

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Tesis

**Expresión de eIF3f en *Schizosaccharomyces
pombe***

Que presenta:
Biol. Paulina Hernández Soto

Para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis: Dr. Marco Aurelio Pardo Galván
Coasesor: M. B. Ana Edith Higareda Mendoza

Morelia Michoacán, Diciembre de 2008

ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
Capítulo I Introducción	
1.1 Ciclo celular	2
1.2 Complejos CDK-Ciclina	2
1.3 Ciclo celular en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
1.4 Regulación del ciclo celular	7
1.4.1 Nivel transcripcional	7
1.4.2 Regulación traduccional	11
1.4.3 Regulación post-traduccional	13
Capítulo II Antecedentes	
2.1 Factor de Iniciación Eucariótico 3 (eIF3)	15
2.2 eIF3f	17
Capítulo III Hipótesis y objetivos	
3.1 Hipótesis	23
3.2 Objetivo general	23
3.3 Objetivos específicos	23
Capítulo IV Estrategia experimental	24
Capítulo V Materiales y métodos	
5.1 Materiales	25
5.1.1 Cepas	25
5.1.2 Medios	25
5.1.3 Plásmidos	26
5.2 Métodos	
5.2.1 Extracción del DNA de levadura	28

5.2.2	Amplificación por reacción de PCR	28
5.2.3	Electroforesis en gel de agarosa	29
5.2.3.1	Purificación de las ampliaciones	30
5.2.4	Digestión directa a producto de PCR	30
5.2.5	Reacción de ligación	30
5.2.6	Transformación por electroporación de bacteria	31
5.2.7	Transformación por electroporación de levadura	31
5.2.8	Ensayo de β-Galactosidasa	31
5.2.9	PCR a partir de colonia	32
5.2.10	Extracción de DNA plasmídico de bacteria	32
5.2.10.1	Reacción de digestión para liberar fragmentos	33
5.2.11	Curva de crecimiento de la cepa NCYC1354	33
5.2.12	Sincronización	33
5.2.12.1	Almacenamiento y fijación de células	34
5.2.12.2	Tinción de muestras	34
5.2.13	Extracción de RNA total de <i>S. pombe</i>	35
5.2.13.1	Cuantificación de RNA total	35
5.2.14	Northern Blot	35
5.2.14.1	Construcción de la sonda	35
5.2.14.2	Preparación del gel	36
5.2.14.3	Preparación de las muestras de RNA para cargar	36
5.2.14.4	Corrimiento y observación del gel	36
5.2.14.5	Remoción del formaldehído	37
5.2.14.6	Transferencia	37
5.2.14.7	Fijación del RNA a la membrana	37
5.2.14.8	Pre-hibridación	37

5.2.15 Soluciones	38
Capítulo VI Resultados	
6.1 Curva de crecimiento de la cepa NCYC 1354 de <i>S. pombe</i>	39
6.2 Sincronización de la cepa NCYC de <i>S. pombe</i> con HU	40
6.3 Patrón de expresión de eIF3f de <i>S. pombe</i> respecto al ciclo celular	41
6.4 Obtención y análisis de la región intergénica de eIF3f	44
6.5 Amplificación de la región intergénica y deleciones de eIF3f	47
6.6 Clonación de la región intergénica y deleciones de eIF3f en el vector Yep 363	47
6.7 Transformación de TPC1 de <i>S. pombe</i> con las construcciones de Yep 363	50
6.8 Ensayo de β -galactosidasa	50
Capítulo VII Discusión	53
Capítulo VIII Conclusión	56
Bibliografía	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 Ciclo celular de <i>S. pombe</i> .	4
Figura 2 Puntos de control que aseguran que los eventos del ciclo celular se lleven a cabo de manera correcta y en orden.	6
Figura 3 Diferentes niveles de regulación que controlan la progresión del ciclo celular.	7
Figura 4 Esquema representativo de un promotor eucariótico.	8
Figura 5 Organización de los diferentes elementos de respuesta dentro del promotor de los genes eucarióticos.	9
Figura 6 Inicio de la síntesis de proteínas.	13
Figura 7 Patrón de expresión del factor eIF3f en cultivos sincronizados. A) Expresión de eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549.	18
Figura 8 Silenciamiento de eIF3f en células humanas y de tabaco.	19
Figura 9 Dominios de las diferentes proteínas homólogas a eIF3f.	21
Figura 10 Estructura génica de los diferentes eIF3f.	22
Figura 11 Mapa del vector de expresión en <i>E. coli</i> pGEM-T Easy.	26
Figura 12 Mapa del vector de expresión en <i>S. pombe</i> YEp 363.	27
Figura 13 Curva de crecimiento de la cepa NCYC 1454 de <i>S. pombe</i> en medio de cultivo YPD líquido.	39
Figura 14 Sincronización de la cepa NCYC 1354 de <i>S. pombe</i> con hidroxiaurea (HU).	40
Figura 15 Construcción de la sonda de eIF3f de <i>S. pombe</i> utilizada para el Northern Blot.	41
Figura 16 Northern blot de eIF3f de <i>S. pombe</i> .	42
Figura 17 Intensidad relativa de la expresión del transcrito eIF3f e índice mitótico del cultivo de <i>S. pombe</i> sincronizado con HU.	43
Figura 18 Región intergénica de eIF3f de <i>S. pombe</i> .	44
Figura 19 Secuencia de la región intergénica.	46

Figura 20 Amplificación de la región intergénica de eIF3f y sus deleciones.	47
Figura 21 PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de <i>E. coli</i> transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + la región intergénica.	48
Figura 22 PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de <i>E. coli</i> transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + primera deleción.	49
Figura 23 PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de <i>E. coli</i> transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + segunda deleción.	49
Figura 24 PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de <i>E. coli</i> transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + Tercera deleción.	50
Figura 25 Ensayo de β -galactosidasa.	51
Figura 26 Región de -235 a la -350 de la región intergénica de eIF3f de <i>S. pombe</i> .	52

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) o levadura de fisión es un eucarionte unicelular de vida libre, en forma de bacilo de aproximadamente 2 a 3 micras de diámetro y de 7 a 14 de longitud. Esta levadura fue aislada de cerveza Africana hace más de cien años, de ahí el nombre de pombe que significa “proveniente de la cerveza” en Swahili. www-rcf.usc.edu/~forsburg/main.html

S. pombe ha sido un organismo modelo en el estudio de células eucarióticas, especialmente en estudios de ciclo celular. En el 2001 se entregó el premio Nobel a Paul Nurse y Leland Hartwell por el descubrimiento de los reguladores clave del ciclo celular, es decir, del mecanismo que controla la división celular en *S. pombe* (Gupta, 2001).

S. pombe completa su ciclo mitótico en aproximadamente 150 minutos en condiciones óptimas de cultivo y es relativamente fácil modificarla genéticamente, sin contar que es un organismo haploide. El genoma de *S. pombe* se encuentra totalmente secuenciado y consta de 13.8 millones de pares de bases distribuidos en tres cromosomas donde se han identificado 4,824 genes que codifican proteínas, siendo éste a la fecha el número más pequeño de genes contenido en un genoma eucarionte. El genoma de *S. pombe* se caracteriza porque el 43% de sus genes tienen intrones de tamaño pequeño, muchos más intrones de los que podemos encontrar en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ya que solo el 5% de sus genes contiene intrones. Además de las diferencias entre los genomas de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, encontramos diferencias en su forma de división: la primera se divide de manera asimétrica por gemación y la segunda por división simétrica, siendo ésta última semejante a la división en eucariontes superiores. Debido a esta característica, a *S. pombe* se le conoce como la levadura de fisión (Wood *et al.*, 2002).

S. pombe muestra un gran número de similitudes con las células eucariontes de mayor complejidad, siendo una de ellas la regulación del ciclo celular. Por lo cual se ha usado como modelo para el estudio de la división celular. El uso de *S. pombe* en las investigaciones sobre genes involucrados en el ciclo celular de mamíferos se ha incrementado, gracias a que en esta levadura de fisión solo se presenta una copia de cada gen. Son tantas las similitudes entre *S. pombe* y mamíferos que los laboratorios de biología celular de mamíferos le han apodado el “micro mamífero” (Forsburg y Rhind, 2006).

En *S. pombe* se han identificado 50 genes asociados con enfermedades humanas incluyendo fibrosis quística, diabetes y cáncer. De éstos, veintitrés genes se encuentran involucrados en respuesta a daño al DNA y la regulación de los puntos de control del ciclo celular; procesos que están involucrados en la estabilidad genómica.

Por otra parte, investigaciones de genómica comparativa han permitido dilucidar la evolución de los organismos y revelar los genes que definen las células eucarióticas, así como la transición entre los organismos unicelulares y multicelulares (Wood *et al.*, 2002).

1.1 CICLO CELULAR

El ciclo celular es el proceso por el cual una célula se convierte en dos y consiste en una secuencia de eventos donde la célula duplica todos sus componentes y se divide físicamente en dos células hijas (Fig. 1), de tal manera que cada célula hija recibe la información y maquinaria necesaria para repetir este procedimiento. En otras palabras, la célula sobrevive y propaga su genoma a una nueva generación. La división celular es llevada a cabo en todos los organismos y este proceso les permite crecer, desarrollarse y regenerarse cuando sufren algún daño (Mendoza *et al.*, 2004).

Durante la división celular ocurren eventos cruciales, como la duplicación del genoma en la fase S ó de síntesis, la división nuclear y la correcta segregación cromosómica durante la fase M ó Mitosis. Estos eventos están separados por dos intervalos ó “gaps” G1 y G2. Durante el primer intervalo G1 la célula incrementa su biomasa por lo que sintetiza y acumula gran cantidad de proteínas requeridas para la siguiente fase. Mientras que el segundo intervalo G2 se caracteriza por la síntesis solamente de las proteínas necesarias para la progresión a mitosis (Fig.1) (Tyson *et al.*, 2002).

La progresión ordenada del ciclo celular es asegurada por mecanismos intrínsecos, los cuales regulan la dependencia de un evento posterior a uno anterior. Un ejemplo claro de esto es que si no ha existido la correcta replicación del DNA la célula no podrá entrar a la fase mitótica (Fariás *et al.*, 2005).

1.2 COMPLEJOS CDK-CICLINA

Debido a que el ciclo celular tiene un papel central en los procesos de crecimiento biológico, reproducción y desarrollo, un gran número de investigaciones se han enfocado en identificar los componentes moleculares y las interacciones proteicas que controlan su progresión. Las moléculas maestras del ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y son éstas las que tienen el control interno del ciclo celular, y cuya acción puede resumirse en la activación e inhibición de otras proteínas a través de fosforilaciones (Fig. 2) (Tyson *et al.*, 2002).

Los complejos Cdk-Ciclina son heterodímeros compuestos de una cinasa, o subunidad catalítica, que fosforila aminoácidos específicos de algunas proteínas, y una ciclina o subunidad regulatoria, la cual es necesaria para activar la cinasa y dar especificidad de sustrato a ésta. Las ciclinas, como su nombre lo indica, tienen una

expresión cíclica a través del ciclo celular. Cuando éstas se asocian con su cinasa correspondiente disparan eventos de gran importancia del ciclo celular como son: la replicación del DNA, la ruptura de la envoltura nuclear, la condensación de los cromosomas y el ensamblaje del uso mitótico, a través de la fosforilación de ciertas proteínas blanco y de ellas mismas (John *et al.*, 2001).

Los complejos Cdk:Ciclina permiten la progresión del ciclo celular de una manera correcta y ordenada, modulando los puntos de control que se encuentran a través del ciclo celular. El primer punto de control del ciclo celular se localiza en la fase G1, llamado "Start" en levaduras o punto de restricción en mamíferos (Fig. 2). Es aquí donde la célula toma la decisión de iniciar o no un ciclo celular, en consideración a estímulos externos e internos. El segundo punto se presenta en la transición G2/M donde la célula asegura que su masa celular, la replicación de su material genético y la energía sean adecuadas para proseguir con la división física. El tercer punto de control se encuentra durante la mitosis, entre la metafase y anafase. Aquí se revisa la estructura del uso mitótico, mientras que en el cuarto punto de control se revisa el correcto posicionamiento del huso mitótico y la estructura del anillo contráctil (Smith y Medema, 2001).

1.3 CICLO CELULAR EN *Schizosaccharomyces pombe*

La fase G1 de *S. pombe* es muy corta dura aproximadamente 20 minutos ocupando aproximadamente el 13% del tiempo total de su ciclo celular que es de alrededor de 150 minutos y coincide con la etapa de septación.

La fase G2 se caracteriza en esta levadura por ocupar aproximadamente el 70% del tiempo de su ciclo celular y es donde se incrementa la masa crítica de la célula, a diferencia de eucariontes superiores en los cuales el aumento de biomasa se presenta durante la fase G1. Dado el gran tamaño de la fase G2 en *S. pombe*, ésta se a dividido en: G2 temprana, media y tardía. Rustici y colaboradores en el 2004 reportan que durante la fase G2 temprana *S. pombe* activa su crecimiento monopolar a bipolar, incrementando para ello su tasa de crecimiento y activando genes involucrados en el crecimiento y metabolismo (Tabla 1).

La fase M está marcada por la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, la segregación de los cromosomas a los polos opuestos de la célula y citocinesis, en donde se forma un septo a la mitad de la célula que separa a las dos células hijas (Fig. 1) (Sveiczner and Novák 2002).

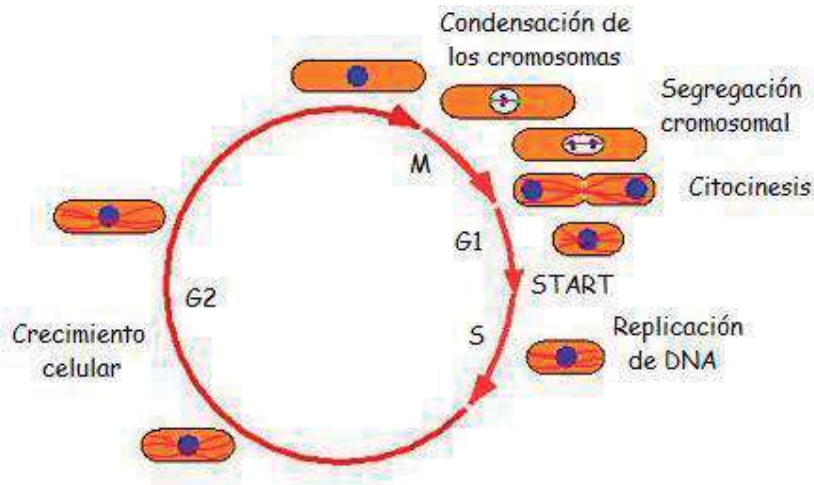


Figura 1. Ciclo celular de *S. pombe*. Esquema representativo de la duración de las diferentes fases del ciclo celular de *S. pombe*, así como los procesos que son llevados a cabo en cada una de ellas: replicación del DNA, crecimiento celular, condensación y segregación de los cromosomas y por último la división física de la célula.

Modificado de www.mc.vanderbilt.edu/vumcdept/cellbio/gould/images/Fig01.jpg

Actualmente, los avances de la biología molecular en las áreas de genómica y proteómica han generado una gran cantidad de información. Gracias a los estudios de microarreglos en células en crecimiento y división se han identificado cientos de genes con una expresión cíclica. Se ha reportado que aproximadamente que el 40% de los genes de *S. pombe* muestran una transcripción ciclo celular regulada o cíclica. Estudios realizados por Peng y colaboradores en el 2005 con cultivos de células sincronizadas por elutriación, bloqueo y liberación de cepas mutantes en *cdc25* de *S. pombe* muestran 747 genes cuya expresión oscila durante el ciclo celular; los productos de algunos de estos genes ya se encuentran caracterizados (Tabla 1).

El complejo transcripcional DSC (DNA synthesis control) el cual activa la transcripción de los genes requeridos para la transición G1/S se une a los genes que contienen la secuencia consenso MCB en sus regiones promotoras (Peng *et al.*, 2005). Se propone que el complejo transcripcional llamado PBF (pombe cell-cycle box (PCB)-binding factor) regula la transcripción durante la transición M-G1. Genes que contienen la secuencia consenso PCB en su región promotora son: *cdc15*, *fin1*, *plo1* y *sid2* que presentan un pico de expresión en el intervalo M-G1. Mientras que la expresión de los genes *cdc25*, *rum1* y *wis3* muestran un máximo de expresión en la fase G2 (Peng *et al.*, 2005).

Tabla 1. Genes con función caracterizada durante el ciclo celular de *S. pombe*

Proceso	G1	S	G2	G2/M	M
Control del ciclo celular	<i>rum1, csk1, mik1</i>		<i>suc1, spd1, wee1, cig1</i>	<i>cdc25</i>	<i>Cdc13, cdr1, nuc2, hcn1</i>
Replicación DNA y ensamblaje de nucleósomas	<i>cd18, pfh1, cdc1, cdt1, cdt2, pol1, cdc22, ssb1, suc22, mip1, cdm1</i>	<i>hta1, hta2, htb1, hht1, hht2, hht3, hhf1, hhf2, hf3</i>		<i>cdc23, orc5</i>	<i>Cdc20, rfc2</i>
Organización de cromosomas	<i>rad21, dfp1, sds21, fin1, smc3, cut2, cnp1</i>	<i>sds22</i>	<i>hst4, spc24, dhp1, cid14, mis4, cut1</i>	<i>cut17</i>	<i>cnd1</i>
Citocinesis	<i>sid2, mob1, imp2, par2, spn2, mid2, cdc4</i>		<i>aps1, rng2, mid1, sep1, myo52</i>	<i>myo51, cdc11</i>	<i>etd1, cdc15, myp2, plo1, rlc1</i>
Subunidades de RNA pol. Biosíntesis de aminoácidos			<i>rpb10, rpb3, rpb9</i>		
			<i>leu2, his3</i>		
Biogénesis de proteínas		<i>tif34</i>	<i>tif51, tif5, tef3, sui1, rps2, rps1202, rpp201, rpp202, rpl901, rpl25a, rpl3202, rps13, rpl2701, rpl129, rpl3801</i>	<i>rpl603</i>	
Transporte y secreción	<i>bet1, emp24, erv14, sec22, anc1</i>	<i>rer1, sod2, clc1, fio1, ght3, ypt3, sec17</i>	<i>arf1, n150, kap104, ght2, bfr1, nup124, nrf1, pmd1, mae1, pim1, apl1, pse1, sec72, sar1, erg28, lsd1, ipk1</i>	<i>Sec1</i>	<i>sly1, abc1, sso1</i>
Metabolismo lípidos/esteroides		<i>erg7, cut6</i>			<i>bem46, gpi1</i>
Biogénesis de pared celular	<i>chs2, exg1, eng1, pmk1, bgs4</i>		<i>cwl1, psu1, gmh2, bgs3, hsf1, atf1, gpx1, ctt1, sks2, mpr1, hsp9, wis4, wis1, csx1, sin1, hsp60, bip1</i>	<i>exg2</i>	<i>Cwg2, ags1</i>
Metabolismo de carbohidratos	<i>fum1</i>		<i>scr1</i>		
Modificación por Ubiquitina	<i>ubc15, ubc3</i>	<i>pub1</i>	<i>ubi4, ubi3, ubi1</i>		<i>ubc11</i>
Reparación de DNA	<i>msh6</i>		<i>rad25, rdp1, top2, hus2</i>	<i>ung1</i>	<i>pms1, pac1, mus81</i>

(Tomada y modificada de Peng *et al.*, 2005)

En *S. pombe* existe una cinasa esencial llamada CDC2 y cuatro ciclinas: Cdc13, Cig 1, Cig 2 y Puc 1, siendo sólo la ciclina Cdc 13 esencial para la progresión del ciclo celular (Sveiczer *et al.*, 2004). El complejo Cdc2/Cdc13 dispara la fase S con modesta actividad y la fase M con alta actividad (Fig. 2).

Como se mencionó anteriormente, el ciclo celular en *S. pombe* es llevado a cabo por fluctuaciones en la actividad del complejo Cdc2/Cdc13, también llamado Factor Promotor de la Mitosis (MPF), cuya actividad es baja en G1, intermedia durante S y G2 y alta en M. La actividad diferencial del MPF durante el ciclo celular está dada por la relación entre éste y los reguladores negativos: APC (Complejo Promotor de la Anafase), Wee1 y Mik 1 (Fig. 2).

La ciclina Cdc13 es continuamente sintetizada en el citoplasma, en donde se une con Cdc2 y como dímero se traslada al interior del núcleo. Durante G2 temprana, Cdc2/Cdc13 se acumula en el núcleo en forma inactiva, debido a que Cdc2 es

fosforilada por las cinasas Wee1 y Mik1 manteniendo así el complejo inactivo. El grupo fosfato es removido por la fosfatasa CDC25 activando el complejo al final de la fase G2. La destrucción del MPF es necesaria para la salida de mitosis y depende de la degradación de Cdc13 por APC/Slp1, este último es activado a su vez por MPF a través de una retroalimentación negativa, lo que permite a la célula re-ingresar a G1 (Fig. 2).

