



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUIMICO-BIOLÓGICAS**

**“INTERACCION PROTEINA-PROTEINA DE eIF3f
HUMANO”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**OPCION EN:
EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
IB. LIZ ALEIDA URIOSTEGUI ALEJO**

**ASESOR:
D.C. MARCO AURELIO PARDO GALVAN**

MORELIA, MICHOACAN. ABRIL 2010

Quien ha visto la Esperanza, no la olvida. La busca bajo todos los cielos y entre todos los hombres. Y sueña que un día va a encontrarla de nuevo, no sabe dónde, acaso entre los suyos.

El Laberinto de la Soledad

Octavio Paz.

REALIZACIÓN:

El trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

ASESOR:

D. C. MARCO AURELIO PARDO GALVÁN

COMITE TUTORAL:

D. C. ELDA MARIA BELTRAN PEÑA

D. C. JESÚS CAMPOS GARCÍA

D. C. CARLOS CERVANTES VEGA

D. C. SALVADOR MANZO ÁVALOS

*A MIS PADRES:
JULIÁN & ODOCIA*

*A MIS HERMANOS:
PILY & BEBO*

AGRADECIMIENTOS

Al D. C Marco Aurelio Pardo Galván y M. C Ana Edith Higareda Mendoza por las atenciones y lecciones aprendidas, las cuales son enseñanzas de vida.

Al D. C. Jesús Campos García por las facilidades para realizar los experimentos de 2D/SDS-PAGE en su laboratorio y las observaciones que enriquecieron el presente trabajo.

Al D. C. Homero Reyes de la Cruz y D. C. Daniel Godinez Hernández por prestarme su Mini-Tetra PROTEAN Electrophoresis System de Bio-Rad.

A los D. C. Carlos Cervantes Vega y D. C. Salvador Manzo Ávalos por sus críticas constructivas y observaciones que amablemente efectuaron al trabajo aquí presentado.

A las D. C. Elda María Beltrán Peña y D. C. María Elena Mellado Rojas por las aportaciones a este proyecto, regaños y jalones de oreja que me dieron cuando lo necesité (jjiji).

A mis compañeros del IIQB, por las charlas en los pasillos y las palabras de aliento que me brindaron.

A mis compañeros de generación de la Maestría, por el apoyo que nos dimos mientras compartimos cursos.

A los integrantes de los laboratorios de Biotecnología Microbiana, Microbiología y Control Traduccional por los buenos momentos, material que me facilitaron para realizar mis experimentos y horas de esparcimiento que tuvimos.

A mis compañeros del Laboratorio Juan Ca, Ernesto (Pipo), Poncho, Chucho, León, Gerard y Bibiana, por las enseñanzas y los buenos momentos que pasamos en el lab. Sobre todo a Chucho por enseñarme a hacer SDS-PAGE.

A Cecy & Asdrubal por su amistad, consejos y palabras de aliento que me brindaron. Asdrubal, gracias por la paciencia que tuviste al enseñarme a hacer Western Blots!

A mi comadrita Pau y familias (Hernández Soto y Piñón Hernández), gracias por la amistad, los buenos momentos, horas de desahogo, chisme que hemos tenido y ojala que sigamos compartiendo los buenos y malos momentos.

A Janette, Ari, Marthita, Erandi, Iris, Tito, Jecsán, Sarael & Vic gracias por todos estos años de amistad, por todas las cosas que hemos compartido, por alentarme a seguir adelante, escucharme y sobre todo por estar conmigo cuando los necesité, espero que sigamos en contacto no importando la distancia ni a donde nos lleven los diferentes senderos de la vida. Los Quiero Mucho!!!

A mis nuevos amigos: Mau (el Desgra!!!), Ara, César Díaz Pérez Campos de Castro (jjjjj, sorry Cx tenía que escribirlo!), Areli, Luz Ma, Luis Ma, Patty, Alma, los 3 Macuarritos (Beto, José & John), Luis José, Valentín, Denise & Susa por los buenos momentos, por levantarme el animo cuando me sentía desesperada, por las horas de lavadero, parranda, consejos, regaños, críticas no solo hacia mi trabajo sino también para mi persona, he aprendido mucho de ustedes, ojala sigamos en contacto durante muchooooo tiempo. Quiero que sepan que no solo los aprecio por el tipo de ñoños que son sino también los admiró, respeto & Quiero Mucho!!!

A Hans, gracias por acompañarme como compañero de posgrado, amigo y ahora como novio, por tu amor, cariño, amistad, comprensión, por el apoyo que me has brindado desde que nos conocimos y por tolerar todas la veces que he hecho bromas a base de tus costillas. T. A!!!

A Dios por darme la fortaleza para seguir adelante y no darme por vencida.

Por último y no menos importante a mi Familia (Papi, Mami, Pily & Bebo), gracias por acompañarme en esta aventura que emprendimos juntos, por apoyarme no solo financieramente sino en mis momentos más difíciles, por tolerar mi mal humor y frustraciones cuando mis experimentos no me salían les pido PERDON por las veces que los lastimé no era mi intención, va para ustedes quienes son mi motor para seguir adelante y superarme. LOS QUIERO Y ADORO MUCHO.

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 Proteínas y su función	1
	1.2 Interacción proteína-proteína	2
	1.3 Herramientas para el estudio de las interacciones proteína-proteína	2
	1.4 Síntesis de proteínas	6
II	ANTECEDENTES	11
III	JUSTIFICACIÓN	19
IV	HIPÓTESIS	19
V	OBJETIVO	19
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	20
	6.1 Línea celular A549	20
	6.2 Anticuerpo contra eIF3f	20
	6.3 Lisis celular	21
	6.4 Determinación de proteína por el método de Lowry	21
	6.5 Técnicas proteómicas	22
	6.5.1 Inmunoprecipitación	22
	6.5.2 Electroforesis de geles nativos al 8%	22
	6.5.3 Electroforesis de geles desnaturizantes al 10%	23
	6.5.4 Extracción de las proteínas de un gel nativo por el método de difusión pasiva	23
	6.5.5 Entrecruzamiento de proteínas	24
	6.5.6 Electroforesis de geles bidimensionales	24
	6.5.7 Transferencia de proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF)	25
	6.5.8 Inmunodetección	26
	6.5.9 Tinción con azul brillante de Coomassie	26
	6.5.10 Tinción de plata	26
VII	RESULTADOS	28
	7.1 Coimmunoprecipitación de la subunidad f del factor de iniciación eucariótico 3	28

7.2	Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida	29
7.3	Inmunodetección de eIF3f en un gel nativo	30
7.4	Extracción de proteínas de un gel nativo, resolución y detección sobre geles desnaturizantes	31
7.5	Resolución, detección de eIF3f y su(s) interactuantes sobre electroforesis en geles bidimensionales	34
VIII	DISCUSIÓN	38
IX	RESUMEN DE RESULTADOS	42
X	CONCLUSIÓN	42
XI	PERSPECTIVAS	42
XII	ANEXOS	43
	12.1 Estimación del peso molecular en un gel nativo	43
	12.2 Estimación del punto isoeléctrico en geles bidimensionales	44
XIII	LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Ruta de inicio de la traducción en organismos eucariotes	8
2	Perfil de expresión de la proteína eIF3f en la línea celular A549	12
3	Silenciamiento de eIF3f induce apoptosis en la línea celular A549	12
4	eIF3f disminuye la síntesis de las ciclinas B1 y B2	13
5	eIF3f disminuye la traducción de manera dosis-dependiente <i>in vitro</i>	13
6	La expresión ectópica de eIF3f disminuye la síntesis global de proteínas en las células A375	14
7	La proteína eIF3f está disminuida en cáncer de páncreas	15
8	Modelo de interacción dinámica entre eIF3f y mTOR/raptor y S6k1	17
9	Modelo propuesto para la inhibición del sitio de escisión del extremo 3' del mRNA del VIH-1	18
10	Coinmunoprecipitación de eIF3f	28
11	Electroforesis en geles de poliacrilamida nativo al 10 y 8%	29
12	Inmunodetección de los complejos donde participa eIF3f	30
13	Electroforesis de un gel de poliacrilamida desnaturizante bajo condiciones desnaturizantes teñido con una tinción de plata	32
14	Inmunodetección de eIF3f en una mono dimensión desnaturizante	33
15	Tinción de plata de un 2D/SDS-PAGE	34
16	Tinción de plata de proteínas entrecruzadas y resueltas por 2D/SDS-PAGE	35
17	Inmunodetección de eIF3f en un 2D/SDS-PAGE	36
18	Inmunodetección de eIF3f entrecruzado en un 2D/SDS-PAGE	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1	Curva de Calibración para estimar pesos moleculares en un gel nativo	43
2	Curva de Calibración para estimar pI en un 2D/SDS-PAGE	44

ÍNDICE DE TABLAS

1	Subunidades de eIF3f humano	9
2	Análisis de la expresión de eIF3f en tumores	14
3	Registro del corrimiento electroforético contra el logaritmo del peso molecular	43
4	Registro del corrimiento electroforético contra el punto isoeléctrico	44

RESUMEN

eIF3f es una subunidad que forma parte de un complejo proteico que participa en el inicio de la síntesis de proteínas llamado eIF3 (eukaryotic initiation factor 3). La subunidad f tiene un peso molecular aparente en humano de 47 kDa. Se conoce que dicha subunidad es un modulador de la síntesis de proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*. El objetivo del presente trabajo se centró en conocer la presencia de eIF3f en otros complejos multiproteicos, además de eIF3. Mediante inmunodetección con anticuerpo anti-eIF3f en geles nativos, se detectó la presencia de una banda con un peso molecular alrededor de 125 kDa. Se eluyeron las proteínas que se encontraban en dicha banda para discernir sus componentes e identificar a eIF3f con su o sus respectivos interactuantes. En este trabajo, se demostró que durante la fase de crecimiento exponencial de la línea celular humana A549, eIF3f se asocia en un complejo proteico de un peso molecular aproximado de 125 kDa, lo que sugiere que esta subunidad podría estar presente en una asociación proteica diferente a la de eIF3 o estar interactuando con subunidades de eIF3 participando en otros procesos diferentes al del inicio de síntesis de proteínas.

I. INTRODUCCIÓN

Cada célula contiene la información necesaria para hacer un ser vivo completo y único. Sin embargo, no todos los genes son expresados en todas las células. Genes que codifican enzimas esenciales para el funcionamiento celular básico son expresados en todas las células, mientras que aquellas con funciones altamente especializadas son expresadas solo en tipos celulares específicos.

El proteoma es definido como el complemento proteico expresado bajo diferentes circunstancias de un genoma. Es una fotografía instantánea de la expresión proteica en un momento en particular y bajo condiciones específicas. Una descripción comprensiva del proteoma de un organismo no solo provee un catálogo de todas las proteínas codificadas por el genoma sino también datos sobre la expresión proteica bajo condiciones definidas. Los proteomas de las células son extremadamente complejos, comprendiendo miles de proteínas (López, 2006). En conclusión, cada organismo tiene un genoma, pero muchos proteomas.

1.1 Proteínas y su función

El término proteína proviene del griego *proteios*, que significa “lo primero”. El nombre fue propuesto por Jöns J. Berzelius en 1838 (Stryer, 1995). Por definición, una proteína es un polímero de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. La función de una proteína está determinada por su estructura tridimensional, la cual está dictada por su secuencia de aminoácidos (Börnke et al., 2008).

Estas moléculas, no solo son los bloques de construcción que forman a la célula, sino que también ejecutan casi todas las funciones celulares, por ejemplo, las enzimas promueven una gran cantidad de reacciones químicas. Las proteínas embebidas en la membrana plasmática forman canales y bombas que controlan el paso de pequeñas moléculas dentro y fuera de la célula. Otras proteínas llevan mensajes de una célula a otra actuando como integradores de señales que retransmiten un conjunto de señales de la membrana al núcleo. Algunas proteínas sirven como una maquinaria molecular con partes móviles, por ejemplo, las quinesinas que desplazan a los orgánulos a través del citoplasma o las topoisomerasas que pueden desenrollar las moléculas de DNA.

Finalmente, existen también proteínas especializadas que actúan como anticuerpos, toxinas, hormonas, fibras elásticas, etc. (Alberts, 2002).

1.2 Interacción proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína son operativas en la mayoría de los niveles de funcionamiento celular, es decir, conectan la maquinaria de transporte a través de membranas biológicas, el empaquetamiento de la cromatina, las redes de filamentos submembranosos, la contracción muscular, la transducción de señales y la regulación de la expresión génica, por nombrar algunos ejemplos. La pérdida de algunas interacciones proteína-proteína han sido implicada en desórdenes neurológicos tales como el Alzheimer y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Royer, 1999).

Las interacciones proteína-proteína se pueden catalogar en base a los siguientes parámetros:

- i). De acuerdo a su estructura, es decir, si los protómeros que interactúan tienen cadenas similares, son llamadas homo-oligómeros o si los protómeros que presentan la interacción tienen cadenas no idénticas son nombrados hetero-oligómeros.
- ii). En base a su composición, dos diferentes tipos de complejos pueden ser distinguidos en una interacción proteína-proteína, uno de ellos es conocido como complejo obligado, en el cual los protómeros se encuentran como estructuras inestables *in vivo*. El otro tipo es el complejo no obligado, en donde los protómeros pueden existir como unidades independientes y estables (Nooren y Thornton, 2003).
- iii). Pueden ser clasificadas de acuerdo al tiempo de vida. Dentro de esta categoría se dividen en transitorias y permanentes. En las interacciones transitorias, las proteínas pueden existir como unidades independientes o formando parte de un complejo. Mientras que para el caso de las interacciones permanentes, los protómeros solo participan en un complejo (Kleanthous et al., 2000).

1.3 Herramientas para el estudio de las interacciones proteína-proteína

Para el estudio de las interacciones proteicas existen diversos métodos, los cuales se dividen en experimentales y computacionales. Dentro de los experimentales tenemos la coimmunoprecipitación, en el cual un anticuerpo específico es incubado con un

homogenado clarificado o una mezcla de proteínas para formar un complejo entre el anticuerpo con la proteína blanco. Una proteína blanco puede interactuar con una o más proteínas en un complejo. Después de la unión al anticuerpo, el complejo entero puede ser aislado de la mezcla usando la proteína inmovilizadora A o proteína G (proteína A/G). Posteriormente es separado en geles desnaturizantes y detectado por Western blot (Miernyk y Thelen, 2008). Otra técnica experimental que ha sido utilizada para el estudio de las interacciones proteína-proteína es la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida, en donde las proteínas no son separadas de acuerdo a la proporción carga/masa pero sí en función de gradientes de acrilamida, es decir en base al peso molecular de los complejos proteicos o proteínas. La migración de las proteínas gradualmente se desacelera con la distancia de corrida y la disminución del tamaño del poro del gradiente del gel. Proteínas individuales deben detenerse casi completamente cuando se aproximan a su tamaño, el cual es poro específico dependiente (Wittig et al., 2006). Esta técnica se puede acoplar al Western blot o a geles desnaturizantes para obtener una mejor resolución de las proteínas que conforman un complejo proteico. Otra técnica usada para estudiar interacciones proteína-proteína son los ensayos de unión *in vitro*, en donde un dominio proteico recombinado con una marca de afinidad (entre los más usados se tiene etiqueta de Histidinas, proteína Glutathion S-transferasa [GST], la proteína de unión a matorra [MPB] y myc) puede ser incubado *in vitro* con una fracción celular, la cual depende de la localización sub-celular de la proteína blanco, se recupera de la mezcla de reacción usando la marca de afinidad, se lava, se eluye y los compañeros de unión son analizados por una digestión con proteasas acoplado a un espectrómetro de masas. Una separación electroforética podría ser incluida antes del análisis proteómico, pero este paso no es esencial para la identificación de los interactuantes (Miernyk y Thelen, 2008).

