work we provide evidence that relates translation with control of the cell cycle through eIF3f expression and function. eIF3f function is related to the mitotic phase in human A549 cells, and is essential for cell viability. eIF3f abundance peaks in the S phase in human A549 cells and this increase seems not to be related to the presence of

an intronless eIF3f copy, but to regulatory elements of the chromosome 11 eIF3f gene promoter.

Methods

Materials

Monoclonal antibodies against tubulin and caspase-9 were from Sigma Aldrich (ST. Louis, MO) and Upstate (Lake Placid, NY), respectively. Rabbit polyclonal antibody against eIF3f was obtained from Global Peptide Services, LLC (Fort Collins, CO) and later from Biologend (San Diego, CA). Mouse anti-Cyclin B1 monoclonal antibody and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). The pBluescript SK(-) vector is from Stratagene (La Jolla , CA). The pGEM-T Easy and pGL3 basic plasmids, restriction enzymes, DNA and RNA molecular weight markers, and RNA polymerases were from Promega (Madison, WI). The pMSG vector, GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit, Protease Inhibitor Mix, protein molecular weight markers, Hybond-P PVDF Membrane, Amersham Hybond™-N+, and the Enhanced Chemiluminescence (ECL) system for Western blot analysis were from GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ). 293-H cell line, 293 SFM II medium, synthesized primers, the pSL301 vector, LipofectAMINE 2000, TRIzol®, and Quant-iT™ RiboGreen RNA Assay Kit were from Invitrogen (Carlsbad, CA). DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), DIG Luminescent Detection Kit and Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film were from Roche (Indianapolis, IN). All other reagents were of molecular biology grade and obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO).

Cell culture

A549 cells, a human lung adenocarcinoma epithelial line, were obtained from ATCC (designation CCL-185) and used for all experiments. The cells were cultured in MEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. A549 cells are adherent and grow with a doubling time of approximately 22 hours. 293-H cells, clonal isolates derived from transformed embryonal human kidney cells, were cultured in suspension with 293 SFM II medium supplemented with 2 mM L-glutamine at 37°C in a humidified atmosphere with 8% CO₂. A549 and 293-H cells were routinely passaged twice per week to maintain them in a logarithmic growth phase.

Plasmid constructs

The pGL3 basic plasmid was used as the luciferase reporter expression vector, where different fragments of the human eIF3f promoter gene were introduced. Fragments were amplified by PCR from A549 genomic DNA, extracted with the GenomicPrep Kit. For the intron-containing gene [Locus NP_003745], mapped on chromosome 11p15.4, we used the 11:7947867-11:7948866 fragment to generate a plasmid, called pF11P1K, that encompasses 1 kb of genomic DNA corresponding to the promoter (Forward Primer: ACATAGTGATAAAAGCTTTGACTTAATAAC, Reverse Primer: GCCGGTGTGGCAAGCTTGTGCGAGAAAGAAGG). For the intronless copy [NCBI removed record XM_290345], mapped on chromosome 2p16.1, we used the 2:58331072-2:58332078 fragment to generate a plasmid, called pF02P1K, that also encompasses 1 kb of genomic DNA corresponding to the promoter region of the eIF3f intronless copy (Forward Primer: TGTGGAGGATGTATTGAGCTAAAAC, Reverse Primer: TCTTGTGCGAGATCTAGCTTTACTTTCAAAC). The pMSG plasmid with the leaky inducible (dexamethasone) MMTV LTR promoter was used to generate eIF3f gene expression vector, called pFH11S, and eIF3f antisense vector,

called pFH11A. Total RNA was extracted from A549 cells with TRIzol, according to the manufacturer's instructions. eIF3f gene sequence [NCBI Entrez Gene 86652: Locus NP_003745] was amplified by RT-PCR using forward primer TTCTCGACAAGATGGCCACACCGGCG and reverse primer TCACAGGTTTACAAGTTTTTCATTGAG. Amplification product was subcloned in the pBluescript SK(-) vector (plasmid construct pSK11F) and orientated into the pMSG plasmid to generate the sense and antisense constructs. All constructs were verified by sequencing (Macrogen Corp, Rockville, MD). The verified antisense targeting sequence of eIF3f is 5'---

```
ttctcgacaagATGgccacaccggcggtaccagtaagtgtctctccggccacgccaacccagctcccggcgggcc  
ccagcctcagttccagcgccaacgccagcaccggctgcggtccgggtcccgtgcggtccagcctcatcctcagacc  
tgcggcagcagcggctgcaactgcggtcctggccagacccggcctcagcgaagctccagcgcagacccagcgc  
ccgctctgctgtctctcttccagggccctccccggcgccgcgtggcaggtgcaccagtcattttggcctccatt  
gtggacagctacgagagacgaacgaggggtgctgcccagttatcgggaccctgttgggaactgtcgacaaactcag  
tggaggtcaccattgctttcagtgccgcacaatgagtcagaagatgaagtggtgttgacatggaatttgtaagaatgt  
atgaactgcataaaaaagtttctccaaatgagctcatcctgggctggtacgctacgggcatgacatcacagagcactctgt  
gctgatccacgagtactacagccgagaggccccaacccatccacctactgtggacacaagtctccagaacggccgc  
atgagcatcaaagcctacgtcagcactttaatgggagtcctgggaggaccatgggagtgatgttcacgcctctgacagtg  
aaatacgcgtactacgacactgaacgcatcggagttgacctgatcatgaagacctgcttagcccaacagagtgattgga  
ctctcaagtgacttgcaagtaggaggggcatcagctcgatccaggatgccctgagtacagtggtgcaaatatgcagag  
gatgtactgtctgaaagggtcagctgacaatactgtggccgctcctgatgagcctggttaaccaagtaccgaaaatag  
tcccgatgactttgagacctgtcaacagcaacatcaatgaccttttgatggtgacctacctggccaacctcacacagtca  
cagattgactcaatgaaaaactgtaaacctgTGA---3'.
```

siRNA design and production

Design and production of siRNAs against eIF3f was carried out according to Kittler *et al.* [30]. Briefly, eIF3f sequence was analyzed in the DEQOR web-program [31] to select a 400 to 600 bp sequence for the design and quality control of siRNAs. The sequence from 529 to 1020 bp was amplified by PCR from the pFH11S vector using forward primer CATGACATCACAGAGCAC and reverse primer CAGGTAGGTCACCATCAA. The siRNA targeting sequence of eIF3f is 5'---
catgacatcacagagcactctgtgctgatccacgagtactacagccgagaggccccaacccatccacctcactgtgga
cacaagtctccagaacggccgcatgagcatcaaagcctacgtcagcactttaatgggagtcctgggaggaccatggga
gtgatgttcacgcctctgacagtgaaatacgcgtactacgacactgaacgcatcggagttgacctgatcatgaagacctgct
ttagccccaacagagtgattggactctcaagtgacttgcagcaagtagggggcatcagctcgcacccaggatgcctga
gtacagtgttgaatatgcagaggatgtactgtctggaaaggtgtcagctgacaatactgtgggccgcttctgatgacct
ggtaaccaagtaccgaaaatagttcccgatgactttgagacctgctcaacagcaacatcaatgacctttgatgtgacct
acctg---3'. The amplified sequence was cloned into the pGEM plasmid to generate the pF11SIR vector. dsRNA were obtained by *in vitro* transcription of the eIF3f fragment sequence with T7 and T3 RNA polymerases. siRNAs against eIF3f were obtained by digestion of dsRNA with RNase III, generating a mixture of siRNAs from 25 to 30 pb. Scrambled siRNAs were obtained by *in vitro* transcription of the MCS of vector pSL301 with SP6 and T7 RNA polymerases and further digestion with RNase III. siRNAs were cleaned with Q-sepharose columns.

Cell synchronization

Cells were accumulated in G0 by serum deprivation (0.1% FBS) for 48 hours [14]. Synchronization and accumulation of cells in M was achieved by adding 0.4 µg/mL of nocodazole to the culture media [32]. Synchronization in S phase was done by adding of 0.8 mM HU to the culture media [33]. After 24 hours of synchronization with HU or nocodazole, samples were processed to determine parameters in S or M phase,

respectively. For sample taking at specific timepoints, cells were washed 2 times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), another 2 times with MEM and refed with fresh medium. Cells were accumulated in G1 by releasing cells synchronized in M for 24 hours, washing twice with PBS and MEM, adding MEM and incubating for 4 hours. Cell synchrony was microscopically (LEICA DM IL FLUO, Wetzlar, Germany) assessed by determining the mitotic index on cells fixed with 1% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde for 5 min at room temperature [34], and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Each timepoint was assessed in triplicate, and at least 400 cells were scored in each sample. To confirm mitotic index, Cyclin B1 expression was determined by Western blot analysis at specific timepoints: from serum-starved cells (Q: quiescence), mitotic cells (M), proliferating asynchronous cells (A), and serum stimulated cells at 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19, 22 and 24 hours after HU release [35, 36, 37].

Northern-blot analysis

Total RNA was extracted from A549 cells with TRIzol, according to the manufacturer's instructions. The resulting RNA pellet was air-dried, resuspended in nuclease-free water, and treated with amplification-grade DNase I. RNA was quantified using a spectrophotometer (Jenway, Burlington, NJ); A260/280 readings between 1.8 and 2.0 were used to ensure purity. Total RNA was also quantified with a VersaFluor fluorometer (Bio-Rad, Hercules, CA) using Quant-iT™ RiboGreen RNA Assay Kit, according to the manufacturer's instructions. Agarose/formaldehyde denaturing gel electrophoresis, as described by Sambrook and Russel [34], was performed with 10 µg of total RNA, and intact 18S and 28S ribosomal RNA were verified. To compare the RNA loaded in each lane, 28S ribosomal RNA was quantified and used to normalize eIF3f mRNA data. For quantification purposes, 28S

ribosomal RNA densitometric measurements were performed using the Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 100 for Windows (Rochester, NY). An upward capillary transfer of RNA from the gel to a nylon membrane (Amersham Hybond™-N+) [34] was performed, and RNA was fixed on the membrane by baking 2 hours at 80 °C. According to the manufacturer's specifications, a complementary antisense single-stranded RNA probe of eIF3f was produced with the DIG RNA Labeling Kit (T7) using the plasmid construct pSK11F as the template: eIF3f cDNA subcloned in the pBluescript SK(-) vector in a antisense orientation with respect to the T7 RNA polymerase site. Prehybridization, RNA:RNA hybridization and high stringency post-hybridization washes of blots were performed according to the DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche). Hybridization bands were visualized by DIG Luminescent Detection Kit using Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film.

Western-blot analysis

For Western blot analysis, cells were scraped from dishes and cellular protein extracts were prepared by homogenization in ice cold lysis buffer (25 mM Tris pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4mM EGTA, 1% Triton X-100 and 1 mM DTT) containing a protease inhibitor mix. 15 µg of protein were separated per lane by 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. After electrophoretic transfer of proteins to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, eIF3f, Cyclin B1 or caspase-9 specific bands were detected by reaction with a rabbit antibody against eIF3f, a mouse antibody against caspase-9, followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody, respectively. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL). Immunoblots were stripped using mild antibody stripping solution and re-probed with a mouse anti-tubulin antibody. For quantification

purposes, densitometric measurements were performed using the Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 100 for Windows (Rochester, NY). All eIF3f values were normalized to tubulin levels.

Transient transfections

Transient transfections were performed using the cationic lipid, LipofectAMINE 2000, according to the manufacturer's specifications. All of these experiments were performed in 6-well tissue culture plates with cells plated to reach 60–70% confluence on the day of transfection. Nucleic acid concentration for transfections with constructed and empty plasmids (vector control) was 2 µg, and 3 µg for the siRNAs. Transfection times varied according to each experiment. Cells were harvested 8, 24 and 48 hours after transient transfection with siRNAs, eIF3f sense and antisense constructs, and control plasmids. For transfections with pMSG and derived constructs, 0.1 mM dexamethasone was added to the culture medium. For luciferase activity assays with cells in G1, cell cultures were transiently transfected with the promoter plasmid constructs for 20 hours, then arrested in M phase with nocodazole for 24 hours, and finally released from nocodazole to harvest cells 4 hours later (G1 cells). For luciferase activity assays with cells in M or S, first cell cultures were transiently transfected with the promoter plasmid constructs for 24 hours, then these cultures were arrested with nocodazole or hydroxyurea for 24 hours, to finally harvest transfected cells in M or S phase, respectively. To determine luciferase activity in G0, cell cultures were transiently transfected with the promoter plasmid constructs for 6 hours, and then cultures were accumulated in G0 by serum deprivation for 48 hours after which transfected cells were harvested for luciferase activity assays.

Luciferase activity assay

Promoter activity was determined by measuring the luciferase activities of cell lysates 48 hours after transfection with empty pGL3, pF11P1K or pF02P1K plasmids. Briefly, cells were lysed in ice cold lysis buffer (25 mM Tris pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4mM EGTA, 1% Triton X-100 and 1 mM DTT). Each clarified cell lysate was first assayed for total protein, using the Bio-Rad Protein Assay, according to the manufacture's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA). After adjusting samples for equivalent protein concentration in lysis buffer, samples were assayed for luciferase activity as described by Sambrook and Russel [34] with a Sirius Single Tube V3.1 Luminometer (Berthold, Huntsville, AL). Luciferase activity was normalized to the respective total cellular protein.

Determination of cell viability

Adherent cells were released from the plate with Trypsin-EDTA Solution (1X) and collected. Floating cells were also recovered and included with the formerly adherent cells for cell viability with the trypan blue exclusion method. Percent of cell viability was determined microscopically (LEICA DM IL, Wetzlar, Germany) by counting triplicate samples of 200 to 400 cells in a hemocytometer chamber.

Determination of apoptosis and necrosis

Adherent cells were washed twice with PBS and stained with a mixture of 4 µg/ml acridine orange and 4 µg/ml ethidium bromide in PBS [38] for 5 minutes. Cells were fixed with 1% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde for 5 min at room temperature [34] and visualized by epifluorescence microscopy (LEICA DM IL FLUO, Wetzlar, Germany) at a magnification of 40X. Viable (normal, green nuclei), early apoptotic (condensed, green nuclei), late apoptotic (condensed, red nuclei), and necrotic (normal, red nuclei) cells were counted. At least 400 cells were scored in triplicate for each sample.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. Results of multiple experiments are expressed as mean \pm standard error (SE). Analysis of Student's t test was used to assess the differences between means. A $P < 0.05$, with respect to control experiments, was accepted as statistically significant.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AEHM participated in the design of the study, carried out the molecular genetic and cellular studies, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. MAPG conceived the study and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Y.E. Guzmán-Infante, A. Mendoza-Pineda, D.A. Bolaños-Cornejo and A. Aguilera-Méndez for technical assistance. We would also like to thank S. Zárate for critically reading the manuscript. A.E. Higareda-Mendoza was a recipient of a CONACyT Doctoral Scholarship. This research was supported by CIC Research Programs 2.15 and 16.3 from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, and the Mixed Fund CONACyT-Government of the State of Michoacan MICH-2009-C05-116168.