La actividad del complejo Cdc2/Cdc13 es baja durante G1 por la acción de Rum1 y Ste9, la ciclina Cdc13 es marcada con ubiquitina por Ste9/APC para su degradación; al mismo tiempo Rum1, el cual es un inhibidor estequiométrico, aparece y se une a los dímeros de Cdc2/Cdc13 presentes en G1. Para la entrada a la fase S, es necesario que Rum1 y Ste9 sean neutralizados y es aquí cuando actúan las ciclinas Cig1, Cig2 y Puc1, las cuales se unen a Cdc2 y fosforilan a Rum1 y Ste9 inactivándolas y marcándolas para su degradación. Así, durante las fases S/G2 su actividad es intermedia gracias a la ausencia de Ste y Rum1 (Fig. 2) (Sveiczzer *et al.*, 2004).

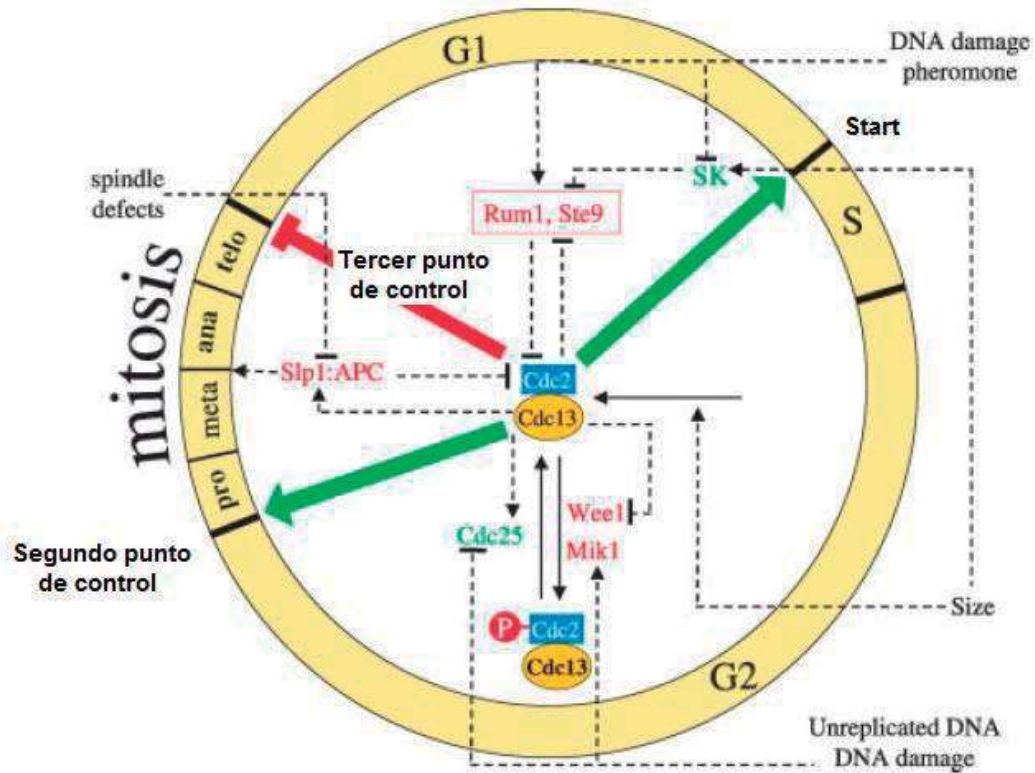


Figura 2. Puntos de control que aseguran que los eventos del ciclo celular se lleven a cabo de manera correcta y en orden. El orden correcto de cada una de las fases del ciclo celular es asegurado por las cinasas dependientes de ciclinas (los dímeros de Cdc2/Cdc13). En *S. pombe*, Cdc2/Cdc13 permite el paso de la transición G1/S y G2/M, pero previene la salida de Mitosis. Cdc2/Cdc13 es regulado negativamente por Sfp1, Ste9, Rum1 y Wee1 y activado por Cdc25. Tomado de Tyson *et al.*, 2002

1.4 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Como mencionamos anteriormente, en eucariontes la progresión del ciclo celular es regulada por una gran variedad de mecanismos, que van desde el nivel transcripcional ciclo celular específico, traduccional y post-traduccional (modificación de proteínas y degradación proteolítica) (Fig. 3). Estos diferentes niveles de regulación permiten a la célula no sólo regular el paso a través del ciclo celular, sino alcanzar una cierta plasticidad, hace pausas en alguna de sus fases y solucionar posibles problemas que pudieran presentarse y así proseguir con su correcta duplicación o, en caso contrario, entrar en apoptosis.

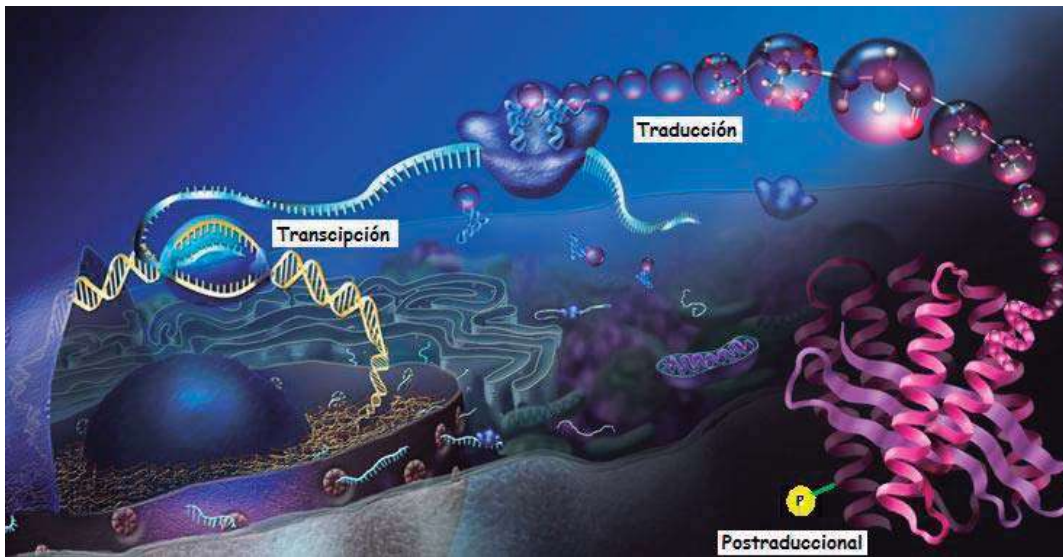


Figura 3. Diferentes niveles de regulación que controlan la progresión del ciclo celular. La transcripción es el proceso mediante el cual la información contenida en el DNA es copiada a RNA, para posteriormente ser traducida a un lenguaje de aminoácidos. Una vez traducido el mensaje es necesario, en algunas ocasiones, activar o inactivar la función de la proteína a través de la adición o remoción de diferentes grupos: fosfatos, ubiquitininas, carbohidratos, etc.

1.4.1 Nivel Transcripcional

En ausencia de secuencias o motivos a los cuales se unan proteínas (factores transcripcionales) capaces de dirigir su transcripción, un gen es irrelevante o infuncional, se encuentra codificado dentro del DNA pero sin mayor importancia. Por esta razón la región promotora de un gen cobra gran importancia ya que ésta contiene elementos o motivos que le permiten regular sus niveles de expresión. Esta regulación comprende desde las condiciones donde el gen debe expresarse hasta en qué células o tejidos se requiere. Al proceso antes mencionado se le conoce como regulación transcripcional (Fig. 4A).

La transcripción es un proceso a partir del cual la información contenida en DNA es copiada a RNA, y es importante en funciones biológicas fundamentales como

autonomía celular, respuesta de la célula al medio ambiente y generación de la diversidad funcional y morfológica para el desarrollo y la evolución.

La enzima fundamental en la transcripción es la RNA polimerasa, de la cual se han identificado tres tipos diferentes: RNA polimerasa I dedicada a la transcripción de los RNA ribosomales (RNAr); RNA polimerasa II encargada de la transcripción de los RNA mensajeros (RNAm) los cuales codifican para las proteínas y RNA polimerasa III que transcribe los RNA's de transferencia (RNAt) y RNAr 5S.

Para que se lleve a cabo la transcripción de los RNAm es necesario que la RNA polimerasa II se una a la región promotora del gen mediante los factores transcripcionales (TF), identificados como TF IIA, B, C, entre otros. Estos factores regulan a la RNA polimerasa II (Fig.4B). Los factores transcripcionales son proteínas que se unen a secuencias específicas en el DNA denominadas cajas o secuencias consenso, dependiendo del caso, los factores reguladores de la transcripción pueden reprimir o activar la transcripción y son esenciales para la programación de la expresión génica.

Las regiones sobre las que actúan los factores transcripcionales son secuencias de DNA no codificante, las cuales se localizan cerca de las secuencias codificantes, y son específicamente reconocidas por los factores transcripcionales. Las cajas más frecuentes son las CCAAT y TATA (Fig.4B).

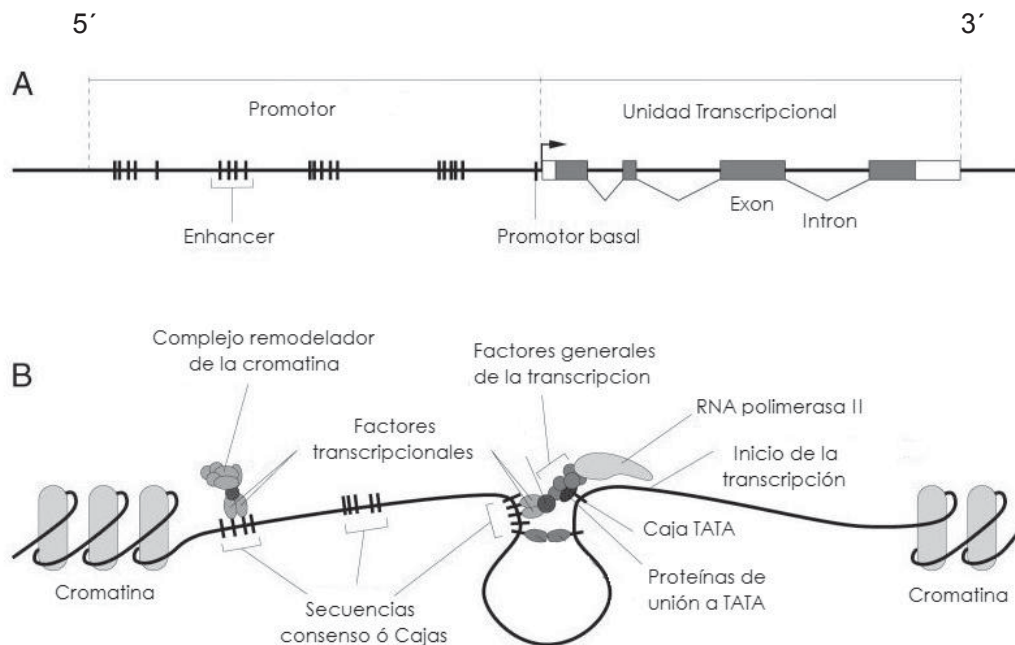


Figura 4. Esquema representativo de un promotor eucariótico. A) Representación de un gen eucariótico típico, el cual se puede dividir en dos regiones: promotor y unidad transcripcional. B) Estructura de un promotor. Para dar inicio a la transcripción es necesaria la interacción de docenas de proteínas con secuencias específicas en el promotor, entre ellas se incluye la RNA polimerasa II, así como factores generales y específicos de la transcripción. Tomado de Wray *et al.*, 2003

Las cajas o elementos regulatorios se encuentran localizados preferentemente río arriba del inicio de la transcripción (región 5'); algunas pueden encontrarse al final del gen en la región 3' ó bien ser de tipo intergénicos (Fig. 4A).

El número y tipo de elementos regulatorios varía con cada gen. La naturaleza de los elementos regulatorios y la combinación de las proteínas que interactúan con ellos, es uno de los principales mecanismos de regulación de los genes inducibles.

Las secuencias consenso ó cajas en los genes eucarióticos se organizan en cuatro diferentes elementos: (Fig. 5) (Latchman, 2001)

- Promotor

Una gran mayoría de genes contienen una caja denominada TATA a la cual se une el factor transcripcional TFIID que se expresa constitutivamente y tiene un papel crítico en el ensamblaje del complejo de transcripción basal. En este complejo también participan otros factores constitutivos como: TFIIA, B, E, y F, así como la propia RNA polimerasa II. El nivel de transcripción realizado por este complejo basal es extremadamente bajo.

- UPE's

Además existen cajas o elementos llamados Elementos Promotores Upstream, (UPE's por sus siglas en inglés) los cuales aumentan en gran medida la expresión de los genes que contienen estos elementos.

- Elementos reguladores

Son secuencias de DNA que permiten la expresión génica en tipos celulares específicos, así como a respuestas a señales específicas. Un ejemplo de esto son los genes inducidos por altas temperaturas que contienen elementos reguladores llamados "Heat Shock Elements" (HSE). Todas las secuencias mencionadas anteriormente se localizan cerca del inicio de transcripción. (Latchman, 2001)

- "Enhancers"

Son elementos distantes que regulan la expresión génica. Estas secuencias no pueden ejecutar por sí solas la transcripción, pero pueden aumentar la actividad del promotor en varios órdenes de magnitud.

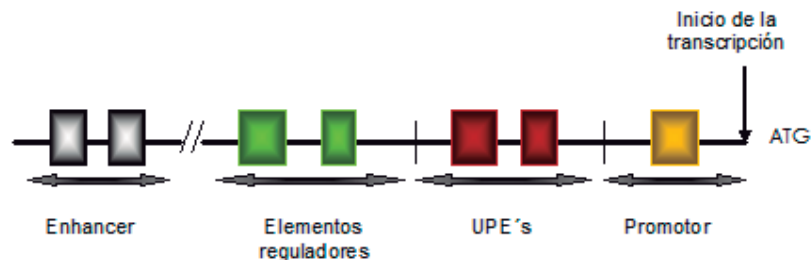


Figura 5. Organización de los diferentes elementos de respuesta dentro del promotor de los genes eucarióticos. Tomado de Latchman, 2001

En estudios del ciclo celular se descubrió que la transcripción de algunos genes ocurre de manera específica durante alguna de las fases, es decir tienen una

expresión periódica o cíclica (Tabla 1). Los transcritos de estos genes tienen oscilaciones en su concentración con respecto al ciclo celular; un ejemplo claro de esto son los genes que codifican para las histonas que presentan un máximo de expresión durante la replicación del DNA en la fase S (Ewen, 2000).

Al parecer, la expresión periódica de genes es una característica universal de la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, los genes que codifican para las ciclinas E presentan un pico de expresión durante G1, lo cual coincide con su función ya que dicha ciclina es necesaria para que la célula entre al ciclo celular; este punto de control se encuentra precisamente en la fase G1.

En la Tabla 2 se resumen las características de algunos de los factores transcripcionales, así como de los sitios de unión reportados hasta ahora para la regulación de la expresión génica durante las diferentes fases del ciclo celular de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

Tabla 2. Elementos de respuesta y factores que se unen a estos elementos para dar una expresión específica.

<i>S. cerevisiae</i>		
Fase	Secuencia consenso del sitio ^a	Factor transcripcional
G1/S	ACGCGT	MBF
G1/S	CRCGAAA	SBF
G2/M	Mcm1+GTAAACAA	Mcm ip+Fkh2p
G2/M	No descrito	No descrito
M/G1	YAATTA+Mcm1	Yox1/Yhp1+Mcm1p
M/G1	ACCAGCR	Swi5p, Ace2p
<i>S. pombe</i>		
G1/S	ACGCGT	MBF
G1/S	No descrito	No descrito
G2/M	GTAAACAA	Sep1p? Fkh2p?
G2/M	GNAACR	PBF, Mbx1?
M/G1	No descrito	No descrito
M/G1	ACCAGCCNT	Ace2p

^a N representa cualquier base, R es A ó G, Y es C ó T. (Bähler 2005)

El programa transcripcional G1/S en *S. pombe*, está regulado por los factores transcripcionales “MCB- binding factor” (MBF) también conocido como “DNA synthesis control complex” (DSC), el cual funciona de manera análoga al “SCB-binding factor” (SBF) y MBF de *S. cerevisiae*, uniéndose a promotores con secuencias MCB (Mlu cell-cycle box).

El complejo MBF esta formado por Cdc10p, Res1 y Res2; estas dos últimas proteínas contienen repeticiones de anquirina, en su amino terminal un dominio de unión a DNA, mientras que en el extremo carboxilo interacciona con la ciclina cdc10.

Esta última interacción es esencial para pasar el punto de regulación START. Res1 es esencial para pasar START a temperaturas sub-óptimas de crecimiento, mientras que Res2 lo es para la replicación pre-meiótica. Los genes regulados por MBF contienen múltiples elementos MCB.

1.4.2 Regulación Traduccional

La traducción o síntesis de proteínas consiste en traducir el lenguaje de nucleótidos del transcrito al de aminoácidos de la proteína. La traducción se divide en tres fases: iniciación, elongación y terminación.

La fase de iniciación traduccional es el principal punto de control, ya que aquí es donde se regula la velocidad de síntesis proteica. El inicio de la traducción en eucariontes depende de varios factores de iniciación (eIF's), que estimulan el reclutamiento del RNA de transferencia (RNAt) cargando con la metionina inicial (tRNA-met) y de las subunidades ribosomales al RNAm (Fig. 6) (Kapp *et al.*, 2004).

Para dar inicio a la traducción dependiente de "cap" (guanina trifosfato en posición inversa 5'-5' adicionada al RNAm en su extremo 5') es necesario que esta estructura sea reconocida por el factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F). Este factor se encuentra formado por las subunidades eIF4G, eIF4A y la subunidad eIF4E que reconoce el cap; la subunidad eIF4A tiene actividad de helicasa que remueve las estructuras secundarias del RNAm, mientras que la subunidad eIF4G funciona como proteína de andamiaje (Fig 6) (Merrick, 2001).

De todos los factores de iniciación involucrados en la traducción el factor (eIF3) destaca por su interacción con el factor eIF4F, específicamente con la subunidad eIF4G, reclutando así la subunidad menor ribosomal al RNAm y al complejo ternario formado por el eIF2, GTP y el tRNA, formando el complejo de pre-iniciación 48S (Dmitriev *et al.*, 2003). Posteriormente se une la subunidad mayor del ribosoma obteniéndose el complejo de iniciación (Fig. 6).

Podemos resumir que las funciones de eIF3 son: a) formar un complejo estable con la subunidad menor ribosomal 40S, evitando de esta manera la asociación prematura de las dos subunidades ribosomales 40S y 60S, b) estabilizar la unión del complejo ternario (eIF2-GTP-Met-tRNA) a la subunidad 40S y c) estabilizar el puente entre la subunidad 40S y el RNA mensajero a través de las interacciones con el factor eIF4G, el cual es una subunidad del complejo de iniciación eIF4F (Fig. 6) (Siridechadilok *et al.*, 2005).

Durante el ciclo celular la síntesis de proteínas tiene fluctuaciones, se ha observado que durante la fase G1 la traducción es alta, mientras que en mitosis la traducción proteica es reducida de manera importante debido a que la célula dirige su energía para la división física o mitosis (Bonneau y Sonenberg, 1987).

Durante la transición G2/M del ciclo celular, la subunidad eIF4E del factor de iniciación eIF4F es desfosforilada, lo que correlaciona con un decremento en la traducción dependiente de cap. La síntesis de proteínas es llevada a cabo por dos vías: la traducción dependiente de cap y la traducción a través de IRES. Existen elementos dentro de algunos RNAm en su región 5' no traducida denominado IRES (Internal Ribosome Entry Site). Para la traducción de estos mensajeros no son necesarios los factores de iniciación; eIF1, 1A, 4A, 4B, and 4E. (Bonneau y Sonenberg, 1987)

Estudios recientes muestran que los RNAm con IRES como el de ornitina decarboxilasa, la cinasa p58^{PITSLRE} y c-myc son activados durante la transición G2/M. Estos experimentos muestran que la inhibición de la traducción dependiente de cap por la defosforilación de eIF4F correlaciona con la traducción selectiva de algunos RNAm que contienen IRES (Hellen y Sarnow, 2001).

La ornitina decarboxilasa es una enzima limitante en la biosíntesis de poliaminas, que presenta dos picos de expresión durante el ciclo celular, durante G1/S y G2/M. Durante G1/S la traducción de esta enzima es dependiente de cap, mientras que durante la transición G2/M la síntesis de esta proteína es a través de IRES. El RNAm de c-myc también contiene IRES que funcionan durante mitosis. Lo anterior sugiere que la traducción dependiente de IRES es un mecanismo general para sintetizar proteínas de vida corta durante mitosis cuando la traducción dependiente de cap es abatida de manera importante (Pyronnet *et al.*, 2000).