El uso de agentes entrecruzadores es una excelente forma de estabilizar las interacciones proteína-proteína *in vivo*. Los entrecruzadores han sido usados en la determinación de las relaciones proteína-proteína, estructuras tridimensionales, inmovilización de fase sólida, conjugación proteína acarreadora-hapteno y en la asociación de proteínas en la membrana celular. El entrecruzamientos de proteínas consiste en la formación de un enlace covalente de dos o más moléculas. Los agentes entrecruzadores contienen extremos reactivos para grupos funcionales específicos (aminas primarias,

grupos sulfhidrilos, etc) para proteínas u otras moléculas. El uso de los entrecruzadores para una aplicación específica se determina de manera empírica, pero se debe de elegir en base a las siguientes características: especificidad química, radio de reacción, solubilidad, permeabilidad a la membrana, que contenga extremos con el mismo grupo reactivo (homobifuncional) o diferente grupo reactivo (heterobifuncional), su divisibilidad y por último, si el agente entrecruzador tiene la capacidad de ser etiquetado con otra marca o ser radiomarcado (Miernyk y Thelen, 2008).

Otra herramienta que nos permite estudiar las relaciones proteína-proteína es la ultra-centrifugación, la cual separa complejos proteicos basado en su tamaño y forma. La sacarosa y el glicerol son los medios usados más comunes. Los gradientes lineales mayores (>20mL) son preparados generalmente usando una bomba peristáltica marcadora de gradiente, mientras que los gradientes lineales menores para sacarosa o glicerol requieren secuencialmente capas de menor concentración seguidas de una difusión pasiva para un tiempo de fijo dependiente del tamaño del gradiente. La linealidad del gradiente debe ser revisada por refractometría. El rango de concentración del gradiente, la fuerza centrífuga y la duración de la centrifugación son parámetros variables en la ultra-centrifugación y generalmente pueden ser obtenidos de la literatura o determinados empíricamente (Miernyk y Thelen, 2008).

La técnica más utilizada para el estudio de las interacciones proteína-proteína es el sistema de doble híbrido de levadura el cual consiste de dos componentes: el dominio de unión al DNA (DBD) de un factor transcripcional (generalmente Gal4 o LexA) fusionado a una proteína "X" a esta recombinación se le conoce como "cebo"; y el dominio de activación de la transcripción (TAD; generalmente Gal4 o B42) fusionado a la proteína "Y", el cual se le conoce como "cazador". Cuando ambas proteínas recombinantes son co-expresadas y localizadas en el núcleo y si la proteína "X" interactúa con la proteína "Y", ellas reconstituirán un factor transcripcional funcional que activará la transcripción de genes marcadores en el núcleo (Lalonde et al., 2008).

Los métodos computacionales buscan las interacciones proteína-proteína en base a: la genómica comparativa, comparación en base a secuencias detalladas y análisis

estructural, correlación de características genómicas de proteínas funcionales. A continuación se describe cada una de las categorías.

Relaciones funcionales proteicas predichas en base a la genómica comparativa.

Existen diversos métodos para predecir relaciones funcionales entre pares interactuantes en base a modelos de ocurrencia y su localización a través de múltiples genomas. El primer método identifica pares de proteínas que son adyacentes a lo largo del cromosoma. Los pares de proteínas están probablemente compartiendo funciones similares si la proximidad cromosómica es conservada a través de múltiples genomas. El segundo método predice interacciones funcionales proteicas en base a modelos de dominios de fusión. Algunas veces dos dominios proteicos existen como proteínas separadas en un genoma, pero ellas están fusionadas en una sola proteína en otro genoma. En tal caso, los dominios probablemente pueden estar funcionalmente relacionados. El tercer método analiza modelos de ocurrencia de proteínas en múltiples genomas. Para cada proteína, un perfil filogenético es construido e indica si la proteína está presente en cada genoma. Desde un punto de vista evolutivo, los pares proteicos con similares perfiles filogenéticos tienden a viajar juntos y son candidatos para una interacción funcional (Xia et al., 2004).

Interacciones proteína-proteína predichas en base de secuencias detalladas y análisis estructural

Dos métodos se basan en la hipótesis que proteínas que interactúan tienden a co-evolucionar. En el primer método, la co-evolución de familias de proteínas interactuantes es medida por similitud de árboles filogenéticos construidos en base a alineamientos de secuencias múltiples de dos familias proteicas. Cuando esta técnica se aplica en escala genómica, los árboles filogenéticos para todas las proteínas pueden ser construidos. Proteínas con similares árboles filogenéticos son más probables que interactúen uno con otro. En el segundo método, la señal co-evolutiva en alineamientos de múltiples secuencias es además analizada en términos de mutaciones correlacionadas: Un par proteico es probable que interactúe si hay una acumulación de mutaciones correlacionadas entre los interactuantes.

Las bases de datos de estructuras tridimensionales ya resueltas para complejos proteicos provee información adicional que puede ser utilizada para la predicción de las interacciones proteína-proteína. En este método, llamado empate multimérico, secuencias de cada par proteico son alineadas a templados de complejos tridimensionales. Los pares proteicos con el mejor puntaje de compatibilidad están probablemente interactuando en una manera similar al templado del complejo tridimensional (Xia et al., 2004).

Correlación de características genómicas de proteínas funcionales como predictores para interacciones proteína-proteína.

Dos proteínas es más probable que interactúen si sus características genómicas son correlacionadas. Los parámetros que se toman en cuenta para correlacionar a un par proteico son los siguientes:

- 🍏 Expresión del RNA mensajero. Las proteínas que interactúan tienden a tener perfiles de expresión correlacionados. La abundancia de la proteína puede ser medida indirectamente por la presencia o ausencia del transcrito correspondiente. Esta correlación es más notoria en proteínas que participan en complejos permanentes y menos evidente para aquellas que forman parte de complejos transitorios.

- 🍏 El fenotipo de mutantes “knockout” puede servir como un indicador de interacciones proteicas, sugiriendo que la delección de una de las proteínas interactuantes puede perturbar la formación del complejo o la funcionalidad del mismo (Xia et al., 2004).

- 🍏 Para formar una interacción, las proteínas deben localizarse en el mismo compartimento celular a la vez. La co-localización sirve como un útil predictor para las interacciones proteicas.

1.4 Síntesis de proteínas

Uno de los procesos celulares que es ejemplo de una red biológica, es la síntesis de proteínas, la cual se efectúa en tres pasos: iniciación, elongación y terminación. La iniciación es la fase en donde se acopla el RNA mensajero (mRNA) y el metionil-tRNA_i (Met-tRNA_i) a la subunidad 40S con ayuda de los factores eucarióticos de iniciación. En la elongación, el aminoacil-tRNA entra en el sitio aceptor (sitio A) donde la decodificación se lleva a cabo. Si el tRNA es afín, el ribosoma cataliza la formación del enlace peptídico.

Después los tRNAs y el mRNA son translocados de tal manera que el siguiente codón es movido al sitio A, el proceso se repite hasta que se lea un codón de paro. La terminación se lleva a cabo cuando un codón de paro es encontrado y el polipéptido es liberado del ribosoma (Kapp et al., 2004).

Dentro de la traducción, la etapa donde se regula la velocidad de síntesis proteica es en el inicio de la síntesis de proteínas, en donde el ribosoma 80S se separa en sus dos componentes, la subunidad 40S y subunidad 60S (figura 1). Para mantenerlos disociados, se requiere de los factores de iniciación eucarióticos (eIF) eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5. Por otro lado se tiene la unión del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2) a una molécula de trifosfato de guanosina (GTP) y al met-tRNA_i formando el complejo ternario (CT). En la siguiente etapa se presenta la unión del CT a la subunidad 40S junto a los eIF's para formar el complejo de pre-iniciación 43S. Por otra parte se debe activar el mRNA con ayuda del factor eIF4F formado por: eIF4A, una helicasa que se encarga de desenrollar el extremo 5' del mRNA; eIF4E, proteína que reconoce al cap m⁷G y eIF4G proteína encargada de anclar el mRNA al complejo de pre-iniciación 43S. El extremo 3' del mRNA se une la proteína de unión a poliadenina (PABP), así el mRNA forma una estructura semicircular. El complejo de pre-iniciación 43S rastrea el mRNA hasta encontrar el codón de inicio; este proceso es estimulado por eIF1, eIF1A y eIF4G, también se requiere a eIF4A así como a su proteína accesoria eIF4B y la hidrólisis de ATP. Durante la búsqueda del codón de inicio, la molécula de GTP unida a eIF2 es hidrolizada a GDP por eIF5. Sin embargo, la liberación del pirofosfato (Pi) del complejo ternario es prevenida por eIF1 hasta que el codón de inicio entre al sitio ribosomal P y reconozca al anticodón del Met-tRNA_i. El reconocimiento del codón de inicio libera a eIF1, habilitando al complejo 48S para asumir una conformación cerrada incompatible con el rastreo e induciendo a la liberación del Pi. La liberación de los factores de iniciación y la unión de la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S es estimulada por eIF5B-GTP (Hinnebusch, 2006).

El reciclaje de eIF2-GDP es llevado a cabo por eIF2B y es inhibido en condiciones de estrés y por la fosforilación de la subunidad α de eIF2 efectuado por las cinasas GCN2, PERK o HRC1; disminuyendo la velocidad de la traducción (Hinnebusch, 2006).

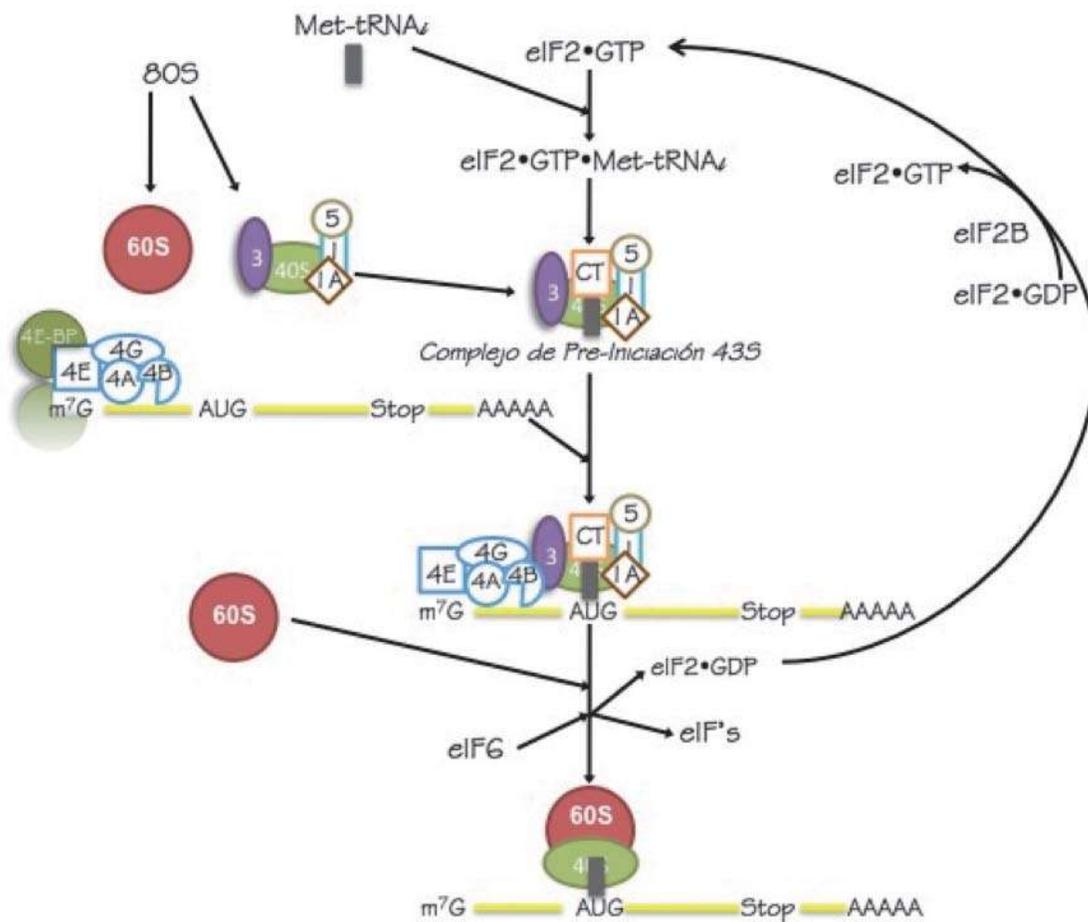


Figura 1. Ruta de inicio de la traducción en organismos eucariotes

Tomado y modificado de Proud y Denton, 1997

Factor eucariótico de inicio de la traducción (eIF3)

Como se menciona anteriormente, uno de los factores que participa en el inicio de la síntesis de proteínas es el factor eucariótico de inicio de la traducción 3 (eIF3). Entre las funciones de eIF3 se encuentra la de impedir que la subunidad 60S se una a la 40S, facilitar la entrada del complejo ternario y unir el mRNA al complejo de pre-iniciación 43S.

eIF3 es un complejo proteico que en mamíferos presenta un peso molecular aproximado de 800 kDa (tabla 1), esta formado por trece subunidades no idénticas, de las cuales, cinco subunidades eIF3a, b, c, g e i han sido reportadas como indispensables para el funcionamiento del eIF3 como factor de inicio de la traducción y a este conjunto de

proteínas se les conoce como el centro catalítico de eIF3 (Browning et al., 2001; Phan et al., 1998), al resto de las subunidades que integran al eIF3 se les ha atribuido la función accesoria o reguladora, por ejemplo, eIF3j en *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido reportado para ser requerido para la unión estable del subcomplejo eIF3*bjj* a la subunidad 40S del ribosoma (Fraser et al., 2004).

Tabla 1. Subunidades de eIF3 en humanos.

Nomenclatura	<i>kDa</i>	Dominio
eIF3a	166.569	PCI
eIF3b	92.492	RRM
eIF3c	105.344	PCI
eIF3d	63.973	-
eIF3e	52.221	PCI
eIF3f	37.564	MPN
eIF3g	35.611	RRM
eIF3h	39.930	MPN
eIF3i	36.502	WD _{repetido}
eIF3j	29.062	-
eIF3k	25.060	PCI
eIF3l	66.727	PCI
eIF3m	42.503	PCI

Tomada y modificada de Zhou et al., 2008

Como se observa en la tabla 1, las subunidades de eIF3 presentan dominios PCI (Proteasome, COP9, Initiation factor 3), MPN (Mpr1/ Pad1 N-terminal), RRM (reconocimiento a RNA) y WD (Tryptófano y Ac. Aspártico), a los cuales se ha propuesto que participan en las interacciones proteicas.

Las subunidades de eIF3 no solo presentan interacciones entre ellas, sino también con los eIF's dentro del inicio de la síntesis de proteínas, por ejemplo en el caso de los

mamíferos, eIF3a interacciona con eIF4B la cual provee un vínculo adicional entre el mRNA y el complejo de pre-iniciación 43S, asegurando que el mRNA sea traducido con alta fidelidad (Methot et al., 1996). eIF3c interactúa con la proteína supresora de tumor Schwannomin (la cual participa en la organización del citoesqueleto), donde Schwannomin regula los niveles de eIF3c durante la proliferación celular (Scoles et al., 2006). No solo las subunidades que forman parte del centro catalítico presentan interacciones proteína-proteína, la subunidad k (la cual es una subunidad accesoria) interacciona con la ciclina D3, en donde se ha observado que se eleva la síntesis de proteínas durante la fase G1 (Shen et al., 2004).

II. ANTECEDENTES

La subunidad f de eIF3 presenta una masa molecular aparente de 47 kDa debido a que muestra un retardamiento en su corrimiento en geles desnaturalizantes debido a la región amino terminal la cual es rica en prolina y alaninas (Asano et al., 1997) pero su peso real obtenido por espectrometría de masas es de 37.554 kDa (Zhou et al., 2008).

Se ha descrito que esta subunidad no forma parte del centro funcional de eIF3 en humano (Asano et al., 1997), pero un reporte reciente hipotetiza que la subunidad f junto con eIF3a, b, c, e y h constituyen el centro funcional del eIF3 en mamíferos (Masutani et al., 2007). Esta información concuerda con lo reportado para *Schizosaccharomyces pombe* en donde eIF3f es indispensable para la síntesis de proteínas (Zhou et al., 2005).