References

1. Benne R, Hershey JW: **The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes.** *J Biol Chem* 1978, **253**:3078-3087.
2. Brown-Luedi ML, Meyer LJ, Milburn SC, Yau PM, Corbett S, Hershey JW: **Protein synthesis initiation factors from human HeLa cells and rabbit reticulocytes are similar: comparison of protein structure, activities, and immunochemical properties.** *Biochemistry* 1982, **21**:4202-4206.
3. Asano K, Kinzy TG, Merrick WC, Hershey JW: **Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3.** *J Biol Chem* 1997, **272**:1101-1109.
4. Sonenberg N, Hershey JWB: *Translational Control of Gene Expression*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY 2000, 33-88.
5. Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR, Browning KS: **Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit.** *J Biol Chem* 2001, **276**:2122-2131.
6. Dong Z, Zhang JT: **Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, **59**:169-180.
7. Phan L, Zhang X, Asano K, Anderson J, Vornlocher HP, Greenberg JR, Qin J, Hinnebusch AG: **Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5.** *Mol Cell Biol* 1998; **18**:4935-4946.

8. Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, Leatherwood J, Wolf DA: **PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes.** *BMC Biol* 2005, **3**:14.
9. Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, Bushell M, Doudna JA, Hershey JW: **The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro.** *J Biol Chem* 2004, **279**:8946-8956.
10. Aravind L, Ponting CP: **Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.** *Protein Sci* 1998, **7**:1250-1254.
11. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA: **The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy.** *EMBO J* 2008, **27**:1266-1276.
12. Higareda-Mendoza AE, Farias AE, Llanderal JM, Méndez AB, Pardo-Galvan MA: **A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition.** *Miami Nat Biotechnol Short Reports* 2003, **14**:111.
13. Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, Nelson MA: **Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells.** *Oncogene* 2006, **25**:4923-4936.
14. Tzen CY, Scott RE, Robinson FD: **Serum deprivation induces SV40 early promoter activity.** *Cell Prolif* 1997, **30**:53-60.
15. Kojima KK, Okada N: **mRNA Retrotransposition Coupled with 5' Inversion as a Possible Source of New Genes.** *Mol Biol Evol* 2009, **26**:1405-1420.

16. Zimmer SG, DeBenedetti A, Graff JR: **Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis.** *Anticancer Res* 2000, **20**:1343-1351.
17. Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, Lynch RL, Monteith D, Weir SN, Schwier P, Capen A, Goode RL, Dowless MS, Chen Y, Zhang H, Sissons S, Cox K, McNulty AM, Parsons SH, Wang T, Sams L, Geeganage S, Douglass LE, Neubauer BL, Dean NM, Blanchard K, Shou J, Stancato LF, Carter JH, Marcusson EG: **Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity.** *J Clin Invest* 2007, **117**:2638-2648.
18. Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, Schmidt EV: **Elevated levels of Cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:7358-7363.
19. Dong Z, Liu LH, Han B, Pincheira R, Zhang JT: **Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth.** *Oncogene* 2004, **23**:3790-3801.
20. Dong Z, Zhang JT: **EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:3942-3951.
21. Morris C, Jalinot P: **Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits Cyclin B-Cdk1 activation.** *Oncogene* 2005, **24**:1203-1211.
22. Shen X, Yang Y, Liu W, Sun M, Jiang J, Zong H, Gu J: **Identification of the p28 subunit of eukaryotic initiation factor 3(eIF3k) as a new interaction partner of Cyclin D3.** *FEBS Lett* 2004, **573**:139-146.

23. Dong Z, Liu Z, Cui P, Pincheira R, Yang Y, Liu J, Zhang JT: **Role of eIF3a in regulating cell cycle progression.** *Exp Cell Res* 2009, **315**:1889-1894.
24. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N: **A cell cycle-dependent internal ribosome entry site.** *Mol Cell* 2000, **5**:607-616.
25. Kim TH, Kim BH, Yahalom A, Chamovitz DA, von Arnim AG: **Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the Arabidopsis translation initiation factor subunit eIF3h.** *Plant Cell* 2004, **16**:3341-3356.
26. Fan H, Penman S: **Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis.** *J Mol Biol* 1970, **50**:655-670.
27. Deininger PL, Batzer MA: **Mammalian retroelements.** *Genome Res* 2002, **12**:1455-1465.
28. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H: **Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:3220-3225.
29. McCarrey JR, Thomas K: **Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene.** *Nature* 1987, **326**:501-505.
30. Kittler R, Heninger AK, Franke K, Habermann B, Buchholz F: **Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells.** *Nat Methods* 2005, **2**:779-784.
31. Henschel A, Buchholz F, Habermann B: **DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:W113-W120.

32. Sterner JM, Murata Y, Kim HG, Kennett SB, Templeton DJ, Horowitz JM: **Detection of a novel cell cycle-regulated kinase activity that associates with the amino terminus of the retinoblastoma protein in G2/M phases.** *J Biol Chem* 1995, **270**:9281-9288.
33. Jiang J, Matranga CB, Cai D, Latham VM Jr, Zhang X, Lowell AM, Martelli F, Shapiro GI: **Flavopiridol-induced apoptosis during S phase requires E2F-1 and inhibition of Cyclin A-dependent kinase activity.** *Cancer Res* 2003, **63**:7410-7422.
34. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001:7.31-7.45, 16.13, 17.42-17.47.
35. Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR: **E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription.** *EMBO J* 2004, **23**:4615-4626.
36. Cooper S, Paulsen M, Ljungman M, Vu-Phan D, Kim D, Gonzalez-Hernandez M: **Membrane-elution analysis of content of Cyclins A, B1, and E during the unperturbed mammalian cell cycle.** *Cell Div* 2007, **2**:28.
37. Frisa PS, Jacobberger JW: **Cell cycle-related Cyclin B1 quantification.** *PLoS One* 2009, **4**:e7064.
38. Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W: **Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **29**:562-570.

Figures

Figure 1 - Human eIF3f expression is cell growth related in A549 cells

A) Western blot (WB) analysis of eIF3f expression in quiescent A549 cells (G0) and proliferating asynchronous cultures (A). Tubulin WB is shown to document equal protein loading. B) Promoter activity of the upstream sequences of eIF3f by promoter driven luciferase activity in quiescent A549 cells (G0) and proliferating asynchronous cultures (A). Luciferase activity with the empty vector pGL3 was below 10 RLU/ μ g of protein. Data expressed as mean \pm SE; * $p < 0.01$ with respect to G0, $n \geq 3$.

Figure 2 - Transcriptional activity of human eIF3f gene

Promoter activity of the upstream sequence of eIF3f copy in chromosomes 2 is transcriptionally inactive in both 293-H and A549 asynchronous cultures, as exhibited by luciferase activity; in contrast, the eIF3f gene in chromosome 11 is active. Luciferase activity with the empty vector pGL3 was below 10 RLU/ μ g of protein. Data expressed as mean \pm SE; * $p < 0.01$ with respect to control (pGL3), $n \geq 3$.

Figure 3 - Human eIF3f expression profile in A549 cells throughout the cell cycle

A) Expression of eIF3f protein (relative intensity units normalized with tubulin, panel B of this Figure), and mitotic index (% , verified with Cyclin B1 expression shown in panel B of this Figure) in a 24 hour cell cycle in A549 cells after HU release (t = 0 h). B) WB analysis of eIF3f (top), tubulin (middle), and Cyclin B1 (bottom) along the 24 h cell cycle. All proteins visualized by their respective specific antibodies. Only some of the timepoints represented in panel A are shown in panel B. The same membrane was used for eIF3f and tubulin blots. A second membrane was used for Cyclin B1, where protein concentration load was verified by another tubulin blot (not shown). C) Expression of eIF3f mRNA (relative intensity units normalized with 28S ribosomal RNA), and mitotic index (%) in a 24 hour cell cycle in A549 cells after HU release (t

= 0 h). D) Northern blot analysis of eIF3f mRNA (top) and 28S ribosomal RNA (bottom) along the 24 h cell cycle. Only some of the timepoints represented in panel C are shown in panel D.

Figure 4 - Promoter activity of the upstream sequence of functional eIF3f in quiescent A549 cells (G0), M, G1, and S synchronous cultures

A) Cell cultures in G0, M or S were transiently transfected with the promoter plasmid constructs and harvested 48 (for M and S cells) or 54 (for G0 cells) hours after transfection for luciferase activity assays. For cells in G1, cell cultures were transiently transfected with the promoter plasmid constructs for 20 hours, then arrested in M phase with nocodazole for 24 hours, and finally released from nocodazole to harvest cells 4 hours later for luciferase activity assays in G1. Luciferase activity with the empty vector pGL3 was below 10 RLU/ μ g of protein. Data expressed as mean \pm SE; * $p < 0.01$ with respect to control (pGL3), $n \geq 3$. B) Cell cycle distribution for nocodazole, HU and serum deprivation after release from arrest in M, S and G0, respectively. Cells were stained with DAPI at different timepoints to assess mitotic index. Micrographs of mitotic and interphase A549 cells are shown (top) at a magnification of 264X.

Figure 5 - Ectopic expression of human eIF3f in A549 cells

A) WB analysis of eIF3f expression in transfected pMSG (control) and pFH11S (ectopic expression) A549 cultures. Tubulin WB is shown to document equal protein loading. B) Difference in cell growth in control and overexpressed eIF3f cultures after 24 and 48 hours of transfection. Timepoint zero represents cells before transfection. Cells were stained with acridine orange and ethidium bromide to visualize cell morphology and death by necrosis or apoptosis. Final magnification: 40X. C) Percent of apoptosis in control (water and pMSG) and overexpressed eIF3f (pFH11S) transfected cells, estimated from cell counts in microscopic fields similar to those

shown in panel B. Data expressed as mean \pm SE; * $p < 0.01$ with respect to control (water or pMSG), $n \geq 3$.

Figure 6 - Expression silencing of human eIF3f in A549 cells

A) WB analysis of eIF3f expression in transfected pMSG (control) and pFH11A (antisense) A549 cultures. Tubulin WB is shown to document equal protein loading.

B) WB analysis of eIF3f expression in transfected scrambled (control) and eIF3f siRNAs A549 cultures. Tubulin WB is shown to document equal protein loading. C) Difference in cell growth in control (water and scrambled siRNAs) and eIF3f siRNA treated A549 cultures after 24 and 48 hours of transfection. Left: suspended and adherent cells stained with trypan blue to assess cell viability after 24 hours of transfection. Right: Cells were stained with acridine orange and ethidium bromide to visualize cell morphology and death by necrosis or apoptosis. Timepoint zero represents cells before transfection. Final magnification: 40X. D) Percent of apoptosis in control (water and pMSG), antisense eIF3f (pFH11A), scrambled siRNAs and eIF3f siRNAs transfected cells, estimated from cell counts in microscopic fields similar to those shown in panel C. Data expressed as mean \pm SE; * $p < 0.01$ with respect to their respective control (water, scrambled siRNAs or pMSG), $n \geq 3$.

Additional files

Additional file 1 – Original Western blots for the data used in Figure 1A

Original Western blots (WB) for the analysis of eIF3f expression in quiescent A549 cells (G0) and proliferating asynchronous cultures (A). The first WB (left) shows eIF3f expression, detected with a polyclonal rabbit anti-human eIF3f antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the second WB (right) shows tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody

(primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody).

Additional file 2 – Original Western blots for the data used in Figure 3A

Original Western blots (WB) for the analysis of eIF3f and tubulin expression in A549 synchronous cultures. The left WBs show eIF3f expression, detected with a polyclonal rabbit anti-human eIF3f antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the WB at the right show tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody). Numbers represent the time in hours after HU release in A549 cultures. (mw: protein molecular weight).

Additional file 3 – Original Western blots for the eIF3f and tubulin data used in Figure 3B

Original Western blots (WB) for the analysis of eIF3f and tubulin expression in A549 synchronous cultures. The top WB shows eIF3f expression, detected with a polyclonal rabbit anti-human eIF3f antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the WB at the bottom shows tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody). Numbers represent the time in hours after HU release in A549 cultures.

Additional file 4 – Original Western blots for the Cyclin B1 data used in Figure 3B

Original Western blots (WB) for the analysis of Cyclin B1 expression in A549 synchronous cultures. The left WBs show Cyclin B1 expression, detected with a

monoclonal mouse anti-Cyclin B1 antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the WBs at the right show tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody). Numbers represent the time in hours after HU release; M represents expression in mitotic A549 cells, by accumulating cells with nocodazole; A represents expression in A549 proliferating asynchronous cultures; G0 represents expression in quiescent A549 cells, by accumulating cells with serum deprivation; and mw, protein molecular weight.

Additional file 5 – Original Northern blots for the data used in Figure 3C

A) Original Northern blots (NB) for the analysis of eIF3f mRNA expression in A549 synchronous cultures. The NBs show eIF3f mRNA expression, detected with a complementary antisense single-stranded RNA probe of human eIF3f. To document equal RNA loading and to normalize the expression of eIF3f mRNA, the relative intensity units of the 28S ribosomal RNA bands were determined. B) Total RNA gel photographs, corresponding to the NBs shown in panel A, and taken with a Hoefer Photoman Polaroid Camera (Hoefer Inc., Holliston, MA). Numbers represent the time in hours after HU release, and A represents expression in A549 proliferating asynchronous cultures.

Additional file 6 – Original Northern blots for the data used in Figure 3D

Original Northern blot (NB) for the analysis of eIF3f mRNA expression in A549 synchronous cultures. The NB (top) shows eIF3f mRNA expression, detected with a complementary antisense single-stranded RNA probe of human eIF3f. To document equal RNA loading and to normalize the expression of eIF3f mRNA, the relative

intensity units of the 28S ribosomal RNA bands were determined. Total RNA gel photograph (bottom) corresponds to the NB shown above, and taken with a Hoefer Photoman Polaroid Camera (Hoefer Inc., Holliston, MA). Numbers represent the time in hours after HU release.

Additional file 7 – Original Western blots for the data used in Figure 5A

Original Western blots (WB) for the analysis of eIF3f expression in A549 cultures transfected with pMSG (control) and pFH11S (ectopic expression). A549 cells were lysed 48 hours after transfection and proteins were transferred to a PVDF membrane after separation by SDS-PAGE gel electrophoresis. The first WB (left) shows eIF3f expression, detected with a polyclonal rabbit anti-human eIF3f antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the second WB (right) shows tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody).

Additional file 8 – Amplified micrographs for the data used in Figure 5B

Amplified micrographs (~ 2 X) of A549 cells transfected with pMSG (control) and pFH11S (ectopic expression). Micrographs were reduced to 40% of original size. Microscope final magnification: 40X.

Additional file 9 – Original Western blots for the data used in Figure 6A and B

Original Western blots (WB) for the analysis of eIF3f expression in transfected A549 cultures with pMSG (control), pFH11A (antisense), scrambled siRNAs (control), and eIF3f siRNAs. A549 cells were lysed 48 hours after transfection and proteins were transferred to a PVDF membrane after separation by SDS-PAGE gel electrophoresis. The first WB (left) shows eIF3f expression, detected with a polyclonal rabbit anti-

human eIF3f antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody). To document equal protein loading, the second WB (right) shows tubulin expression, detected with a monoclonal mouse anti-human beta-tubulin antibody (primary antibody) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody).

Additional file 10 – Amplified micrographs for the data used in Figure 6C
Amplified micrographs (~ 2 X) of A549 cells transfected with scrambled siRNAs (control) and eIF3f siRNAs. Micrographs were reduced to 40% of original size.
Microscope final magnification: 40X.

