



**Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo**
Facultad de ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de estudios de posgrado

**“Identificación de la vía de transducción de señales
modulada por la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico-
 α_{1B} en células humanas.”**

TESIS
para obtener el grado de:
Maestra en ciencias de la salud

Presenta:
Q.F.B. Paola Jiménez Alcántar

Directora de Tesis:
Doctora en Ciencias Biológicas Ana Edith Higareda Mendoza

Codirector de Tesis:
Doctor en Ciencias Biomédicas Marco Aurelio Pardo Galván



Morelia Michoacán, Agosto 2014

Índice de contenido:

Lista de abreviaturas	4
Capítulo I - Resumen	6
1.1 - Abstract	7
Capítulo II – Marco Teórico	8
2.1 - Ciclo celular	8
Fases del ciclo celular.....	9
2.2 – Control del ciclo celular	11
Puntos de control del ciclo celular:	12
Componentes reguladores de ciclo celular	14
Actividad de los complejos Cdk-ciclina.....	17
Inhibidores de los complejos Cdk-ciclina (CKI).....	18
Proteína 27 (p27 ^{kip1})	20
2.3 - Síntesis de proteínas en eucariontes.....	23
Características del complejo eIF3	27
eIF3f	28
2.4 – Receptores de superficie celular.....	32
Receptores acoplados a proteínas G.....	33
Receptores adrenérgicos	39
Receptor Adrenérgico α_1B :.....	44
Capítulo III – Justificación.....	48
Capítulo IV – Hipótesis.....	48
Capítulo V – Objetivos	49

5.1 - Objetivo general.....	49
5.2 – Objetivos específicos.....	49
Capítulo VI – Materiales y Métodos.....	50
6.1 - Material Biológico	50
6.2 – Técnicas celulares	50
Mantenimiento y manejo de las líneas celulares A-549 y Ramos.....	50
Determinación de proteína por el método de Bradford	54
Ensayo Western Blot	55
6.3 - Análisis estadístico.....	57
Capítulo VII – Resultados.....	58
7.1 – Complejo proteínico en células en estado proliferativo	58
7.2 – Determinación de la vía de transducción de señales	58
Elección de la línea celular.....	58
Modificación de la expresión de eIF3f	59
Capítulo VIII – Discusión.....	64
Capítulo IX - Conclusión	66
Capítulo X - Referencias Bibliográficas	67

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
α1AR	Receptor adrenérgico alfa 1
α1_AAR	Receptor adrenérgico alfa 1 ^a
α1_BAR	Receptor adrenérgico alfa 1B
α1_DAR	Receptor adrenérgico alfa 1D
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína quinasa B
Ala	Alanina
AMP	Adenosin monofosfato ciclico
APC	Complejo promotor de la anafase
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
CAK	Quinasa activadora de quinasas dependiente de ciclina
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
Cip	Proteína que interactúa con quinasas dependientes de ciclina
CKI	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina
E2F	Factor de transcripción de genes para la entrada a la fase S
eIF	Factor de inicio de la traducción en eucariotes
eIF3f	Factor eucariótico de inicio de la traducción 3 subunidad f
GAP	Proteínas aceleradora de actividad GTPasa
GDP	Guanosin difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GNRP	Proteínas liberadoras de guanina
GRK	Proteínas quinasas de receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
His	Histidina
INK4	Inhibidores de quinasa dependiente de ciclina 4
IP3	1,4,5 Trifosfato
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica
Kip	Proteína inhibidora de quinasa
Lys	Lisina
MPF	Factor promotor de la mitosis
MPN	Dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal
mTOR	Proteína objetivo de la Rapamicina en mamíferos
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PI	Fosfoinositido
PIP2	Fosfatidilinositol 2 fosfato

PIP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
Rb	Retinoblastoma
SCF	Skp1-Cullin-F-complejo proteínico de caja –o box-
UTR	Región no traducida de un gen

Capítulo I - Resumen

La proliferación celular se lleva a cabo de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo. Las células de algunos tejidos (por ejemplo el tejido hematopoyético) se dividen rápidamente, otras como los glóbulos rojos pierden la capacidad de dividirse. Algunas, como las células hepáticas, conservan, aunque no utilizan (o muy escasamente), su capacidad de división. El ciclo celular es un proceso altamente regulado y en él encontramos diferentes puntos de control. Los puntos de control se definen como los instantes del ciclo celular eucarionte en los que puede detenerse la progresión hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada puede producirse daño genético y/o celular. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en puntos de control bien definidos. Los componentes del control del ciclo celular detectan fallos y detienen el ciclo celular, pero además pueden poner en marcha la reparación de las fallas, pero si esto no sucede el crecimiento y la proliferación celular se vuelve descontrolada. Este tipo de fallas llevan a patologías tales como el cáncer. Por tal motivo, el conocer los elementos que regulan los procesos involucrados en la división celular nos permite entender y, en su caso, solucionar patologías relacionadas a problemas de división celular como el cáncer.