En experimentos realizados en nuestro laboratorio, se evaluó la expresión de la proteína de eIF3f en cultivos sincronizados de células A549 (línea celular humana proveniente de un adenocarcinoma de pulmón). La expresión de la proteína mostró un patrón cíclico, observándose dos picos, uno máximo en mitosis y otro pico en la fase S (figura 2). Lo anterior sugiere que eIF3f posiblemente tiene dos funciones, una relacionada con la síntesis de proteínas y otra con su participación en otros procesos celulares. Dentro de esta línea celular, también se encontró que eIF3f es un gen indispensable para el transcurso de la fase G2 a M, debido a que si se silencia este gen se abren programas de muerte celular (figura 3).

Años atrás no se sabía con certeza cual era la función de eIF3f dentro del inicio de síntesis de proteínas. Farías en el 2002, en experimentos *in vitro*, en un sistema acoplado transcripción-traducción en reticulocitos de conejo, mostró que eIF3f modula de manera negativa la síntesis de proteínas (figura 4), debido a que al agregar eIF3f al sistema se observó que disminuye la síntesis de la ciclina B1 y B2. De manera similar Shi et al. (2006) en la línea celular A375 (línea celular proveniente de melanoma humano), realizaron experimentos *in vitro* en un sistema de traducción de reticulocitos de conejo, en donde encontraron una disminución de la traducciónn dosis dependiente midiendo la actividad de la luciferasa en los grupos donde estaba presente eIF3f (figura 5).

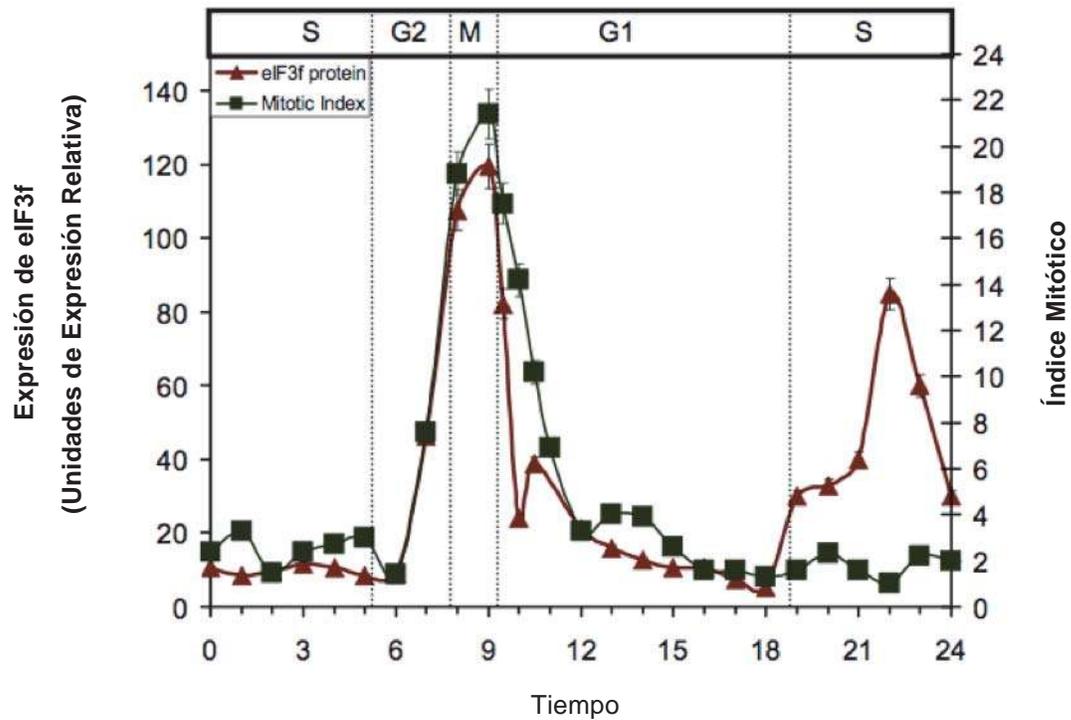


Figura 2. Perfil de expresión de la proteína eIF3f en la línea celular A549. Se muestra el perfil de la proteína de eIF3f, determinado por experimentos de Western blot utilizando anticuerpos de contra eIF3f (Tomado de Higareda-Mendoza 2009).

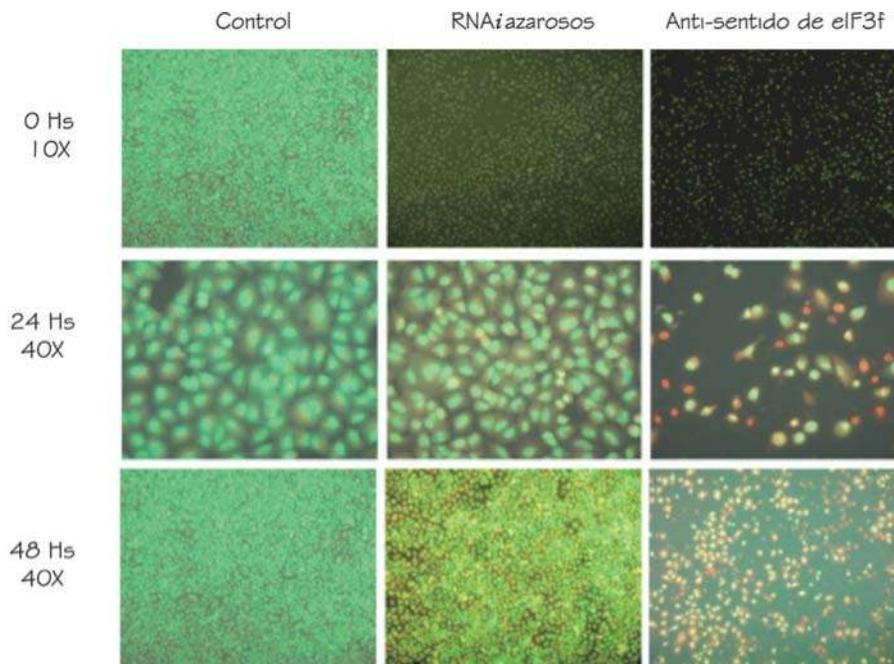


Figura 3. Silenciamiento de eIF3f induce apoptosis en la línea celular A549. Células de la línea A549 fueron transfectadas con un vector que contenía RNAi azarosos como control y el antisentido de eIF3f, se analizaron por medio de una tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio y se observaron en un microscopio de fluorescencia con objetivos de 10 y 40X a las 0, 24 y 48 horas (Mendoza, 2008).

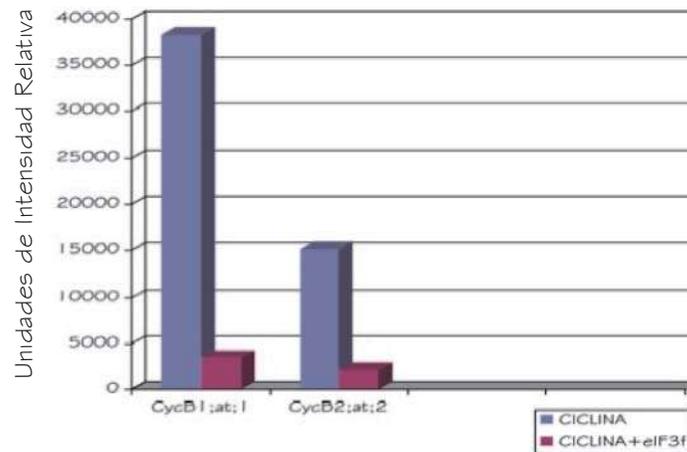


Figura 4. eIF3f disminuye la síntesis de la Ciclina B1 y B2. Los mRNA de la ciclina B1 y B2 fue traducido *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo en ausencia y presencia de eIF3f (Fariás, 2002).

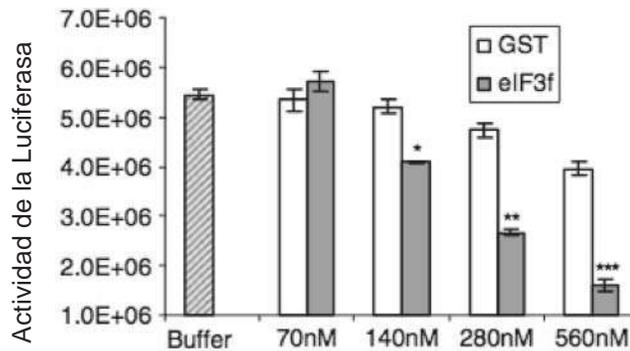


Figura 5. eIF3f disminuye la traducción de manera dosis dependiente *in vitro*. El mRNA de la luciferasa fue traducido *in vitro* en la presencia de glutation S-transferasa (GST) ó eIF3f (Shi et al., 2006).

También en este reporterealizaron experimentos *in vivo*, en donde midieron la incorporación de leucina radiomarcada (^3H), encontraron que la síntesis de proteína global disminuía en el grupo que contenía sobreexpresada a la subunidad f (figura 6). Dichos autores reportaron que la expresión del mRNA de eIF3f en diferentes tumores estaba disminuida en comparación a los tejidos sanos (tabla 2) y que al sobreexpresar eIF3f en las células A375 y BxPc3 (línea celular proveniente de un adenocarcinoma de páncreas),

se encontró que inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis, sugiriendo con ello que eIF3f podría estar regulador el crecimiento y la proliferación celular.

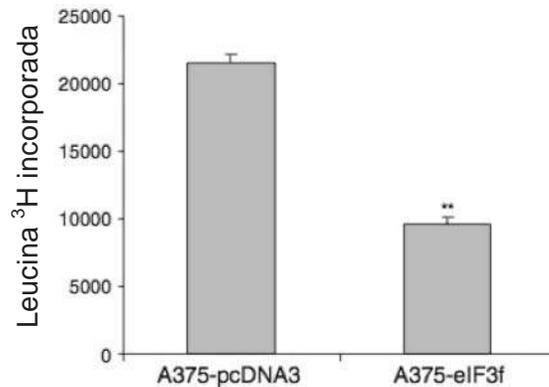


Figura 6. La expresión ectópica de eIF3f disminuye la síntesis global de proteínas en las células A375. Células de la línea A375 fueron transfectadas con pcDNA3 o pcDNA3-eIF3f y fue medida por experimentos de pulso y caza la incorporación de [³H]Leucina *in vivo*, la cual fue cuantificada en microplatos en un contador de centelleo (Shi et al. 2006).

Tabla 2. Análisis de la expresión de eIF3f en tumores humanos

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
Tiroides	60	10
Intestino delgado	80	10
Páncreas	100	7

Tomada y modificada de Shi et al., 2006

Un comportamiento semejante al encontrado por Shi et al., (2006) en líneas celulares fue reportado por Doldan et al., (2008) en donde la expresión proteica de eIF3f **esta disminuida** en el adenocarcinoma de páncreas (figura 7), donde se observa como se va perdiendo eIF3f conforme avanza el cáncer.

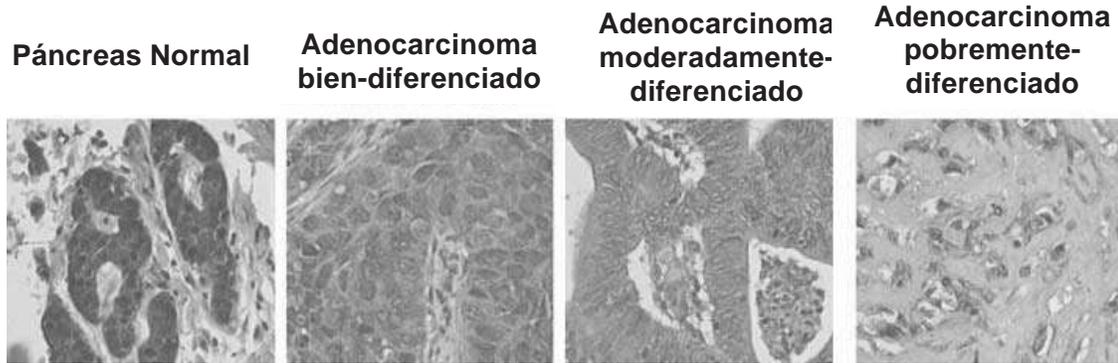


Figura 7. La proteína eIF3f esta disminuida en cáncer de páncreas. Inmunohistoquímica fue realizada a un tejido de cáncer pancreático usando anticuerpo contra eIF3f. Se observa en la fotografía, la comparación del tejido normal contra los diferentes estadios del cáncer de páncreas (Doldan et al., 2008).

Los resultados antes mencionados sugieren que la función de eIF3f dentro del complejo eIF3 es la modulación negativa la síntesis global de proteínas y en ciertos tumores su expresión se encuentra a la baja.

Por otro lado, Damoc et al. (2007), por medio de un análisis de espectrometría de masas encontraron en la estructura primaria de eIF3f un sitio de fosforilación (Ser-258) y un sitio de acetilación (Ala-2), pero también aclaran que se pueden encontrar sitios adicionales de fosforilación en regiones proteicas no cubiertas por el análisis de espectrometría de masas, debido a que se han perdido en el momento de la purificación o por el estado fisiológico de la línea celular.

Estructuralmente eIF3f posee un dominio MPN (Mpr1/ Pad1 N-terminal), que se extiende aproximadamente de la arginina 90 a la isoleucina 248 (Asano et al., 1997; Hernández-Soto, 2005; Shi et al., 2006 y Langirand-Cantaloube et al., 2008). La función sugerida para dicho dominio es que participa en la interacción proteína-proteína y está implicado en el inicio de la síntesis de proteínas, regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind y Ponting, 1998). Un ejemplo de la interacción antes mencionada, es en las células C2C12 (línea celular de mioblastos provenientes de ratón), la ubiquitin 3

ligasa Atrogin 1/MAFbx que contiene un dominio rico en residuos de leucina cargados (LCD), interacciona con el dominio MPN presente en eIF3f (Langirand-Cantaloube et al., 2008). Otra interacción reportada para eIF3f, es la que lleva a cabo con el extremo amino terminal de la proteína denominada espiga (Spike) presente en el síndrome respiratorio agudo severo provocado por coronavirus (SARS-CoV) y del coronavirus de la bronquitis infecciosa (IBV) (Xiao et al., 2008), donde los autores observan que esta interacción conduce a la inhibición de síntesis de proteínas global.

Por otra parte, Holz et al. (2005) y Harris et al. (2006) reportaron en las línea celular HEK293E (línea celular embrionaria proveniente de riñón humano-EBNA). En condiciones basales eIF3f interacciona con S6K1, cuando se censan nutrientes y factores de crecimiento, la cinasa mTOR fosforila a S6K1 liberándola de la interacción, ocupando mTOR su lugar y lo acerca para fosforilar a su segundo blanco, la proteína de unión al factor eIF4E (4E-BP1). La interacción de mTOR y S6K1 con eIF3f es dinámica y sensible a la falta de nutrientes, estimulación de insulina y/o tratamiento con rapamicina (figura 8). Csibi et al. (2010) confirman en células de músculo de ratón bajo condiciones de atrofia, la interacción entre eIF3f y la forma hipofosforilada de S6K1, además determinaron que esta interacción se lleva a cabo través del dominio MPN de eIF3f; S6K1 al ser fosforilada por mTOR promueve su disociación de eIF3f. Mientras que para el caso de la interacción entre eIF3f con mTOR, los autores determinan que el dominio que participa en dicha interacción es el extremo carboxilo de eIF3f (261-357). Dentro del dominio carboxilo de eIF3f, encontraron una secuencia consenso de cinco aminoácidos (323-327), FETML (Phe, Glu, Thr, Met, Leu) que es un dominio evolutivamente conservado y coincide con otros dominios TOS (TOR Signaling) que han sido mostrados para funcionar en respuesta a sus respectivas proteínas. Los autores sugieren que el extremo carboxilo de eIF3f que puede tener una propiedad crítica para la regulación y contribuye a un mecanismo de modulación fina que juega un papel importante para la función de eIF3f en el musculo esquelético.