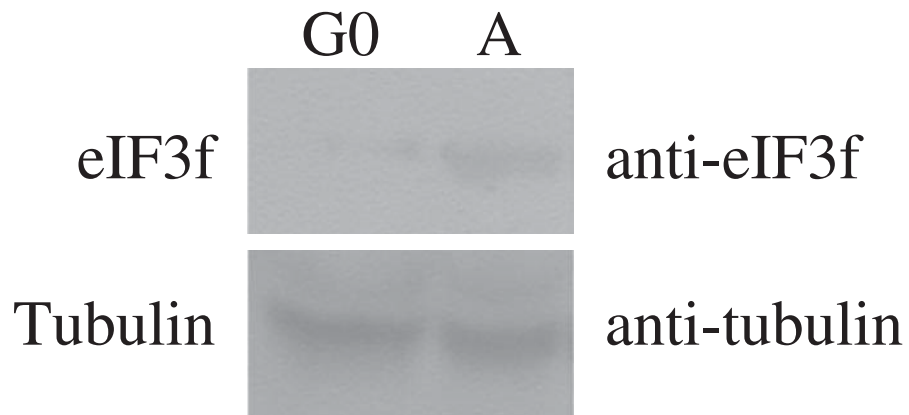
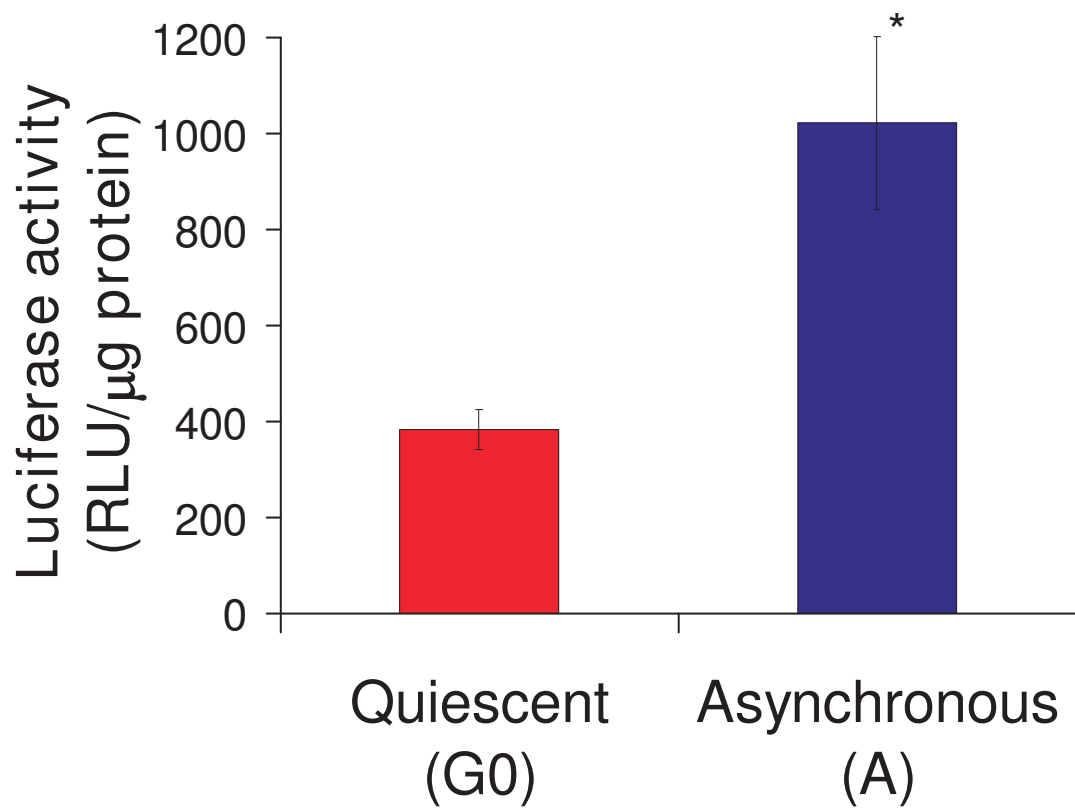
A**B**

Figure 1

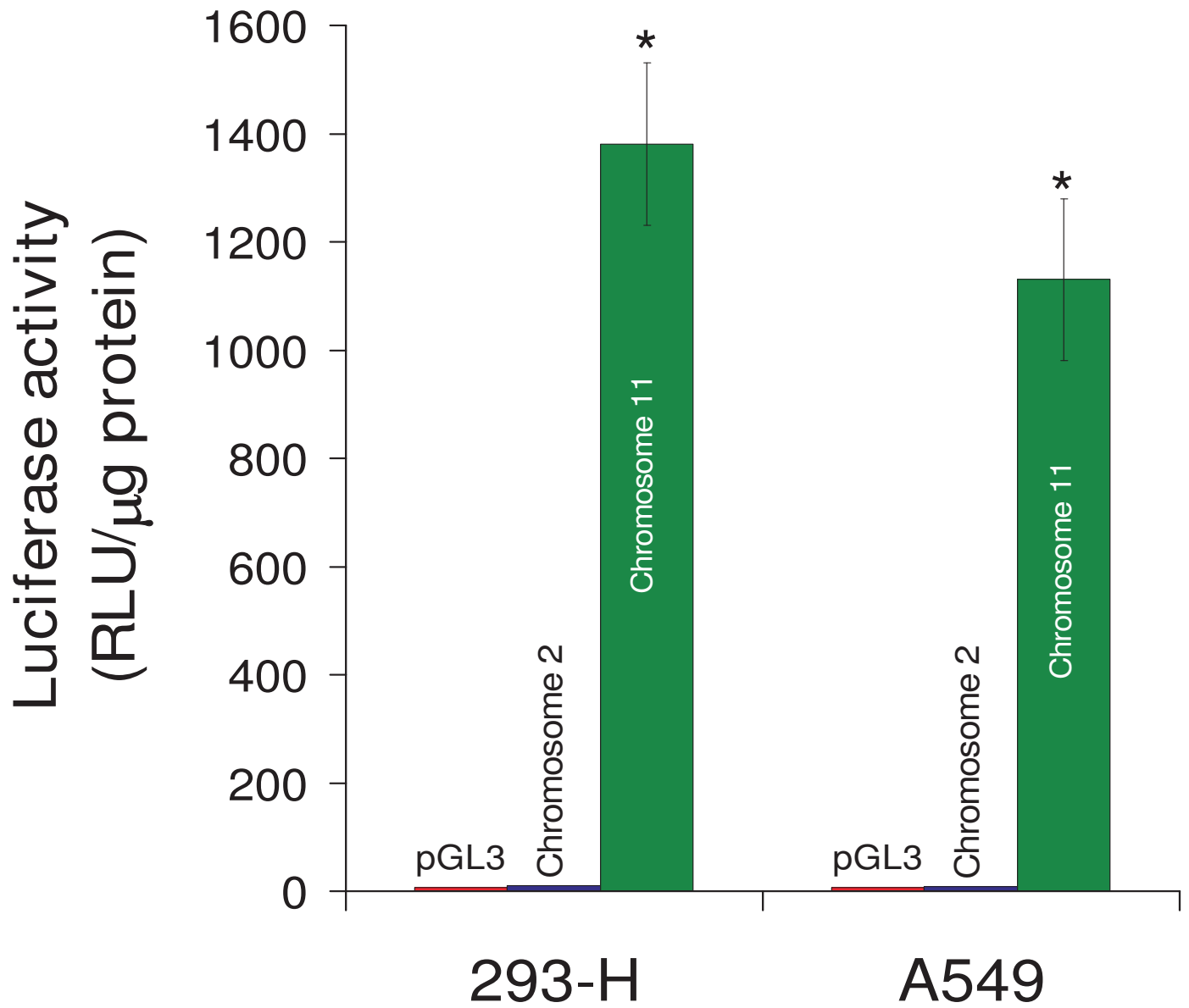


Figure 2

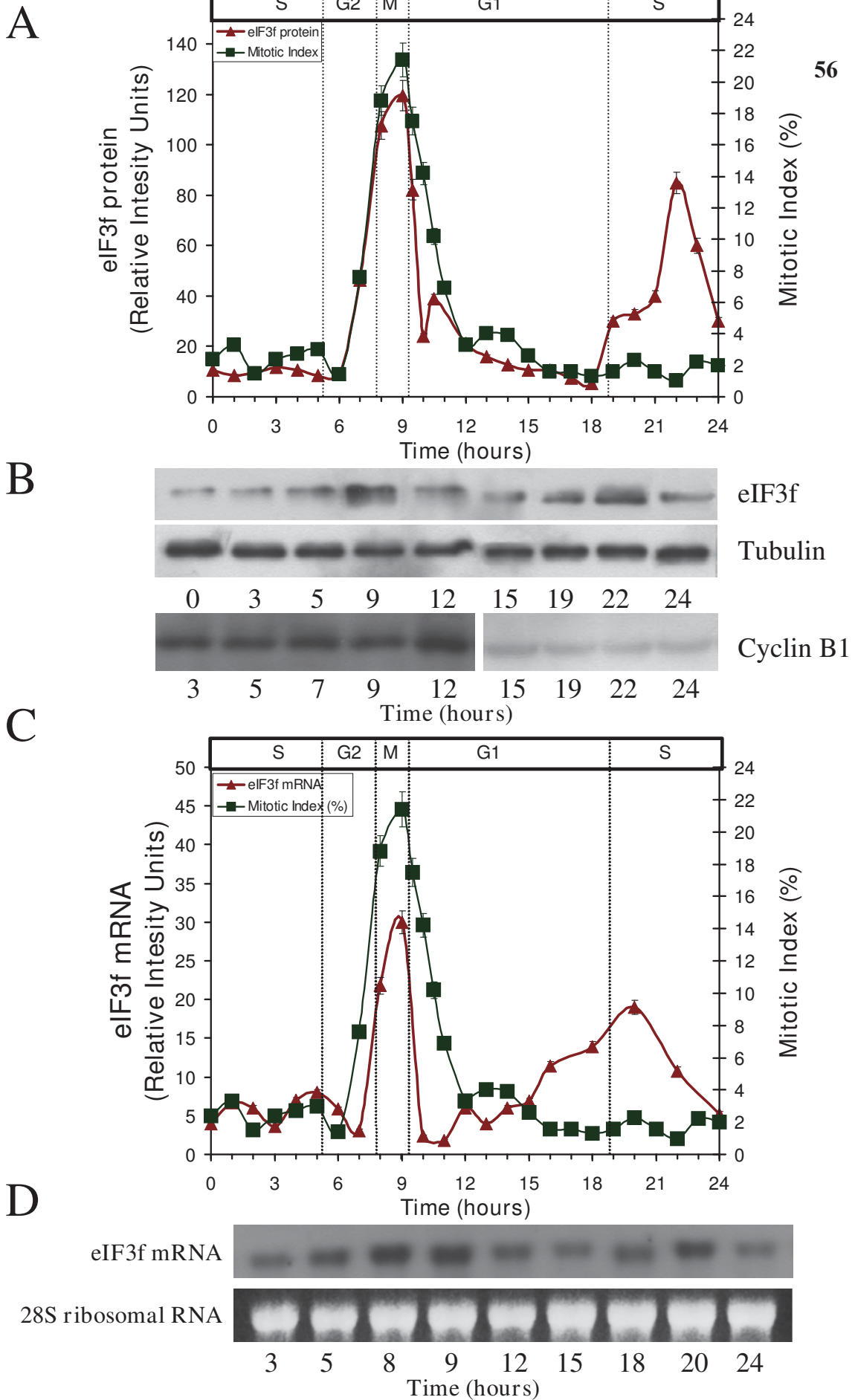


Figure □

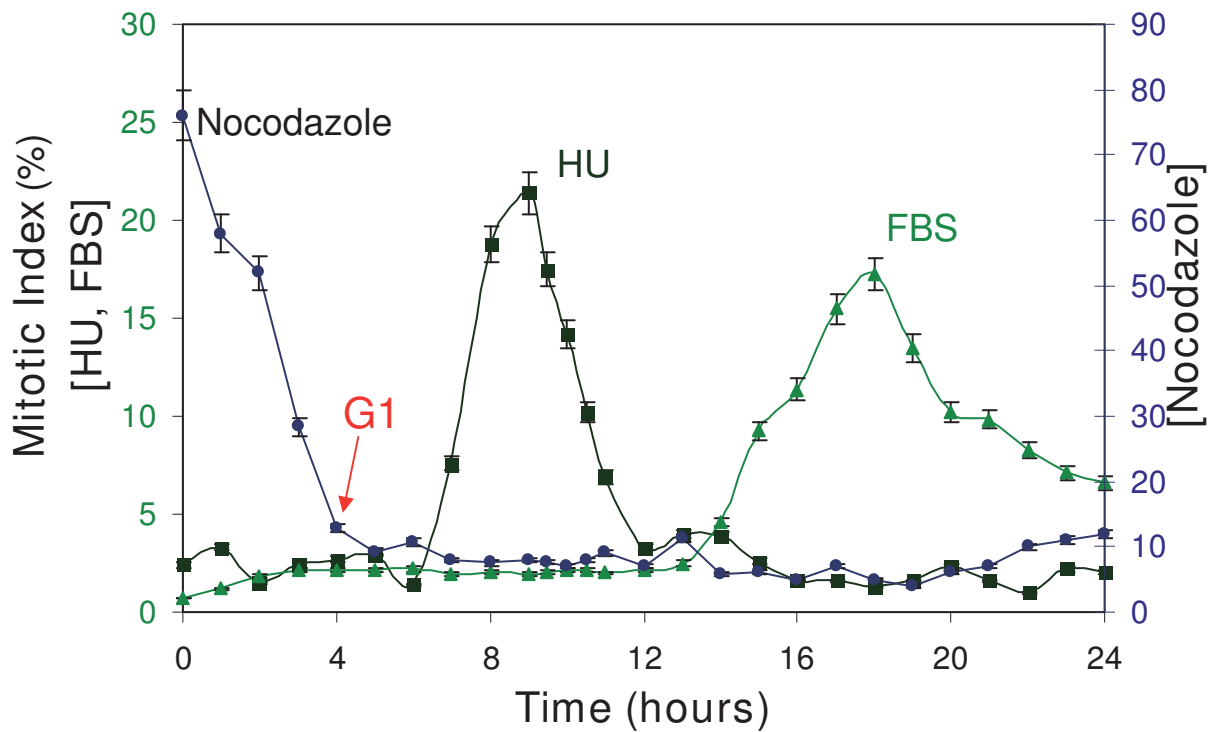
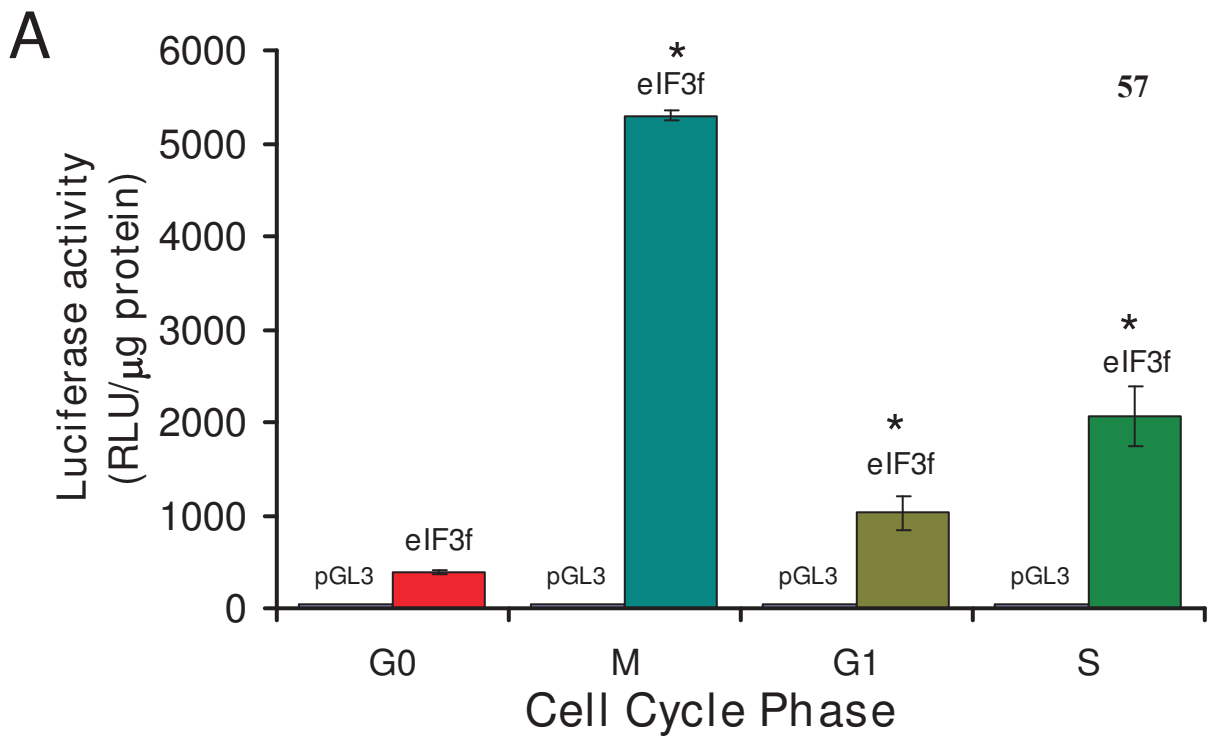
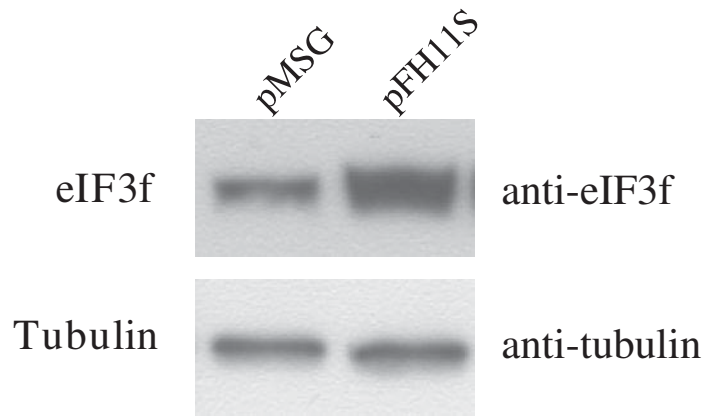