El proceso de traducción continúa con la fase de elongación donde la cadena polipeptídica crece mediante un proceso cíclico. El crecimiento de la cadena se detiene al encontrarse un codón de paro, el cual no codifica para ningún aminoácido, de tal manera que se disocian las subunidades ribosomales liberando la proteína, alcanzando entonces a la fase de terminación. (Mathews 2000)

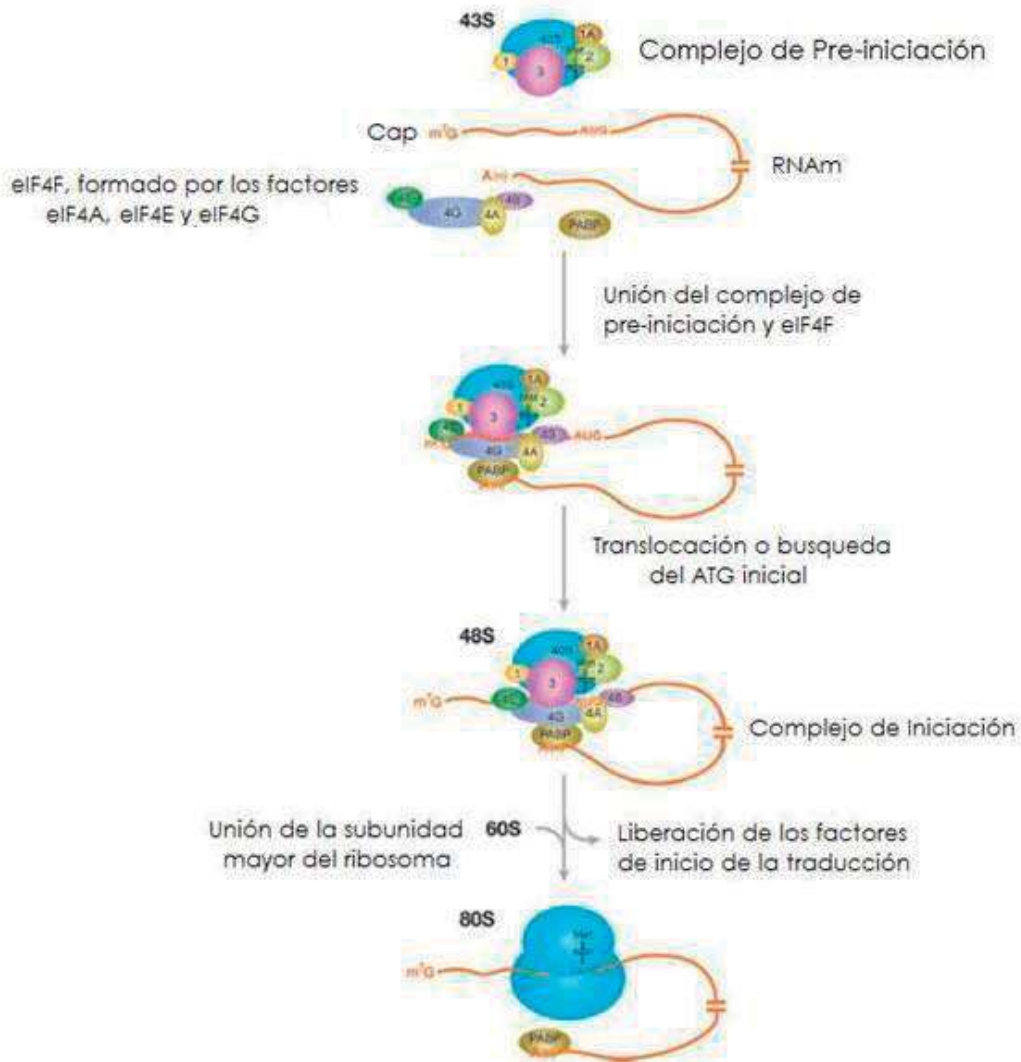


Figura 6. Inicio de la síntesis de proteínas. Para dar inicio a la síntesis de proteínas dependiente de Cap, es necesario que esta última estructura sea reconocida por el factor eIF4E. Posteriormente se une el complejo de pre-iniciación 43S, que recorre al RNAm en busca del inicio de la traducción ó ATG inicial. Finalmente se une la subunidad mayor del ribosoma liberándose los eIF's para dar paso a la síntesis del péptido. Tomado de Lewin 2008

1.4.3. Regulación post-traducciona

La regulación post-traducciona se da por modificación a la proteína, una de las más importantes es la fosforilación que puede activar proteínas claves en tiempos específicos, permitiendo así la progresión del ciclo celular. Un ejemplo de esto es la activación del factor promotor de la maduración (MPF), el cual se encuentra formado por la cinasa CDK2 y la ciclina B, y a través de fosforilaciones y desfosforilaciones este complejo es activado para regular la entrada a mitosis.

La proteólisis dirigida, o degradación de proteínas a través del marcaje por ubiquitina es otro proceso importante dentro de la regulación del ciclo celular. La destrucción de la ciclina B durante la anafase la cual es necesaria para la progresión de Mitosis a G1 y se da a través de esta vía. (Smits and Medema 2001)

La proliferación celular es esencial para todos los seres vivos, este proceso es la base del crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de todos los organismos vivos. La división celular es consecuencia de una sucesión de eventos fisiológicos y metabólicos estrictamente regulados. Estudiar ésta regulación es importante para el entendimiento del crecimiento celular en términos del número de células, ya que cuando los controles que se ejercen sobre el ciclo celular comienzan a fallar, la célula comienza a multiplicarse de manera descontrolada. Un ejemplo claro del mal funcionamiento de los mecanismos reguladores del ciclo celular son las células cancerosas, en estas células se pierde el control de la proliferación además, estas células desreguladas evaden los mecanismos de apoptosis de la propia célula resultando así una división sin control ni limitaciones.

CAPITULO II ANTECEDENTES

La alteración de la expresión de los genes involucrados en procesos como proliferación celular o apoptosis puede causar un crecimiento anormal, así como la transformación maligna celular. La mayoría de los estudios se han enfocado en la regulación transcripcional de los genes, mientras que investigaciones recientes indican que la desregulación en la traducción de las proteínas también puede contribuir al desarrollo de células cancerosas. (Doldan *et al.*, 2008)

Como mencionamos anteriormente, para llevar a cabo la síntesis de proteínas son necesarios varios factores que permitan la unión de la maquinaria necesaria para traducir la información nucleotídica del RNAm a proteína. Los factores de iniciación, promueven la unión de las subunidades ribosomales y el tRNA-met al RNAm.

La activación del factor de inicio de la traducción eIF4F (eIF4A, eIF4E y eIF4G) es un complejo esencial para el fenotipo del carcinoma de pecho. Se ha reportado que el eIF4E controla la traducción de RNAm involucrados en la síntesis de poliaminas, progresión del ciclo celular, activación de proto-oncogenes, angiogénesis, etc., dichos transcritos presentan un papel central tanto en la formación del tumor como en la metástasis. Otro factor que se ha reportado está involucrado en la transformación celular es eIF2, ya que la anulación de su fosforilación causa la malignización de las células NIH 3T3. Lo antes mencionado muestra la importancia de la regulación traduccional en la oncogénesis. (Doldan *et al.*, 2008)

2.1 FACTOR DE INICIACIÓN EUCARIÓNTICO 3 (eIF3)

Como se mencionó anteriormente el Factor de Iniciación Eucariontico 3 ó eIF3, está involucrado en el inicio de la síntesis proteica, proceso altamente regulado en la célula. Este complejo multiproteico se encuentra formado por al menos ocho subunidades distintas en levadura y hasta trece en mamíferos. Estas subunidades se han denominado con letras de la “a” hasta la “m”, ordenadas de manera descendiente de mayor a menor peso molecular.

Mediante experimentos con anticuerpos contra eIF3b de *S. cerevisiae*, se identificaron cinco polipéptidos que co-inmunoprecipitaban con esta subunidad, los cuales correspondían a las subunidades a, b, c, g, e i del complejo eIF3. Estas cinco subunidades de levadura tienen sus homólogos correspondientes en mamíferos, como podemos observar en la Tabla 3. (Phan *et al.*, 1998).

El complejo eIF3 de *S. cerevisiae* ha sido purificado y ha reemplazado al complejo eIF3 de mamíferos en experimentos *in vitro*, lo que indica una fuerte conservación funcional entre eucariontes. (Phan *et al.*, 1998)

Tabla 3. Subunidades que forman parte del complejo eIF3.

Subunidad	Humano	Trigo	<i>A. thaliana</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
eIF3a	p170	p116	p114	p110	SPBC17D11
eIF3b	p116	p83	p82	p90	SPAC25G10
eIF3c	p110	p107	p105	p93	SPAC4A8
eIF3d	p66	p87	p66	-----	Moe1
eIF3e	p48	p45	p51	-----	Int6
eIF3f	p47	p34	p32	-----	SPBC4C3
eIF3g	p44	p36	p33, p35	p32, p33	SPBC18H10
eIF3h	p40	p41b	p38	-----	C821
eIF3i	p36	p41a	p36	p39	Sum1
eIF3j	p35	-----	-----	p30	Spac29b12
eIF3k	p28	p28	p25	-----	
eIF3l	p67	p56	p65	-----	

En color verde se muestran las subunidades que forman parte del núcleo o “core” de eIF3 y en azul se muestra el homólogo de eIF3f en *S. pombe*. Modificado de Burks *et al.*, 2001

Varios reportes indican que el complejo de iniciación eIF3 contiene un “núcleo funcional” altamente conservado formado por las subunidades a, b, c, g e i. Las otras subunidades asociadas a éste núcleo al parecer evolucionaron de manera divergente. Esta idea se refuerza si se considera que las subunidades d, e, f, y k no tienen homólogos en levadura, sugiriendo que en el complejo eIF3 de mamíferos existe un núcleo activo (en la función del factor de inicio de la traducción 3) formado por cinco subunidades (a,b,c,g e i) y que las subunidades d, e, f y k podrían estar modulando la actividad de eIF3. (Dunand-Sauthier *et al.*, 2002)

Las funciones de todas las subunidades que forman el complejo eIF3, no se han definido completamente. Al parecer las subunidades que no forman parte del "núcleo funcional" del eIF3 tienen un papel regulador; por ejemplo, Kim y colaboradores (2004) reportaron que la subunidad eIF3h de *Arabidopsis thaliana* aparentemente selecciona mRNAs específicos, mientras que se ha reportado que la subunidad j de humano que *in vitro* es requerida para la unión estable de eIF3 y la subunidad 40S. (Fraser *et al.*, 2004)

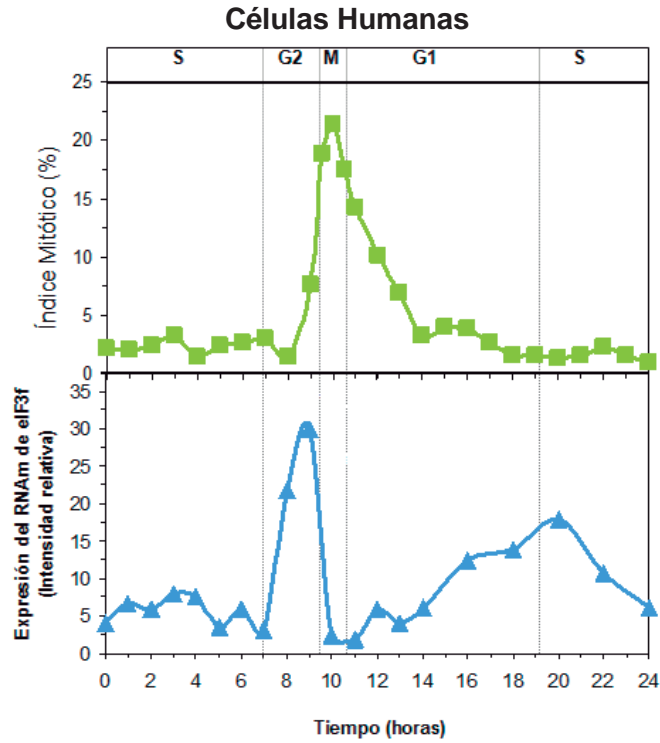
Zhou y colaboradores (2005) encuentran que al deletar la subunidad eIF3e de *S. pombe* se genera una cepa viable, pero con un fenotipo de crecimiento lento, así como una pequeña reducción en la síntesis total de proteínas. En su estudio identifican dos complejos diferentes de eIF3 los cuales se distinguen por las subunidades eIF3e y eIF3m. El complejo eIF3 que contiene la subunidad eIF3m, se asocia con una mayor cantidad de RNAm (2464), mientras que el complejo que contiene la subunidad eIF3e se asocia con un grupo más restringido (520 RNAm). Sus resultados indican que los diferentes complejos de eIF3 se asocian con diferentes RNAm y proponen que tienen distintas especificidades traduccionales. En experimentos donde es deletada la subunidad eIF3m, se ve afectada la síntesis global de proteínas en un 80%, mientras que mutantes de eIF3e muestran una marcada sensibilidad al estrés por privación de nutrientes, bajas temperaturas y estrés osmótico.

Reportes en la literatura muestran una desregulación de varias subunidades de eIF3 en diferentes cánceres; por ejemplo la sobreexpresión de la subunidad eIF3a en cáncer cervical, de pulmón, pecho y gástrico. La subunidad eIF3b también se encuentra sobreexpresada en cáncer de pecho y eIF3c en seminomas testiculares. (Doldan *et al.*, 2008)

2.2 Subunidad eIF3f

En nuestro laboratorio, experimentos de Northern blot realizados en cultivos de células sincronizadas de tabaco (Llanderal, 2003) (Fig. 7A), así como en células humanas (Fig. 7B), han mostrado que la subunidad eIF3f presenta un patrón de expresión circunscrito a la fase G2/M del ciclo celular y en la transición G1/S y en G2/M, respectivamente. (Higareda y Mendoza, 2006)

A)



B)

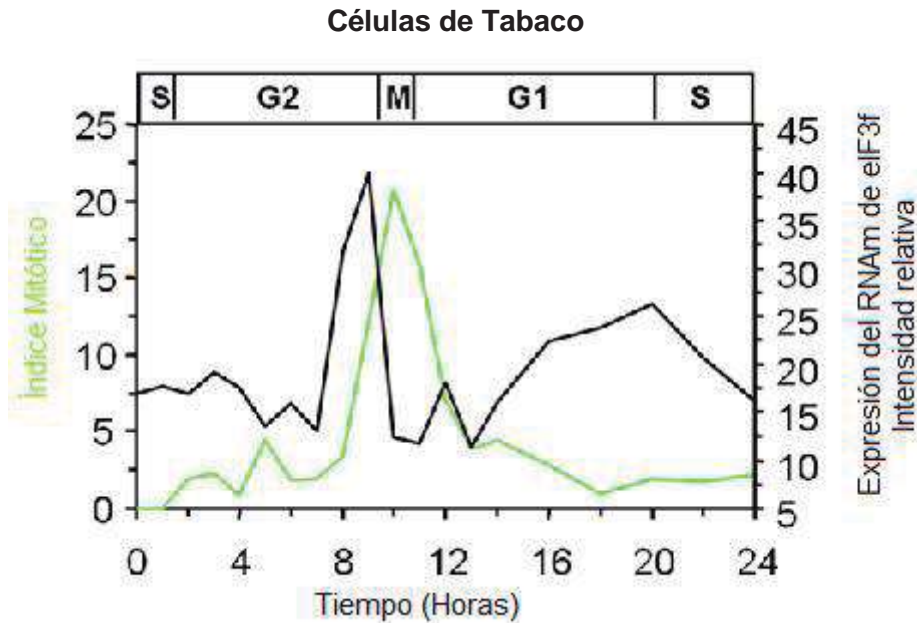


Figura 7. Patrón de expresión del factor eIF3f en cultivos sincronizados. A) Expresión de eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549. Línea celular A549 sincronizada al final de la fase S con afidicolina. B) Expresión de eIF3f durante el ciclo celular de células de tabaco TBY2. Células de tabaco TBY2 fueron sincronizadas al final de la fase S con afidicolina. Los índices mitóticos se determinaron por microscopía de fluorescencia después de la liberación con afidicolina por tinción con DAPI (línea verde en B).

Resultados de nuestro grupo de trabajo también sugieren que la subunidad eIF3f es una proteína esencial para la viabilidad de la célula, debido a que al silenciar la expresión de eIF3f en la línea celular humana A549 (Higareda y Mendoza, 2006), así como en cultivos celulares de TBY2 (Llanderal, 2003), se ha observado que las células no entra a la fase mitótica y abren programas de muerte celular (Fig. 8).

Mediante una transfección transitoria con la construcción antisentido de eIF3f humano se silenció este gen en la línea celular A549 de carcinoma de pulmón. En la Fig. 8A se muestra el control (células transformadas con el vector vacío) y las transfectadas con el antisentido de eIF3f. Las células transfectadas fueron teñidas con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio. Las células de color verde, extendidas y con núcleos intactos son las células viables. Mientras que las células apoptóticas tempranas presentan núcleos condensados y ausencia de estructuras extranucleares. Las células apoptóticas tardías presentan color rojo.

En la Fig. 8B se muestra la transformación de las células TBY2. Las células fueron teñidas con DAPI, en el control se puede observar a las células turgentes con núcleos bien definidos, mientras que las células transformadas con el antisentido de eIF3f, se observa un colapso membranal indicativo de células apoptóticas.

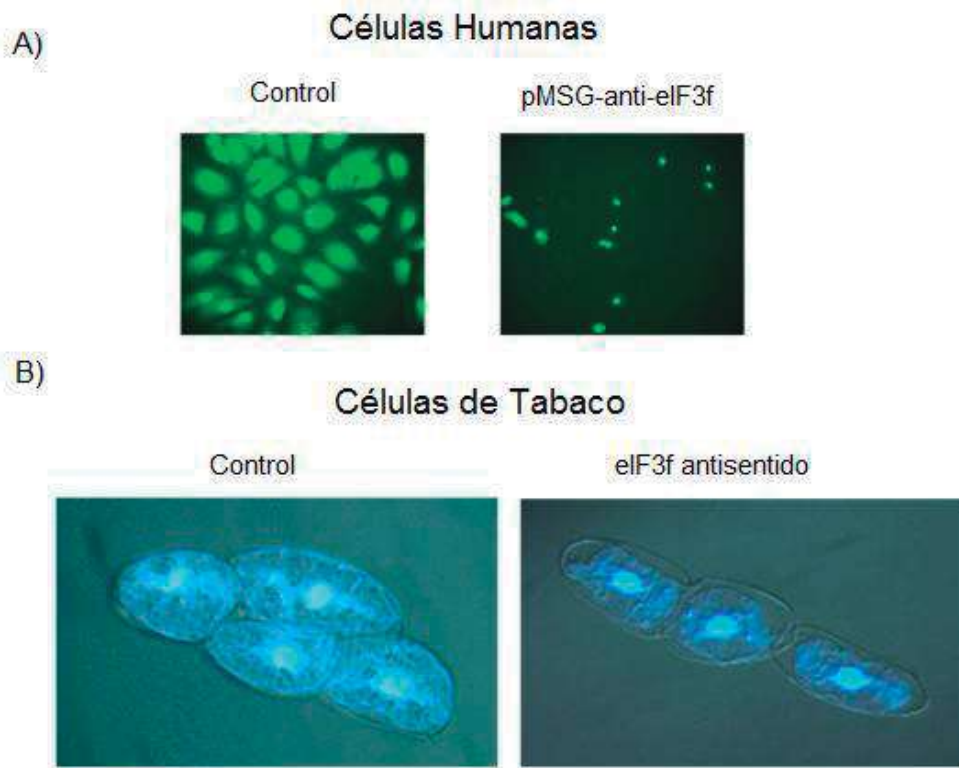


Figura 8. Silenciamiento de eIF3f en células humanas y de tabaco. A) Mediante una transfección transitoria con la construcción antisentido de eIF3f humano se silenció este gen en la línea celular A549 de carcinoma de pulmón. Las células transfectadas fueron teñidas con bromuro de etidio y naranja de acridina. B) Con la construcción anti sentido de eIF3f de tabaco se transformaron las células TBY2. Se muestran las fotos del control vs las células transformadas teñidas con DAPI.

En relación a la función de eIF3f, en la literatura se encontraron pocos reportes: en experimentos de doble híbrido Shi y colaboradores (2003) reportan que eIF3f de humano interacciona con la cinasa CDK11 dependiente de ciclina durante apoptosis, esta cinasa parece ser un importante efector corriente abajo durante la señalización apoptótica.

En la Tabla 4 se muestra que los niveles del transcrito de eIF3f disminuye substancialmente en varios tumores. Shi y colaboradores (2006) encuentran que cuando eIF3f se sobreexpresa en melanomas, el número de colonias disminuye drásticamente con respecto a las células que fueron transfectadas con el vehículo. Además la inhibición del crecimiento observada en las células que sobreexpresaron eIF3f correlaciona con un aumento de apoptosis.