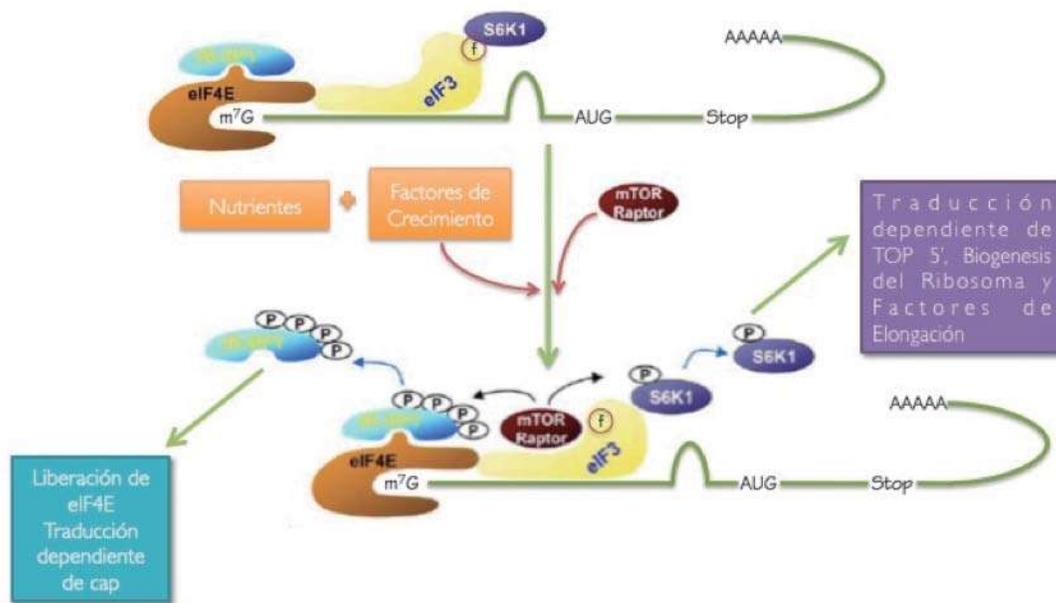


Figura 8. Modelo de la interacción dinámica entre eIF3 y mTOR/raptor, S6K1. Bajo condiciones basales S6K1 se une a eIF3f. Por estimulación de mitógenos, nutrientes, un complejo activo esta formado, el cual recluta a mTOR/raptor y fosforila a S6K1 y 4E-BP1, la fosforilación de S6K1 conduce a su disociación de eIF3 (Modificado de Holz et al., 2006).

En células de la línea A375, Shi et al. (2009) reportaron que eIF3f interacciona por medio de su dominio MPN con la isoforma p46 de la ciclina dependiente de cinasa 11 (CDK11^{p46}). Además CDK11^{p46} fosforila a eIF3f en dos sitios, la Ser 46 y Thr 119 durante la apoptosis. eIF3f al ser fosforilado en estos dos aminoácidos durante la apoptosis tiene una mayor afinidad por las subunidades eIF3b y eIF3c y observaron una disminución de la síntesis global de proteínas.

En las células HEK293, Lee et al. (2010) reportaron la interacción *in vitro* entre eIF3f, eIF3h y la ubiquitin 3 ligasa residente de reticulo endoplásmico TRC8, observaron que estas subunidades (eIF3f y eIF3h) pueden ser blanco para ser ubiquitinadas por TRC8, debido a que al transfectar con una etiqueta de ubiquitina e inmunoprecipitar con TRC8 a las subunidades de eIF3, encuentran productos marcados con ubiquitina de alto peso molecular. Además analizaron por medio de gradientes de sacarosa si había alguna relación entre la ubiquitinación a través de TRC8 a las subunidades de eIF3 y encontraron que al sobreexpresar TRC8 había una disminución en el perfil de polisomas así como una

disminución en la síntesis de proteínas, a lo que atribuyen que al existir una acumulación de TRC8 ejecuta un efecto supresor sobre la síntesis de proteínas transmembranales del retículo endoplásmico.

Por otra parte, Valente et al. (2009) reportaron que la sobreexpresión de eIF3f o su amino terminal (hasta el aminoácido 91), bloquea la replicación del virus del VIH-1 en su extremo 3'. El mecanismo por el cual eIF3f inhibe el procesamiento del extremo 3' del mRNA del VIH-1 fue sugerido por la observación de que eIF3f interacciona tanto *in vivo* como *in vitro* con CDK11 y que CDK11 a su vez interacciona directamente con 9G8 (proteína que pertenece a la familia SR (proteínas ricas en Ser/Arg) la cual agrupa a factores de empalme (splicing)). La proteína 9G8 interacciona con proteínas que participan en el empalme alternativo y en el procesamiento del extremo 3' del mRNA. Debido a que el virus del VIH-1 contiene una secuencia consenso en el extremo 3' para 9G8 esta beneficiaría al procesamiento del mRNA del VIH-1. Al existir una expresión alta inapropiada de eIF3f, interaccionará directamente con 9G8, bloqueando sus interacciones con las proteínas que participan en el procesamiento del extremo 3' del mRNA del virus del VIH-1 (Figura 9).

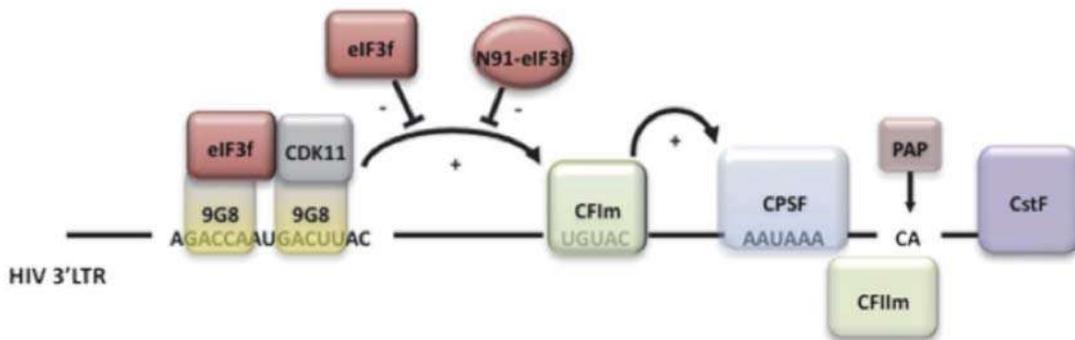


Figura 9 Modelo propuesto para la inhibición del sitio de escisión del extremo 3' del mRNA del VIH-1 (Valente et al. 2009),

Cabe mencionar que este es el primer reporte que indica una interacción proteína-proteína de eIF3f independiente del inicio de síntesis de proteínas, lo que nos da la pauta para buscar nuevas interacciones proteicas diferentes a las que tiene asignada en el complejo eIF3.

III. JUSTIFICACIÓN

Las posibles interacciones proteicas que presentará eIF3f en la línea celular A549 permitirá en un futuro inferir su participación en diferentes procesos celulares además del inicio de síntesis de proteínas.

IV. HIPÓTESIS

En la línea celular humana A549, eIF3f presenta interacciones proteicas diferentes a las descritas en el inicio de síntesis de proteínas.

V. OBJETIVO

Analizar las interacciones proteína-proteína de eIF3f humano en la línea celular A549.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Línea Celular A549

La línea celular que se utilizó fue A549, la cual proviene de un carcinoma de pulmón, su nivel de bioseguridad es uno y fue donada por el laboratorio de Virus Respiratorios del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). Creció de manera adherente a 37°C con una atmósfera al 8% de CO₂, presentando una morfología epitelial y su tiempo de duplicación fue de 22 horas.

Las células A549 crecen en el Medio Esencial Mínimo (MEM) complementado con: carbonato de sodio (NaHCO₃) 30 mM, L-glutamina 4 mM, Hepes 10 mM, suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos penicilina y estreptomina a 100 unidades/L y 0.1 mg/L respectivamente (MEM 100%). El medio se esterilizó por filtración previo a la adición del suero fetal bovino a 350-650 mbares sobre una membrana de acetato de celulosa con poros de 0.22µm.

La resiembra de la línea celular A549 se realizó cada tercer día, cuando se alcanzaba una confluencia aproximada de 1.8×10^6 células/mL y se efectuó de la siguiente manera: se decantó el medio y se lavo 2 veces con de buffer de fosfatos salinos (PBS) 1X estéril frío. Se adicionaron y dispersaron 0.5 mL de una solución tripsina-EDTA 1X por cada 25 cm² y se incubó a 37°C por 2 min. para desprender las células. Se adicionó MEM al 100% y homogenizó por pipeteo suave. Se determinó la cantidad de células viables y se resembró en frascos T-25 o 75 cm² diluyendo en MEM 100% precalentado para obtener una concentración final de 0.6×10^6 células viables/mL. Se incubó a 37°C y a una atmósfera de 5-8% de CO₂, aflojando las tapas de los frascos para permitir la oxigenación/aireación.

6.2 Anticuerpo contra eIF3f

En el laboratorio se cuenta con el anticuerpo policlonal anti-eIF3f, diseñado por la compañía IMGENEX contra la región que abarca del aminoácido 310 al 325 (subrayado), la cual fue elegida porque tenía mayor antigenicidad dentro de la región del carboxilo terminal de eIF3f.

1 MATPAVPVSA PPATPTPVPA AAPASVPAPT PAPAAAPVPA AAPASSSDPA AAAAATAAPG
 61 QTPASAQAPA QTPAPALPGP ALPGPFPGGR VVRLHPVILA SIVDSYERRN EGAARVIGTL
 121 LGTVDKHSVE VTNCFVPHN ESEDEVAVDM EFAKNMYELH KKVSPNELIL GWYATGHDIT
 181 EHSVLIHEY Y SREAPNPIHL TVDTSLQNGR MSIKAYVSTL MGVPGRMTMGV MFTPLTVKYA
 241 YYDTERIGVD LIMKTCFSPN RVIGLSSDLQ QVGGASARIQ DALSTVLQYA EDVLSGKVSA
 301 DNTVGRFLMS LVNQVPKIVP DDFETMLNSN INDLLMVTYL ANLTQSQIAL NEKLVNL

También se cuenta con el anticuerpo policlonal comercial adquirido a la compañía Biologend (638202). Este anticuerpo está diseñado contra toda la proteína de eIF3f, cabe señalar que los experimentos de co-inmunoprecipitación se realizaron con el primer anticuerpo mencionado, los demás experimentos fueron procesados con el segundo anticuerpo.

6.3 Lisis celular

Las células de la línea A549 que se utilizaron fueron colectadas cuando se encontraban en la fase exponencial. Para lissarlas se centrifugaron a 1000 rpm, 4°C durante 7 minutos (min.), se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 7.5mL de PBS, los cuales se resuspendieron con suavidad por pipeteo. Posteriormente se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 7 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se suspendió en 200 µL de buffer E (de extracción) (NaCl 150 mM, Sacarosa al 10%, Tritón X-100 al 0.5%) el cual debe estar frío. Se pipeteó de manera moderada hasta que se observó que el buffer estaba turbio, se centrifugó la muestra a máxima velocidad (14000 rpm), 4°C por 10 min., se cambió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se guardó a -80°C.

6.4 Determinación de proteína por el método de Lowry

Se prepararon tres soluciones, A [carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 3% disuelto en hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 M], B [citrate de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)] al 4% y C [sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 2%]. Se realizó una mezcla con una proporción 48:1:1 de acuerdo al orden indicado respectivamente a la que llamaremos solución D. En un total de 13 microtubos estériles se agregaron los siguientes volúmenes de albúmina de suero bovino (ASB): 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µL tomando en cuenta

que el ASB se encuentra a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A cada uno de los tubos se le añade la solución D en el volumen necesario para complementar 1 mL. Se agitan en el vórtex y se incuban durante 10 min., y posteriormente se le añaden 50 μL del reactivo de Folin, se agitan nuevamente y se incuban durante 25 min., a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se tomó la lectura en el espectrofotómetro a 640 nm. Las muestras que se cuantificaron por este método, se prepararon de la siguiente forma: 5 μL de extracto proteico o de proteínas extraídas de la matriz del gel de poliacrilamida más 995 μL de la solución D, después de la incubación señalada se le agrega 50 μL del reactivo de Folin, se incuba por el tiempo ya mencionado y se lee en el espectrofotómetro a 640 nm.

6.5 Técnicas proteómicas

6.5.1 Inmunoprecipitación

Después de lisar las células, se incubó 500 μL de lisado celular con 5 μL de anticuerpo contra eIF3f durante toda la noche, a 4°C con agitación suave. Se añadió 50 μL de la proteína A sefarosa y se incubó por 360 min., 4°C y agitación vigorosa. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 2 min., se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM y Tritón X-100 al 1%). Se repitieron los pasos desde la centrifugación de 14000 rpm tres veces. A la muestra se le adicionó 25 μL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; SDS al 2%; glicerol al 10%; β -mercaptoetanol al 1%; EDTA 12.5 mM y azul de bromofenol al 0.02%) y se calentó en baño maría durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min., a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo y se guardó a 4°C para realizarle una electroforesis en geles desnaturalizantes.

6.5.2 Electroforesis de geles nativos al 8%

Para elaborar un gel nativo al 8% se ensamblaron las placas de vidrio, seguido se preparó el gel de la siguiente forma:

a). Gel separador al 8%

En un tubo Falcón se agregó 2.3 mL de H₂O tridestilada, 1.3 mL de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1.3 mL de Tris 1.5 M, pH 8.8; 50 μL de persulfato de

amonio (APS) al 10% y 3 μL de N,N,N,N-Tetrametil-Etilendiamino (TEMED). Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en las placas de vidrio y se esperó a que polimerice (aproximadamente 30 min).

b). Gel concentrador al 5%

En un tubo Falcón se adicionó 1.4 mL de H_2O tridestilada, 330 μL de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 250 μL de Tris 1M, pH 6.8; 20 μL de APS al 10% y 2 μL de TEMED. Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en las placas de vidrio, se puso el peine de teflón y se esperó a que polimerice (aproximadamente 30 min).

Después de que polimerizó el gel, se armó y llenó la cámara de electroforesis con el buffer de corrida Tris-Glicina (Gly) (Gly 192 mM y Tris 25 mM), se cargó el gel con 100 μg de proteínas en cada carril, se conectó la cámara a la fuente de poder y se programa para a 100 V, se dejó correr durante 210 min., a 4°C. Después de que se corrió el gel por el tiempo indicado se apagó la fuente de poder, se desensambló la cámara y se removió el gel.

6.5.3 Electroforesis de geles desnaturalizantes al 10%

El gel desnaturalizante al 10% se preparó de la misma manera que el gel nativo solamente se agregó dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, a el gel separador 50 μL y a su concentrador 20 μL , además de que el buffer de corrida Tris-Gly se le agregó 0.5% de SDS. Estos geles se cargaron con 30 μg de proteínas en cada carril. Se conectó la cámara a la fuente de poder y dejó correr durante 120 min., a 100 V. Después de que se corrió el gel por el tiempo indicado se apagó la fuente de poder, se desensambló la cámara y se removió el gel.

6.5.4 Extracción de las proteínas de un gel nativo por el método de difusión pasiva

Se cortó y maceró la banda de interés dentro de un microtubo, se le agregó 1 mL de H_2O tridestilada estéril, se selló con parafilm y se puso a agitar en una placa rotatoria durante toda la noche a 4°C. Después, se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 min., se tomó el sobrenadante y se concentró en Amicones hasta obtener un volumen aproximado de 50 μL en la parte superior del Amicón, donde se midió la concentración de proteína por el

método de Lowry. Las proteínas purificadas se guardaron con 10% de glicerol y a -80°C para su posterior uso.