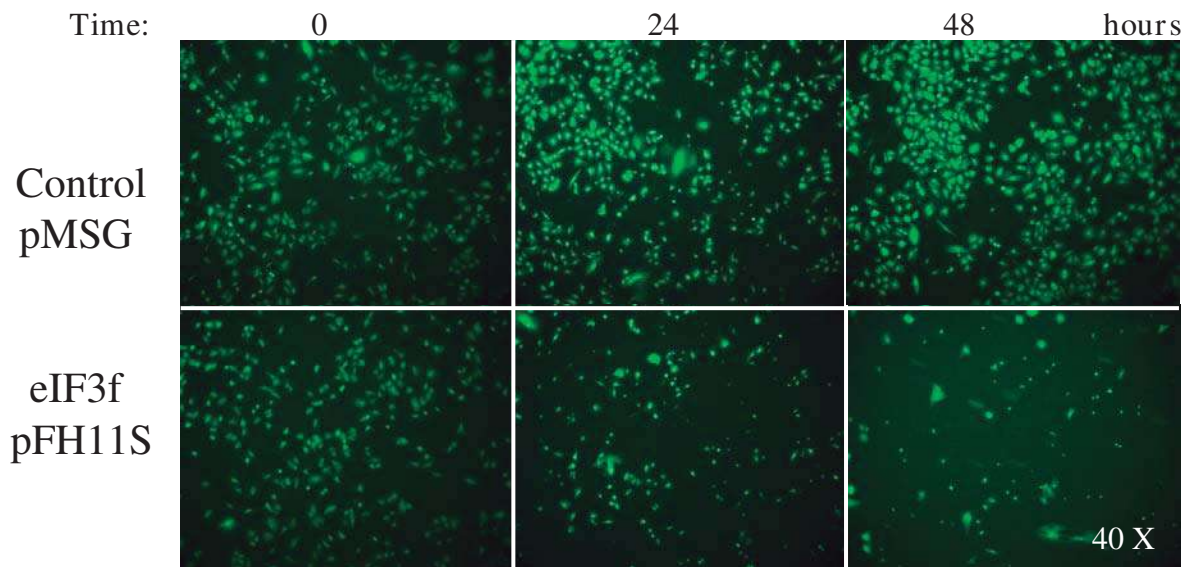
Figure 4

A

58



B



C

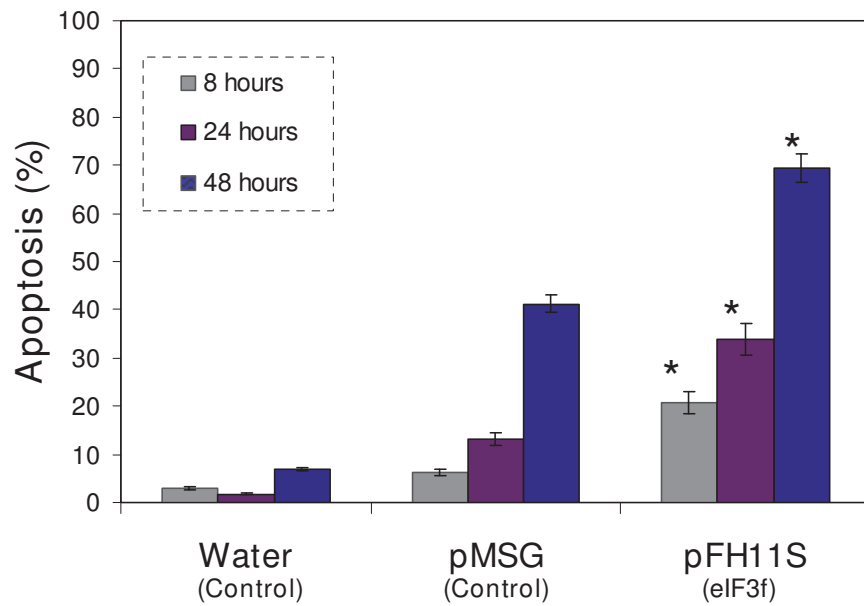


Figure 5

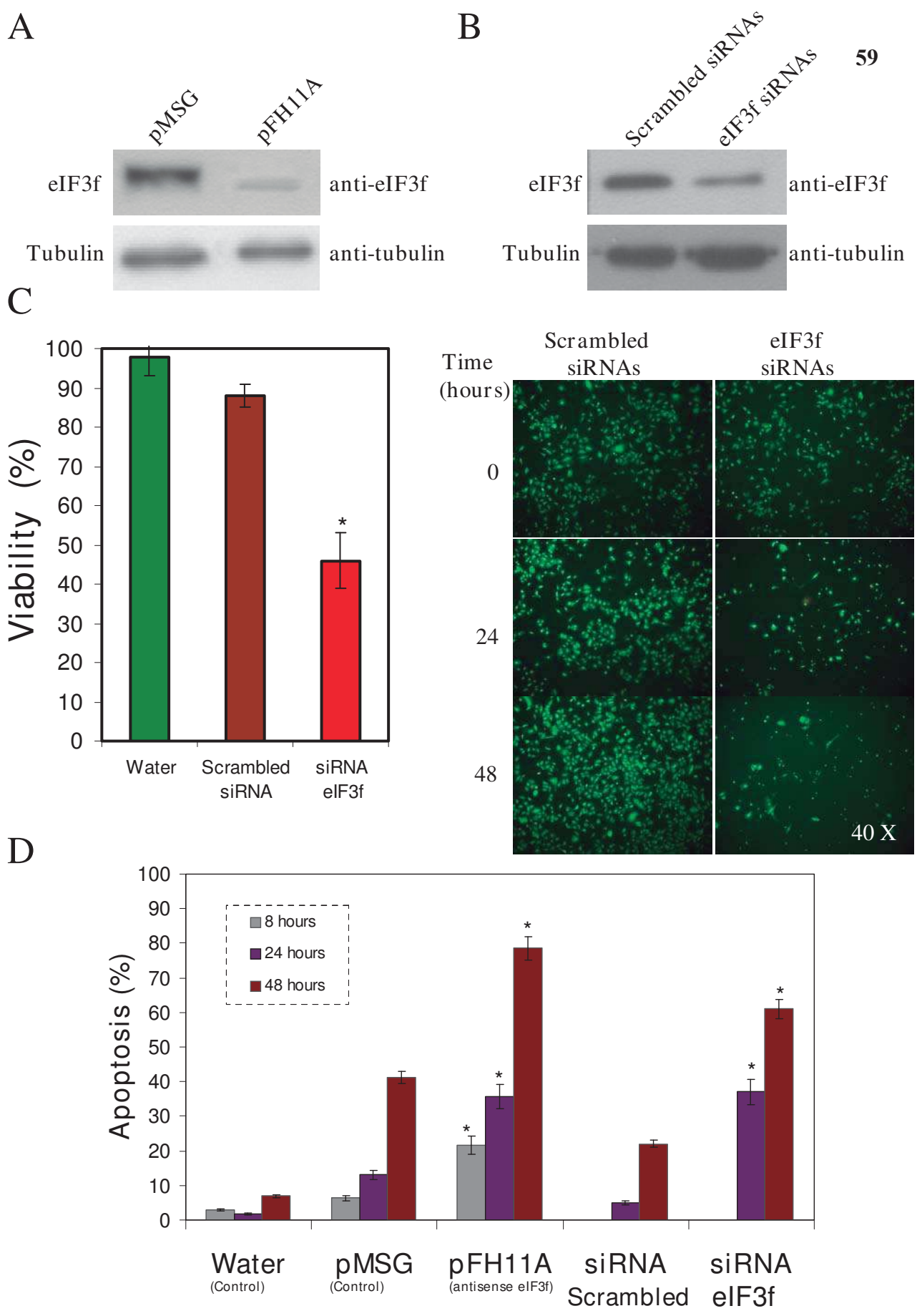


Figure 6

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: Additional file 1.pdf, 161K
<http://www.celldiv.com/imedia/1543312003388782/supp1.pdf>

Additional file 2: Additional file 2.pdf, 308K
<http://www.celldiv.com/imedia/9937240713887826/supp2.pdf>

Additional file 3: Additional file 3.pdf, 146K
<http://www.celldiv.com/imedia/2355900833887827/supp3.pdf>

Additional file 4: Additional file 4.pdf, 272K
<http://www.celldiv.com/imedia/1136648184388782/supp4.pdf>

Additional file 5: Additional file 5.pdf, 183K
<http://www.celldiv.com/imedia/6896187483887828/supp5.pdf>

Additional file 6: Additional file 6.pdf, 161K
<http://www.celldiv.com/imedia/2268097003887828/supp6.pdf>

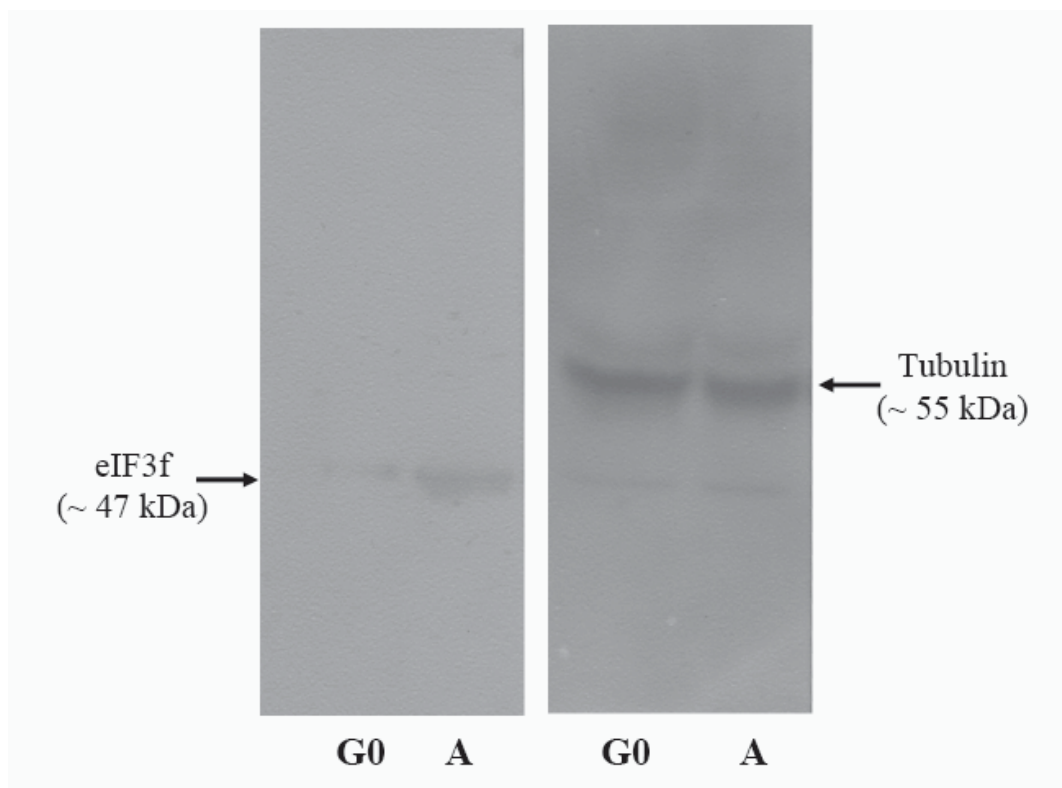
Additional file 7: Additional file 7.pdf, 188K
<http://www.celldiv.com/imedia/5397682338878295/supp7.pdf>

Additional file 8: Additional file 8.pdf, 125K
<http://www.celldiv.com/imedia/5458183293887830/supp8.pdf>