Tabla 4. Disminución de la subunidad eIF3f del Factor de Iniciación 3 en distintos cánceres

Tejido	% de pacientes con eIF3f disminuido	No. de Pacientes
Pecho	90	10
Ovario	70	10
Estomago	60	10
Riñón	70	10
Vejiga	80	5
Vulva	100	5
Tráquea	100	3
Útero	70	10
Cérvix	60	10
Glándula Tiroidea	60	10
Piel	80	10
Intestino delgado	71	7
Páncreas	100	7

Los niveles de expresión (RNAm) fueron medidos por Northern Blot, Shi y colaboradores 2006

Por otra parte, estudios de traducción *in vitro*, utilizando como reportero la luciferasa, se observó una inhibición en la síntesis de esta proteína en presencia de eIF3f humano, sugiriendo que eIF3f es un regulador negativo de la traducción. Para corroborar que estos resultados eran producto de la inhibición de la síntesis de proteínas y no de una disminución en el RNAm, se realizó un RT-PCR en tiempo real, no encontrándose una diferencia entre los niveles de RNAm de luciferasa de células transformadas con el vector vacío y células transformadas con el vector más eIF3f (Shi *et al.*, 2006)

En lo que se refiere a la presencia de eIF3f, Dunand-Sauthier y colaboradores (2002) reportan que esta subunidad no se encuentra presente en *S. cerevisiae* pero *S. pombe* si lo posee.

Experimentos en *S. pombe* realizados por Zhou y colaboradores (2005) muestran que al apagar la expresión de eIF3f disminuye la síntesis global de proteínas en aproximadamente un 80%. Estos datos en *S. pombe* sugieren que la subunidad f del factor eIF3 puede ser parte del “núcleo funcional” de este complejo.

Hernández (2005), mediante análisis bioinformáticos, encuentra que la subunidad f del complejo eIF3 de *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Castanea sativa*, *Oryza sativa*, *Anopheles gambiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Schizosaccharomyces pombe*, presenta una conservación que va del 20% al 47% y entre miembros de un mismo taxón se incrementa del 73% hasta 96% de identidad a nivel proteína.

eIF3f es miembro de la familia Mov 34, entre los cuales se encuentran proteínas involucradas en procesos de inicio de la traducción, regulación del proteosoma y transcripción (Aravind y Ponting 1998). Los miembros de esta familia se caracterizan por contener en su secuencia proteica el dominio MPN (Mad 1, Pad N-terminal), a la cual se le adjudica la interacción proteína-proteína.

La subunidad eIF3f posee los siguientes dominios: MPN al cual se atribuye la interacción proteína-proteína, el carboxilo terminal (Aravind y Ponting 1998) y el dominio poli PA (alto contenido de prolina y alanina), siendo este último exclusivo de mamíferos (Fig. 9). Al parecer esta proteína ha evolucionado y se ha especializando conjuntamente con la evolución de los organismos (Hernández 2005).

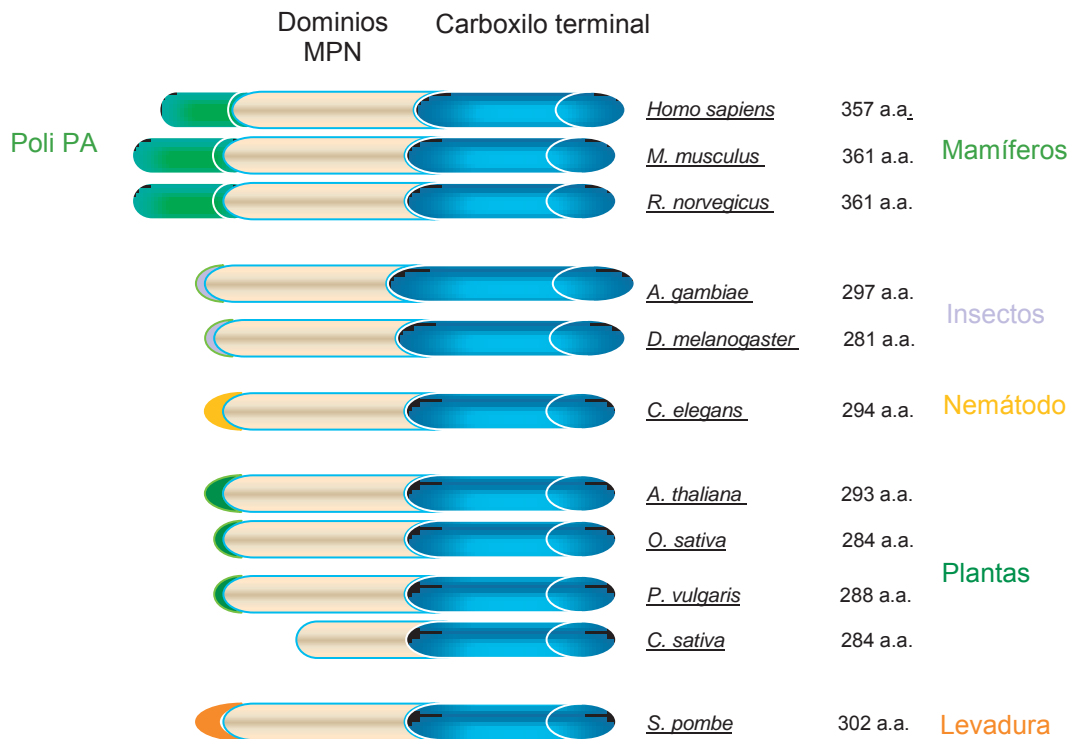


Figura 9. Dominios de las diferentes proteínas homólogas a eIF3f. Se observa que todas las proteínas muestran dos dominios; MPN y Carboxi-terminal. Las proteínas de mamíferos muestran además un dominio denominado Poli PA denominado así por su alto contenido en prolina y alanina (Hernández 2005).

La estructura génica de la subunidad f también está altamente conservada entre los taxones, en mamíferos consta de 8 exones y 7 intrones, en plantas de 6 exones y 5 intrones (Fig. 10). Los datos anteriores indican una fuerte conservación de la proteína y un aumento en la complejidad de acuerdo al grado evolutivo del organismo que lo posee. El alto grado de conservación sugiere que la función también se ha mantenido y el aumento en la complejidad la adquisición de una nueva función.

En la Figura 10 se muestra la estructura génica de eIF3f en diferentes organismos, los rectángulos muestran los exones o partes codificantes del gen, mientras que las líneas representan los intrones. Puede observarse que los miembros de un mismo taxón cuentan con el mismo número de intrones y exones así como la misma longitud entre ellos. Es importante resaltar que el único gen que codifica para eIF3f reportado hasta el momento que no posee intrones es el de *S. pombe*.

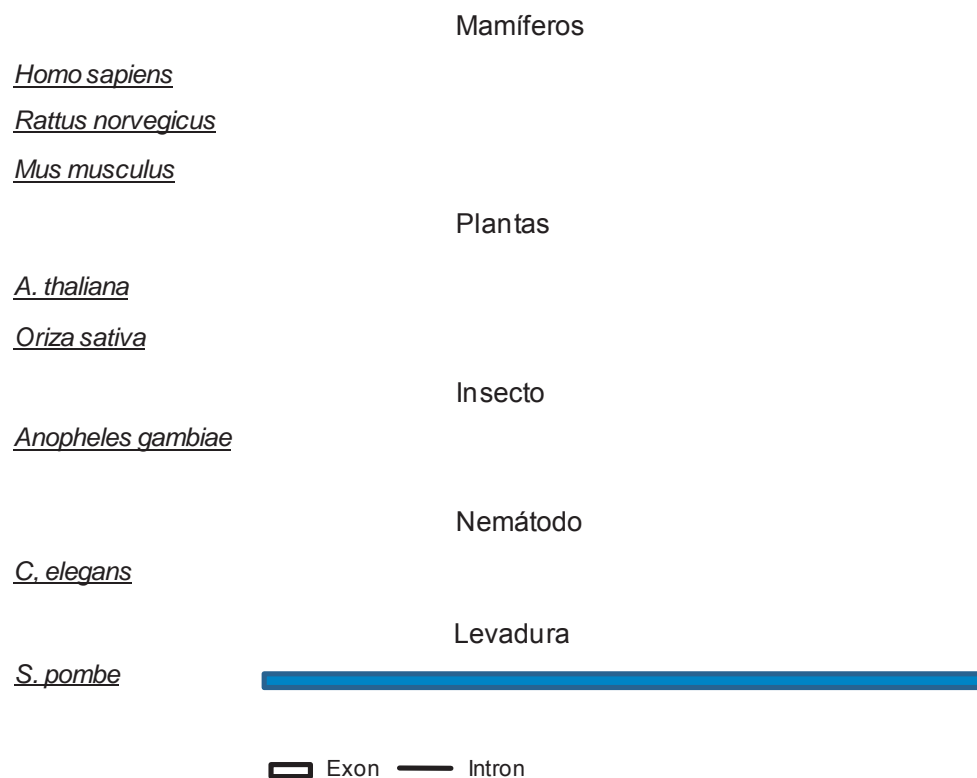


Figura 10. Estructura génica de los diferentes eIF3f. Solo hay proporcionalidad entre miembros del mismo grupo. (Hernández 2005)

En base a los antecedentes mencionados y debido a que *S. pombe* es un organismo unicelular que presenta un ciclo celular comparable al de eucariontes superiores y posee eIF3f, es de nuestro interés conocer su perfil de expresión respecto al ciclo celular.

CAPITULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La expresión de *eIF3f* de *S. pombe*, al igual que ocurre en otros eucariontes es ciclo celular dependiente.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de expresión de *eIF3f* de *S. pombe* durante el ciclo celular.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✿ Realizar una curva de crecimiento de la cepa NCYC1354 de *S. pombe*.
- ✿ Sincronizar cultivos de *S. pombe*
- ✿ Determinar la expresión del transcrito de *eIF3f* de *S. pombe* durante el ciclo celular.
- ✿ Aislar y fusionar transcripcionalmente la región promotora de *eIF3f* de *S. pombe* al gen reportero lac Z.
- ✿ Realizar deleciones dirigidas de la región promotora de *eIF3f* de *S. pombe* y fusionarlas a lac Z.
- ✿ Determinar los niveles de expresión de lac Z que generan las construcciones obtenidas.

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- a) Realizar una curva de crecimiento de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*.
- b) Sincronizar cultivos líquidos de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*
- c) Determinar el patrón de expresión de eIF3f de *S. pombe* respecto al ciclo celular.
- d) Ubicar la región codificante de eIF3f en el genoma de *S. pombe* e identificar la región intergénica entre este gen y el anterior.
- e) Someter la región intergénica a un análisis bioinformático en busca de elementos en *cis* de respuesta a factores transcripcionales específicos para levadura.
- f) Diseñar oligonucleótidos para la amplificación de la región intergénica así como oligonucleótidos que eliminen regiones específicas de dicha región.
- g) Amplificar la región intergénica así como sus delecciones y clonar en el vector Yep363.
- h) Secuenciar las construcciones.
- i) Transformar la cepa de *S. pombe* TPC1 auxotrófica a leucina con las construcciones realizadas en Yep363.
- j) Determinar la expresión de β -galactosidasa en cada una de las transformantes.

CAPÍTULO V MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 CEPAS

CEPAS

Como cepa receptora se utilizó XLBlue de *Escherichia coli* (*E. coli*). La cepa de *Schizosaccharomyces pombe* TCP1 (h⁻, leu1-32) (K180-01 Invitrogen) se empleó para las transformaciones y la cepa silvestre NCYC 11354 fue utilizada para los experimentos de sincronización.

5.1.2 MEDIOS

El medio LB se utilizó para cultivar las cepas de *E. coli*. Para su preparación se disolvió 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio en ~900 ml de agua destilada; se aforó la solución a 1 L y se esterilizó por 15 min. a 120 °C en autoclave. Para medio sólido se adicionó 15 g/L de agar antes de aforar y esterilizar.

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

El medio YPD se utilizó para cultivar las cepas de *S. pombe* NCYC 1354 y TPC1. Se disolvió en ~950 ml de agua destilada 20 g de peptona y 10 g de extracto de levadura y se esterilizó por 18 min. a 120 °C en autoclave, después de enfriar, se adicionó 50 ml de glucosa al 40%. Para obtener medio sólido se adiciona 20 g/L de agar.

El medio sintético sin leucina se utilizó para seleccionar las transformantes de *S. pombe* TPC1, con las construcciones de Yep 363 + la región intergénica y sus delaciones. Se disolvió en ~900 ml de agua destilada 6.7 g de Base nitrogenada de levadura sin amin.oácidos, 1.6 g de suplemento sintético sin leucina se aforó a 950 ml, se esterilizó por 18 min. a 120 °C en autoclave. Después de enfriar, se adicionó 50 ml de glucosa al 40%. Para obtener medio sólido se adicionan 20 g/L de agar.

5.1.3 PLÁSMIDOS

El plásmido pGEM-T, está construido para la clonación de productos de PCR enseguida se muestra su mapa físico.

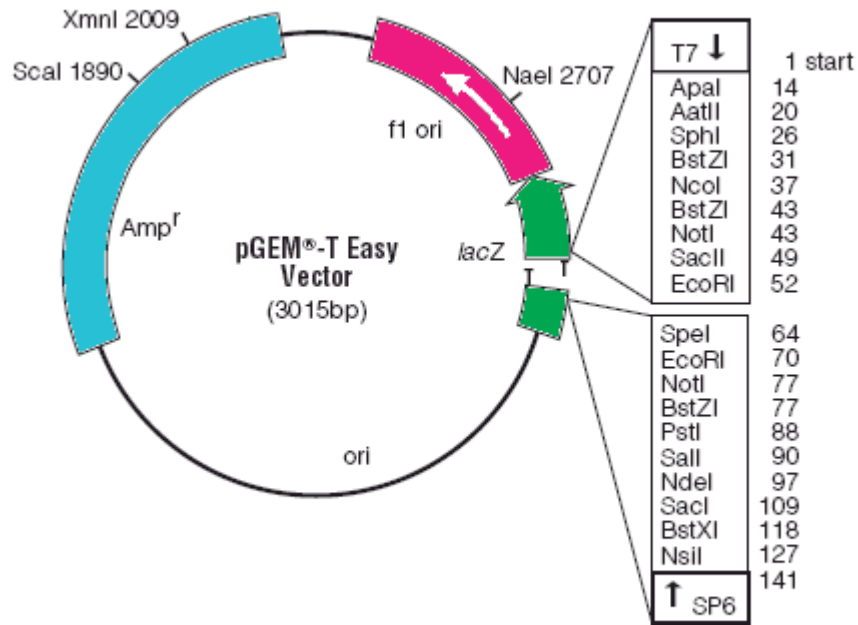


Figura 11. Mapa del vector de expresión en *E. coli* pGEM-T Easy. Inicio de transcripción para la RNA polimerasa **T7** y **SP6**, sitio múltiple de clonación **10-128**, gen de resistencia a Ampicilina **Amp^r**, gen de Lac Z, que permite la α complementación para la selección por color (azul/blanco de plásmidos recombinantes), región codificante de β -lactamasa **1337-2197**, origen de replicación del plásmido en bacteria (**ori**) y origen de replicación para el fago filamentososo f1 (**f1ori**). Invitrogen

El plásmido Yep 363 permite medir los niveles de expresión de LacZ, según el promotor que se introduzca al plásmido en fase con la región codificante de este gen reportero, es decir se realiza una fusión traduccional.

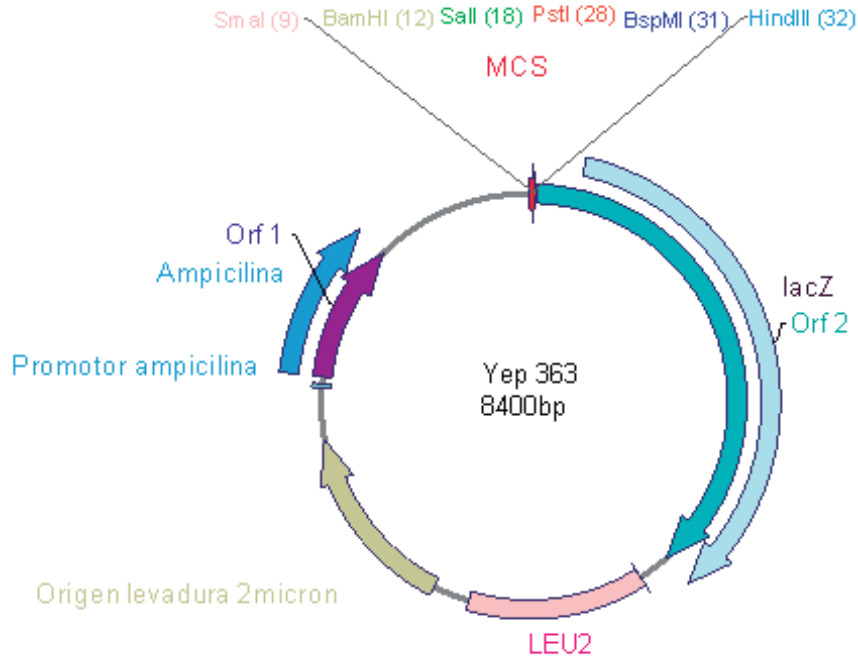


Figura 12. Mapa del vector de expresión en *S. pombe* YEp 363. Tiene un peso de 8.4 Kb y presenta las siguientes características: sitio múltiple de clonación (**MCS**), la secuencia comienza con el primer nucleótido del MCS y termina con el octavo aminoácido de β -galactosidasa, Leucina como marcador de selección en *S. pombe* (**LEU2**), gen reportero β -galactosidasa (**LacZ**), gen de resistencia Ampicilina (**Ampicilina**), origen de replicación del plásmido en bacteria (**Orf 1 y 2**) y Origen de replicación del plásmido en levadura (**2 micron**). Donado por Dr. Alicia González IFC UNAM

5.2 METODOS

5.2.1 EXTRACCIÓN DEL DNA DE LEVADURA

Crece la cepa NCYC1354 de *S. pombe* en YPD líquido toda la noche. Centrifugar a 1200 xg por 5 min. a temperatura ambiente (TA), verter el sobrenadante y resuspender las células en 500 µl de agua. Centrifugar nuevamente por 5 segundos a TA y tirar el sobrenadante. Resuspender las células en 200 µl de buffer de lisis. Adicionar 0.3gr de perlas de vidrio y 200 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Agitar en vortex a alta velocidad por 3 min. Adicionar 200 µl de buffer TE y agitar en vortex constantemente. Centrifugar 5 min. a alta velocidad a TA y transferir la fase acuosa a un tubo limpio. Adicionar 1ml de etanol al 100% y mezclar por inversión. Centrifugar 3 min. a alta velocidad a TA. Remover el sobrenadante y resuspender la pastilla en .4 ml de Buffer TE. Adicionar 30 µl de RNAsa 1mg/ml, mezclar e incubar por 5 min. a 37 °C. Adicionar 10 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol y mezclar por inversión. Centrifugar 3 min. a alta velocidad TA. Descartar el sobrenadante y secar la pastilla. Resuspender el DNA en 100 µl de Buffer TE.

5.2.2 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN DE PCR

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región promotora de eIF3f de *S. pombe*, en base a un análisis bioinformático. Se buscó que el diseño de oligonucleótidos nos permitiera construir delecciones parciales de la región promotora, además se tomaron en cuenta los sitios de restricción en el sitio múltiple de clonación del vector Yep 363, y así facilitar la ligación de nuestro fragmento dentro de este vector. De esta manera se modificaron algunas bases para obtener oligonucleótidos con sitios de restricción que nos permitieran dirigir nuestra inserción en el vector.

	Promotor Completo	Primera Delección	Segunda Delección	Tercera Delección
Agua	32.5 µl	34.5 µl	34.5 µl	34.5 µl
d´NTP`s	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Buffer MgCl2	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
Oligos:	4.0 µl y 2 µl	2.0 µl de c/u	2.0 µl de c/u	2.0 µl de c/u
Taq polimerasa	2.0 µl	2.0 µl	2.0 µl	2.0 µl
Programa de PCR	P2	P1	P1	P1

JUEGO DE OLIGOS UTILIZADOS PARA LAS AMPLIFICACIONES POR PCR.

Promotor completo

AAG CTT GAG TCC CCA AAG CCA T
Constante ATG 0 +
4485

CGT GAG GGA TCC GT
All Bam H1

Primera deleción

AAG CTT GAG TCC CCA AAG CCA T
Constante ATG 0 +
3874

GCT AAC CGG ATC CTT TGA
Del 1 Bam H1
4486

Segunda Deleción

AAG CTT GAG TCC CCA AAG CCA T
Constante ATG 0 +
3874

AGG ATC CAT TGT TAA GGA G
Del 2 Bam H1
4487

Tercera deleción

AAG CTT GAG TCC CCA AAG CCA T
Constante ATG 0 +
3874

CAA TTT AAC GGA TCC TAT GAG
Del 3 Bam H1
4488

(P1)

Programa Uno

1 ciclo 94 °C 5min.