6.5.5 Entrecruzamiento de proteínas

A la muestra proteica se le agregó PBS 1 M en una proporción 1:1 (v/v) para formar lo que se conoce como el buffer de reacción. Después al buffer de reacción se le añadió ditiosuccimidil propionato (DSP 25 mM) para obtener una concentración final de 5 mM. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min., posteriormente se agregó la solución de paro (Tris 1 M, pH 7.5) para llegar a una concentración final de 30 mM y se incubó por 15 minutos. Las proteínas entrecruzadas se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Para eliminar el agente entrecruzador, a la muestra entrecruzada se le agrega buffer de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; SDS al 2%; glicerol al 10%; β -mercaptoetanol al 1%; EDTA 12.5 mM y azul de bromofenol al 0.02%) y se calienta en baño maría por 5 min.

6.5.6 Electroforesis de geles bidimensionales

El protocolo que se siguió para realizar esta técnica fue el descrito por O'Farrell. (1973), el cual a continuación se describe.

En tubos capilares de 14x0.2 cm, cubiertos por uno de los extremos con parafilm, se llenaron con una mezcla a un volumen final de 5 mL repartida entre los capilares hasta una altura aproximada de 11 cm. Esta mezcla contiene 900 μL de acrilamida-bisacrilamida al 30% (acrilamida 28.38%, bisacrilamida 1.62%), 2.75 g de urea (9 M), 100 μL Nonidet P40 (NP-40), 100 μL anfolitas pH 3.5-10 (Bio-rad), 100 μL de anfolitas pH 6-8 (Bio-rad), 10 μL APS al 10%, 5 μL TEMED y los capilares se aforan con H_2O desionizada. Una vez polimerizado el gel, se retiró el parafilm, se eliminó el H_2O de los tubos y se montaron en el equipo de electroforesis (Hoefer). Se agregaron 20 μL de buffer de lisis [urea 9.5 M, NP-40 al 2% (v/v), anfolitas al 2% (pH 3.5-10 al 1%; pH 6-8 al 1%) y β -mercaptoetanol al 5% (v/v)] y 20 μL de buffer K [urea 6 M y anfolitas al 2% (pH 3.5-10 al 1%; pH 6-8 al 1%)] en la parte superior de los tubos y el resto se llenó con buffer ánodo (NaOH 0.02 M). Se adicionó buffer del cátodo (H_3PO_4 0.01 M) en la parte inferior del equipo de electroforesis

capilar (hasta cubrir aproximadamente 1 cm de la parte inferior de los tubos capilares) y buffer del ánodo a la bandeja superior del equipo hasta cubrir completamente la parte superior de los capilares, tratando de evitar que se formen burbujas en ambos extremos de los capilares. El equipo se conectó a la fuente de poder y se hizo una pre-corrída a 200 V por 30 min.; 300V durante 30 min., y finalmente 400 V por 60 min., con la finalidad de que se formará el gradiente en los capilares. Al finalizar la pre-corrída, se retiró el buffer del ánodo, sin desmontar el equipo, se lavaron los capilares 3 veces con H₂O desionizada.

La muestra se le agregó 500 µL de acetona para precipitar las proteínas, la cual se incubó por lo menos 120 min. a -20°C, se centrifugó a 13 200 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y los residuos de acetona se volatilizaron durante aproximadamente 10 min., después se homogenizó la pastilla con 20 µL de buffer de lisis, al homogenizado se le agregó 20 µL de marcador de punto isoeléctrico más 30 µL de buffer K y buffer del ánodo hasta llenar los capilares. El equipo de electroforesis se conectó nuevamente a la fuente de poder y se corrió a 400 V durante 1200 min. (20hrs.), tiempo transcurrido, se desmontó el equipo de electroforesis, los geles se retiraron de los capilares y se colocaron en tubos de ensayo con 5 mL de buffer de equilibrio (buffer O) [Tris 0.06 M, pH 6.5; SDS al 2% (w/v), β-mercaptoetanol al 5% (v/v) y glicerol al 10% (v/v)], se almacenaron por lo menos 2 horas a -20°C. Las proteínas separadas por enfoque isoeléctrico se resolvieron por SDS-PAGE al 12%, el cual se elaboró como ya mencionó.

6.5.7 Transferencia de proteínas a una membrana polifluoruro de vinildieno (PVDF)

El gel antes de transferirlo a una membrana de PVDF, se lavó con buffer de transferencia Towbin [Tris 25 mM, Gly 192 mM y metanol (CH₃OH) al 20%, pH 8.3] en una placa orbital, 2 veces durante 5 min. La membrana de PVDF después de ser polarizada en CH₃OH por 20 seg., se sumergió en el buffer Towbin. Para hacer el sándwich, se cortaron 12 rectángulos de papel Whatman No. 3MM, los cuales fueron humedecidos con el buffer Towbin. Entre cada rectángulo se niveló con una pipeta Pasteur para eliminar las burbujas de aire. La transferencia se llevo a cabo por 60 min., a 20 V en una cámara de transferencia “semi-seca” de Bio-rad. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, la membrana con las proteínas trasferidas se tiñó con una solución de rojo de Ponceau para visualizarlas, se hicieron varios lavados con buffer Tris salino 1X (TBS) con agitación

vigorosa hasta que se eliminó el colorante. Después se almacenó la membrana en TBS 1X a 4°C para su uso posterior.

6.5.8 Inmunodetección

La membrana con las proteínas se incubó con la solución de bloqueo [leche en polvo sin grasa al 5% (w/v), Tween 20 al 0.05%, disuelto en TBS 1X], esto debe cubrir en su totalidad a la membrana, la incubación duró 150 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se incubó con el primer anticuerpo específico contra eIF3f, a una dilución que fue 1:1000, durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Después se hicieron 5 lavados de 7 min., cada uno con TBS-Tween20[®] (TBS más 0.1% de Tween 20) con agitación vigorosa. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo), a una dilución de 1:10,000 por 60 min., a temperatura ambiente con agitación suave, se realizaron 4 lavados de 6 min., cada uno con TBS-Tween 20 con agitación vigorosa. Se prepararon 200 µL de solución de detección del kit Amersham ECL Plus (RPN2132), mezclando 195 µL de A con 5 µL de B, esta solución cubrió la parte frontal de la membrana, se incubó por 5 min., se eliminó el exceso, se expuso en el cassette durante 5 min con la radiografía del tamaño de la membrana, se incubó 5 min. Después se sacó la radiografía del cassette, se colocó en la solución reveladora aproximadamente 60 seg. o hasta que se vieran bandas con ayuda de la lámpara de luz roja, después se enjuagó con H₂O para finalmente incubar la radiografía en la solución fijadora por 3 min. La radiografía se volvió a enjuagar y se dejó secar.

6.5.9 Tinción con azul brillante de Coomassie

El gel se sumergió en un volumen que cubra el gel de azul brillante Coomassie, se incubó toda la noche y al otro día se hicieron cuatro lavados cada media hora con la solución para desteñir (CH₃OH grado industrial al 30%, ácido acético glacial grado industrial al 10% y H₂O destilada 60%).

6.5.10 Tinción de plata

La tinción de plata depende de la reducción desigual de los iones de plata que se unen a las cadenas polipeptídicas. Se hicieron cinco lavados de 30 min., con H₂O

desionizada (para geles bidimensionales), con agitación suave (con la finalidad de eliminar las anfolitas y evitar falsos positivos). Se fijaron las proteínas durante 15 min., con la solución fijadora [CH₃OH al 40%, 60% H₂O desionizada al 60% y Formaldehído (37%) al 0.05%]. Se realizaron dos lavados con H₂O desionizada de 5 min. Se incubó durante 1 min. con la solución de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) 50X (1g de Na₂S₂O₃ disuelto en 100 mL de H₂O desionizada). Se efectuaron dos lavados con H₂O desionizada durante 20 seg. Se incubó por 15 min. con nitrato de plata (AgNO₃) al 0.1%. Se hizo un lavado de un minuto con H₂O desionizada. Se agregó la solución reveladora (12 mL de carbonato de sodio al 25%, 1 mL de Na₂S₂O₃ 100X [2 g de Na₂S₂O₃ disuelto 100mL de H₂O deisonizada], formaldehído (37%) al 0.045%, aforar a 100mL con H₂O desionizada); Se dejó la solución reveladora hasta que aparezcan las manchas (spots). La reacción se detuvo añadiendo una solución de ácido acético glacial grado analítico al 1%.

Nota: los reactivos se preparan frescos y la solución de AgNO₃ se mantuvo a 4°C.

VII. RESULTADOS

7.1. Coimmunoprecipitación de la subunidad f del factor de iniciación eucariótico 3.

El objetivo del presente trabajo fue investigar las interacciones proteína-proteína de la subunidad f del factor de iniciación eucariótico 3. La herramienta que empleamos para lograr nuestro objetivo fue la coimmunoprecipitación; partiendo de un extracto total proteico de la línea celular A549, se coimmunoprecipitó una fracción de la muestra con anticuerpo contra eIF3f (figura 10, carril 4) y otra fracción con suero pre-inmune como control (figura 10, carril 2). Las muestras se resolvieron en un gel desnaturalizante, posteriormente se inmunodetectaron con anticuerpo específico para eIF3f. En la autorradiografía (figura 10) podemos observar en los carriles 1 y 3 del extracto total de las células A549, la banda correspondiente a eIF3f, mientras que en el carril 3 no la inmunodetectamos. En el carril 4 se observa que no se inmunoprecipitó suficiente cantidad de eIF3f, debido a que el anticuerpo contra eIF3f no fue capaz de inmunoprecipitar la proteína del extracto total, así que proseguimos a plantearnos una nueva estrategia experimental que nos permitiera cumplir con nuestro objetivo.

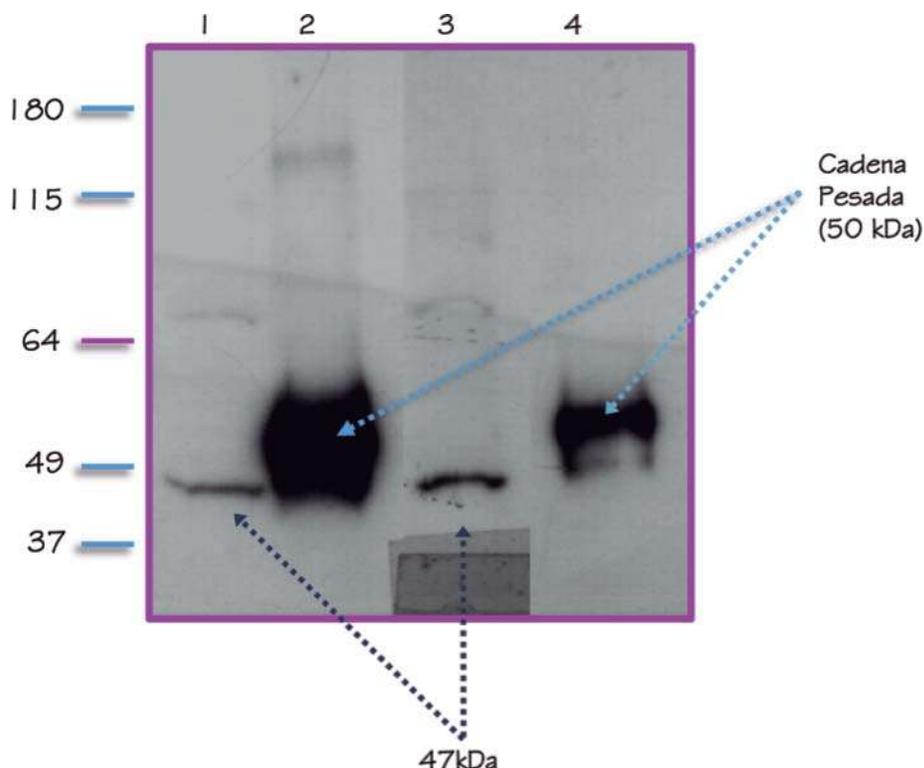


Figura 10. Coimmunoprecipitación de eIF3f. Extractos de la línea celular A-549 fueron coimmunoprecipitados usando anti-eIF3f (carril 4) y suero pre-inmune (carril 2). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot usando el anticuerpo específico para eIF3f. Los carriles 1 y 3 corresponde a extractos totales.

7.2 Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida

Como primer paso de esta nueva estrategia experimental, la técnica que se empleó fue la de los geles nativos, la cual permite preservar las interacciones proteína-proteína presentes en la célula. Los extractos celulares provenientes de la línea celular A-549 fueron resueltos en geles nativos al 10 y 8%, se emplearon estos dos tamaños de poro para determinar cuál era el más adecuado para resolver los complejos proteicos con una mayor calidad en las células A549.

Se puede apreciar en los geles al 10 y 8% (figura 11, panel A y B respectivamente); que en el gel al 10% se observa una mayor cantidad de proteína en la entrada del gel, respecto al gel al 8%. Otro parámetro que se tomó en cuenta fue la cantidad de bandas definidas a lo largo de cada gel. Respecto a este último parámetro para la selección del tamaño de poro del gel en el gel al 10% se visualizaron menos bandas que al 8%.

Tomando en cuenta ambos parámetros, se decidió realizar los siguientes experimentos en geles al 8% debido a que presentan una mayor separación de las bandas proteicas y una menor cantidad de proteína en la entrada del gel.

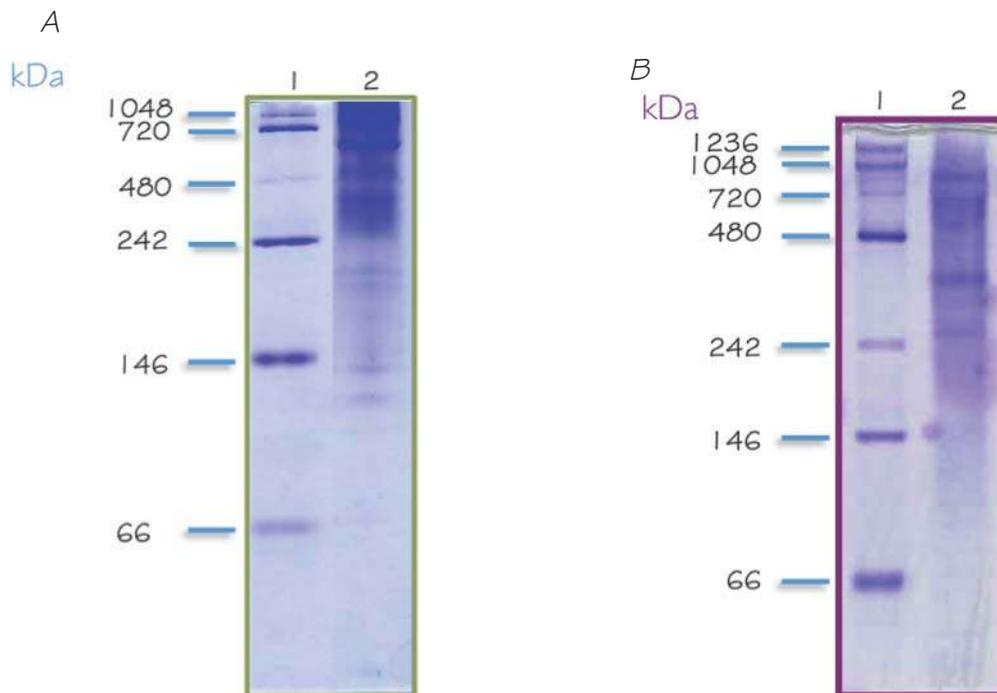


Figura 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida nativo al 10 y 8%. Las proteínas provenientes de las células de la línea A-549 fueron corridas en un gel no desnaturizante. Panel A, proteínas resueltas al 10%; carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 extracto total (30 µg), posteriormente se le practico una tinción con azul brillante de Coomassie. Panel B, el gel al 8% se corrió bajo las mismas condiciones y en el mismo orden, solamente cambio el tamaño de poro.