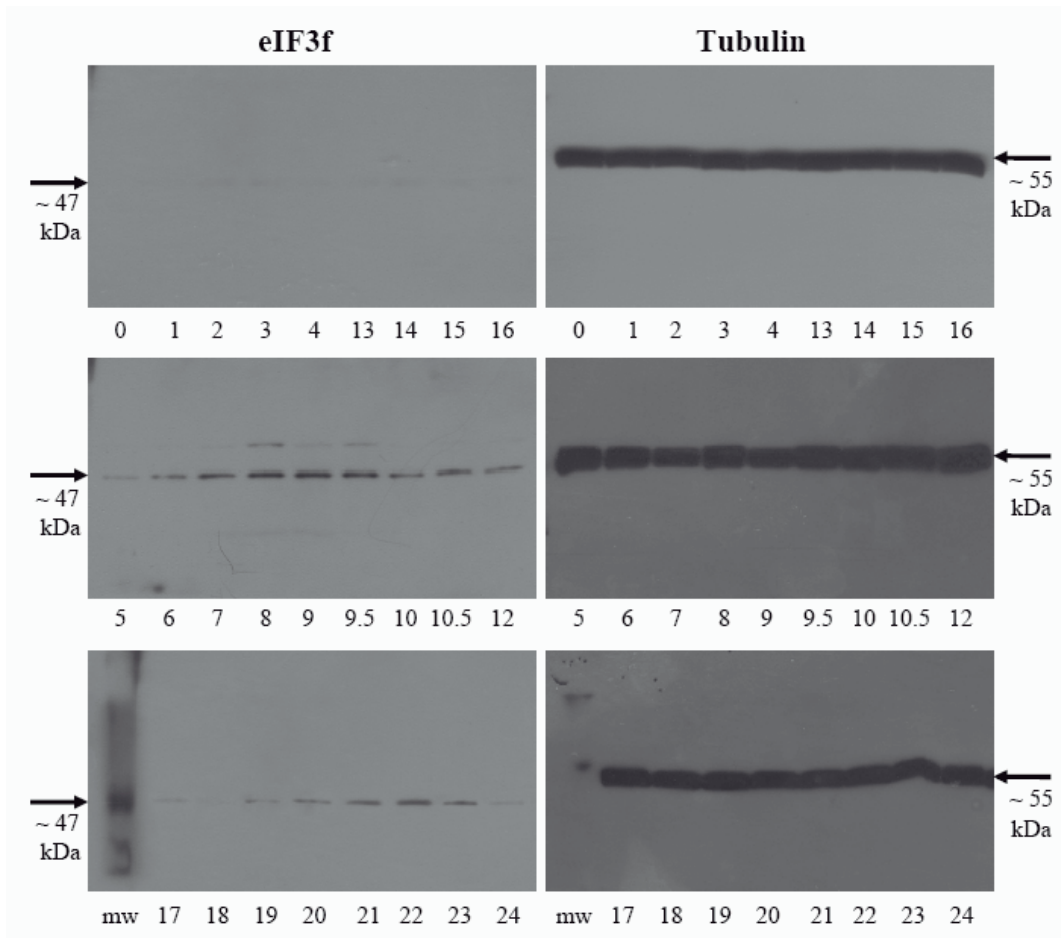
Additional file 9: Additional file 9.pdf, 80K
<http://www.celldiv.com/imedia/9063115653887830/supp9.pdf>

Additional file 10: Additional file 10.pdf, 120K
<http://www.celldiv.com/imedia/2082536471388783/supp10.pdf>