35 ciclos 94 °C 30 seg
 55 °C 45 seg
 72 °C 1 min.

1 ciclo 72 °C 5 min.
 4 °C Hold

(P2)

Programa Dos

1 ciclo 94 °C 5min.

35 ciclos 94 °C 30 seg
 66 °C 45 seg
 72 °C 50 min.

1 ciclo 72 °C 5 min.
 4 °C Hold

5.2.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se preparó un gel de agarosa al 0.8%, disolviendo 0.8 gr de agarosa en 100 ml de TAE 1X. Una vez tibia la solución, se agregó 5 µl de bromuro y se pasó a una cama con un peine. Se dejó polimerizar por una hora, se retiró el peine y se pasó el gel a una cámara de electroforesis; ésta se llenó con buffer TAE 1X, posteriormente se cargaron las muestras.

5.2.3.1 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

* Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Catalogo A9281 Promega

Se cortó la banda del gen de interés y se coloca en un microtubo de 1.5 ml previamente pesado. Por diferencia se obtiene el peso de la banda y se agregan por cada 10 mg de gel 10 μ l de "Membrane binding solution". Agitar en vortex e incubar de 5 a 10 min. a 60 °C hasta que se disuelva el gel. Transferir el gel disuelto a una columna en su respectivo tubo de recolección e incubar 1 min. a temperatura ambiente. Centrifugar a 13,200 RPM por 1 min., descartar el líquido del tubo de recolección. Adicionar 700 μ l de "Wash solution" y centrifugar a 13,200 RPM por 1 min. Descartar el líquido del tubo de recolección. Adicionar 500 μ l de "Wash solution" y centrifugar a 13,200 RPM por 5 min. Descartar el líquido del tubo de recolección. Dejar la columna 1 min. en campana con mechero prendido para que la evaporación total del etanol contenida en "Wash solution". Pasar la columna a un microtubo estéril de 1.5 ml adicionar de 16 a 20 μ l de agua tridestilada estéril e incubar 1 min. centrifugar a 13,200 RPM por 1 min. y cuantificar.

5.2.4 DIGESTIÓN DIRECTA A PRODUCTO DE PCR

Como los oligos contienen los sitios de restricción para Bam H1 y Hind III, después de la reacción de PCR se purificó cada deleción y se sometió a una reacción de digestión:

8 μ l de producto de PCR purificado (70 ng/ μ l)
2 μ l de agua
2 μ l de Buffer
4 μ l de Bam H1
4 μ l de Hind III

20 μ l TOTALES

Se incubó la reacción a 37 °C por 18 horas, se purificó por columna y se cuantificó por electroforesis.

5.2.5 REACCIÓN DE LIGACIÓN

1 μ l de agua
2 μ l de buffer 2X
2 μ l de YEP363 (100 ng totales)
1 μ l de inserto (80 ng/ μ l)
1 μ l de enzima T4

10 μ l TOTALES

La reacción se incubó por 28 horas a 20 °C y posteriormente a 23 horas a 4 °C.

5.2.6 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE BACTERIA

Se descongelan en hielo por 5 min. las células electrocompetentes de la cepa (XL-Blue). Se adicionan 2 µl de la reacción de ligación y se deja reposando 2 min. Posteriormente se electropora y se deja incubando por 1 hora las células. Se plaquean en cajas de LB-ampicilina y se dejan crecer “overnight” a 37 °C.

5.2.7 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE LEVADURA

Se inocula una asada de la cepa NCYC 1353 de *S. pombe* en 10 ml de medio EMM “overnight” a 30° C/250 RPM. Se determina la densidad óptica (D.O.) a 600nm y diluir en 50 ml de EMM hasta una D.O de 0.4 y se deja crecer 18 horas a 30°C/250 RPM. Centrifugar 1500 xg por 5 min. a 4° C. Lavar con .05 volúmenes del cultivo con agua tridestilada fría. Centrifugar 1500 xg por 5 min. a 4° C. Lavar con 0.5 volúmenes del cultivo con sorbitol 1M frío. Centrifugar 1500 xg por 5 min. a 4° C. Determinar el volumen de la pastilla y resuspender en 2 volúmenes de sorbitol 1M frío. Tomar 100 µl de la suspensión celular y pasarlos a una celda fría, agregar 1 µg de DNA e incubar por 7 min. en hielo. Electroporar a 2500 V. Inmediatamente adicionar 1 ml de sorbitol 1M y pasar a un microtubo estéril frío. Tomar 50-100 µl y pasar a platos selectivos PDM (-L) y plaquear. Dejar crecer “over night” a 30° C.

5.2.8 ENSAYO DE β-GALACTOSIDASA

Células transformadas previamente con una construcción que incluya LacZ se pueden teñir con la actividad de beta – galactosidasa. Lavar las células con 2 - 3 veces con PBS, aspirar el sobrenadante y adicionar el colorante de Beta-galactosidasa.

Formulación de la solución de X-gal (hecha en PBS)

STOCK	Para 1ml	Concentración final
Trizma Base 1M	50 µl	50 mM
Mg Cl ₂ 1M	2 µl	2 mM
NaCl 1M	2 µl	15 mM
K ₃ Fe (CN) ₆ 0.1M	20 µl	2 mM
K ₄ Fe (CN) ₆ 0.1M	20 µl	2 mM
X-gal (DMSO) 17.5 mg/ml	85 µl	1 mg/ml
Células	200 µl	
Agua tridestilada estéril	<u>600 µl</u> 1000 µl	

Incubar a 37° C por 2 horas.

5.2.9 PCR A PARTIR DE COLONIA

Para verificar si las colonias fueron transformadas se realizó un PCR de colonia. Se pica con un palillo estéril la colonia y con el palillo se estrían en una caja con LB, cuidando que nada más sea por un lado del palillo para que queden bacterias por el otro lado. Posteriormente se coloca el palillo un microtubo de 0.5 ml con 25 µl de agua tridestilada estéril se agita en vortex el palillo. El tubo se coloca en un flotador y se hierven por 5 min. y se centrifugan por 2 min. a máxima velocidad (13,200 RPM). Rápidamente se toman 5 µl del sobrenadante y se agregan los oligos correspondientes, buffer, agua, dNTP's y Taq polimerasa para poner la reacción.

Se corre la reacción en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio para verificar el producto de la transformación.

5.2.10 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIA

Tomar una colonia transformada e inocularla en 7 ml de LB líquido y el antibiótico correspondiente, en este caso ampicilina 75 µl/ml. Incubar con agitación a 37 °C de 12 a 16 hrs. Tomar un mililitro del pre-inoculo y colocarlo en un microtubo de 1.5 ml pre-enfriado en hielo, centrifugar a 3600 RPM por 5 min. decantar el sobrenadante y repetir el proceso hasta terminar el preinóculo. Adicionar 1ml de STE frío, agitar en vortex suave y esporádicamente hasta que se desprenda la pastilla. Centrifugar a 3600 RPM por 5 min. y decantar el líquido. En este paso se sacan los tubos del hielo y se adicionan 300 µl de buffer de resuspensión que contenga RNAsa a 30 µl /ml (TA). Agitar en vortex suavemente, adicionar 300 µl de buffer de lisis y agitar por inversión una sola vez. Es importante que el buffer de lisis se prepare unos minutos antes de usar. Adicionar 300 µl de buffer de neutralización y dejar reposar en hielo de 7 a 10 min. sin agitar. En este paso se observa una mancha blanca. Centrifugar a 4 °C a máxima velocidad (13,200 R.P.M.) durante 15 min. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado de no acarrear nada de la pastilla. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril. Repetir la centrifugación a máxima velocidad por 15 min. transferir el sobrenadante a un tubo nuevo estéril medir el volumen y adicionar 0.7 veces de isopropanol correspondiente al volumen medido agitar por inversión 5-6 veces y centrifugar por 30 min. a máxima velocidad (13,200-14,000 RPM). Decantar el líquido y escurrir en una toalla de papel. Adicionar de 700 a 1000 µl de Etanol al 70% frío. Agitar 2 veces por inversión y centrifugar por 5 min. a máxima velocidad. Decantar y secar unos minutos sobre una toalla de papel. Resuspender en 20 µl de agua tridestilada estéril y guardar a -20 °C.

5.2.10.1 REACCIÓN DE DIGESTION PARA LIBERAR EL FRAGMENTO CLONADO

12 μ l de agua
2 μ l de buffer
4 μ l de DNA (400 ng totales)
1 μ l de Bam H1
1 μ l de Hind III

20 μ l TOTALES

La reacción se incubó a 37 °C por 2 horas y se corrió un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio para verificar la construcción.

La clona de la tercera delección se trató primero con RNAsa, dado que se traslapa el RNA que contienen la muestra de DNA con el fragmento liberado por ser del mismo peso molecular.

(1 μ l de RNAsa 20 mg/ml por 400 ng de muestra, se incuba la reacción “overnight” a 37 °C, no es necesario lavar para la posterior reacción de digestión)

5.2.11 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NCYC 1354

En un tubo de ensaye con 5 ml de medio YPD líquido se creció una asada de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe* por 7 horas a 30 °C, posteriormente se paso el preinóculo a un matraz de 250 ml con 50 ml de YPD líquido y se incubo nuevamente a 30 °C. Se tomaron muestras cada 2 horas hasta la hora 35 después de esta hora se tomaron muestras cada 5 horas hasta la hora 60 y por ultimo cada 8 horas hasta las 140 horas. A cada muestra tomada se le midió su intensidad óptica a una longitud de onda de 160 nm.

5.2.12 SINCRONIZACIÓN

La hidroxiurea es un inhibidor de la ribonucleósido difosfato reductasa que bloquea la síntesis de deoxinucleotidos trifosfato (dNTP's) por lo tanto, no puede haber replicación de DNA y las células se detienen en la fase S del ciclo celular. La concentración utilizada para sincronizar va de 12-15 mM, para que el bloqueo sea reversible. Dado que el tiempo de duplicación de *S. pombe* es de 150 min. (2 horas y media), se toman muestra durante 3 horas para tomar el ciclo completo.

Se crece en 7.5 ml de YPD líquido una asada de la cepa NCYC 1354 a 30 °C por 7 horas con una agitación de 160 RPM, se ponen 2 tubos. Pasar cada preinóculo a un matraz de 250 ml con 50 ml de medio líquido YPD y crecer nuevamente en agitación por 15 horas. Se saca el cultivo con un crecimiento total de 22 horas y se adiciona hidroxurea a una concentración final de 12 mM. Se incuba nuevamente el cultivo a 30 °C por 3 horas. Se saca el cultivo y se pasa cada uno a un tubo falcon de 50 ml estéril, se centrifuga por 1 min. a 2000 RPM y se repite hasta que se termine el cultivo.

Una vez obtenida la pastilla de células, se lava 2 veces con agua tridestilada estéril precalentada a 30 °C. Resuspender pipeteando cada pastilla en 5 ml de YPD precalentado a 30 °C. Se mezclan las pastillas resuspendidas y se agregan 5 ml de éste en 45 ml de YPD precalentado a 30 °C en matraces limpios. Se ponen a crecer nuevamente a 30 °C y a partir de este momento se toman un mililitro de muestra cada 10 min., tomando 18 muestras en total. Se va intercalando la toma de muestras entre los 2 matraces.

Las muestras tomadas se dividen en dos, una para sacar el índice mitótico y la otra para hacer extracción de RNA total.

5.2.12.1 ALMACENAMIENTO Y FIJACIÓN DE CÉLULAS

El almacenamiento y la fijación de las células se hacen inmediatamente después de la toma de cada muestra.

MUESTRA PARA EXTRACCIÓN DE RNA

La muestra, rápidamente se centrifuga a 1600 RPM por 1 min.uto, se decanta el sobrenadante y se pone en nitrógeno líquido. Una vez terminada la toma de muestras, éstas se almacenan a -70 °C.

MUESTRA PARA ÍNDICE MITÓTICO

A la segunda muestra se le agregan 300 µl de metanol frío y se deja fijando por 7 min. se centrifuga y se decanta el metanol, se lava la pastilla 2 veces con buffer PEM, se centrifuga y decanta. Finalmente se resuspende la pastilla en 500 µl de buffer PEM con azida de sodio y se guarda máximo 4 días a 4 °C.

5.2.12.2 TINCIÓN DE MUESTRAS

A las células resuspendidas en 500 µl PEM +azida de sodio se les adiciona 1 µl de DAPI a 1mg/µl. Se mezcla por pipeteo e inversión para obtener una buena tinción y posteriormente se cubren las muestras con alumin.io, ya que el DAPI es fotosensible. Se guardan a 4 °C y al siguiente día se observan en un microscopio epifluorecente para obtener el índice mitótico.

5.2.13 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE *S. pombe*

Las muestras tomadas durante la sincronización y almacenadas en nitrógeno líquido a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se ponen en hielo y antes de que se descongelen se agregan $800\text{ }\mu\text{l}$ de trizol. Posteriormente se agregan 10 perlas de vidrio estériles a cada microtubo.

Se agita en vortex a TA 3 veces, por 45 segundos cada vez. Se incuba la muestra a TA por 5 min. Se agregan $160\text{ }\mu\text{l}$ de cloroformo. Con la mano se agita vigorosamente por 15 segundos y se incuban a TA por 3 min. Se centrifuga a $12,000\text{ g}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Se pasa la fase acuosa a un microtubo estéril. Se agregan $400\text{ }\mu\text{l}$ de isopropanol. Se mezcla 10 veces por inversión y se incuba a TA por 10 min. Se centrifuga a $12,000\text{ g}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Se decanta el sobrenadante y se agrega 1 ml de etanol al 75% frío. Se mezcla con vortex y centrifugar a $7,500\text{ g}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Se quitar el sobrenadante con jeringa insulínica y se deja secar la pastilla en campana de 5 a 10 min. máximo. Se resuspende pipeteando en $20\text{ }\mu\text{l}$ de agua tridestilada estéril + $0.5\text{ }\mu\text{l}$ de inhibidor de RNAsa a 40 unidades / μl y se incuba 10 min. a $55\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño maría y almacenar a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.13.1 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Se cuantificó el RNA total midiendo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm .

5.2.14 NORTHERN BLOTTING

5.2.14.1 CONSTRUCCIÓN DE LA SONDA

* DIG Lumin.scent Detection Kit for Nucleic Acids 1 363 514 ROCHE

Se realizó un PCR de la región codificante de eIF3f de *S. pombe*, se corrió un gel y se corroboró el peso esperado y se purificó la banda. Se cuantificó la concentración obtenida después de la purificación corriendo otro gel.

Se realizó una ligación de acuerdo a la siguiente reacción:

- 5 μl de Buffer
- 1 μl de pGEM (50 ng/ μl) Vector específico para productos de PCR
- 3 μl de inserto (100 ng/ μl)
- 1 μl de T4 ligasa

10 μl TOTALES

Se dejó a temperatura ambiente 90 min. Se transformó por electroporación y se seleccionaron las transformantes a través de X-Gal-IPTG, seleccionando las colonias de color blanco. Se verificó la orientación de la construcción por análisis de restricción.

Se linearizó la construcción con Spe I para realizar posteriormente una reacción de polimerización:

- 6.6 μ l de DNA
- 2 μ l de NTP (10 X)
- 2 μ l de Buffer (10 X)
- 1 μ l de Inhibidor de RNAsa
- 1 μ l de RNA polimerasa

13.6 μ l + 6.4 μ l de agua tridestilada estéril para llevar a 20 μ l TOTALES.

Se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C por 2 horas, se paró la reacción con 2 μ l de EDTA 0.2 M.

5.2.14.2 PREPARACIÓN DEL GEL.

Se disuelve en un matraz de 250 ml 2 gr de agarosa en 170 ml de agua tridestilada estéril. Se deja enfriar y se agregan 20 ml. de MOPS (buffer de corrida para RNA) 10X y 11 ml de formaldehído. Se agita y se vacía en la cámara de electroforesis. Se deja polimerizando mínimo 90 min.

5.2.14.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE RNA.

Para cargar la misma cantidad de RNA en todos los pozos, se hacen los cálculos para cargar 5 μ g totales. Para ésto se cuantificó previamente la cantidad de RNA por microlito de cada muestra. Se sacan las muestras del congelador y se ponen en hielo para descongelar. En tubos previamente rotulados con el número de cada muestra se coloca primero el agua posteriormente el RNA y al final 8.5 μ l de buffer de carga. Se lleva con agua tridestilada a un volumen final de 20 μ l. Se agita en vortex cada muestra por 5 segundos. En el primer carril se cargan 1.5 de marcador de peso molecular mas 18.5 μ l de buffer de carga.

5.2.14.4 CORRIMIENTO Y OBSERVACIÓN DEL GEL

El buffer de corrida que se utiliza es MOPS 1X y el gel se corre a 50 mV. En este caso no es necesario teñir el gel, pues el buffer de corrida ya contiene bromuro de etidio. En caso de teñir se agregan 5 μ l de bromuro de etidio a 100 ml de agua tridestilada estéril y se deja tiñendo de 2 a 3 min. Se observa el corrimiento del gel con luz UV y se toma una foto para tenerla como referencia.

5.2.14.5 REMOCIÓN DEL FORMALDEHÍDO DEL GEL

Se coloca el gel en un recipiente de vidrio limpio y se adicionan 300 ml de SSC al 0.1% y se deja en agitación suave por 30 min. con agitación suave, se desecha el líquido y se agregan otros 300 ml de SSC 0.1% y se deja otros 30 min. en agitación suave.

5.2.14.6 TRANSFERENCIA

Se cortan cuadros de papel toalla, papel cromatográfico y membrana de nylon del tamaño del gel más un margen de 0.5 cm. Se corta una tira larga de 12x40 cm. A un refractario limpio con SSC 10X se le coloca un vidrio limpio encima, a manera de puente, y se moja con SSC 10X. Enseguida se coloca la tira larga de papel cromatográfico asegurándose que ésta toque de ambos lados el SSC 10X del refractario. Se moja la tira con SSC 10X y se coloca el gel con los pozos hacia abajo sin que queden burbujas entre el papel y el gel. A los lados del gel se coloca parafilm para evitar fuga en la transferencia y encima del gel se coloca la membrana de nylon utilizando pinzas y con cuidado de no dejar burbujas. Por último se colocan 2 papeles cromatográficos, las toallas de papel y un cristal. Encima del cristal se coloca un peso, que puede ser un libro. Se deja transfiriendo toda una noche. Se quita con cuidado el peso, el cristal y las toallas. Con pinzas se quitan los papeles cromatográficos, con cuidado de no levantar la membrana. Se marca la membrana. Se retira la membrana y se le saca una foto.

5.2.14.7 FIJACIÓN DEL RNA A LA MEMBRANA

El RNA se fija a la membrana con luz U.V por 10 segundos y posteriormente 2 horas a 80 °C.

5.2.14.8 PRE HIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

Se coloca la membrana en un tubo de hibridación, con el lado que contiene el RNA hacia arriba, y se agregan 17 ml de buffer de hibridación. Se pre-hibrida en un horno de hibridación pre-calentado a 76 °C por 2 horas. Se saca el tubo, se tira el líquido, se agregan 10 ml de buffer de hibridación y se coloca nuevamente en el horno por 20 min. Se saca el tubo de hibridación, se agrega la sonda y se deja hibridando toda la noche.

La membrana se coloca en un refractario limpio y se lava con SSC 2X y SDS 0.1%, se pone en agitación suave por 5 min. Se tira el líquido se agrega SSC 2X y SDS 0.1% y se pone en agitación suave por 10 min.

Se tira el líquido se agrega SSC 0.1X y SDS 0.1% y se deja en agitación por 5 min. Se agrega SSC 0.1X y SDS 0.1% y se deja 15 min. mas en agitación. Se saca la membrana del refractario y se coloca en un tubo de hibridación limpio con SSC 0.1X y SDS 0.1% precalentado a 65 °C y se coloca en el horno por 15 min. Se coloca la membrana en un refractario limpio, se agrega "buffer washing" y se pone en agitación por 3 min., se tira el líquido se agrega "buffer blocking" y se deja en agitación suave por 30 min. Se tira el líquido se agregan 20 ml de buffer blocking + ANTI-DIG-AC y se deja en agitación suave por 30 min. * "DIG Lumin.scent Detection Kit for Nucleic Acids". Se desecha el líquido y se agrega "buffer washing" y se agita con mano por 1 min. Se tira el líquido se agrega nuevamente "buffer washing" y se deja en agitación suave por 15 min. Se desecha el líquido se agrega nuevamente "buffer washing" y se deja en agitación por 15 min. más. Se saca la membrana del refractario, se coloca en un refractario limpio con 50 ml de buffer 3 y se deja en agitación por 5 min. Se saca la membrana y se coloca en una bolsa de plástico; se sella la bolsa por todos sus lados se corta una orilla y se agrega por ésta 2 ml buffer 3 + CSPD (DIG Lumin.scent Detection Kit for Nucleic Acids). Se vuelve a sellar la bolsa y pasando la mano sobre la bolsa se dispersa bien el líquido sobre la membrana cuidando que no queden burbujas sobre esta. Se deja reposando 5 min. en oscuridad y 25 min. a 37 °C. Se saca la membrana de la bolsa y se coloca en un casete para revelar. En un cuarto oscuro se corta un film (Kodak bioMax light Film) del tamaño aproximado de la membrana y se coloca dentro del casete, donde se encuentra la membrana. Se deja exponiendo de 1 a 2 horas antes de revelar.