7.3 Inmunodetección de eIF3f en un gel nativo

Posteriormente, las proteínas separadas de un gel nativo fueron transferidas a una membrana de PVDF, a la cual se le realizó una inmunodetección con anticuerpo específico para eIF3f, donde se esperaba detectar bandas de alto peso molecular, lo que nos indicaría posibles complejos proteicos donde participará eIF3f. Como se observa en la figura 12, el anticuerpo detectó de manera consistentemente únicamente una banda. Así que se efectuó la estimación del peso molecular por medio de una ecuación obtenida a partir de una curva de calibración de peso molecular. Dicha curva fue elaborada en base a marcadores de peso molecular para geles nativos, los cuales al ser resueltos bajo las mismas condiciones dieron patrones de corrimiento muy similares (anexo 12.1).

El peso molecular que resultó de la estimación fue de 125 kDa, el cual fue persistente durante las diez replicas del experimento. Lo anterior sugiere la presencia constante de eIF3f en el complejo proteico, el cual puede estar formado por subunidades de eIF3 o proteínas ajenas a dicho complejo.

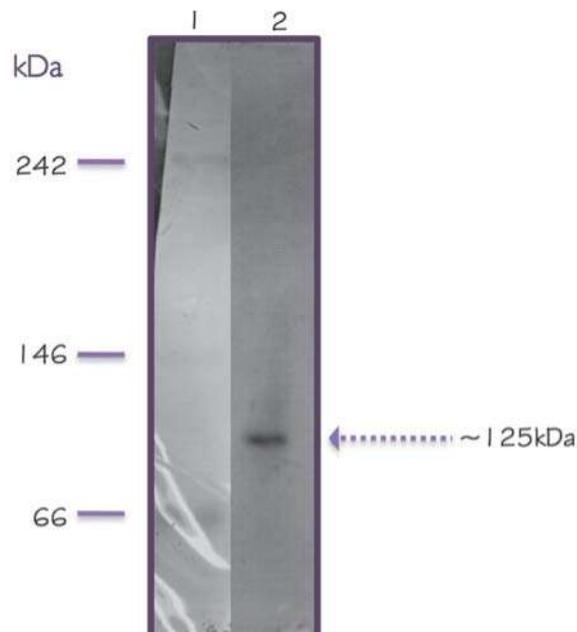


Figura 12. Inmunodetección de los complejos donde participa eIF3f. Un extracto proteico (30 μ g) fue resuelto en un gel nativo al 8% (carril 2), posteriormente se analizó por Western blot usando anticuerpo contra eIF3f. El peso molecular aproximado de la banda detectada se muestra en el carril 1 de la autorradiografía.

7.4 Extracción de las proteínas de un gel nativo, resolución y detección sobre geles desnaturalizantes

Después de inmunodetectar consistentemente la banda de 125 kDa, el siguiente paso consistió en extraer las proteínas que se encontraban en dicha banda. El método que se empleó fue el reportado por Witting et al., 2006, el cual consiste en aislar las proteínas por difusión pasiva (materiales y métodos). Este procedimiento no solamente sirve para extraer las proteínas de la matriz del gel de poliacrilamida, sino que también puede acoplarse a otras técnicas, como el mantenimiento de las uniones de las interacciones proteicas por medio de un agente entrecruzador o para inyectarlas directamente a un espectrómetro de masas por citar algunas herramientas en el estudio de las interacciones proteína-proteína.

Después de eluir las proteínas del gel, la muestra fue dividida en dos fracciones, una fue tratada con el agente entrecruzador DSP [Ditio-bis(succimidil propionato)], con la finalidad de preservar las interacciones proteicas, mientras que la otra fracción no se entrecruzó y se utilizó como control, para observar la abundancia y el patrón de las proteínas que se extrajeron de dicha región. La fracción que se entrecruzó posteriormente se subfraccionó en dos partes, una de ellas se sometió a una reacción reversible del entrecruzamiento mientras que la otra no.

Todas las fracciones fueron analizadas por electroforesis de geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes; uno de estos geles fue teñido con plata mientras que otro fue transferido a una membrana de PVDF para ser inmunodetectado con anticuerpo específico para eIF3f.

Como podemos observar en el gel desnaturalizante teñido con plata (figura 13), se aprecia el patrón del extracto total como control (carril 2), las proteínas que conforman a la región de 125 kDa (carril 3) resueltas aproximadamente en 10 bandas. También se observa que las proteínas tratadas con el entrecruzador el número de bandas disminuye con respecto al control (carril 2) y por último al hacer reversible el tratamiento con el entrecruzador se presenta un patrón muy similar al control (reacción sin entrecruzamiento; carril 3). En el gel observamos que hay una banda a la altura de 64 kDa que se encuentra en mayor proporción (carriles 3, 4 y 5), también se observa una banda a la altura de 37 kDa, la cual cuando se entrecruza la muestra no esta presente en el patrón.

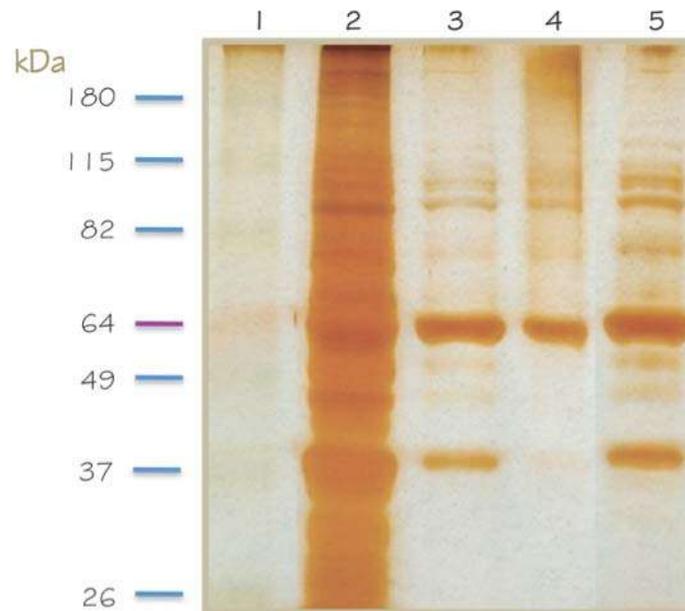


Figura 13. Electroforesis de un gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes teñido con una tinción de plata. Se separaron las proteínas extraídas de un gel nativo de la región de 125kDa (ver materiales y métodos) por medio de un SDS-PAGE; en el carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 extracto total, carril 3 proteínas extraídas del gel nativo de la región de 125 kDa, carril 4 proteínas extraídas de la región de 125 kDa entrecruzadas con DSP [Ditio-bis(succimidil propionato)], carril 5 proteínas extraídas del gel nativo entrecruzadas con DSP y desnaturalizadas para romper el enlace intermedio del entrecruzador.

Para detectar el complejo en donde estuviese presente eIF3f, se realizaron inmunodetecciones con anti-eIF3f. En el primer Western blot (figura 14, panel A), se resolvieron el extracto total, proteínas aisladas de la región de 125 kDa (carril 2), sin entrecruzar (carril 3) y entrecruzadas con DSP (carril 4). Lo que se observó fue que se detectó una banda de 47 kDa que corresponde a eIF3f en los carriles 2 y 3 donde no se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento mientras que en el carril 4 donde se efectuó la reacción de entrecruzamiento no se detectó a eIF3f pero si se detectó una banda de aproximadamente 70 kDa, lo que sugiere que eIF3f y sus interactuantes presenten este peso molecular.

Cabe mencionar que también el anticuerpo presenta un reconocimiento inespecífico que coincide a la altura de la banda detectada en el carril 4 donde se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento (figura 14, panel A), para eliminar la sospecha de que la banda que se detectó fuera un artefacto, se realizó el mismo experimento pero se agregó una condición en donde se resolvieran proteínas aisladas de la región de 125 kDa,

entrecruzadas con DSP y que la reacción se hiciera reversible, es decir, desnaturalizándola por acción de calor y de un agente reductor, como el β -mercaptoetanol (figura 14, panel B). Se obtuvo un resultado similar al anterior solo que en el carril 5, se detectó a eIF3f como en los controles (figura 14, panel B carriles 2, 3 y 4), demostrando que la banda detectada a la altura de 70 kDa es eIF3f con su o sus proteínas interactuantes.

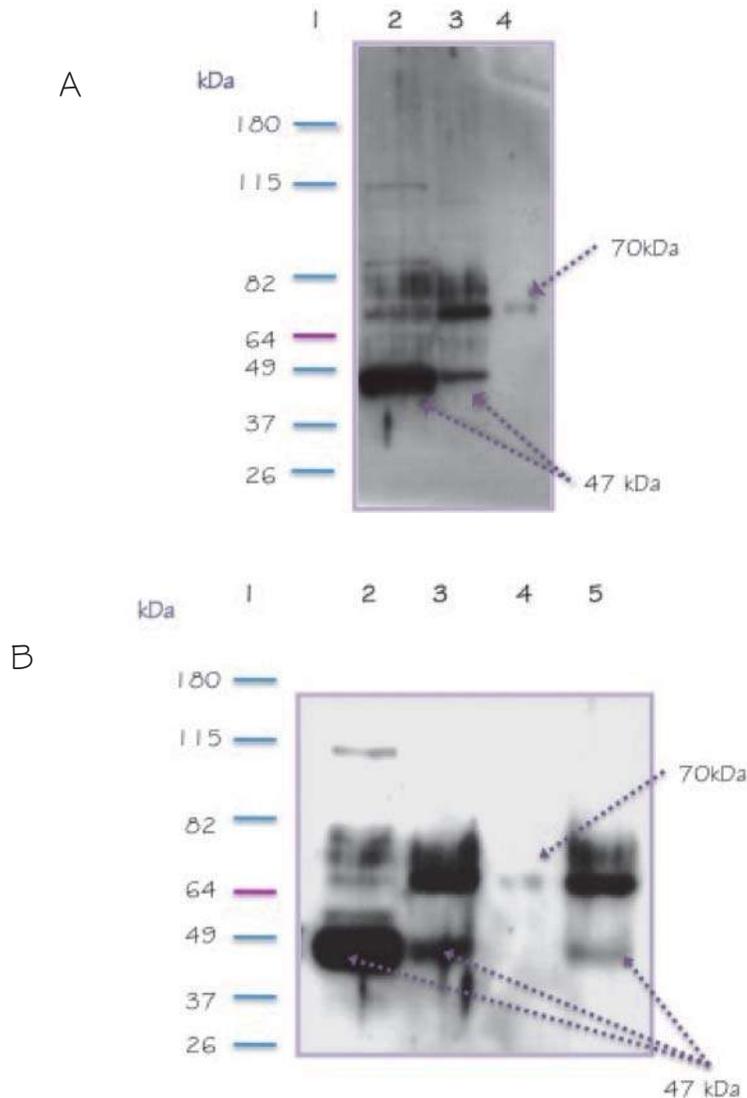


Figura 14. Inmunodetección de eIF3f en una mono dimensión desnaturalizante. Panel A. Se Resolvieron las proteínas extraídas de un gel nativo (ver materiales y métodos) en un gel desnaturalizante; en el carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 extracto total, carril 3 proteínas extraídas del gel nativo de la región de 125 kDa, carril 4 proteínas extraídas de la región de 125 kDa entrecruzadas con DSP. Panel B. El experimento se realizo de manera similar solo que en el carril 5 se resolvieron proteínas extraídas del gel nativo entrecruzadas

7.5 Resolución, detección de eIF3f y su(s) interactuante(s) sobre electroforesis en geles bidimensionales

Debido a que en los experimentos anteriores no solo se detectó a eIF3f y su(s) interactuante(s) sino también algunas inespecificidades, debido a que el anticuerpo contra eIF3f es del tipo policlonal; fue necesario hacer uso de una herramienta más sensible, así que se realizó electroforesis en geles bidimensionales.

Las proteínas fueron aisladas de la región de 125 kDa, una fracción fue entrecruzada con DSP y otra no. Se procedió primero a resolverlas por 2D/SDS-PAGE y realizarle una tinción de plata, para observar a las proteínas que se encuentran en dicha región. En el gel bidimensional en donde se separaron las proteínas sin entrecruzar (figura 15) hay aparentemente 27 proteínas, distribuidas ampliamente en el gel, de los cuales se localizó uno que podría ser eIF3f. Este último, coincide en el punto isoeléctrico (pI) y su peso molecular.

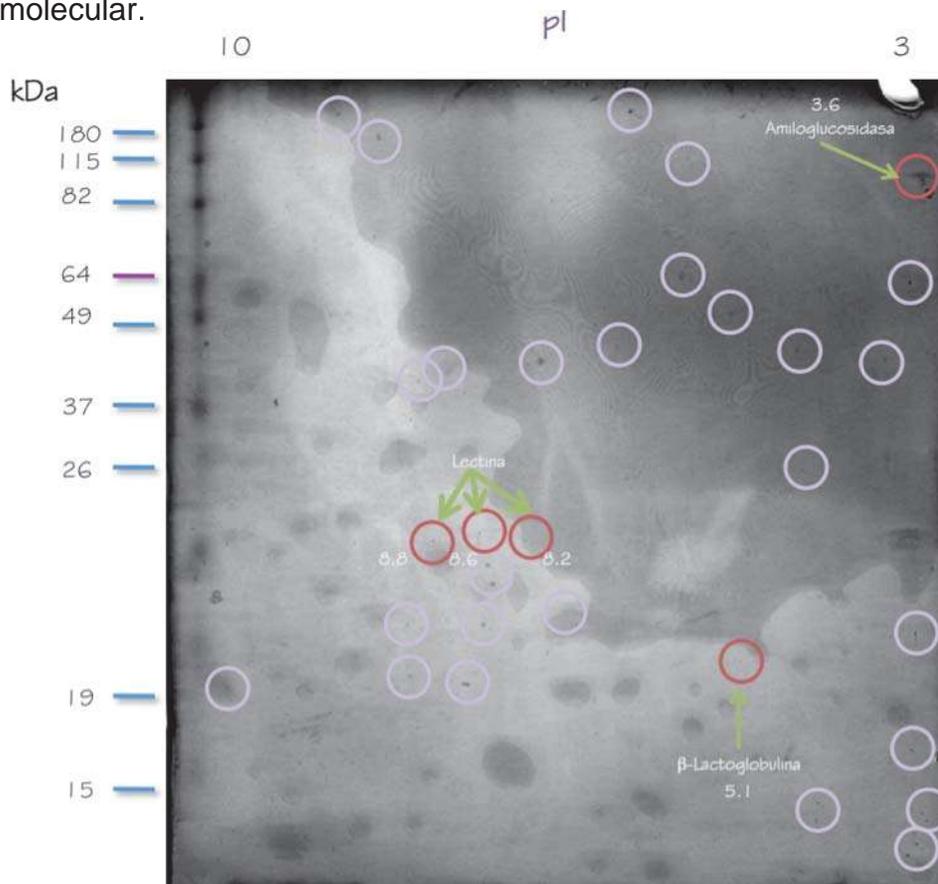


Figura 15. Tinción de Plata de un 2D/SDS-PAGE. Proteínas aisladas de una región de 125kDa de un gel nativo fueron analizadas por electroforesis bidimensional. En círculos lila se muestra los spots resueltos y en naranja los marcadores de punto isoeléctrico con su respectivo valor.

Lo que sugiere que este número de proteínas (27) son los componentes que se encuentran dentro de la banda de 125 kDa.

De igual manera se prosigió en el gel bidimensional donde se resolvieron las proteínas entrecruzadas con DSP, en el cual se ubicaron solo 5 proteínas en la región de 50 a 115 kDa (figura 16). En este gel, se observaron menos proteínas debido a que el entrecruzador debía conservar las interacciones directas donde participaban eIF3f con las proteínas interactuantes presentes en la banda de 125 kDa.