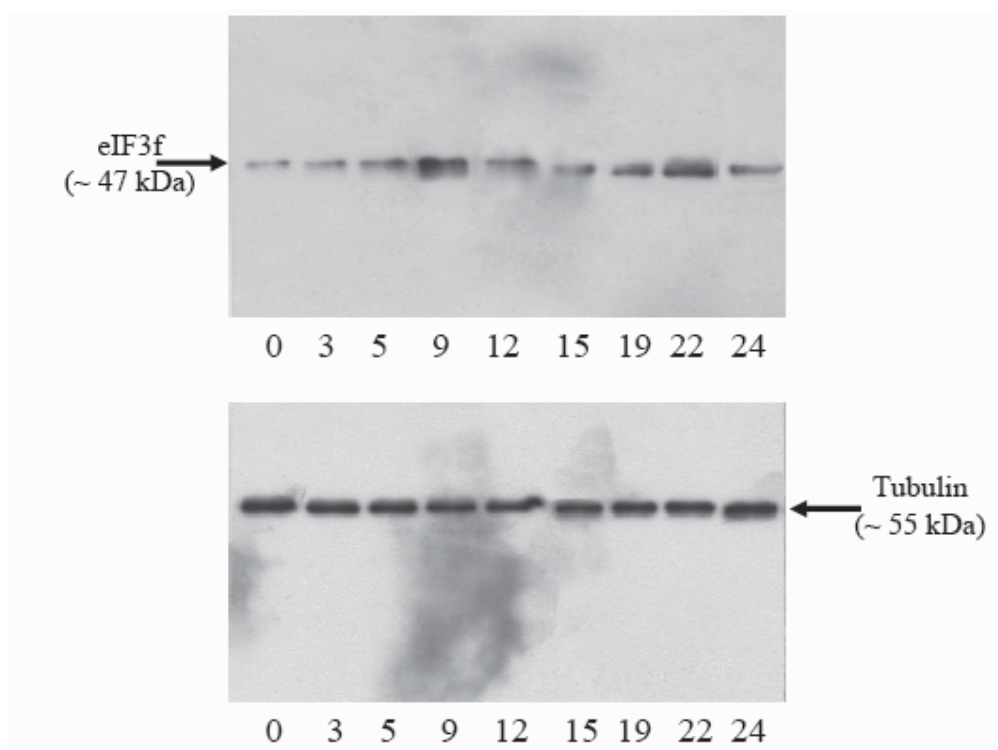
Additional file 1



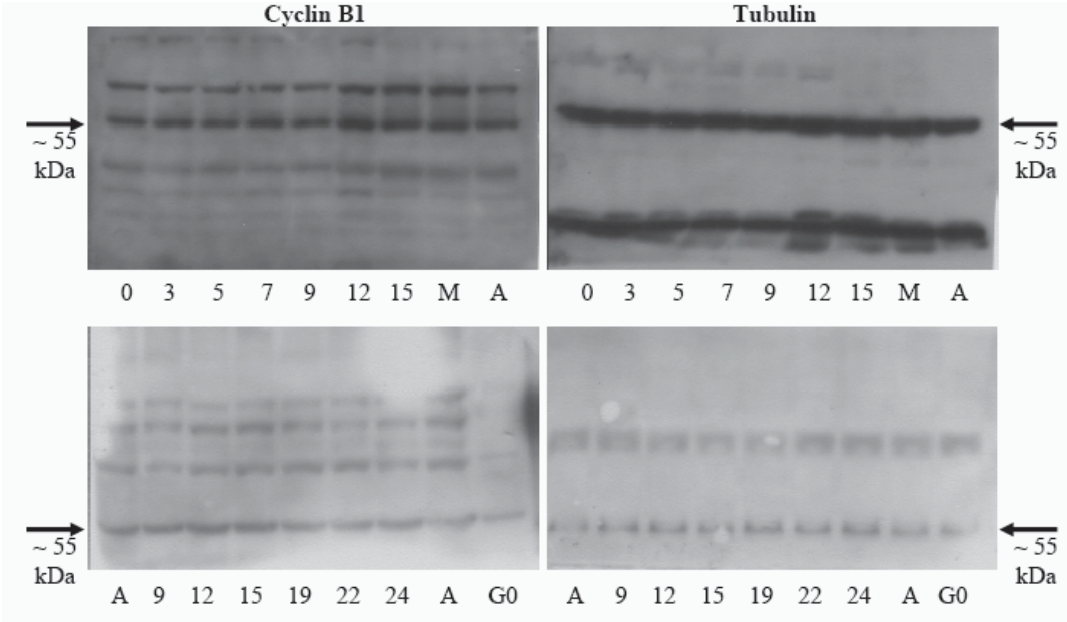
Additional file 2



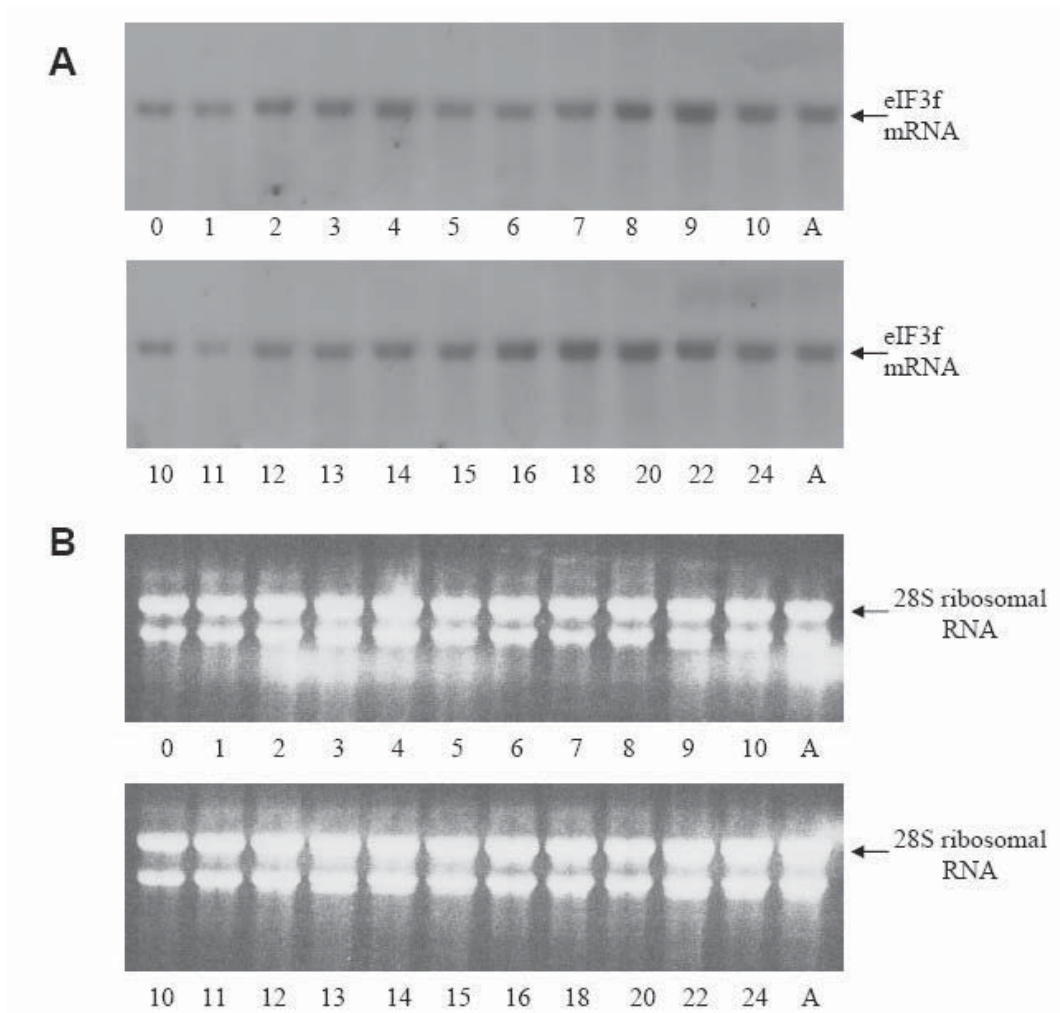
Additional file 3



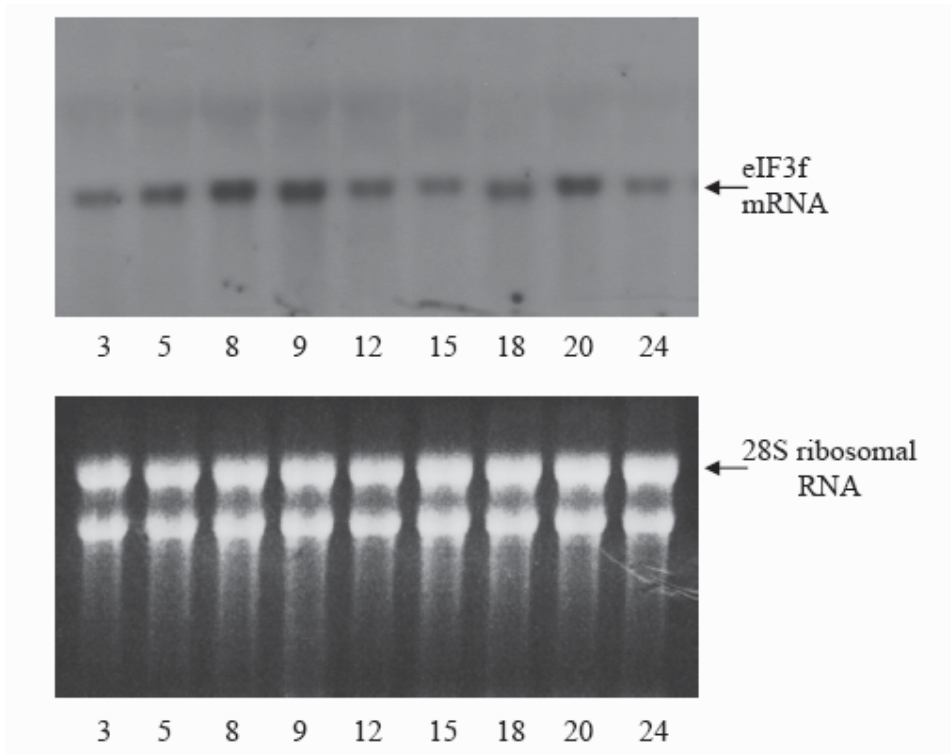
Additional file 4



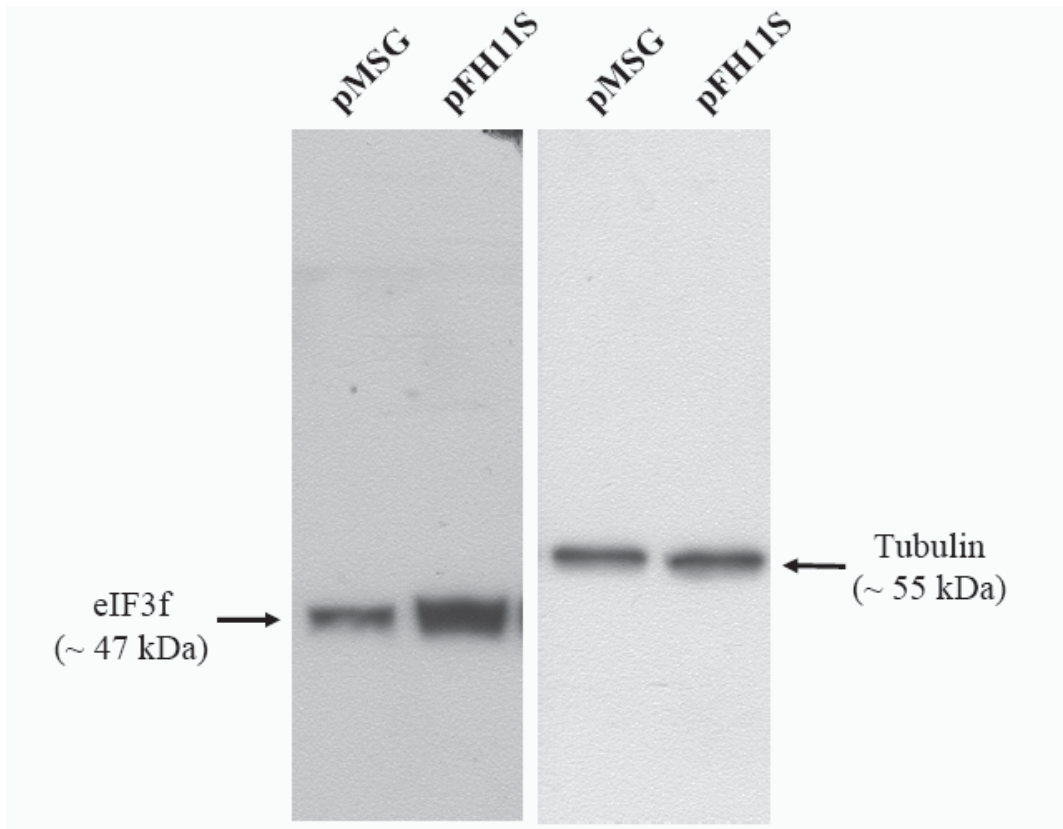
Additional file 5



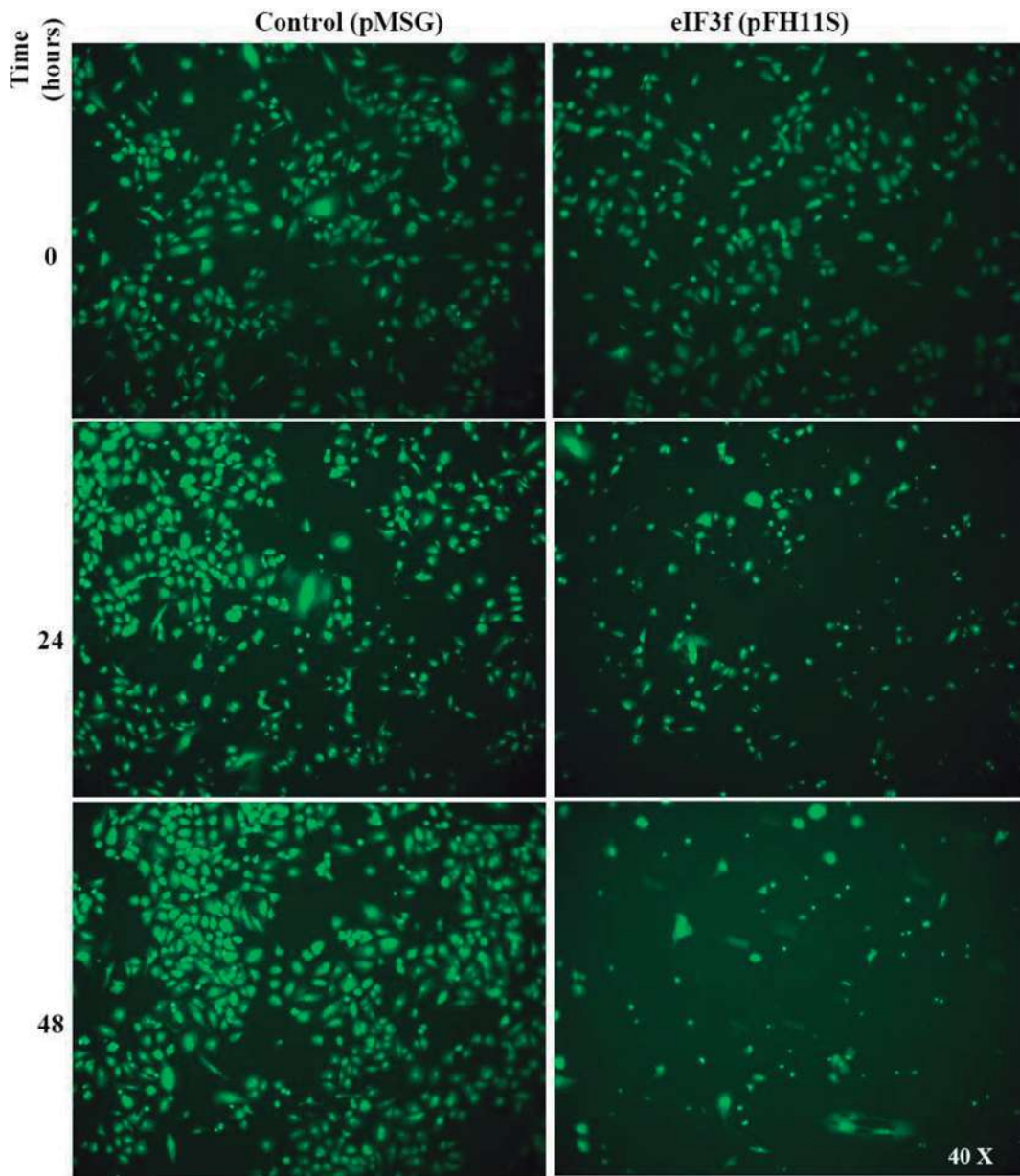
Additional file 6



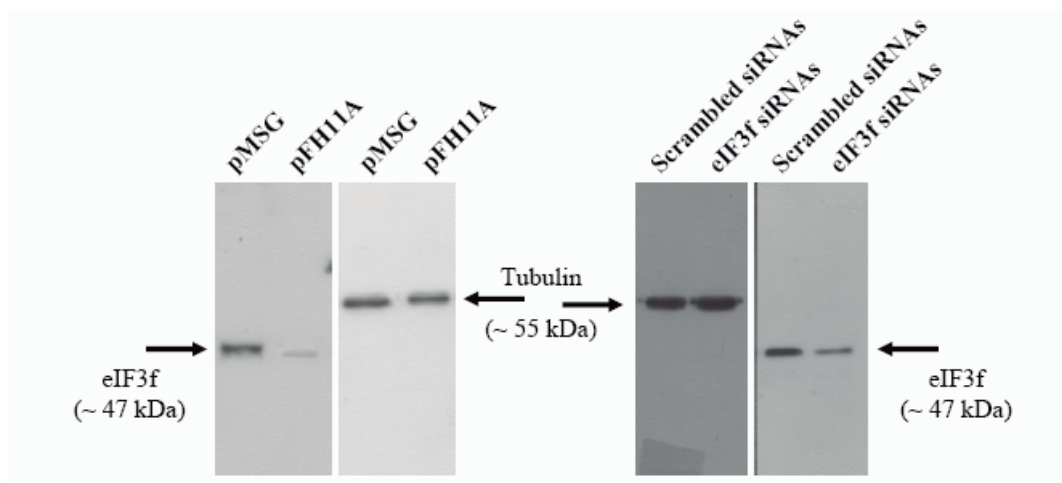
Additional file 7

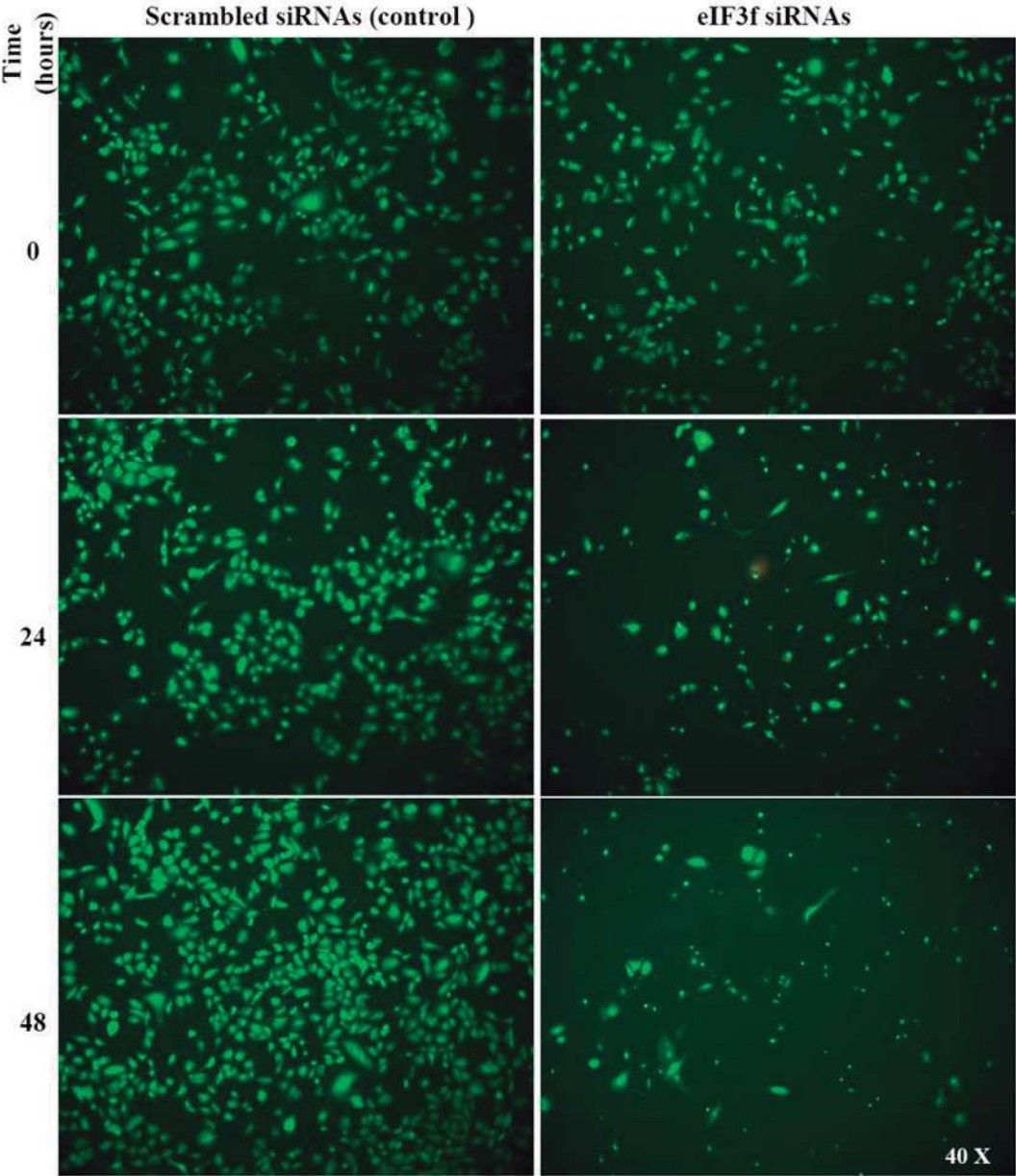


Additional file 8



Additional file 9





VII. DISCUSIÓN

El objetivo central del presente trabajo fue determinar si la expresión del gen eIF3f humano está relacionada al ciclo celular, y si un cambio en los niveles de expresión afecta la proliferación de la línea celular humana de adenocarcinoma pulmonar A549.

Para establecer si la expresión del gen eIF3f estaba relacionada a la división celular se determinó, en primera instancia, si había una diferencia en la expresión de la proteína de eIF3f en cultivos de A549 en estado proliferativo y en cultivos en estado quiescente (Figura 1A). Se encontró que en estado quiescente hay un decremento significativo en el nivel de expresión de la proteína de eIF3f, comparado con el nivel de proteína encontrado en estado proliferativo. Estos resultados, que fueron corroborados mediante la determinación de la actividad del promotor del gen eIF3f en cultivos de A549 en estado proliferativo y quiescente (Figura 1B), nos indican que la función o funciones de eIF3f en células A549 están relacionadas a la división celular. No existen reportes en la literatura donde se estudie al gen eIF3f en relación al ciclo celular; sin embargo, recientemente Dong *et al.* (2009) reportaron que la expresión de la subunidad a del factor multiproteico eIF3 (eIF3a) está relacionada al ciclo celular, mientras que la expresión de las subunidades b (eIF3b) y d (eIF3d) no lo están. Ellos reportan que la expresión de eIF3a decrece en fibroblastos de ratón (NIH3T3) durante el estado quiescente, de manera similar a lo que se observó con eIF3f en células A549 quiescentes; en cambio, la expresión de eIF3b y eIF3d es similar tanto en estado proliferativo como en el estado quiescente. Ésto nos sugiere que diferentes subunidades de eIF3 están implicadas en distintos procesos celulares.

Una vez establecido que la expresión del gen eIF3f está relacionada a la división celular, se prosiguió a evaluar la expresión del mismo durante la progresión del ciclo celular. La determinación del perfil de expresión de un gen durante el ciclo celular es un indicativo de los eventos a los que pudiera estar adscrito durante la división. Por ejemplo, la cinasa Cdk1 se expresa sólo durante la división celular y su función es requerida durante todo el proceso, por lo que su expresión es constante durante el mismo. En contraste, las Ciclinas B son requeridas en la transición S/G2/M, y su expresión se da en estas mismas fases. Se determinaron los niveles de expresión de la proteína y del ARNm de eIF3f (Figura 3) durante la progresión de un ciclo celular de A549 y se determinó la actividad del promotor del gen eIF3f en fases

específicas del ciclo celular (Figura 4). En general, se encontró que la expresión de eIF3f oscila durante el ciclo celular, mostrando un máximo durante la fase S y otro durante la fase M del ciclo. Nuevamente, el único trabajo que relaciona alguna subunidad de eIF3 con el ciclo celular es el de Dong *et al.* (2009), quienes reportan que eIF3a oscila durante el ciclo celular con un máximo de expresión durante la fase S de células NIH3T3 y sugieren que eIF3a es un regulador traduccional para la síntesis de proteínas requeridas en la transición G1/S, como la ribonucleótido reductasa M2, cuya expresión también oscila durante el ciclo celular con un máximo en la fase S. Considerando que eIF3f y eIF3a no forman parte del corazón catalítico de eIF3 y que, por lo tanto, tienen funciones moduladoras (Burks *et al.* 2001), puede esperarse que eIF3f sea un regulador traduccional de la síntesis de proteínas específicas a las fases S y M de ciclo celular. De hecho, Shi *et al.* (2006) sugieren que eIF3f es un regulador negativo de la síntesis de proteínas y Masutani *et al.* (2007) reportan que eIF3f es indispensable para mantener un nivel adecuado de síntesis de proteínas. Fan and Penman (1970) reportan que la síntesis de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular de mamíferos; este trabajo reporta que eIF3f se expresa en la fase M, por lo que sugerimos que eIF3f contribuye a la disminución observada en la síntesis de proteínas durante la fase M. Nuestra interpretación es que eIF3f no es un inhibidor de la síntesis de proteínas como tal, dado que no hay una inhibición total del proceso, y que la disminución observada es debida a su función como modulador traduccional. La propuesta de que eIF3f tenga una función moduladora se basa en estudios previos en *Arabidopsis thaliana* y *Schizosaccharomyces pombe* con otras subunidades de eIF3. En *A. thaliana* se sugiere que la subunidad eIF3h selecciona ARNm específicos a través de sus secuencias líder en el 5' del ARNm (Kim *et al.* 2004), y en *S. pombe* se ha encontrado que las subunidades eIF3m y eIF3e conforman complejos de eIF3 distintos y capaces de traducir diferencialmente distintos ARNm (Zhou *et al.* 2005).

Por otro lado, dada la multifuncionalidad de eIF3f, será necesario elucidar si éste tiene la misma función durante las fases S y M, así como si esta función es similar en otros tipos celulares. Esta necesidad es evidente debido a que durante la fase temprana de S, donde se presenta uno de los máximos de expresión de eIF3f, no disminuye la síntesis de proteínas, sugiriendo una función diferente para eIF3f durante esta fase.