5.2.15 SOLUCIONES

Buffer de lisis (2% triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8 y 1 mM EDTA pH 8).

TE Buffer (10 mM Tris Cl pH 8 y 1 mM pH 8)

Buffer STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris base y 1 mM EDTA)

Buffer de Resuspensión (50 mM glucosa, 25 mM Tris Cl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8)

Buffer de lisis (0.2 N NaOH y 1% SDS)

Buffer de neutralización (para 100 ml 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua)

PEM (100 mM PIPES, 1 mM EGTA y 1 Mm MgSO₄)

PEM + azida (200 µl de azida de sodio al 5% a 10 ml de PEM)

Buffer 1 (100 mM ácido maleico, 150 mM de NaCl y se ajusta pH a 7.5 con NaOH)

Buffer 3 (100 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl y 50 mM de MgCl₂)

Buffer de Hibridación (SDS 7%, Buffer fosfatos 0.3M pH 7.2, EDTA 5 mM)

Buffer fosfatos pH7.2 (Para 100 ml 68.4 ml de Na₂ HPO₄ Y 31.6 ml de NaH₂ PO₄)

Buffer Blocking

Buffer Washing (se toman 250 ml de Buffer 1 pH 7.5 y se agregan 750 µl de Tween)

CAPITULO VI RESULTADOS

6.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NCYC 1354 DE *S. pombe*

Para determinar el patrón de expresión de eIF3f respecto al ciclo celular fue necesaria la sincronización de cultivos de *S. pombe*, en fase de crecimiento exponencial temprano. Para determinar el tiempo en el cual el cultivo se encuentra en esta fase, realizamos una curva de crecimiento de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*. Se inoculó en 50 ml de medio líquido YPD la cepa NCYC 1354, se incubó a 30 °C con agitación y se determinó el crecimiento del cultivo durante 50 horas midiendo la densidad óptica a 600nm.

En la Fig. 13 se muestra el promedio de tres curvas de crecimiento independientes de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*. La gráfica muestra que el tiempo en el cual el cultivo alcanza la fase de crecimiento exponencial de las 19 a las 40 horas en la cual se incrementa diez veces más la densidad óptica (de 0.025 a 2.5).



Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa NCYC 1454 de *S. pombe* en medio de cultivo YPD líquido. Se dejó crecer por aproximadamente 140 horas la cepa NCYC 1354 de *S. pombe* a 30 °C; se tomaron muestras a diferentes horas midiendo la D.O. a 600 nm.

6.2 SINCRONIZACIÓN DE LA CEPA NCYC 1354 DE *S. pombe* CON HU

Para realizar la sincronización del cultivo con hidroxurea (HU) se tomó un cultivo de la cepa NCYC de *S. pombe* con un crecimiento previo de 22 horas (en crecimiento exponencial temprano) y se arrestó el cultivo con HU por 3 horas y se liberó del arresto.

Posterior a la liberación del cultivo se tomaron dos lotes de 18 muestras cada 10 min, con esto cubrimos más de un ciclo de duplicación de *S. pombe*. Un lote de las muestras fue fijada con metanol y teñida con DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole) para ser observadas en microscopio fluorescente y ser contabilizadas determinando así el índice mitótico. Como puede observarse en la Figura 14 se obtuvo una sincronización del 50%.

En la gráfica puede observarse el pico mitótico al minuto 110, durante esta hora la mitad de nuestra población se encuentra en la fase mitótica.

El segundo lote de muestras fue utilizada para la extracción de RNA total.

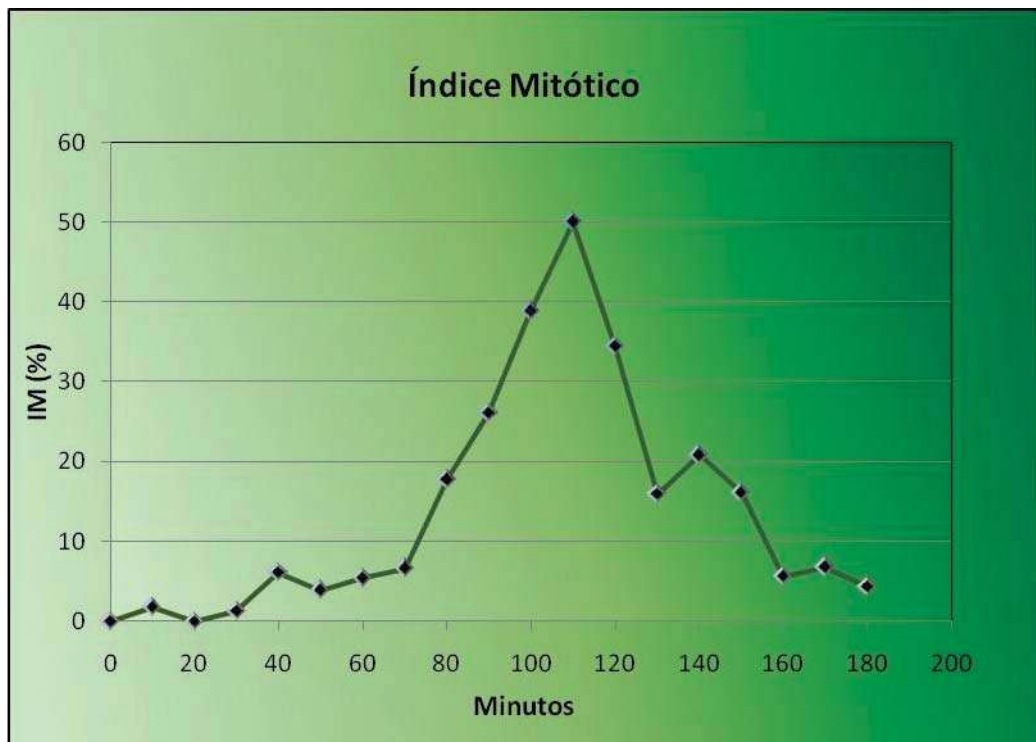


Figura 14. Sincronización de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe* con hidroxurea (HU). Se utilizó HU a una concentración final de 12mM, para sincronizar el cultivo. Una vez contabilizadas las muestras obtenidas de la sincronía se graficaron cada uno de los datos. Se puede observar que se logró una sincronía del cultivo del 50%, con el pico mitótico en el minuto 110. Se realizó este experimento por triplicado.

6.3 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE eIF3f DE *S. pombe* RESPECTO AL CICLO CELULAR

Para determinar el patrón de expresión de la subunidad eIF3f se realizó un Northern Blot. La sonda utilizada para el Northern Blot, se obtuvo mediante la amplificación de la región codificante de eIF3f de *S. pombe* y su clonación en el vector pGEM-T easy (Fig.15).

La construcción fue linearizada con la enzima Spe I, se purificó, cuantificó y se realizó una reacción de transcripción bajo la promoción del sitio de unión a la RNA polimerasa T7 (Fig.15). El kit utilizado para la reacción de transcripción provee un marcaje no radioactivo utilizando digoxigenina en los dUTP.

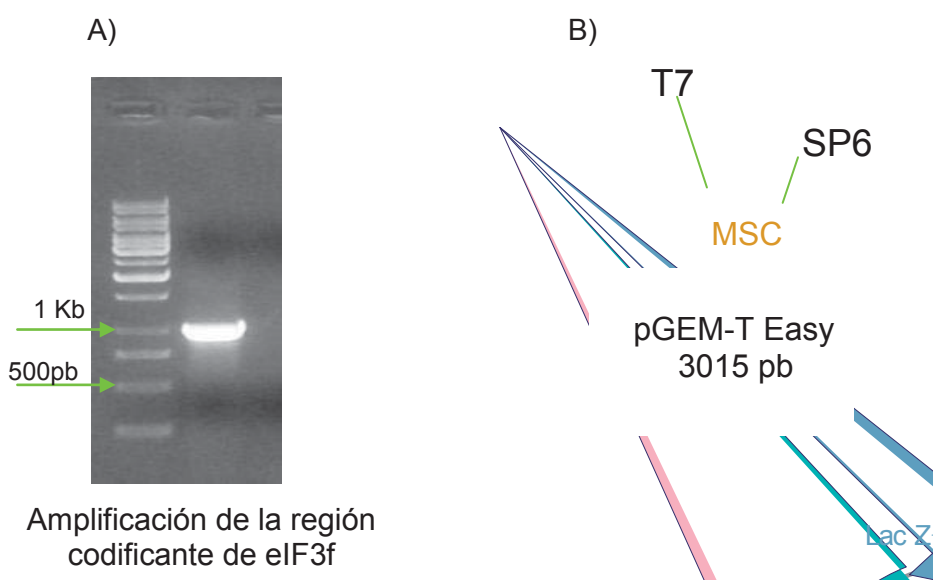


Figura 15. Construcción de la sonda de eIF3f de *S. pombe* utilizada para el Northern Blot. Se realizó un PCR de la región codificante de eIF3f de *S. pombe* (panel A) el cual es de 1kb, se purifico y clono en el plásmido pGEM-T Easy (panel B), flanqueado su sitio múltiple de clonación con los sitios de unión a polimerasa T7 y SP6.

Una vez obtenida la sonda, al segundo lote de muestras obtenidas de la sincronización de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe* se extrajo RNA total con trizol. El RNA obtenido de cada muestra se cuantificó.

El Northern Blot (Fig. 16) muestra que la expresión de eIF3f de *S. pombe* se encuentra circunscrita a la fase G2, ya que se observa la banda de mayor intensidad. La intensidad de cada una de las bandas obtenidas en el Northern blot, se determinó mediante el programa computacional EDAS, las intensidades de eIF3f fueron normalizadas con las intensidades del control de carga (RNAr) que se muestran en la Tabla 5. Los resultados del perfil de expresión de eIF3f se muestran en la Figura 17.

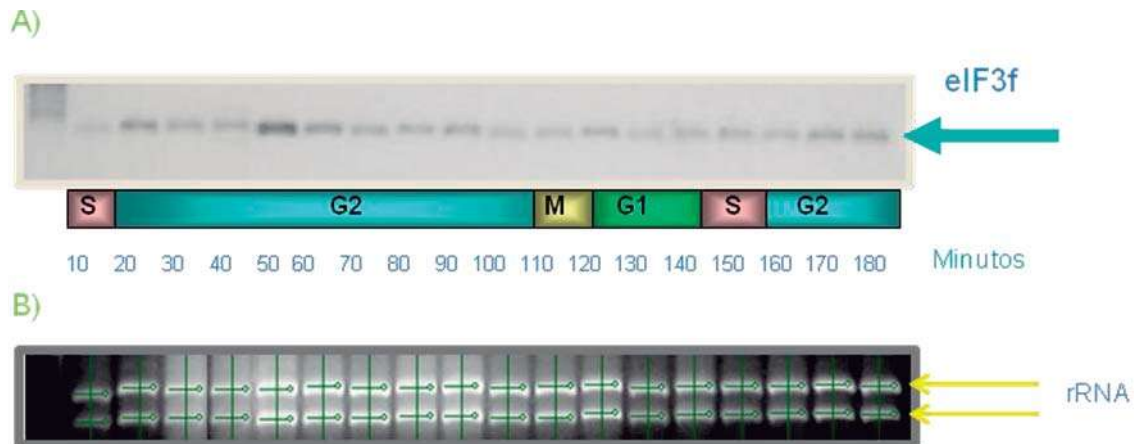


Figura 16. Northern blot de eIF3f de *S. pombe*. A) Northern blot con muestras de un cultivo sincronizado de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*. La radiografía muestra la intensidad de las bandas obtenidas. B) Gel que muestra el rRNA como control de carga.

Tabla 5. Intensidad Relativa de transcrito de eIF3f después de la normalización con los rRNA

Minuto	Intensidad eIF3f	Intensidad rRNA 28S	Intensidad Normalizada
10	1.72	1.22	1.41
20	7.64	1.43	5.34
30	5.21	1.04	5.01
40	45.67	5.44	8.40
50	21.25	1.18	18.01
60	8.09	1.08	7.49
70	5.57	1.18	4.72
80	5.28	1.00	5.28
90	6.77	2.89	2.34
100	2.72	1.47	1.85
110	3.84	1.35	2.84
120	5.91	1.46	4.05
130	4.90	1.59	3.08
140	5.93	1.51	3.93
150	5.10	1.60	3.19
160	6.25	1.69	3.70
170	5.64	1.83	3.08
180	6.69	1.83	3.66

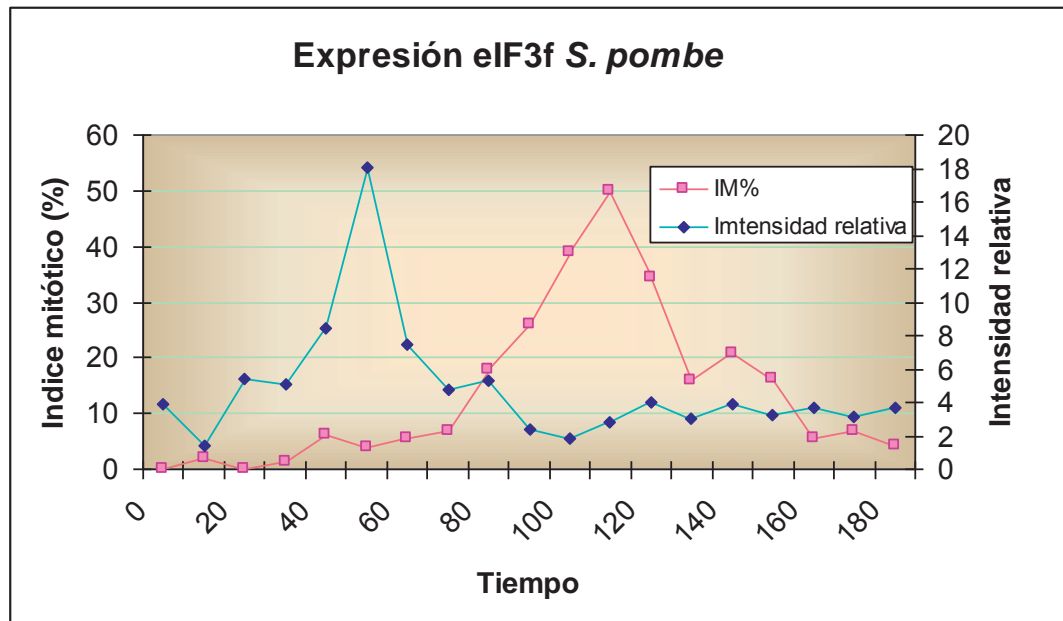


Figura 17. Intensidad relativa de la expresión del transcrito eIF3f e índice mitótico del cultivo de *S. pombe* sincronizado con HU. El pico de expresión de eIF3f se encuentra al minuto 50 del cultivo sincronizado.

La banda más intensa se observa a la hora 50 y corresponde a la fase G2 del ciclo celular de *S. pombe*. Este resultado indica que eIF3f de *S. pombe* tiene un patrón de expresión circunscrito a la fase G2 de su ciclo celular.

El patrón de expresión de eIF3f de *S. pombe* concuerda con la expresión en células de tabaco, que también se encuentra circunscrita a una fase específica del ciclo celular. Además del patrón de expresión de eIF3f de *S. pombe* también correlaciona el tiempo de expresión en relación al ciclo celular y el aumento en el nivel de expresión con los encontrados en tabaco y humano (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de la expresión, de eIF3f en diferentes organismos.

Organismo	Fase	Porcentaje en relación al ciclo celular	Aumento en nivel de expresión
TBY2	G2/M	17	3.8 X
A549	G2/M	14	4 X
<i>S. pombe</i>	G2	20	4.5 X

6.4 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA DE eIF3f

Posteriormente se procedió a identificar en el genoma de *S. pombe*, reportado en National Center for Biotechnology Information (NCBI) la secuencia codificante de eIF3f, encontrándose en el cromosoma dos. Se ubicó el inicio de la traducción ó el ATG inicial de eIF3f así como el codón de paro del gen anterior, determinándose así la región intergénica de un tamaño de 420 pb (Fig. 18).

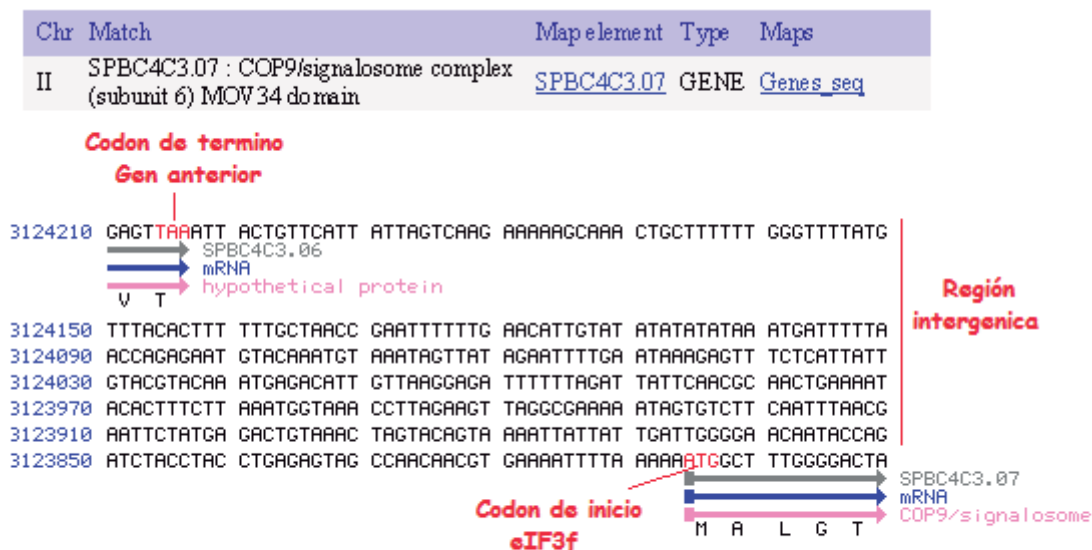


Figura 18. Región intergénica de eIF3f de *S. pombe*. Se localizó el codón de termino del gen anterior al de eIF3f, reportada como proteína de citoesqueleto (Syp 1), así como el codón de inicio de eIF3f, de esta manera, se delimitó la región intergénica con un tamaño de 420 pb y con ello el promotor de eIF3f.

Antes de realizar el diseño de los oligonucleótidos se sometió esta región intergénica a un análisis bioinformático, con el fin de encontrar elementos putativos de respuesta a factores transcripcionales (Tabla 6).

Tabla 6. Elementos reguladores presentes en la región integénica de eIF3f.

A) Elementos putativos de respuesta a factores transcripcionales encontrados en la hebra +.

Strand	Transcription Factor	Consensus	Position
Forward	Adr1p	TTGGGG	-64
Forward	Ash1p	TTGAT	-68
Forward	Azf1p	AAGAAAAA	-380
Forward	Fkh1p	GTAAATA	-269
Forward	Fkh1p	GCCAACA	-28
Forward	Fkh2p	GTAAATA	-269
Forward	Fkh2p	GCCAACA	-28

B) Elementos encontrados en la hebra complementaria

Reverse	Fkh1p	TAGTTAT	-63
Reverse	Fkh1p	CATTTGT	-342
Reverse	Fkh1p	CATTTGTAT	-342
Reverse	Fkh2p	TAGTTAT	-63
Reverse	Fkh2p	CATTTGT	-342
Reverse	Fkh2p	CATTTGTAT	-342
Reverse	Mcm1p	TGGGTTTTTTC	-353
Reverse	Mcm1p	GGGTTTTTTC	-354
Reverse	Mot3p	ATCCAT	-38
Reverse	Mot3p	GTCCAT	-34
Reverse	Mot3p	ATCCAT	-38
Reverse	Mot3p	TTCCAA	-143
Reverse	Pho4p	GTGCAA	-16
Reverse	Tec1p	GTAAGA	-276
Reverse	Yap1p	ACTGATT	-379

En la tabla se muestran las secuencias consenso putativas encontradas en la región promotora de eIF3f. Entre los factores que se encontraron tenemos a; Mot3 que es un represor transcripcional de genes de biosíntesis de ergosterol, Azf1 activador dependiente de glucosa, Ash1 reprime la transcripción de los genes OH, Tec1 involucrado en la expresión específica de genes para hifas en *Candida albicans*, Yap1 activa genes antioxidantes y Fkh2 y Mcm1 involucrados en la expresión específica durante las fase G2 y M en *S. cerevisiae*.