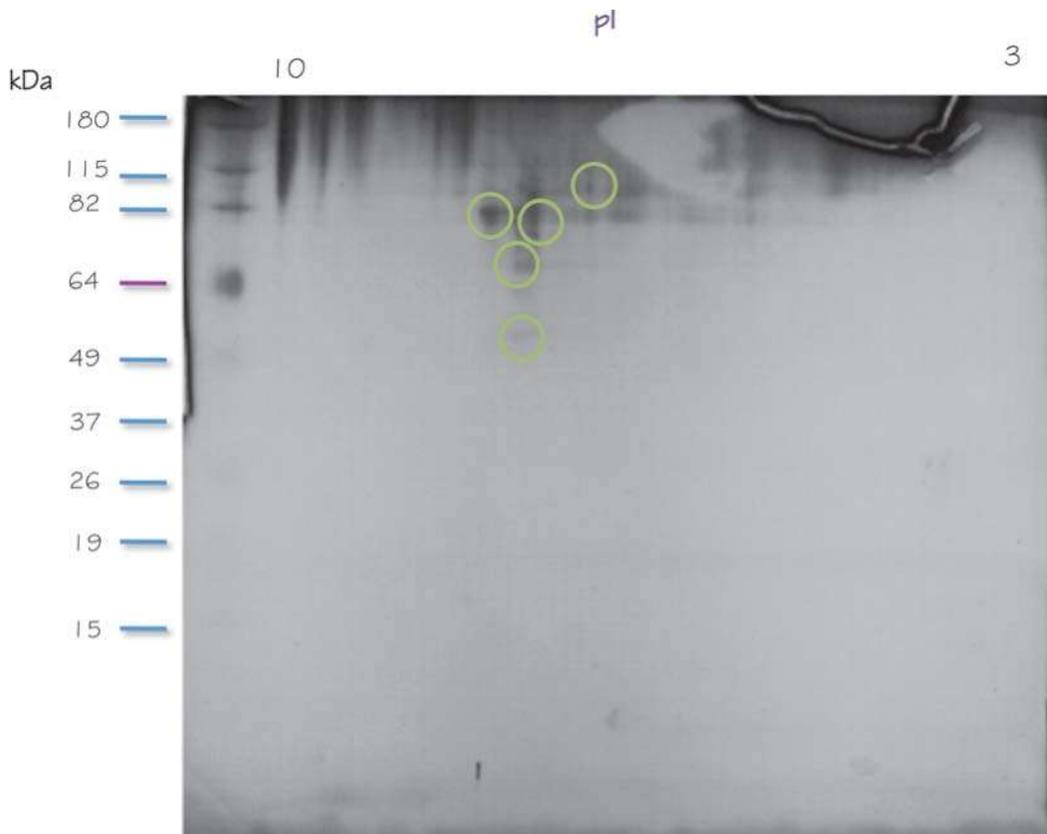


Figura 16. Tinción de Plata de proteínas entrecruzadas y resueltas por 2D/SDS-PAGE. Proteínas extraídas de una región de 125kDa de un gel nativo fueron entrecruzadas con DSP, posteriormente fueron analizadas por electroforesis bidimensional. En círculos verde se muestra los spots resueltos.

De las proteínas localizadas en los dos geles (cruzado y sin entrecruzar), era necesario identificar a eIF3f. La técnica que se utilizó fue la inmunodetección con el anticuerpo contra eIF3f.

Las proteínas detectadas en las diferentes inmunodetecciones, fueron ubicadas por dos parámetros, el pI y su peso molecular. En el caso de la inmunodetección en donde no

se entrecruzaron las proteínas, se encontró una sola proteína, que probablemente corresponde a eIF3f (figura 17). La proteína correspondiente se le calculó el pI obtenido a partir de una curva de calibración de pI (donde se graficaron en el eje de las ordenadas la distancia electroforética recorrida por los marcadores de pI y en las abscisas el valor del pI de los marcadores; anexo 12.2).

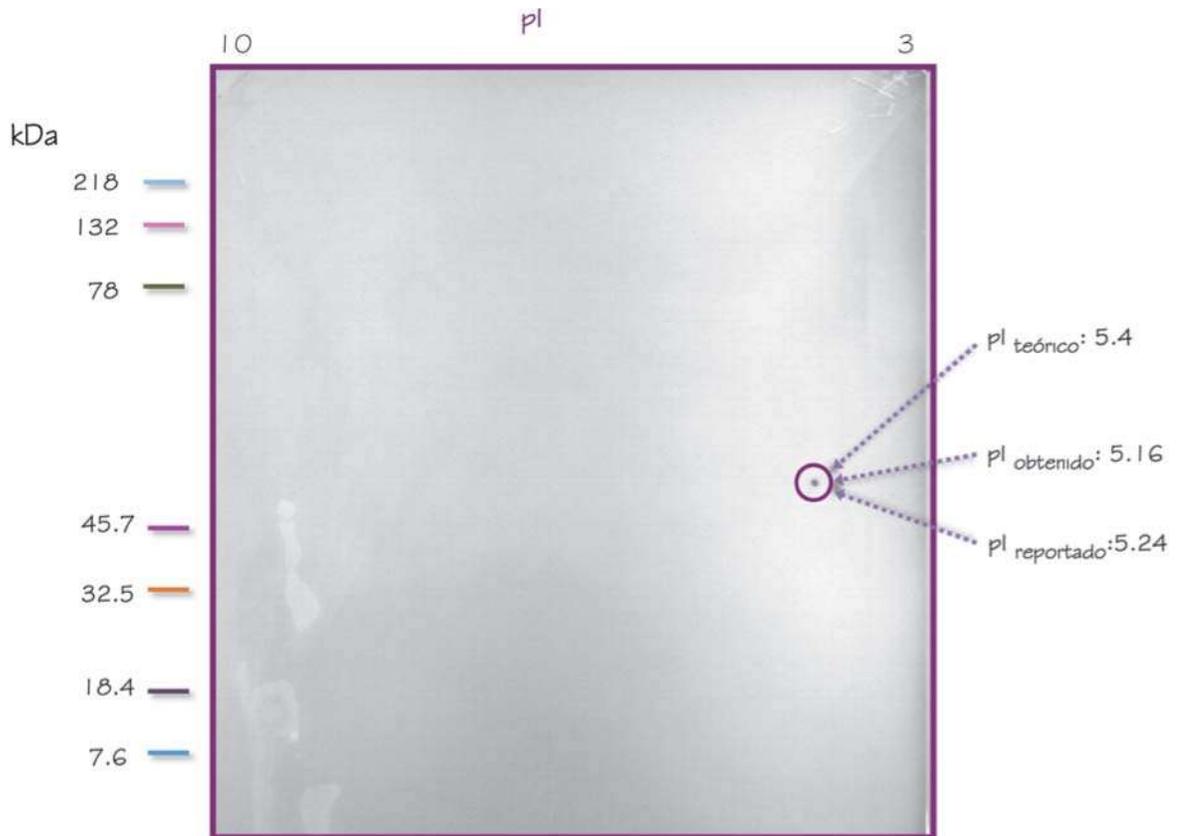


Figura 17. Inmunodetección de eIF3f en un 2D/SDS-PAGE. Las proteínas extraídas de un gel nativo, resueltas por geles bidimensionales, las cuales fueron analizadas por Western blot con anticuerpo eIF3f. En la autorradiografía se muestra el pI de eIF3f teórico, el obtenido de manera experimental y el reportado (Shi et al. 2009, comunicación personal).

Revisando la literatura se encontró que el pI teórico de eIF3f es de 5.4, mientras que Shi et al. (2009) publicaron que eIF3f tenía un pI de 5.24; en base al gráfico ya mencionado se calculó que eIF3f presentaba un pI de 5.16, muy cercano al reportado.

Para el gel en donde se llevó a cabo la reacción de entrecruzamiento, se observaron varias proteínas, además del de eIF3f, se detectó una a la altura de 70 kDa que presentaba un pI de 7.7 (figura 18), dicho complejo podría ser el spot donde se

encuentra eIF3f interactuando con una o más proteínas. También se inmunodetectó un spot cercano al de eIF3f con un peso molecular similar, pero con pI de 5.93, este spot podría ser eIF3f pero presentando alguna modificación post-traduccional, por ejemplo alguna fosforilación en alguna de las serinas que están en eIF3f. Damoc et al. (2007) han reportado que eIF3f es blanco no solo de fosforilaciones sino también de una acetilación en la alanina 2, lo cual podría explicar el cambio de pI.

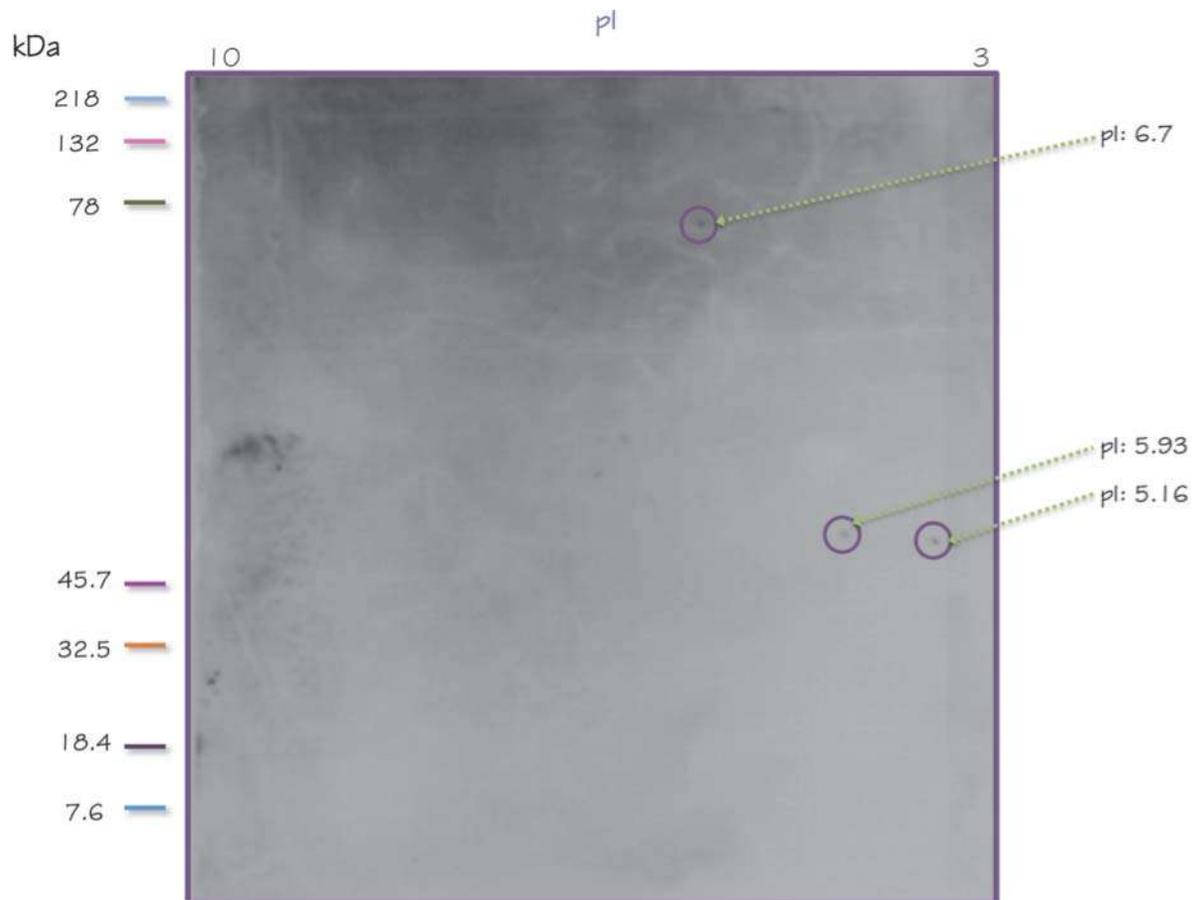


Figura 18. Inmunodetección de eIF3f entrecruzado en un 2D/SDS-PAGE. Las proteínas extraídas de un gel nativo fueron entrecruzadas con DSP y resueltas por geles bidimensionales, las cuales fueron analizadas por Western blot con anticuerpo eIF3f. En la autorradiografía se muestra el pI de eIF3f y su interactuante así como el de eIF3f y una posible modificación postraduccional.

VIII. DISCUSIÓN

Uno de los factores que participa en el inicio de síntesis de proteínas, es el complejo eIF3, el cual en mamíferos está formado por trece subunidades no idénticas, una de estas subunidades es eIF3f que tiene como particularidad que es una subunidad reguladora, debido a que no es esencial para el funcionamiento básico de eIF3. Para esta subunidad se ha reportado por Farias (2002) y Shi et al. (2006) que modula de manera negativa la síntesis de proteínas.

El objetivo del presente estudio fue la búsqueda de las interacciones proteína-proteína de eIF3f en la línea celular A549, por experimentos de inmunodetección en membranas transferidas de geles nativos con anticuerpo específico para eIF3f. En donde se detectó consistentemente una banda proteica con un peso molecular aproximado de 125 kDa (figura 12). Este resultado fue imprevisto debido a que se esperaba inmunodetectar a eIF3f en una banda con un peso molecular de 800 kDa, el cual corresponde al peso molecular en mamíferos de todo el complejo de eIF3 ó 450 kDa del centro funcional reportado por Masutani et al. (2007) en el cual los autores indican que eIF3f forma parte del centro funcional conformado por las subunidades eIF3a, b, c, e, y h. Con respecto al “complejo” donde detectamos a eIF3f, Zhou et al. (2008) realizaron experimentos de espectrometría de masas para conocer la manera en que se ordenan las subunidades de eIF3 y observaron que al aplicar mayor fuerza iónica encuentran que eIF3f, h y m forman un subcomplejo con un peso molecular de 119.74 kDa, el cual se aproxima al que se inmunodetectó. Sin embargo los experimentos de Western blot no aportan la información necesaria para afirmar si este complejo que se detectó corresponde al reportado por Zhou et al. (2008).

Los siguientes experimentos se dirigieron para tratar de conocer si esa interacción se preservaba o sufría alguna modificación. Para preservar la interacción en donde se había detectado a eIF3f, las proteínas inmunodetectadas en el gel nativo a la altura de 125 kDa fueron extraídas por el método de difusión pasiva, este método se utilizó porque no altera la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. Para asegurar de que la interacción de eIF3f y sus interactuantes se mantuviera, se agregó el agente entrecruzador ditio-bis(succimidil propionato), el cual tiene como característica que actúa en un radio de

12°A y liga a las lisinas de las proteínas que se encuentren a dicha distancia. En el experimento se encontró que el complejo de 125 kDa se resolvían en un rango que va de los 120 a 35 kDa. Posteriormente se practicó una inmunodetección para conocer en cual de dichas bandas se encontraba presente eIF3f. Se detectó a eIF3f en una banda con un peso molecular de 70 kDa, lo que indicaba que eIF3f interaccionaba físicamente con una proteína de 25 kDa y de manera indirecta con una proteína de un peso molecular aproximado de 70 kDa (cabe señalar en este punto que pudieran ser varias pero en su conjunto la suma de pesos moleculares es de 70 kDa). En la literatura (ref. 6, 20, 22, 35 y 38) las proteínas con las que se ha reportado que interacciona eIF3f, tienen pesos moleculares que oscilan entre los 70 y los 400 kDa y los pesos moleculares que se detectaron en los experimentos realizados fueron más bajos lo que muestra la posibilidad de descartar que los interactuantes sean los ya reportados.