Hasta el momento, no hemos encontrado reportes en la literatura que indiquen una expresión transcripcional bifásica durante el ciclo celular. Sin embargo, existe un reporte de otra proteína que presenta un perfil de expresión bifásico, pero a nivel traduccional. Pyronnet *et al.* (2000) reportaron que la expresión de la proteína ornitina decarboxilasa es bifásica en células HeLa, presentando máximos en G1/S y G2/M. En este caso, el ARNm de la ornitina decarboxilasa presenta un sólo máximo de expresión en G1/S, por lo que el máximo de expresión de la proteína observado en G2/M se da nivel traduccional; así, la regulación de la expresión de la ornitina decarboxilasa se da a nivel transcripcional en la fase S y traduccional en la fase G2/M. El perfil de expresión transcripcional bifásico de eIF3f concuerda a nivel transcripcional y traduccional, sugiriendo que la regulación de la expresión de eIF3f se da sólo a nivel transcripcional.

Por supuesto, son muchas las interrogantes con respecto a este perfil de expresión, y a su relación con la función o funciones de eIF3f. Es importante resaltar que la expresión transcripcional de eIF3f en plantas y en hongos es monofásica (G2/M y G2, respectivamente), sugiriendo con ello que el máximo de expresión durante S en humano fué adquirido posteriormente por Animalia durante la evolución de esta rama filogenética. Será interesante saber si es una característica humana o no, por lo que será necesario determinar el perfil de expresión de eIF3f en otras especies pertenecientes a esta rama. De ser característica humana, sería interesante saber por ejemplo, si la expresión en S es particular a la línea A549 o si lo comparten otras líneas celulares. De ser particular a la A549, sugeriría una alteración genética propia a la A549, lo que es frecuente en células cancerosas. De ser compartida por varios tipos celulares, pero no todas las células de un organismo pluricelular, sugeriría una función relacionada a la diferenciación, por ejemplo.

Con frecuencia, los genes relacionados al ciclo celular son importantes para la viabilidad de la célula, dado que la división celular es un proceso celular que requiere de la adecuada regulación del ciclo celular mediante la expresión y activación de proteínas específicas en tiempo, concentración y espacio. Por lo mismo, nos preguntamos si cambios en los niveles de expresión del gen eIF3f afectan la proliferación celular. En la Figura VII.1 podemos observar los perfiles de expresión hipotéticos del gen eIF3f en células A549 cuando se silencia o expresa ectópicamente, en comparación con el perfil de expresión de eIF3f endógeno.

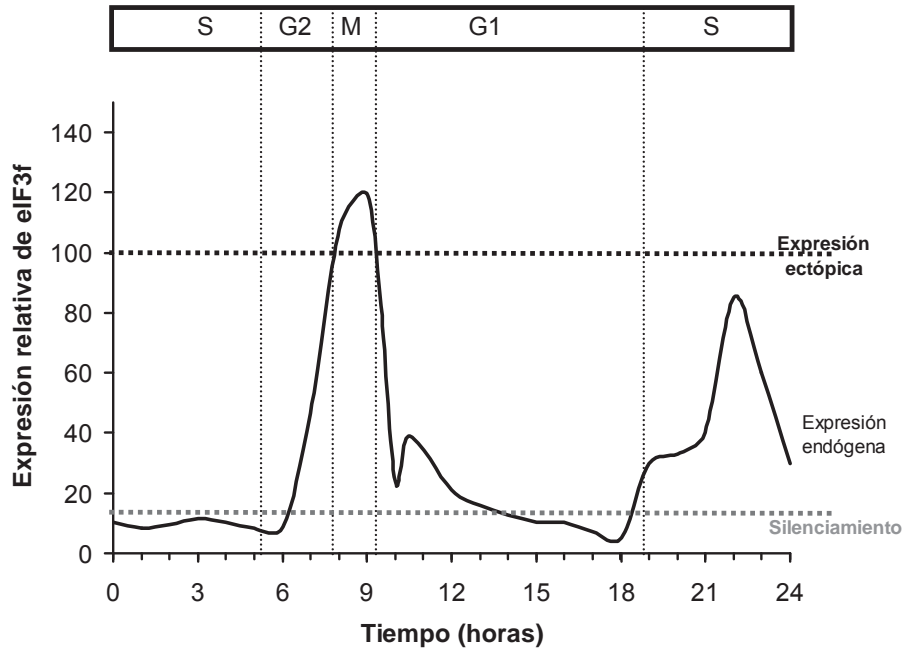


Figura VII.1 *Perfiles de expresión del gen eIF3f. Perfil de expresión endógena (Figura 3) y perfiles de expresión hipotéticos durante la expresión ectópica y durante el silenciamiento del gen eIF3f en células A549.*

Al observar este gráfico es posible predecir que una desregulación en la expresión de eIF3f podría tener consecuencias en la regulación del ciclo celular y, por lo tanto, en la proliferación celular. Con lo anterior, sugerimos que si el gen eIF3f se expresa (expresión ectópica) durante fases del ciclo celular donde no es requerida su función de modulador negativo de la síntesis de proteínas (i.e. G1 y S/G2), esto podría conducir a la inhibición traduccional de proteínas esenciales a dichas fases del ciclo celular. Por otro lado, si el gen eIF3f no se expresa (silenciamiento) durante las fases M o S temprana del ciclo celular, esto podría conducir a la expresión de proteínas cuya expresión debe estar silenciada en estas fases. Ante esta predicción, se decidió evaluar el efecto de la expresión ectópica de eIF3f (Figura 5) y del silenciamiento de eIF3f (Figura 6) en células A459. Se encontró que la expresión ectópica de eIF3f inhibe la proliferación celular e induce apoptosis después de 24 horas. Este resultado es similar al encontrado por Shi *et al.* (2006) en células de melanoma (A375) y células pancreáticas cancerosas (BxPc3). Por otro lado, no existen reportes en la literatura en donde se evalúe el efecto del silenciamiento de eIF3f sobre la proliferación celular. En este trabajo, se encontró que el silenciamiento de eIF3f induce apoptosis desde las 8 horas, lo que

sugiere que su ausencia representa un insulto a la división celular de tal magnitud, que la célula no puede contender con este daño y reacciona con el suicidio.

Es importante considerar que el gen eIF3f humano es un monogen que se encuentra en el cromosoma 11. A pesar de que existe una secuencia similar en el cromosoma 2, en este trabajo se demostró que se trata de un retropseudogene (inactivo). Este resultado era importante conocerlo debido a que, de existir varios genes para una función, en un evento celular específico éstos pueden contribuir a la concentración total del producto génico y/o ser regulados diferencialmente, lo que exigiría analizar a cada uno de ellos en forma separada y dificultaría el silenciamiento de la función.

Los resultados de este trabajo muestran claramente que tanto la expresión ectópica como el silenciamiento de la expresión del gen eIF3f inducen apoptosis y no una muerte por necrosis. Esta aseveración se sustenta en las recomendaciones de nomenclatura para la clasificación del tipo de muerte celular que publicó el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular (NCCD, por sus siglas en inglés) a principios del 2009 (Kroemer *et al.* 2009), y que dice: “el término apoptosis debe aplicarse exclusivamente a eventos de muerte celular que ocurren mientras se manifiestan varias de las características morfológicas que acompañan a este proceso” (indicadas en la introducción de esta tesis). En acuerdo con esta definición, se observaron mediante microscopía fluorescente varias de las características morfológicas que definen al proceso de muerte celular por apoptosis: el redondeo celular, la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la presencia de burbujas en la membrana plasmática.

Además de los cambios morfológicos generados durante la apoptosis, es razonable el uso de análisis bioquímicos que coadyuven a definir el tipo de muerte celular (Kroemer *et al.* 2009), tales como aquellos dirigidos a detectar la fragmentación del ADN en escalera, disfunción del potencial de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas, etc. Sin embargo, es importante recordar que estos análisis por sí solos no pueden definir al muerte por apoptosis, ya que están involucrados también en otros procesos biológicos que, además, no son necesariamente procesos letales (Kroemer *et al.* 2009).

Durante el desarrollo del presente trabajo se emplearon otros métodos para diagnosticar la apoptosis, además del reportado en los resultados. Por ejemplo, se utilizó el método de detección de la disfunción del potencial de la membrana mitocondrial

(MitoCapture™ Mitochondrial Apoptosis Detection Kit, BioVision, Mountain View, CA). Este método consiste en la adición de un fluoróforo catiónico que en células viables se acumula en la mitocondria formando agregados que generan fluorescencia roja, mientras que en células “apoptóticas” no puede acumularse en la mitocondria y permanece en el citosol en su forma monomérica, generando fluorescencia verde. No se reportan los resultados obtenidos con esta metodología debido a que se cuestionó la posibilidad de falsos positivos generados por el mismo proceso de transfección de ADN. Sin embargo, como se observó que había una disfunción en el potencial de la membrana mitocondrial y que los índices apoptóticos eran altos, se decidió diagnosticar si había activación de la caspasa 9. El Western blot que se muestra a continuación nos indica que la activación de la caspasa 9 en los cultivos donde se silenció la expresión del gen eIF3f y en los cultivos donde se sobre-expresó, no es significativamente mayor que la observada en los cultivos control. Estos resultados sugieren que la vía de apoptosis es independiente de la caspasa 9, lo que concuerda con los resultados de Shi *et al.* (2006) quienes reportan que la sobre-expresión del gen eIF3f induce apoptosis por una vía independiente de la caspasa 3.

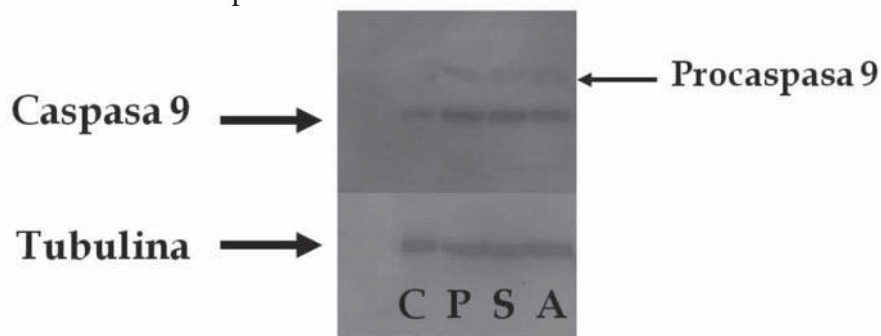


Figura VII.2 Actividad de la caspasa 9 en cultivos A549. C, control interno con células A375 apoptóticas; P, control (vehículo pMSG); S, expresión ectópica de eIF3f en células A549; A, silenciamiento de eIF3f en células A549. La actividad de caspasa 9 se determinó por Western blot (WB). El WB de tubulina se utilizó para documentar cargas equivalentes de proteína.

Es de nuestro interés elucidar la(s) vía(s) involucradas durante este evento, sin embargo, el proceso es mucho más complejo de lo que se había planteado inicialmente. Es decir, además de la complejidad bioquímica y funcional de los distintos subtipos de apoptosis y de su confluencia con otros tipos de muerte celular y/o procesos celulares, la misma multifuncionalidad de eIF3f en distintos procesos celulares dificulta la elucidación de la(s) vía(s) involucradas durante la muerte celular. Es necesario primero describir en su totalidad la

función celular y molecular del gen eIF3f en los distintos procesos celulares y a partir de allí tratar de inferir una posible vía.

El conocimiento generado en torno a la función e interacción de eIF3f con otras proteínas fuera del complejo eIF3 es muy reciente. Sin embargo, en un análisis de la información relacionada a eIF3 y de los resultados obtenidos en este trabajo, es posible plantear un modelo que explique como pudiera estar alterando la fisiología celular el silenciar la expresión del gen eIF3f. El modelo se sustentaría en lo siguiente: (a) El crecimiento celular (incremento en masa y tamaño celular a través de la biosíntesis de macromoléculas) y la división celular (incremento del número de células) son procesos distintos pero acoplados y necesarios para garantizar la formación de células hijas que dan origen a un órgano, organismo o tumor (Schmelzle and Hall 2000, Fingar *et al.* 2004). (b) Se considera que la cinasa(s) dependiente de ciclina (Cdk) es el regulador central de la división celular y que la proteína blanco de rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés), altamente conservada entre los distintos eucariontes, es la cinasa reguladora del crecimiento celular (Schmelzle and Hall 2000, Fingar *et al.* 2004). (c) No se conoce con precisión cómo se coordinan ambos procesos (Fingar *et al.* 2004), pero existen evidencias que indican que TOR pudiera ser una proteína de señalización que vincula al crecimiento celular con la progresión del ciclo celular o la muerte celular en la transición G1/S (Fingar *et al.* 2004, Hong *et al.* 2008, Le Tourneau *et al.* 2008, Csibi *et al.* 2010). (d) mTOR (TOR de mamíferos) regula el crecimiento y la proliferación celular (en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y aminoácidos) a través de la modulación de la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la cinasa 1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (4E-BP1, por sus siglas en inglés) (Csibi *et al.* 2010). (e) Csibi *et al.* (2010) reportaron que eIF3f controla la actividad de la cinasa mTOR, requerida para la diferenciación e hipertrofia del músculo de ratón. Utilizando cultivos primarios de miotubos de ratón (células largas multinucleadas que son precursores de las fibras de músculo esquelético) encontraron que S6K1 y mTOR-raptor (donde raptor es una proteína mediadora que se une a mTOR) interaccionan físicamente con dos dominios de eIF3f, el dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas) de eIF3f se asocia con la forma hipofosforilada de S6K1 (forma inactiva) y mTOR-raptor se asocia a eIF3f a través del dominio señalizador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés), fosforilando y desplazando a S6K1 (forma activa). Es decir, para la

activación de S6K1 por mTOR, se requiere que S6K1 esté asociada a eIF3f (Csibi *et al.* 2010). (f) Durante la atrofia muscular de miotubos de ratón, S6K1 se acumula en forma inactiva, como consecuencia de la degradación proteosómica de eIF3f (Lagrand-Cantaloube *et al.* 2008).

En base al planteamiento anterior, el modelo propuesto para explicar el efecto del silenciamiento de la expresión del gen eIF3f sobre el crecimiento y división celular sería el siguiente:

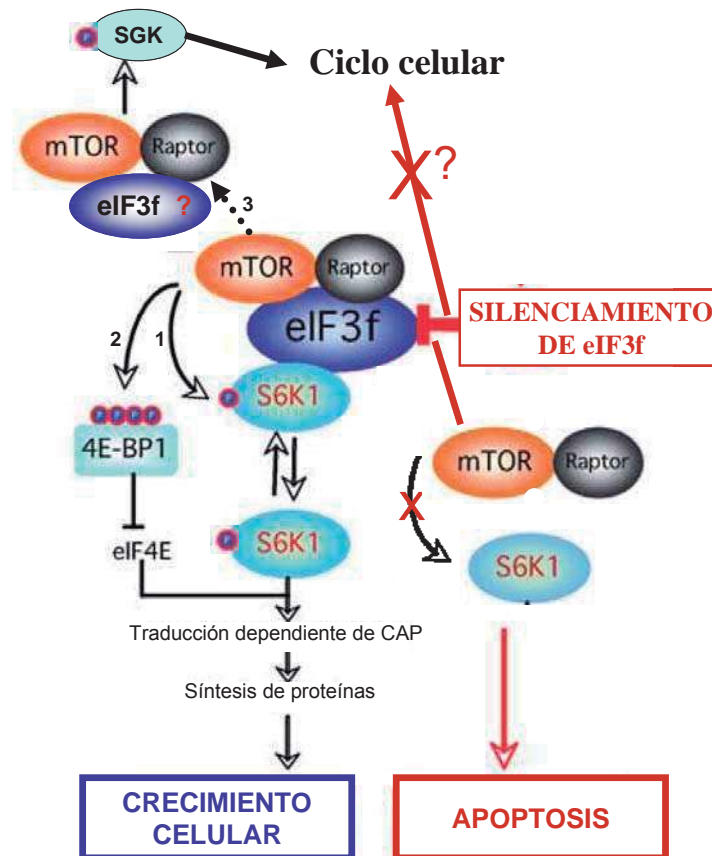


Figura VII.3 Modelo propuesto para el efecto del silenciamiento de la expresión del gen eIF3f sobre el crecimiento y la división celular. La actividad de mTOR-raptor es dependiente de su interacción con eIF3f para la posterior fosforilación e inhibición de S6K y 4E-BP1, lo que conduce a la síntesis de proteínas para el crecimiento celular (incremento de masa). Aun no está totalmente descrita esta vía en cuanto al efecto directo sobre la división celular, pero existe evidencia que vincula la actividad de mTOR con la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, se sabe que mTOR-raptor se une y activa a cinasas inducidas por suero y glucocorticoides (SGC), las cuales inhiben a p27, activando a complejos Cdk/Cyc (A y E,) necesarias para la progresión del ciclo celular en las fases G0 a G1 y G1 a S. Los dominios de interacción entre mTOR-raptor y SGC no han sido encontrados aún, pero se propone la necesidad de dominios distintos a los ya definidos para otros sustratos de mTOR, o bien, la participación de una molécula mediadora (Hong *et al.* 2008). Proponemos que dicha molécula mediadora puede ser eIF3f.