En base a los resultados obtenidos en el análisis bioinformático, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región promotora, así como también oligonucleótidos que nos permitieran construir delecciones parciales de la región promotora.

Adicionalmente se tomaron en cuenta los sitios de restricción en el sitio múltiple de clonación del vector Yep363, que contiene el gen reportero y así facilitar la ligación del fragmento dentro de este vector. De manera que se modificaron algunas bases en los extremos de los oligos, para obtener oligonucleótidos con sitios de restricción para Bam H1 (4 oligos) y Hind III (1oligo) que nos permitieran dirigir nuestra inserción en el vector (Fig.19).

Otro factor que se tomó en cuenta para el diseño de los oligos, fue que la región promotora a analizar debía llevar su propio ATG y quedar en fase con la región codificante del gen reportero, en este caso Lac Z. Se diseñaron 5 oligos diferentes los cuales se muestran en la Figura 19.

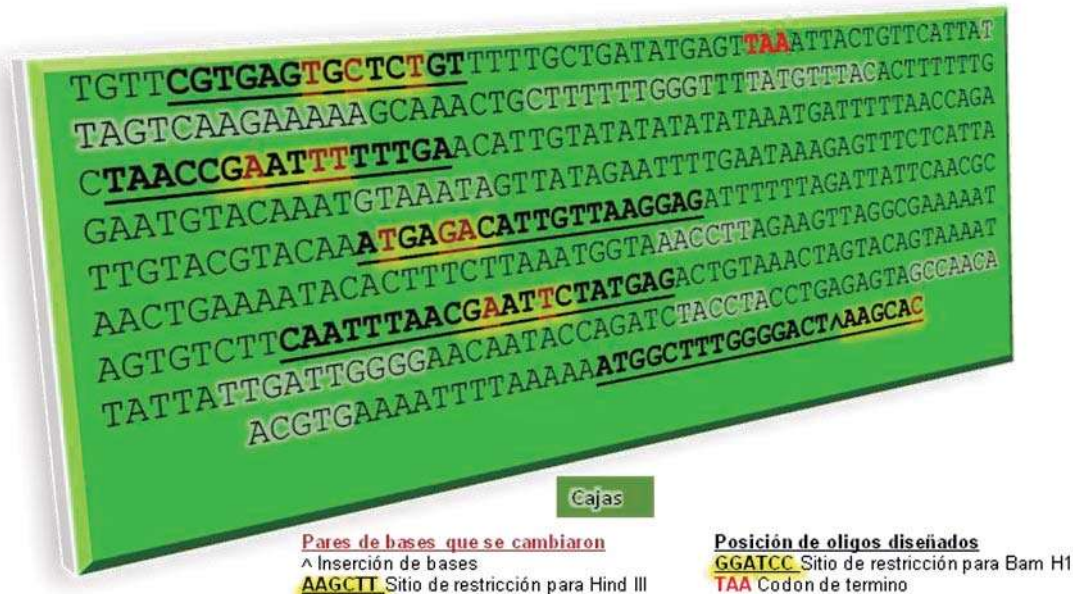


Figura 19. Secuencia de la región integénica. Se encuentra delimitada la secuencia y posición de los oligos diseñados . Se resaltan en amarillo las bases que fueron modificadas y en con el símbolo □ la base adicionada para crear los sitios de restricción para Hind III y BamH I. Se resaltan en blanco las posiciones de las cajas putativas, de manera que se puede observar cuales se eliminan con cada delección.

Con los 5 oligos diseñados y sintetizados se procedió a realizar la amplificación de la región intergénica y las deleciones para lo cual, primero se hizo una extracción de DNA cromosomal de la cepa NCYC 1354 de *S. pombe*, para usarlo como molde.

6.5 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA Y DELECIONES DE eIF3f

Una vez amplificada la región intergénica y las deleciones, se revisó que el tamaño de cada amplificación fuera el esperado, en un gel de agarosa (Fig. 20). Confirmado el tamaño, se corrió el total de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 0.8% sin bromuro de etidio, se cortaron las bandas que correspondían a la región intergénica y sus deleciones y se purificaron con el Kit de purificación (PROMEGA). Se cuantificó cada una de las purificaciones para realizar las clonaciones. Ya purificadas las amplificaciones de la región intergénica y sus deleciones se les realizó una doble digestión (Bam HI y Hind III), los insertos ya digeridos, se purificaron a partir de solución.

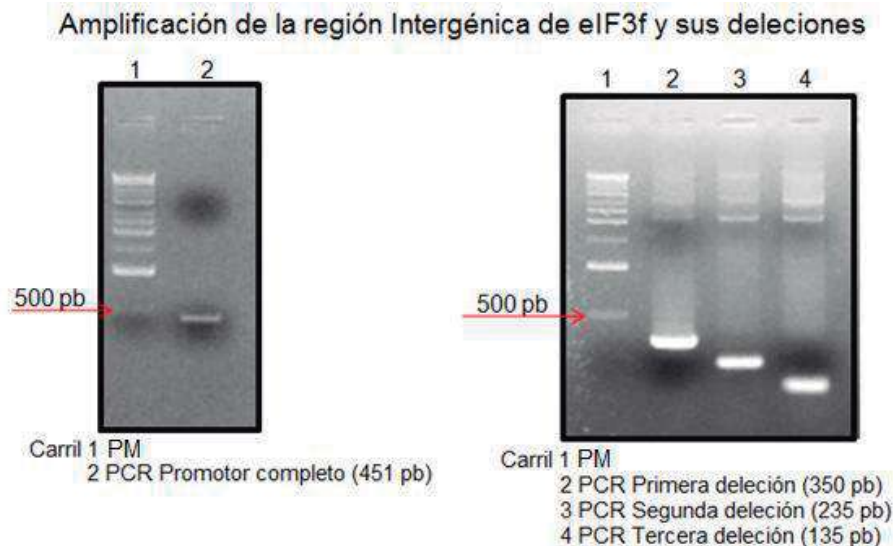


Figura 20. Amplificación de la región intergénica de eIF3f y sus deleciones. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que confirman los tamaños esperados en cada una de las amplificaciones realizadas a través de PCR.

6.6 CLONACIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA Y DELECIONES DE eIF3f EN EL VECTOR Yep 363

Con cada una de las amplificaciones digeridas y purificadas se realizaron reacciones de ligación al vector Yep 363 el cual contiene el gen reportero Lac Z, obteniendo de esta manera cuatro construcciones diferentes: Yep 363 + región intergénica, Yep 363 + primera deleción, Yep 363 + segunda deleción y Yep 363 + tercera deleción. Cada una de estas construcciones se clonó por separado y se transformó por electroporación en células de bacteria de la cepa de *Escherichia coli* (*E.coli*) electrocompetentes.

Para la selección de las bacterias transformadas con nuestras construcciones, las cuales otorgaban resistencia a ampicilina a las bacterias exitosamente transformadas, se crecieron en un medio con este antibiótico, teóricamente todas las colonias que crecieron en este medio tendrían nuestras construcciones.

Para corroborar que las colonias que crecieron en el medio con ampicilina tuvieran nuestras construcciones, se realizó PCR de colonia, para evitar falsos positivos de las colonias que dieron amplificado se les realizó un análisis de restricción (Figuras 21 a 24).

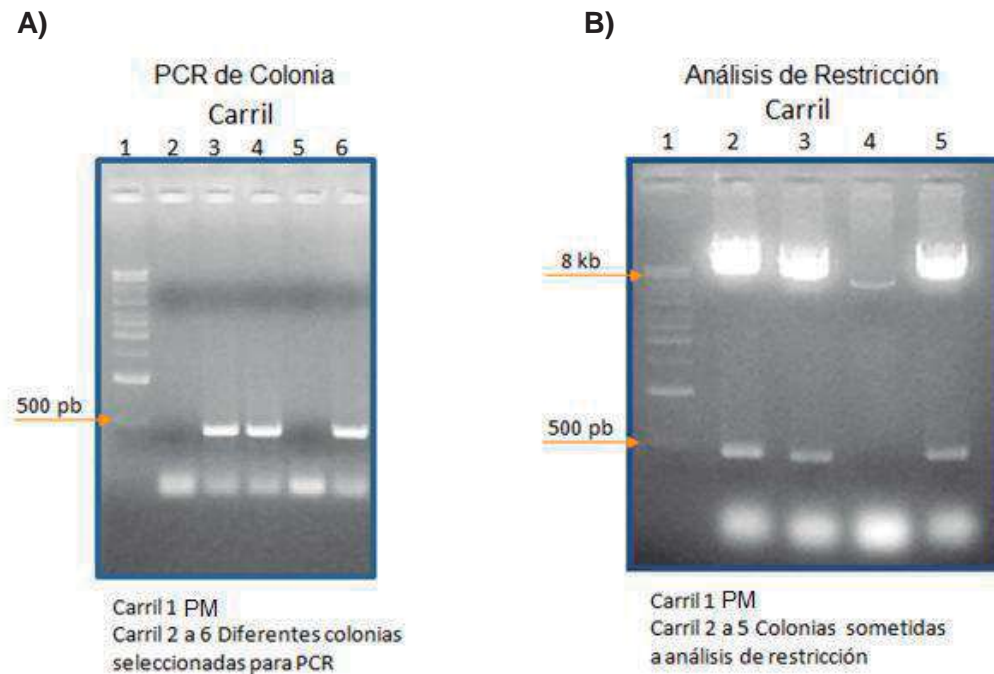


Figura 21. PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de *E. coli* transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + la región intergénica. A) Colonias analizadas por PCR de colonia. **B)** Análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Hind III de las colonias que dieron amplificación positiva. Se muestra la liberación de la región intergénica del vector, obteniéndose con ello dos fragmentos: uno de 8.4 Kb del vector y otro de 451 pb de la región intergénica.

A)

B)

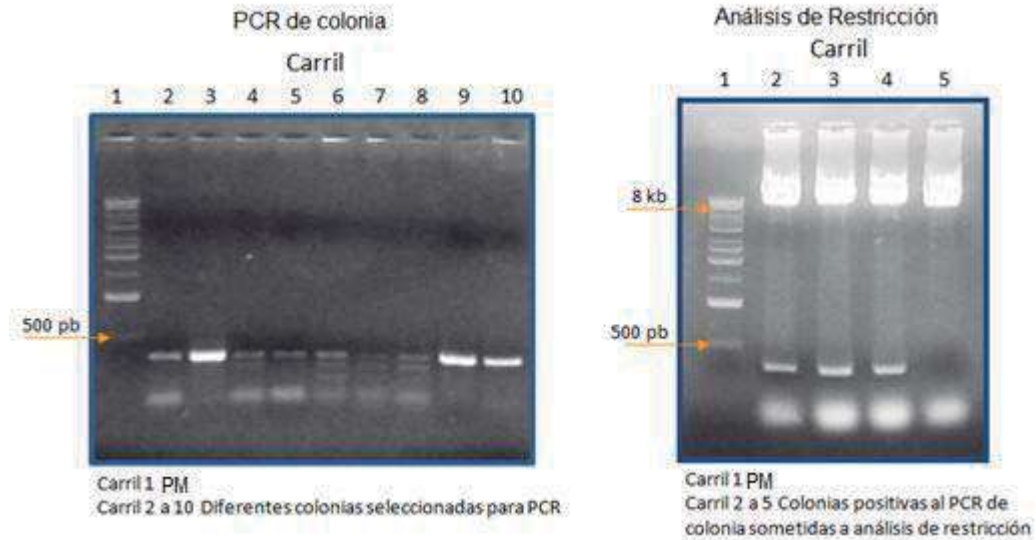


Figura 22. PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de *E. coli* transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + primera deleción. A) Colonias analizadas por PCR de colonia. **B)** Eliminación de posibles falsos positivos del PCR de colonia a través de análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Hind III, fragmentos de 8.4 Kb correspondiente al peso del vector y 350 pb el tamaño de la primera deleción.

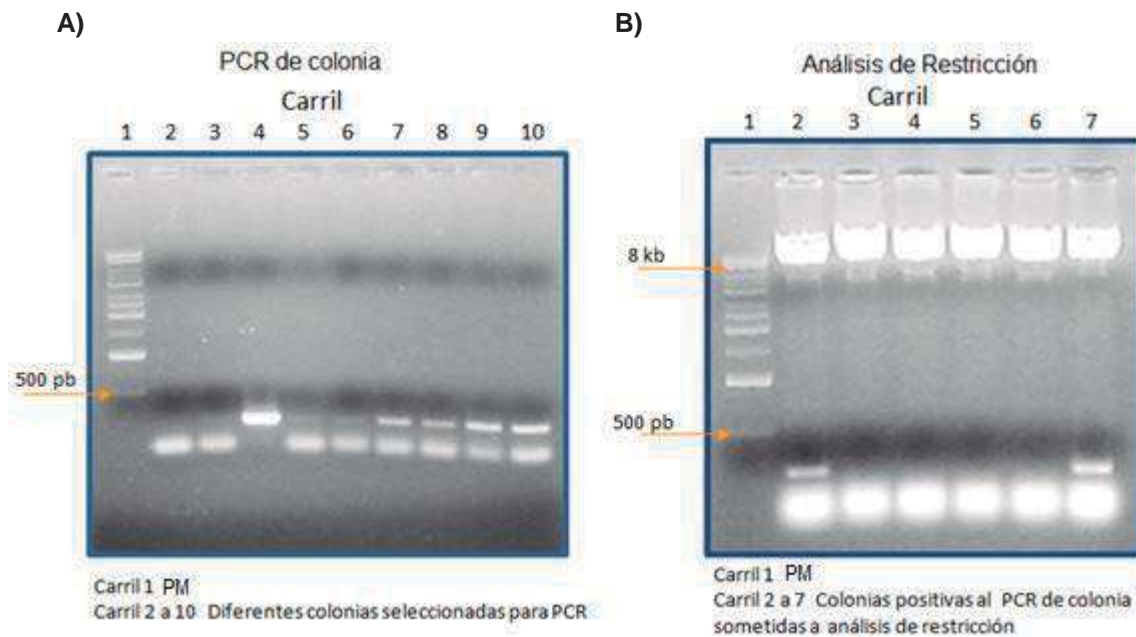


Figura 23. PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de *E. coli* transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + segunda deleción. A) PCR de colonia. **B)** Las colonias que amplificaron el fragmento de 250 pb del inserto, se les realizó una extracción de DNA plasmídico y se hizo un análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Hind III, liberando el inserto del vector; 8.4 Kb del vector y otro de 235 pb de la segunda deleción.

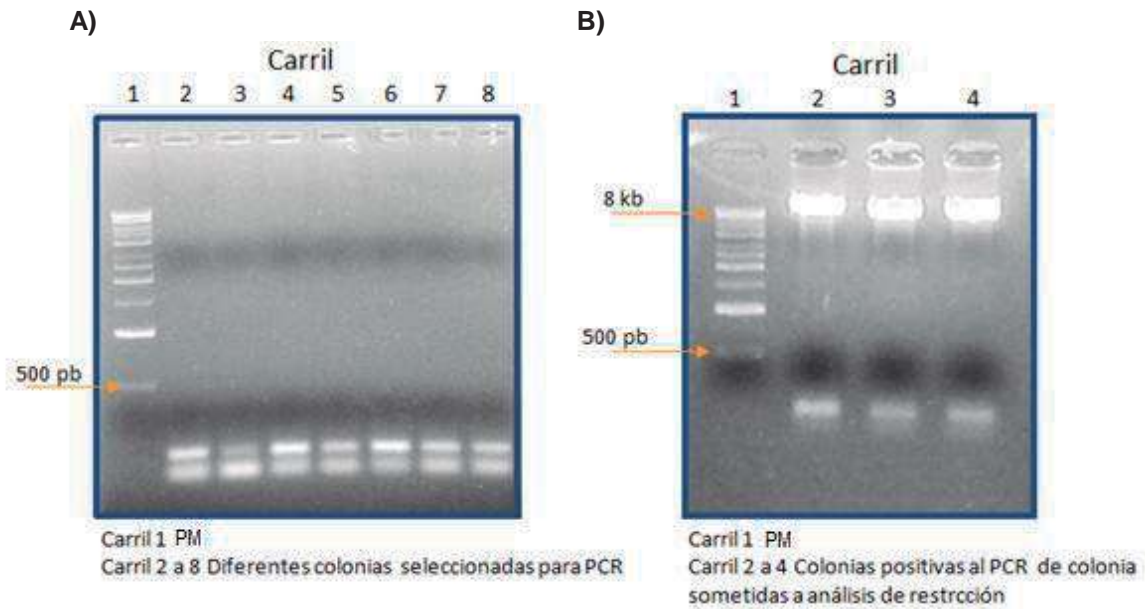


Figura 24. PCR de colonia y análisis de restricción de las bacterias de *E. coli* transformadas por electroporación con la construcción Yep 363 + Tercera deleción. A) PCR de colonia. B) Eliminación de posibles falsos positivos del PCR de colonia a través de análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Hind III. Fragmentos de 8.4 Kb correspondiente al peso del vector y 135 pb el tamaño de la tercera deleción. Dado que el tamaño de esta deleción es muy pequeño y se traslapa con el RNA, fue necesario tratar al DNA plasmídico con RNAsas antes de la digestión.

6.7 TRANSFORMACIÓN DE TPC1 DE *S. pombe* CON LAS CONSTRUCCIONES DE YEp363.

Una vez obtenidas las fusiones traduccionales con la región intergénica y las tres diferentes deleciones de ésta, se procedió a transformar la cepa TPC1 de *S. pombe* la cual tiene auxotrofia a leucina. Las construcciones contienen el gen que complementa la leucina por los que las células transformadas pueden crecer en un medio carente de este aminoácido. De esta manera se seleccionaron las transformantes.

6.8 ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA

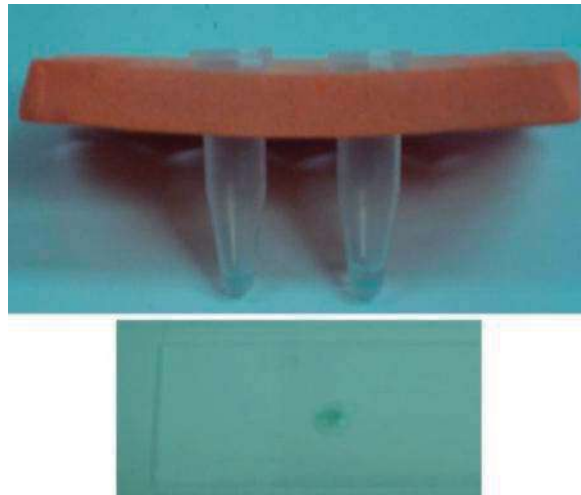
Al fusionar traduccionalmente (en fase) la región intergénica y las deleciones al gen de β -galactosidasa éstas expresan el marcador. Es importante marcar que la ausencia de un promotor fusionado bajo estas condiciones no expresara el marcador.

La β -galactosidasa es una enzima que hidroliza β -D-galactósidos, naturales o sintéticos como el X-gal dando lugar a un producto de color azul al ser hidrolizados.

Para corroborar nuestras transformantes en la cepa TPC1 de *S. pombe*, realizamos un PCR de colonia, y las colonias que dieron amplificación positiva fueron las que se utilizaron para realizar el ensayo de β -galactosidasa. Cabe mencionar que es necesario secuenciar cada una de las construcciones obtenidas. Los resultados de los ensayos antes mencionados se muestran en la Figura 26.

La cepa transformada con la primera delección aparentemente no presenta actividad (color azul), pero al hacer un acercamiento se observan algunos puntos de color azul, lo que indica que solo un pequeño grupo de la población se encuentra expresando el gen reportero. Mientras que la cepa transformada con la segunda delección muestra una alta actividad de β -galactosidasa, todas las células están expresando el gen reportero.

A)



B)

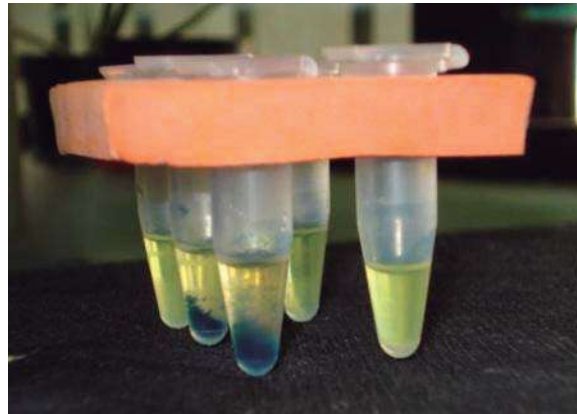


Figura 25. Ensayo de β -galactosidasa. A) Se muestra “spots” de color azul indicando actividad de β -galactosidasa en la cepa de *S. pombe* transformada con Yep 363 + primera delección B) Cepa TPC1 de *S. pombe* transformada con la segunda delección muestra actividad en el total de su población de β -galactosidasa.