Para corroborar los datos obtenidos en los experimentos anteriores se realizó la electroforesis de doble dimensión, en donde se resolvieron con mayor resolución proteínas extraídas la región de 125 kDa provenientes de un gel nativo, de las cuales una porción fue entrecruzada para preservar la interacción, mientras que la otra porción no se le practico dicho tratamiento. Estas dos fracciones después de que se resolvieron por la técnica ya mencionada, se les practicó una tinción de plata, en donde se observó una variación en el número de proteínas, la cual se le atribuye al agente entrecruzador usado (figuras 15 y 16). A continuación los geles bidimensionales se transfirieron a membranas de PVDF para practicarles una inmunodetección con anticuerpo específico contra eIF3f. En una de las membrana solamente se esperaba detectar a eIF3f (figura 17), mientras que en la otra se esperaba a eIF3f y a eIF3f más el interactuante o interactuantes (figura 18). Para descartar que las proteínas que se inmunodetectaron en las membranas fueran artefactos, se verificaron en base a dos parámetros al pI y al peso molecular. En cuanto al pI se realizó una curva de pI para estimar el punto isoeléctrico. El pI que se obtuvo para el caso de la inmunodetección donde solamente se esperaba inmunodetectar a eIF3f (figura 17) fue similar al reportado por Shi et al. (2009). Para el caso del peso molecular, el corrimiento coincidió con el peso molecular de eIF3f. Los valores de estos 2 parámetros indican que la proteína que se detecta es eIF3f y no un artefacto. Caso similar ocurrió con la inmunodetección de proteínas entrecruzadas (figura 18), en donde se evaluaron los

mismos parámetros y se encontró un valor similar en cuanto al pI de eIF3f. Para el valor de pI de las proteínas que se entrecruzaron fue mayor que el valor individual de eIF3f. Curiosamente también se inmunodetectó una tercera proteína que tenía un pI ligeramente mayor al de eIF3f y coincidía en el peso molecular de eIF3f lo que indicaría que posiblemente fuese eIF3f con una modificación pos-traducciona, las cuales están reportadas en la literatura pero no indican cuánto alteran el valor del pI así como el del peso molecular. Cabe mencionar que el valor del peso molecular de las proteínas entrecruzadas corresponde al que se inmunodetectó en las membranas provenientes de geles unidimensionales, lo que demostraría que eIF3f presenta una interacción directa con una proteína de un peso molecular de aproximadamente 25 kDa, la cual probablemente no está reportada.

En base a lo anterior, los resultados que se obtuvieron abren la posibilidad de que eIF3f no esté participando en el inicio de la síntesis de proteínas. Por lo que se cuenta con evidencias experimentales de que eIF3f esté circunscrita a otros procesos como el control del ciclo celular. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que al silenciar dicho gen, las células que se encuentran en división celular abren programas de apoptosis (Higareda et al. 2003). Con respecto al ciclo celular, eIF3f presenta 2 picos de expresión: uno en la fase M (mitosis) y otro a inicios de la fase S (síntesis de DNA) temprana (Higareda et al. 2010). En el caso particular del estado fisiológico de las células A549, el cultivo que se utilizó en los experimentos ya mencionados se encontraba en la fase de crecimiento exponencial, probablemente el interactuante o interactuantes podrían ser proteínas relacionadas al proceso de división celular. Este dato sugiere que eIF3f podría participar en otros procesos celulares, además del inicio de síntesis de proteínas. Hay reportes que indican la participación de eIF3f en otro proceso diferente al inicio de la traducción; por ejemplo, en el procesamiento del extremo 3' del mRNA, debido a que eIF3f bloquea la replicación del virus del VIH-1 en su extremo 3'. Valente et al. (2009) reportaron que eIF3f interactúa de manera directa con CDK11 (interacción previamente reportada por Shi et al. 2009) y de manera indirecta con 9G8, una proteína que es miembro de la familia SR, la cual agrupa a factores del empalme (splicing). Estas proteínas contienen en el amino terminal uno o más motivos de reconocimiento a RNA (RRM) que reconocen secuencias

específicas de unión a RNA y en el carboxilo terminal rico en regiones alternadas de arginina y serina conocida como dominio RS.

Aunque la interacción es de manera indirecta (porque CDK11 es el vínculo entre eIF3f y 9G8) tiene consecuencias en el procesamiento de extremo 3' del virus del VIH-1, si existe una expresión alta inapropiada de eIF3f, éste interactuará directamente con 9G8 bloqueando las interacciones río debajo de 9G8, es decir las interacciones involucradas con procesamiento del extremo 3' (Figura 9).

Para conocer la identidad del interactuante es necesario realizar experimentos de secuenciación de proteínas que definan al interactuante o interactuantes y así poder inferir una nueva función biológica de eIF3f.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- 🍏 En la línea celular A549, eIF3f físicamente interacciona directamente con una proteína de ~25 kDa y bajo condiciones nativas se asocia en un complejo proteico de peso molecular aproximado de 125 kDa.
- 🍏 eIF3f presenta un pI de 5.16, mientras que el pI de la interacción que se detectó fue de 6.7. También se detectó una posible modificación postraduccional, que presenta un pI de eIF3f.

X. CONCLUSIÓN

La evidencia experimental nos indica que en la línea celular A549, eIF3f interacciona con un complejo proteico que pudiera ser diferente al factor de inicio de la traducción eIF3.

XI. PERSPECTIVAS

- 🍏 Secuenciar los componentes del complejo proteico aislado de aproximadamente 70 kDa.
- 🍏 Dilucidar las funciones biológicas de las proteínas que interactúan con eIF3f en la línea celular A-549.

XII. ANEXOS

12.1 Estimación del peso molecular en un gel nativo

Se midió el corrimiento electroforético de cada uno de los marcadores de peso molecular para geles nativos, presentando una similitud en cada corrimiento, en la tabla 12.1 se muestran los datos de dicha medición así como el valor del logaritmo del peso molecular. En la gráfica 12.1, aparece la ecuación así como su grado de correlación (r^2)

Tabla 12.1 Registro del corrimiento electroforético contra el logaritmo del peso molecular

Log PM	Rf (cm)			
1.819	4.4	4.5	4.6	4.7
2.164	3.2	3.0	3.1	3.0
2.681	1.2	1.3	1.2	1.1

Curva de Calibración

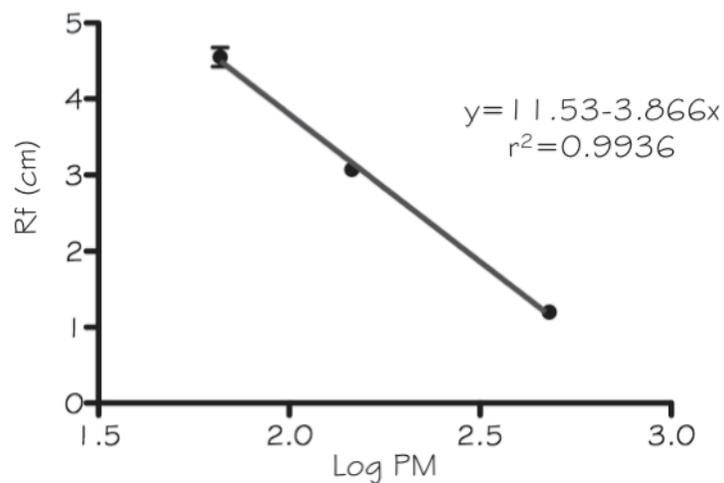


Gráfico 12.1 Curva de calibración para estimar los pesos moleculares en un gel nativo. En el eje de las ordenadas las distancias de corrimiento electroforético de los pesos moleculares de los marcadores de proteínas y en el eje de las abcisas los pesos moleculares de dichos estándares

12.2 Estimación del punto isoeléctrico en geles bidimensionales

Se midió el corrimiento electroforético de cada uno de los marcadores de punto isoeléctrico en la segunda dimensión, en la tabla 11.2 se muestran los datos de dicha medición así como el valor del punto isoeléctrico. En la gráfica 11.2, aparece la ecuación así como su grado de correlación (r^2), las cuales fueron obtenidas de Chávez (2009).

Tabla 12.2 Registro del corrimiento electroforético contra el punto Isoeléctrico

pI	Rf
5.1	12.0
6.6	7.4
8.2	2.9
8.6	1.9
8.8	1.3

Curva de Calibración para la determinación del pI.

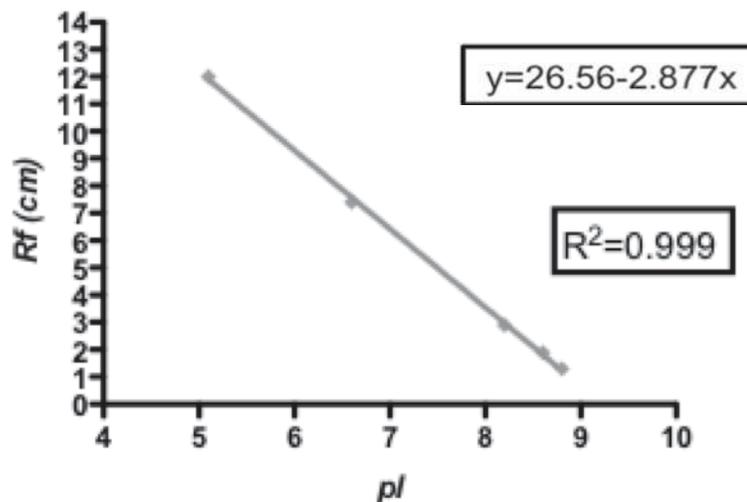


Gráfico 12.2 Curva de calibración para estimar el pI en 2D/SDS-PAGE. En el eje de las ordenadas la distancia electroforética recorrida por los marcadores de pI y en las abcisas el valor del pI de los marcadores

XIII. LITERATURA CITADA

1. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2002.** Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*. USA. (Versión electrónica).
2. **Aravind L. y Pointing C. P. 1998.** Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* 7: 1250-1254.
3. **Asano K., Vornlocher H. P, Richter-Cook N. J., Merrick W. C., Hinnebusch A. G. y Hershey J. W. B. 1997.** Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *J. Biol. Chem.* 272: 27042-27052.
4. **Browning K. S., Gallie D. R., Hershey J. W. B., Hinnebusch A. G., Maitra U., Merrick W. C. y Norbury C. 2001.** Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends Biochem. Sci.* 26: 284.
5. **Chavez M. N. A. 2009.** Caracterización de LiuE DE *P. aeruginosa*, una acil-coa liasa involucrada en el catabolismo de leucina y de terpenos acíclicos. *Tesis de Maestría. IIQB. UMSNH.* 50p.
6. **Csibi A., Cornille K., Leibovitch M. P., Poupon A., Tintignac L. A., Sanchez A. M. J y Leibovitch S. A. 2010.** The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS ONE.* 5: e8994.
7. **Damoc E., Fraser C. S., Zhou M., Videler H., Mayeur G. L., Hershey J. W. B., Doudna J. A, Robinson C. V y Julie A. L. 2007.** Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics.* 6: 1135–1146.
8. **Doldan A., Chandramouli A., Shanas R., Bhattacharyya A., Cunningham J. T, Nelson M. A. y Shi J. 2008.** Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Mol Carcinog.* 47: 235–244.
9. **Farias E. A. 2002.** Estudios *in vitro* acerca de la función molecular de la proteína CAF1. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.* 40-47pp.
10. **Fraser C. S., Lee J. Y., Mayeur G. L., Bushell M., Doudna J. A. y Hershey J. W. B. 2004.** The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable

- binding of elf3 and its subcomplexes to 40S ribosomal subunit *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 279: 8946-8956.
11. **Harris T. E, Chi A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Rhoads E. R. y Lawrence Jr. J. C. 2006.** mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J.* 25: 1659-1668.
 12. **Hernández S. P. 2005.** Análisis estructural del gen y la proteína PSIF en eucariotes superiores. *Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. UMSNH.* 50-52pp
 13. **Higareda-Mendoza A. E., Farias A., Llanderal J., Méndez A. y Pardo-Galván M. A. 2003.** A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition. *Miami Nature Biotech. Short Reports.* 14: 111.
 14. **Higareda-Mendoza A. E. y Pardo-Galván M. A. 2010.** Expression of human eukaryotic factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cell and is essential for cell viability. *Cell Div.* En prensa.
 15. **Hinnebusch A. G. 2006.** eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends. Biochem. Sci.* 31: 553-562.
 16. **Holz M. K., Ballif B. A., Gygi S.P. y Blenis J. 2005.** mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell.* 123: 569-580.
 17. **Junker B. H., Schreiber F. y Börnke F. 2008.** Analysis of Biological Networks. *Wiley.* USA. 207-232 pp.
 18. **Kapp L. D. y Lorsch J. R. 2004.** The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 657-704.
 19. **Kleanthous C., Jones S. y Thornton J. 2000.** Protein-protein recognition. *Oxford.* UK. 33-59 pp.
 20. **Lagirand-Cantaloube J., Offner N., Csibi A., Leibovitch M. P., Batonnet S. P., Tintignac L. A., Seguran C. T. y Leibovitch S. A. 2008.** The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J.* 27: 1266-1276.
 21. **Lalonde S., Ehrhardt D. W., Loqué D., Chen J., Rhee S. Y y Frommer W. B. 2008.** Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J.* 53: 610–635.

22. **Lee J. P., Brauweiler A., Rudolph M., Hooper J. E., Drabkin H. A. y Gemmill R. M. 2010.** The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways. *Mol. Cancer Res.* 8: 93-106.
23. **Lopez J. L. 2007.** Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr B.* 849: 190–202.
24. **Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S. e Imataka H. 2007.** Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J.* 26: 3373-3383.
25. **Méthot N., Song M. S. y Sonenberg N. 1996.** A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation Factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Mol. Cell Biol.* 8: 5328-5334.
26. **Miernyk J. A. y Thelen J. J. 2008.** Biochemical approaches for discovering proteína-protein interactions. *Plant J.* 53: 597-609
27. **Nooren I. M. A. y Thornton J. M. 2003.** Diversity of protein-protein interaction. *EMBO J.* 22: 3486-3492
28. **O'Farrell P. H. 1975.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
29. **Phan L., Zhang X., Asano K., Anderson J., Vornlocher H. P., Greenberg J. R., Gin J. y Hinnebusch A. G. 1998.** Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol. Cell Biol.* 18: 4935–4946.
30. **Proud C. G. y Denton R. M. 1997.** Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem. J.* 328: 329–341.
31. **Royer C. 1999.** Protein-protein interaction. Outline of the thermodynamic and structural principles governing the ways that proteins interact with other proteins. Previamente publicado en Biophysics Textbook Online (BTOL).
32. **Scoles D. R., Yong W. H., Qin Y., Wawrowsky K. y Pulst S. M. 2006.** Schwannomin inhibits tumorigenesis through direct interaction with the eukaryotic initiation factor subunit c (eIF3c). *Hum. Mol. Genet.* 15: 1059–1070.
33. **Shen X., Yang Y., Liu W., Sun M., Jiang J., Zong H. y Gu J. 2004.** Identification of p28 subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3k) as a new partner of cyclin D3. *Febbs Lett.* 573: 139-146.

34. **Shi J., Kahle A., Hershey J. W. B., Honchak B. M., Warneke J.A., Leong S. P. y Nelson M. A. 2006.** Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. 25: 4923-36
35. **Shi J., Hershey J. W. B. y Nelson M. A. 2009.** Phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 3f by cyclin-dependent kinase 11 during apoptosis. *Febbs Lett.* 583: 971-977.
36. **Sonenberg N. y Hershey J. W. B., Mathews M. B. 2000.** Translational Control of Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
37. **Stryer L. 1995.** Bioquímica. *Editorial Reverté*. España. 17pp.
38. **Valente S. T., Gilmartin G. M., Venkatarama K., Arriagada G. y Goff S. P. 2009.** HIV-1 mRNA 3' end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. *Mol. Cell.* 36: 279-289.
39. **Witting I., Braun H. P. y Schägger H. 2006.** Blue Native PAGE. *Nat. Protoc.* 1: 418-428.
40. **Xia Y., Yu H., Jansen R., Seringhaus M., Baxter S., Greenbaum D., Zhao H. y Gerstein M. 2004.** Analyzing cellular biochemistry in terms of molecular networks. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 1051-87.
41. **Xiao H., Xu L. H., Yamada Y. y Liu D. X. 2008.** Coronavirus Spike protein inhibits host cell translation by Interaction with eIF3f. *PLoS One.* 1 (e1494): 1-11
42. **Zhou C., Arslan F., Wee S., Krishnan S., Ivanov A. R., Oliva A., Leatherwood J. y Wolf D. A. 2005.** PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biol.* 3: 14.
43. **Zhou M., Sandercock A. M., Fraser C. S., Ridlova G., Stephensa E., Matthew R., Schenauer M. R, Yokoi-Fongd T., Barsky D., Leary J. A, Hershey J. W. B., Doudnab J. A. y Robinsona C. V. 2008.** Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 18139-18144.