En el presente trabajo se propuso una ruta de transducción de señales del ciclo celular en las que se cree se encuentra involucrada una asociación proteínica encontrada en el 2012 por Gutiérrez-Fernández y colaboradores entre la proteína eIF3f y el receptor Adrenérgico α_{1B} ($\alpha_{1B}AR$).

Palabras clave: eIF3f, p27, receptor adrenérgico alfa 1B

1.1 - Abstract

In the present work we investigated the down and up-regulation of the function of the gene coding for the subunit f of the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3f) and evaluated its cellular effect. The eIF3f gene plays an important role in the initiation of translation (Benney Hershey 1978). We originally found that the transcriptional expression of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) eIF3f gene was related to cell division. Laboratory results showed that expression of the eIF3f bean gene in meristematic tobacco cells TBV-2 is circumscribed to the G2/M transition of the cell cycle, and that it is essential for the progression of the cell cycle.

Recent results suggest that eIF3f is a negative regulator of translation and has a role in apoptotic signaling (Shi *et al.* 2006). Therefore, it was interesting to investigate if deregulation of eIF3f expression had an effect on human cell proliferation. We investigated the effect of ectopic expression and silencing of eIF3f gene on cellular growth of a human lung adenocarcinoma (cell line A549) with the objective of gathering evidence that indicated its importance in cell division and its possible use in gene therapy against cancer. We found that in quiescent cultures, arrested in G0 by serum limitation, the levels of expression of eIF3f are lowered, compared to proliferating cultures. To determine the expression profile of human eIF3f gene during the cell cycle, A549 cells were synchronized and samples were taken after arrest release (mitotic index, RNA and protein). Expression profiles of both the mRNA and the protein of human eIF3f showed the same cyclic outline. It was found that the expression profile of human eIF3f is similar to that of plants, as it oscillates along the cell cycle; however, in plants only one expression peak is reached during the G2/M transition, while in humans this peak is present together with another peak during the S phase. This was corroborated by quantifying, in phases G0, M and S, the activity of the eIF3f promoter by transcriptionally fusing it to the reporter gene of luciferase.

Key words: eIF3f, p27, receptor adrenérgico alfa 1B

Capítulo II – Marco Teórico

2.1 - Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo involucrado en el crecimiento y la proliferación de las células, el desarrollo del organismo, la regulación de hiperplasia de los tejidos, la reparación de daños al ADN como respuesta a una lesión o enfermedades tales como el cáncer. El ciclo celular envuelve numerosas proteínas reguladoras que dirigen a la célula a través de una secuencia específica de eventos que culminan en la división celular “mitosis” y la producción de dos células hijas (Schafer KA. 1998).

Los requerimientos universales para el ciclo celular son: que se produzcan un par de células hijas genéticamente idénticas, es decir, que el ADN se replique exactamente y que los cromosomas replicados se segreguen en dos células distintas. La gran mayoría de las células también doblan su masa y duplican todos sus orgánulos citoplasmáticos en cada ciclo celular (Alberts B *et al.* 2002).

Una vista global del ciclo celular permite observar dos etapas bien diferenciadas (Luque J, Herráez A, 2002):

- **División celular:** Mitosis (para células somáticas)
- **Interfase**

La interfase a su vez se subdivide formando así cuatro fases distintas en el ciclo celular. Durante estas fases, las células ejecutan dos eventos básicos en la división: la generación de los componentes necesarios de un nuevo ejemplar y una copia fiel de su material genético (fase S) y la partición de todos los elementos celulares en dos células hijas idénticas (fase M). Las otras dos fases del ciclo, G1 y G2, representan una “brecha”, durante la cual la célula se prepara para completar con éxito las fases S y M, respectivamente. Cuando las células dejan de proliferar, ya sea debido a señales antimitogénicas o a la ausencia de señalización mitogénica adecuada, salen del ciclo y entran en un estado de reposo en el que no se dividen conocido como G0. Para garantizar la correcta progresión a través del ciclo celular, las células han desarrollado una serie de

puntos de control que impiden que entren en una nueva fase hasta que no tengan completado con éxito la fase anterior (Cánepa ET *et al.* 2007).