Es importante señalar que los resultados del ensayo de β -galactosidasa son cualitativos y preliminares y tendrán que confirmarse a través de métodos cuantitativos. De acuerdo a estos resultados preliminares del ensayo de β -galactosidasa la construcción con la primera delección (350pb a partir del inicio de traducción), parece contener los elementos necesarios para darle a eIF3f una expresión específica, ya que solo se observan algunos puntos de color azul en el cultivo celular, que corresponden muy probablemente a las células que se encuentran en la fase G2 temprana, fase a la cual se encuentra circunscrita la expresión de eIF3f. En las células transformadas con la construcción que tiene la segunda delección (235pb a partir del inicio de traducción), se observa que todas presentan coloración azul indicando que la región promotora que contiene esta construcción permite una expresión constitutiva de la β -galactosidasa.

Los resultados antes mencionados sugieren que en la región -235 y -350 pb del promotor se encuentran elementos represores que le permiten a eIF3f una expresión específica, debido a que al deletar esta región de 115 pb la expresión de eIF3f al parecer se vuelve constitutiva (Fig. 26). Es importante señalar que dentro de estos 115pb se encontraron dos cajas putativas: Tec1p y Fkh1p, esta última se ha reportado como un elemento represor.

```
TAACCGAATTTTTTGAACATTGTATATATATATAAATGATTTTTAACCA
GAGAATGTACAAATGTAATAAGTTATAGAATTTTGAATAAAGAGTTTCT
CATTATTGTACGTACAAATGAGACATTGTTAAGGAG
```

Tec1p GTAAGA -276 Fkh1p GTAAATA -269

Figura 26. Región de -235 a la -350 de la región intergénica de eIF3f de *S. pombe*. Dentro de esta región se localiza Fkh1p un elemento represor.

CAPITULO VII DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en la curva de crecimiento de *S. pombe*, nos indican que este microorganismo tiene una fase logarítmica amplia de aproximadamente 19 horas y una fase lag de 18 horas. Además *S. pombe* es un eucarionte unicelular que nos permite obtener datos de manera rápida ya que un experimento de sincronización podemos obtenerlo en 3 horas, mientras que en otros eucariontes como las células humanas son necesarias 24 horas para obtener este mismo dato. Esta levadura es un sistema en el cual se pueden alcanzar buenos índices de sincronía, por arriba del 50%, mientras que en sistemas como células humanas (A549) y células de tabaco (TBY2) hemos alcanzado índices por debajo del 25%.

Respecto a los genes que son expresados específicamente durante el ciclo celular, se sabe que los productos de éstos son necesarios en un tiempo en particular. Por ejemplo la ciclina B es expresada al final de la fase S ya que su producto es necesario para dar paso a la mitosis. En este trabajo encontramos que la subunidad eIF3f presenta un patrón de expresión específico y circunscrito a la fase G2 temprana; durante esta fase ocurre un evento importante en *S. pombe*, que consiste en cambiar su patrón de crecimiento monopolar a bipolar, incrementando para ello su tasa de crecimiento y activando genes involucrados en el crecimiento y metabolismo celular como *cig1* (ciclina tipo B), *pof6* (esencial para la separación celular), *psu1* (involucrada en la síntesis de pared celular) y *gpd2* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) entre otros. (Rustici *et al.*, 2004)

De acuerdo con el patrón de expresión de eIF3f, se puede inferir que la función de este gen es necesaria durante la fase G2 de *S. pombe*, lo que nos permite sugerir que eIF3f podría estar formando parte de un complejo de eIF3 particular requerido para la traducción de ciertos mensajeros durante la fase G2 temprana. Por otra parte Zhou y colaboradores (2005) reportan que la subunidad eIF3m de *S. pombe* al parecer forma parte del núcleo de eIF3, ya que al deletar la función de esta subunidad se disminuye la síntesis global de proteínas en un 80%, pero además forma un complejo muy particular que tiene preferencia por algunos transcritos.

eIF3f al igual que eIF3m podría ser parte de un complejo de eIF3 muy particular, involucrado en la traducción de genes específicos requeridos para el crecimiento y metabolismo celular que se dan durante la fase G2 temprana y/o podría estar regulando la velocidad de síntesis de proteínas incrementándola durante esta fase.

Los datos publicados por Zhou y colaboradores (2005) indican que después de 20 horas del silenciamiento de eIF3f se abate un 80% la síntesis global de proteínas fenotipo muy parecido al que ocurre con la subunidad eIF3m. Es importante señalar que este experimento fue realizado en un cultivo celular asincrónico. Zhou y colaboradores, también reporta que eIF3f es esencial para *S. pombe*, ya que al deletar éste gen en células diploides y posteriormente esporular estas mutantes, la viabilidad de las esporas fue casi nula.

Los resultados antes mencionados indican la conservación de la esencialidad del gen de eIF3f para la viabilidad celular ya que tanto en *S. pombe* como en mamíferos, al deletar este gen, las células de ambos sistemas no son viables.

Los genes que controlan el ciclo celular aparecieron con las primeras células. Dada la esencialidad de este gen para la viabilidad celular y su prevalencia en levadura, plantas, nemátodos, insectos y mamíferos. El gen de eIF3f pudo haber aparecido en las primeras células eucarióticas. Según la estructura génica y proteica de eIF3f, podemos darnos cuenta que éste gen ha evolucionado, adquiriendo intrones en el gen y dominios en la proteína. Mientras más evolucionado es el organismo más compleja se vuelve la subunidad eIF3f. Además de los datos antes mencionados, la esencialidad de eIF3f es sugerida por su prevalencia en los diferentes reinos.

La especialización de este gen así como la adquisición de nuevas funciones a la par de su evolución, nos permite sugerir que en un principio la subunidad eIF3f pudo haber sido parte del núcleo funcional de eIF3 y con el paso del tiempo esta subunidad se especializó de tal manera que pasó a ser un regulador de eIF3 como podría ser el caso de humano ya que Shi y colaboradores (2006) reportan a eIF3f humano como un inhibidor de la síntesis de proteínas.

Respecto a qué elementos confieren a eIF3f el patrón de expresión en la fase G2 temprana, solo podemos inferir, debido a que no se han identificados los elementos que permiten la expresión ciclo celular específica en *S. pombe*.

Los estudios realizados en *S. cerevisiae*, con el gen de la ciclina CLB2 expresado en la fase G2/M, muestran que es necesaria la unión cooperativa de los factores transcripcionales Fkh2p y Mcm 1p para definir su expresión específica en esta transición. Estudios previos en CLB2, muestran que Fkh1p es requerido para reprimir la expresión mientras que Fkh2p activa la expresión a los niveles normales de CLB2. (Morillon *et al.*, 2003)

S. pombe tiene un homólogo cercano al Fkh2 de *S. cerevisiae* y al parecer su función consiste en regular la expresión génica durante el ciclo celular. Varios genes inducidos durante la mitosis muestran una expresión constitutiva en ausencia de este elemento; también se ha observado que la expresión basal de genes mitóticos es incrementada en ausencia de Fkh2, lo que indica que este elemento tiene una función represora de la transcripción en algunas fases del ciclo celular. Además de que la sobrexpresión de Fkh2 es letal en células silvestres "*Wild-type*".

En *S. pombe*, Bulmer y colaboradores (2004) reportan que Fkh2 regula la expresión periódica de *cdc15* y *spo12* durante las fases de M y G1. Rustici y colaboradores (2004) en sus estudios con cultivos sincronizados identifica 407 genes expresados periódicamente durante el ciclo celular de *S. pombe*, de los cuales 147 genes son expresados durante la fase G2. Este grupo de genes es bastante heterogéneo, con máximos de expresión en diferentes tiempos durante la fase G2. Cabe destacar que la mayoría de los genes tienen un máximo de expresión durante la fase G2 temprana.

Los resultados obtenidos en el ensayo de β -galactosidasa sugieren que entre la región -235 y -350 pb de la región intergénica, se encuentran elementos represores ó que se eliminaron elementos que dan especificidad de expresión a eIF3f; debido a que al deletar la región de 115 pb la expresión de eIF3f al parecer se vuelve constitutiva (Fig. 25). Es interesante notar que en la región -235 a la -350 se encuentran dos cajas putativas: Tec1p y Fhk1p, esta última involucrada en la represión en casi todas las fases del ciclo celular excepto durante las fases G2 y M en *S. cerevisiae*.

Wood y colaboradores (2002) reportan que la longitud media de la región intergénica de los genes de *S. pombe* es de 450pb. Kim y colaboradores (2004) encuentra que el gene de la glutatión sintetasa un importante antioxidante involucrado en respuesta a estrés, y que las secuencias que regulan su patrón de expresión se encuentran entre -365 a -234 pb a partir del inicio de la traducción. El gen que codifica para la tiorredoxina reductasa, cuya expresión es inducida por estrés oxidativo, contiene elementos de inducción localizados entre -499 a -186 pb a partir del inicio de al traducción (Kang *et. al*, 2006).

Con los resultados preliminares identificamos que podrían existir elementos entre la región -253 a -350 pb que regularían el patrón de expresión de eIF3f de *S. pombe*. Es importante señalar que dentro de esta región, como mencionamos anteriormente, se han encontrado también elementos en otros genes inducibles.

Cabe mencionar que tanto es importante la expresión inducida como la represión, ya que a través de ésta se impide la función de una proteína cuando esta no es necesaria. El expresar una función fuera del tiempo en la cual es requerida puede ser la diferencia entre los procesos apoptóticos y de división celular. El gen eIF3f es esencial para la viabilidad celular (Zhou et al., 2005) y su producto es requerido en base al patrón de expresión encontrado en la fase G2 temprana, por lo que la represión de este gen durante es resto el ciclo celular se vuelve de vital importancia.

Es interesante el hecho de que las cajas que se han reportado para *S. cerevisiae* para una expresión específica durante la fase G2, al parecer no son las mismas que utiliza *S. pombe*. Sin embargo hay que considerar que la fase G2 en *S. pombe* es totalmente diferente en *S. cerevisiae*. Durante la fase G2 *S.pombe* crece a diferencia de *S. cerevisiae* la cual aumenta su biomasa en la fase G1. Otra diferencia importante es la duración de esta en cada levadura: en *S. pombe* ocupa el 70% de su ciclo celular, por lo que los genes que se expresan en esta fase se subdividen en fase G2 temprana, media y tardía mientras que en *S. cerevisiae* la fase G2 no ocupa ni un 15% de su ciclo celular.

Por lo antes mencionado, no es difícil suponer que la regulación transcripcional en *S. pombe* sea diferente a *S. cerevisiae*. Los datos de Rustici y colaboradores (2004) también nos siguieren esto y además que existe un campo virgen en el cual explorar respecto a la regulación transcripcional durante la fase G2 en *S. pombe*.

CAPITULO VIII

CONCLUSION

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la subunidad eIF3f de *S. pombe* presenta un patrón de expresión específico que se encuentra circunscrito a la fase G2 temprana del ciclo celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aravind L. and Ponting C.P. (1998). "Homologues of 26s proteasome subunits are regulators of transcription and translation". *Protein Science* 7: 1250-1254.
2. Bähler J. (2005). "Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast". *Annual Review of Genetics* 39: 69-94.
3. Beskow A. and Wright A.P.H. (2006). "Comparative analysis of regulatory transcription factors in *Schizosaccharomyces pombe* and budding yeast". *Yeast* 23: 929-935
4. Bonneau A.M. and Sonenberg N. (1987). "Involvement of the 24KDa cap-binding protein in regulation of synthesis in mitosis". *The Journal of Biological Chemistry* 262: 11134-11139
5. Boros J., Lim F.L., Darieva Z., Pic-Taylor A., Harman R., Morgan B.A and Sharrocks D. (2003). "Molecular determinants of the cell cycle regulated Mcm1-Fkh2p transcription factor complex". *Nucleic Acids Research* 9: 2279-2288
6. Bulmer R., Pic-Taylor A., Whitehall S.K., Martin A.K., Millar J.B.A., Quinn J. and Morgan B.A. (2004). "The forkhead Fkh2 regulates the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*". *Eukaryotic Cell* 4: 944-954
7. Burks E. A., Bezerra P.P., Le H., Gallie D.R. and Browning K.S. (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. Doldan A., Chandramouli A., Shanas R., Bhattacharyya A., Cunningham J.T., Nelson A.M. and Shi J. (2008). "Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer". *Molecular Carcinogenesis* 47: 235-244
9. Dmitriev E.S., Terenin M.I., Dunaevsky Y.E., Merrick C.W. and Shatsky N.I. (2003). "Assembly of 48S translation initiation complex from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions". *Molecular and Cellular Biology* 23: 8925-8933
10. Dunand-Sauthier I., Walker C., Wilkinson C., Gordon C., Crane R., Norbury C. and Humphrey T. (2002). "Sum1, a component of the fission yeast eIF3 translation initiation complex, is rapidly relocalized during environmental stress and interacts with components of the 26S proteasome". *Molecular Biology of the Cell* 13 1626-1640
11. Ewen E.M. (2000). "Where the cell cycle and histones meet". *Genes and Development* 14: 2265-2270

12. Farías Escalera A., Beltrán Peña E. y Pardo Galván M.A. (2005). "Control molecular del ciclo celular eucariótico" *Ciencia Nicolaita* 4: 37-56
13. Fraser C.S., Lee J.Y., Mayeur G.L., Bushell M., Doudna J.A. and Hershey J.W.B. (2004). "The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40S ribosomal subunits *in vitro*". *The Journal of Biological Chemistry* 279: 8946-8956
14. Forsburg S.L. and Rhind N. (2006). "Basic methods for fission yeast". *Yeast* 23: 173-183
15. Gupta P.K. (2001). "Key regulators of the cell cycle: nobel prize for physiology or medicine". *Current Science* 81: 1280-1286.
16. Hellen C.U.T. and Sarnow P.(2001). "Internal ribosome entry in eukaryotic mRNA molecules". *Genes and Development* 15: 1593-1612
17. Hernández P. (2005). "Análisis estructural del gen y la proteína PSIF en eucariontes superiores". Tesis de licenciatura. Escuela de Biología UMSNH. Morelia Michoacán, México, 69 pp.
18. Higareda-Mendoza A.E, Aguilera A, Llanderal J, Méndez A. y Pardo-Galván M.A. (2006). "Muerte celular programada por la sobreexpresión o silenciamiento de eIF3f en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549)". Tercer Foro de Investigación. UMSNH.
19. John P.C., Mews M. and Moore R. (2001). "Cyclin/Cdk complex: their involvement in the cell cycle progression and mitotic division". *Protoplasma* 216: 119-142
20. Kang H.J., Hong S.M., Kim B.C., Kim K. Park E.H. and Lim C.J. (2006). "Transcriptional analysis and Pap1-dependence of a unique gene encoding thioredoxin reductase from the fission yeast". *The Journal of Microbiology* 1: 35-41,
21. Kapp L.D. and Lorsch J.R. (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation". *Annual Review of Genetics* 73: 657-704
22. Kim T.H., Kim B.H., Yahalom A., Chamovitz D.A. and von Arnim A.G. (2004). "Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the Arabidopsis translation initiation factor subunit eIF3h". *The Plant Cell* 16: 3341-3356
23. Kim S.J., Kim H.G., Kim B.C., Park E.H. and Lim C.J. (2004). "Transcriptional regulation of glutathione synthetase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Molecules and Cells* 2: 242-248

24. Latchman D.S. (2001). "Transcriptional gene regulation in eukaryotes". Encyclopedia of life sciences Nature www.els.net
25. Lewin B. 2008. Genes IX. Jones & Bartlett Publishers. USA. 152-83p.p
26. Llanderal-Mendoza J. (2003). "Estudios *in vivo* sobre la función de la proteína Psif en la división celular de *Nicotiana tabacum*". Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología UMSNH. Morelia, Michoacán, México, 81 pp.
27. Mathews K C and Van Holde K. (2000). "Bioquímica". 2a Ed. McGraw-Hill. Madrid.
28. Mendoza-Revol A., Martínez-Rodríguez H.G y Barrera Saldaña H.A. (2004). "Control del ciclo celular y sus alteraciones". Medicina Universitaria 6: 33-38
29. Merrick C.W. (2001). "Initiation factors in eukaryotes". Encyclopedia of life sciences Nature www.els.net
30. Morillon A., O'Sullivan J., Azad A., Proudfoot N. and Mellor J. (2003). "Regulation of elongation RNA polymerase II by forkhead transcription factors in yeast". Science
31. Peng Xu, Murthy Karuturi R. K., Miller L. D., Lin K., Jia Y., Kondu P., Wang L., Wong Lim-Soon, Liu E. T., Balasubramanian M. K. and Liu J. (2005). "Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast". Molecular Biology of the Cell 16: 1026–1042.
32. Phan L., Zhang X., Asano K., Anderson J., Vornlocher H. P., Greenberg J. R., Qin J. and Hinnebusch A.G. (1998). "Identification of a translation initiation factor (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals that interacts with eIF5". Molecular and Cellular Biology 18: 4935-4946
33. Pyronnet S., Pradayrol L. and Sonenberg N. (2000). "A cell cycle-dependent ribosome entry site". Molecular cell 5: 607-616
34. Rustici G., Mata J., Kivinen K., Lió P., Penkett C.J., Burns G., Hayles J., Brazma A., Nurse P. and Bähler J. (2004). "Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle". Nature Genetics 36: 809-817
35. Siridechadilok B., Fraser C.S., Hall R.J., Doudna J.A. and Nogales E. (2005). "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis". Science 310: 1513-1515.
36. Shi J., Feng Y., Goulet A.C., Vaillancours R.R., Sach N.A., Hershey J.W.B. and Nelson M. A. (2003). "The p34^{cdc2}-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis". The Journal of Biological Chemistry 278: 5062-5071

37. Shi J., Kahle A., Hershey J.W.B., Honchak B.M., Warneke J.A., Leong S.P.L. and Nelson M.A. (2006). "Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells". *Oncogene* 25: 1–14.
38. Smits A. J. V. and Medema H.R. (2001). "Checking out G2/M transition". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Gene Structure and Expression* 1519: 1-12
39. Sveiczzer A. and Novak B. (2002). "Regularities and irregularities in cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*" *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 49: 289-304
40. Sveiczzer A., Tyson John J. and Novak Bela (2004). "Modelling the fission yeast cell cycle". *Briefings in functional genomics and proteomics* 4: 298–307
41. Tyson J., Csikasz-Nagy Attila and Novak Bela (2002). "The dynamics of cell cycle regulation". *BioEssays* 24: 1095–1109
42. Wood V., Gwilliam R., Rajandream M.-A., Lyne M., Lyne R., Stewart A., Sgouros J., Peat N., Hayles J., Baker S., Basham D., Bowman S., Brooks K., Brown D., Brown S., Chillingworth T., Churcher C., Collins M., Connor R., Cronin A., Davis P., Feltwell T., Fraser A., Gentles S., Goble A., Hamlin N., Harris D., Hidalgo J., Hodgson G., Holroyd S., Hornsby T., Howarth S., Huckle E. J., Hunt S., Jagels K., James K., Jones L., Jones M., Leather S., McDonald S., McLean J., Mooney P., Moule S., Mungall K., Murphy L., Niblett D., Odell C., Oliver K., O'Neil S., Pearson D., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rutherford K., Rutter S., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Skelton J., Simmonds M., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Taylor R. G., Tivey A., Walsh S., Warren T., Whitehead S., Woodward J., Volckaert G., Aert R., Robben J., Grymonprez B., Weltjens I., Vanstreels E., Rieger M., Schafer M., Müller-Auer S., Gabel C., Fuchs M., Fritz C., Holzer E., Moestl D., Hilbert H., Borzym K., Langer I., Beck A., Lehrach H., Reinhardt R., Pohl T. M., Eger P., Zimmermann W., Wedler H., Wambutt R., Purnelle B., Goffeau A., Cadieu E., Dreano S., Gloux S., Lelaure V., Mottier S., Galibert F., Aves S. J., Xiang Z., Hunt C., Moore K., Hurst S. M., Lucas M., Rochet M., Gaillardin C., Tallada V. A., Garzon A., Thode G., Daga R. R., Cruzado L., Jimenez J., Sánchez M., Rey F., Benito J., Domínguez A., Revuelta J. L., Moreno S., Armstrong J., Forsburg S. L., Cerrutti L., Lowe T., McCombie W. R., Paulsen I., Potashkin J., Shpakovski G. V., Ussery D., Barrell B. G. & Nurse P.. (2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*". *Nature* 415: 871-880.
43. Wray G. A., Hahn M. W., Abouheif E., Balhoff J. P., Pizer M., Rockman M. V. and Romano L. A. (2003). "The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes". *Molecular Biology and Evolution* 20: 1377-1419
44. www.mc.vanderbilt.edu/vumcdept/cellbio/gould/images/fig01.jpg
45. www-rcf.usc.edu/~forsburg/main.html

46. Zhou C., Arslan F., Wee S., Krishnan S., Ivanov A.R., Oliva A., Leatherwood J. and Wolf D.A. (2005). "PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes". *BMC Biology* 3:14