En resumen, silenciar la expresión de eIF3f equivale a la degradación del mismo. Al no estar presente eIF3f, S6K1 no puede ser activada y el inhibidor de eIF4E, 4E-BP1, no puede ser inactivado. En consecuencia, la síntesis de proteínas es inhibida, lo que conduce a la inhibición del crecimiento celular y la inhibición de la activación de complejos Cdk/Cyc, necesarios para la progresión del ciclo celular.

En cuanto al efecto de la expresión ectópica del gen eIF3f, Shi *et al.* (2006) encontraron que eIF3f tiene un efecto regulador negativo de la síntesis de proteínas. Resultados similares fueron encontrados en nuestro laboratorio (Higareda *et al.* 2003). En concordancia con lo anterior, la inhibición de la síntesis de proteínas afecta al crecimiento y a la división celular, lo que conduce a la muerte celular, pero por un mecanismo diferente al propuesto aquí para el silenciamiento de la expresión de eIF3f, ya que no estaría alterando la activación de S6K1. Sugerimos que su efecto reside sobre la inhibición de la síntesis de proteínas específicas que son requeridas principalmente en las fases G1 y G2 del ciclo celular; es decir, en los puntos en que no debería estar presente su función de regulador negativo. Por ejemplo, y sobre todo, en la fase G1 del ciclo celular se forman nuevos orgánulos, lo cual requiere de la síntesis de enzimas y proteínas estructurales (Lewin 2007).

Un interés del presente trabajo fue evaluar a eIF3f como posible blanco en terapia génica contra células cancerosas. Se sustenta en estudios previos de nuestro laboratorio con células de tabaco TBX-2, donde se encontró que el silenciamiento de eIF3f conducía a muerte celular. Esta idea nace de un interés por encontrar a un gen “ideal” que pueda ser blanco a silenciar e inducir apoptosis en células cancerosas, desde la perspectiva de silenciar una función celular básica y no necesariamente alterada en dicha patología (como son los casos de *i.e.* p53, cdc2, BCR, Ras, VEGF, bcl-2, etc).

Un proceso celular básico e irreversible es la división celular, el cual requiere, como fue mencionado anteriormente, de la expresión y activación de proteínas específicas en tiempo, concentración y espacio. El cáncer es en última instancia, un grupo de células que son incapaces de detener su ciclo celular (división) y, el organismo que es incapaz de controlarlas y eliminarlas, incapacidad que frecuentemente lo lleva a la muerte. Una circunstancia que ha limitado el uso de terapia génica por silenciamiento de genes importantes para el ciclo celular, es que con frecuencia existen varias copias del mismo gen en el genoma, por lo que su concentración supera la capacidad silenciadora del antisentido o bien, otras proteínas similares

sustituyen la función del gen silenciado, como sucede con las Cdks (Morris *et al.* 2005). eIF3f es un monogen y su función no es sustituida por otro gen. Aunque existe una secuencia similar en el cromosoma 2, en este trabajo se demostró que se trata de un retropseudogen (inactivo). Así también en este trabajo se demostró que el silenciamiento de eIF3f por antisentido o por siARN genera muerte celular, por lo que no hay sustitución funcional. Merece atención especial la velocidad con que el silenciamiento de eIF3f genera apoptosis, que es de 24 a 48 horas posteriores al tratamiento, esto es, de uno a dos ciclos celulares. Esto significa que, *en teoría*, un tratamiento de terapia génica usando a eIF3f como blanco a silenciar eliminaría al cáncer en un corto periodo de tiempo. Actualmente se realizan experimentos en organismos completos encaminados a saber si lo encontrado en este trabajo también se logra en esos modelos (Cortés-García *et al.* 2009).

VIII. PERSPECTIVAS

El gen eIF3f es esencial para la proliferación celular y su silenciamiento induce muerte celular programada. Su expresión está vinculada al desarrollo del ciclo celular y su perfil de expresión transcripcional es único, con máximos en las fases S y M, por lo que el estudio de sus elementos *cis* y *trans* reguladores en su promotor prometen dar luz sobre nuevos circuitos de regulación génica durante la división celular. Asimismo, el hecho de que el gen eIF3f se exprese en dos fases distintas del ciclo celular genera interrogantes acerca de su función (o debería decir funciones), ya que los circuitos morfogénicos y bioquímicos son muy distintos en la fase S en comparación a la fase M. Existe evidencia que indica que eIF3f no se relaciona exclusivamente con eIF3, sino que se relaciona físicamente con proteínas ajenas a este factor traduccional, por lo que sería interesante conocer con cuáles (además de los ya descritos), y a través de este conocimiento, saber en qué otras vías metabólicas o genéticas se encuentra involucrado.

El silenciamiento de eIF3f induce muerte celular programada en tan solo 24 horas, por lo que eIF3f se convierte en un candidato atractivo para ser manipulado en terapia génica. Será necesario saber si se induce apoptosis en varios tipos celulares, y si funciona en organismos modelo completos, como rata, conejo, etc.

IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. Akiyoshi, Y., J. Clayton, L. Phan, M. Yamamoto, A. G. Hinnebusch, Y. Watanabe y K. Asano. 2001. **Fission Yeast Homolog of Murine Int-6 Protein, Encoded by Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site, Is Associated with the Conserved Core Subunits of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3.** *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10056-10062.
2. Aravind L. y C. P. Ponting. 1998. **Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.** *Protein Science* 7: 1250-1260.
3. 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.
4. Benne R. y Hershey J.W. 1978. **The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes.** *The Journal of Biological Chemistry* 253: 3078-3087.
5. Browning K.S., D.R. Gallie, J.W. Hershey, A.G. Hinnebusch, U. Maitra, W.C. Merrick, C. Norbury. 2001. **Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3.** *Trends in Biochemical Sciences* 26(5): 284.
6. Buchanan, B. B., W. Gruissem y R. L. Jones. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** *American Society of Plant Physiologists USA.* 1367: 528-565.
7. 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.

8. Castedo M., J. L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema y G. Kroemer. 2004. **Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.** *Oncogene* 23(16): 2825-2837.
9. Csibi A., K. Cornille, M. P. Leibovitch, A. Poupon, L. A. Tintignac, A. M. J. Sanchez y S. A. Leibovitch. 2010. **The Translation Regulatory Subunit eIF3f Controls the Kinase-Dependent mTOR Signaling Required for Muscle Differentiation and Hypertrophy in Mouse.** *PLoS One* 5(2): e8994.
10. Degtarev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz y J. Yuan. 2005. **Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.** *Nature Chemical Biology* 1(2): 112-119.
11. De Toro G. 2006. **Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular.** En: García Pobrete E. y Moro Rodríguez E. (Eds.) *Actas del VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.* Madrid, España. ISBN: 84-690-3467-7 <http://conganat.cs.urjc.es/>
12. Dong, Z., Z. Liu, P. Cui, R. Pincheira, Y. Yang, J. Liu y J.T. Zhang. 2009. **Role of eIF3a in regulating cell cycle progression.** *Experimental Cell Research* 315:1889-1894.
13. Fan H. y S. Penman. 1970. **Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis.** *Journal of Molecular Biology* 50: 655-670.
14. Fingar D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou y J. Blenis. 2004. **mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E.** *Molecular and Cellular Biology* 24(1): 200-216.

15. Garcia-Cortes J. C., A. E. Higareda-Mendoza y M. A. Pardo-Galvan. 2009. **Rat (*Rattus norvegicus*) eukaryotic initiation factor 3f (eIF3f) knockdown affects liver regeneration.** *Hepatology* (enviado).
16. 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.
17. Hara M. R. y S. H. Snyder. 2007. Cell signaling and neuronal death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 117-141.
18. Hartwell L. H. y T. A. Weinert. 1989. **Checkpoints, controls that ensures the order of cell cycle events.** *Science* 246: 629-633.
19. 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.
20. Hernández-Soto P. 2005. **Análisis estructural del gen y la proteína psif en eucariontes superiores.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 46 pp.
21. Higareda-Mendoza A. E., A. Farias, J. Llanderal, A. Méndez y M. A. Pardo-Galván. 2003. **A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition.** *Miami Nature Biotechnology Short Reports* 14: 111.
22. 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.

23. Hong F., M. D. Larrea, C. Doughty, D. J. Kwiatkowski, R. Squillace y J. M. Slingerland. 2008 **mTOR-Raptor Binds and Activates SGK1 to Regulate p27 Phosphorylation**. *Molecular Cell* 30: 701-711.
24. Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka y E. Kominami. 2006. **Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals**. *The Journal of Biological Chemistry* 281(7): 4035-4041.
25. Kamada, Y., T. Sekito y Y. Ohsumi. 2004. **Autophagy in yeast: a TORmediated response to nutrient starvation**. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 279: 73-84.
26. Kim T. H., B. H. Kim, A. Yahalom, D. A. Chamovitz y A. G. von Arnim. 2004. **Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the Arabidopsis translation initiation factor subunit eIF3h**. *Plant Cell* 16: 3341-3356.
27. King, R. W., P. K. Jackson y M. W. Kirshner. 1994. **Mitosis in transition**. *Cell* 79: 563-571.
28. Klionsky D. J. 2005. **Autophagy**. *Current Biology* 15(8): R282-R283.
29. 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.
30. Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata y G. Melino. (2005). **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death**. *Cell Death and Differentiation* 12: 1463-1467.

31. Kroemer G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R.A Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky y G. Melino. 2009. **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differentiation* 16(1): 3-11.
32. 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.
33. 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.
34. Leist M. y M. Jaattela. 2001. **Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(8): 589-598.
35. Le Tourneau C., S. Faivre, M. Serova y E. Raymond. 2008. **mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work?** *British Journal of Cancer* 99(8): 1197-1203.
36. Lewin B. 2007. **Genes IX.** Jones and Bartlett Publishers. 9a. ed. Boston, MA. USA. 912 pp.
37. Llanderal-Mendoza J. 2003. **Estudios in vivo sobre la Función de la Proteína Psif en la División Celular de Nicotiana tabacum.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 64 pp.

38. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, A. C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Sipursky y J. Darnell. 2005. **Biología Celular y Molecular**. 5ª. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 853-973.
39. Lum J. J., D. E. Bauer, M. Kong, M. H. Harris, C. Li, T. Lindsten y C. B. Thompson. 2005. **Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis**. *Cell* 120(2): 237-248.
40. Masutani M., N. Sonenberg, S. Yokohama y H. Imataka. 2007. **Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3**. *The EMBO Journal* 26: 3373-3383.
41. 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, NY. 934 pp.
42. Merrick W. C. 2003. **Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes**. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31: 378-385.
43. Morgan D. O. 1997. **Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 261-291.
44. Morgan D. O. 2007. **The cell cycle: principles and control**. New Science Press Ltd. and Oxford University Press. Corby, Northants, UK. 297: 2-54, 111-137.
45. Morris C. y Jalinot P. 2005. **Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation**. *Oncogene* 24: 1203-1211.
46. Murray A. W. 2004. **Recycling the cell cycle: cyclins revisited**. *Cell* 116: 221-234.
47. 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].

48. Norbury C. y P. Nurse. 1992. **Animal cell cycles and their control.** *Annual Review of Biochemistry* 61: 441-470.
49. Pardee A. B. 1989. **G1 events and regulation of cell proliferation.** *Science* 246: 603-608.
50. Paulovich A. G., D. P. Toczyski y L. H. Hartwell. 1997. **When checkpoints fail.** *Cell* 88: 315-321.
51. 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.
52. 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.
53. Preiss T. y M. W. Hentze. 2003. **Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation.** *Bioessays* 25: 1201 – 1211.
54. Pyronnet S., L. Pradayrol y N. Sonenberg. 2000. **A cell cycle-dependent internal ribosome entry site.** *Molecular Cell* 5: 607-616.
55. Roninson I. B., E. V. Broude y B. D. Chang. 2001. **If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells.** *Drug Resistance Updates* 4(5): 303-313.
56. Russell P. y P. Nurse. 1986. **cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast.** *Cell* 45(1): 145-153.
57. Schweichel J. U. y H. J. Merker. 1973. **The morphology of various types of cell death in prenatal tissues.** *Teratology* 7(3): 253-266.

58. Shi, J., Y. Feng, A. C. Goulet, R. R. Vaillancourt, N. A. Sachs, J. W. Hershey y M. A. Nelson. 2003. **The p34cdc2-related Cyclin-dependent kinase 11 Interacts with the p47 Subunit of Eukaryotic Factor 3 during Apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* 278: 5062-5071.
59. 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.
60. Shintani T. y D. J. Klionsky. 2004. **Autophagy in health and disease: a double-edged sword.** *Science* 306(5698): 990-995.
61. Sperandio S., I. de Belle y D. E. Bredesen. 2000. **An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97(26): 14376-14381.
62. Sperandio S., K. Poksay, I. de Belle, M. J. Lafuente, B. Liu, J. Nasir y D. E. Bredesen. 2004. **Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix.** *Cell Death and differentiation* 11(10): 1066-1075.
63. 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.
64. Wang Y., X. Li, L. Wang, P. Ding, Y. Zhang, W. Han y D. Ma. 2004. **An alternative form of paraptosis-like cell death triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression.** *Journal of Cell Science* 117(Pt 8): 1525-1532.

65. Wu M., H. F. Ding y D. E. Fisher. 2001. **Apoptosis: Molecular Mechanisms**. En: Zheng Y. (Ed.) **Encyclopedia of Life Sciences**. 1a. ed. John Wiley & Sons, Ltd. USA. <http://www.els.net> [DOI: 10.1038/npg.els.0001150].
66. Zhou C., F. Arslan, S. Wee, S. Krishnan, A. R. Ivanov, A. Oliva, J. Leatherwood y D.A. Wolf. 2005. **PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes**. *BMC Biology* 3:14.