Fases del ciclo celular

La **mitosis**, el proceso de división nuclear, conducirá al momento de la división celular. Durante la mitosis la envoltura del núcleo se descompone, los contenidos del núcleo se condensan formando cromosomas visibles y los microtúbulos se reorganizan formando el huso mitótico que finalmente separará los cromosomas. Mientras tiene lugar el proceso de la mitosis, la célula parece detenerse brevemente en un estado llamado *metafase*, en el cual los cromosomas, ya duplicados, se alinean en el huso mitótico, preparados para la segregación. La separación de los cromosomas duplicados señala el inicio de la *anafase*, durante la cual los cromosomas se trasladan a los polos del huso, donde se descondensan y forman un nuevo núcleo. Entonces la célula se divide por el centro en dos mediante un proceso llamado **citocinesis**, que tradicionalmente se considera el fin de la fase mitótica, o **fase M**, del ciclo celular (Alberts B *et al.* 2002).

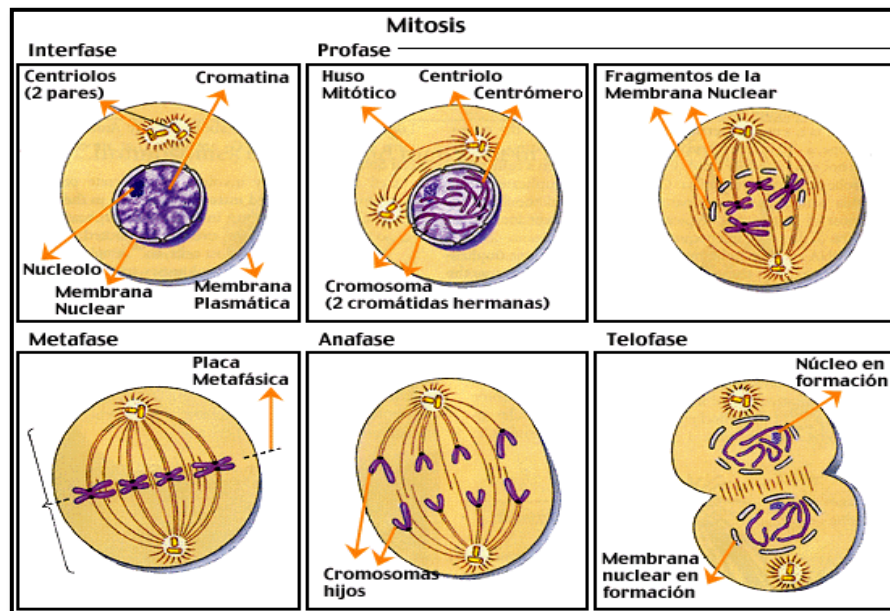


Figura 1. Mitosis. Etapas del proceso de división celular.

El periodo que transcurre entre una fase mitótica y la siguiente se denomina **interfase**. En la interfase, la célula se prepara para dividirse, duplicando su material genético (ADN), y todo su contenido (proteínas, ARN, orgánulos y membranas), de modo que duplica su tamaño antes de dividirse en dos células hijas. Clásicamente el ciclo se plantea en torno al proceso de replicación, o duplicación del ADN nuclear, con lo que se definen dentro de la interfase tres etapas: Fase S, G₁ y G₂ (Luque J, Herráez A, 2002).

Fase S: En esta etapa la célula duplica su material genético para proporcionar una copia idéntica del genoma a cada una de las células hijas resultantes al final del ciclo. Hay algunas proteínas que son sintetizadas en esta fase, como las histonas, proteínas no histonas cromosomales y proteínas reguladoras de la fase G₂ (Alberts B *et al.* 2002).

Fase G₁ y G₂: (Gap = intervalo): Entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula es altamente activa en su biosíntesis, lo cual le permite incrementar su tamaño aumentando el número de proteínas y organelos y proveer de material necesario para la siguiente fase. Durante la **fase G₁** se sintetizan materiales, como ARN y proteínas. Es un periodo funcional durante el cual la célula se prepara para la fase S y responde a factores extracelulares, los cuales determinan si una célula continúa el ciclo o no. La célula puede entrar a la fase G₁ por inducción a partir de la fase G₀ o por entrada directa al término de una división previa. Durante la fase G₂ la información es integrada para determinar si la célula esta lista para entrar a la fase M. Una de sus características principales es la elevada tasa de síntesis de proteínas necesarias para la mitosis. Mientras que algunas células entran en división tras completar cada interfase, otras pasan a un estadio modificado de G₁, denominado **G₀ o quiescente**, en el que permanecen días o incluso años antes de emprender un nuevo ciclo, o del que nunca salen (Luque J, Herráez A, 2002).

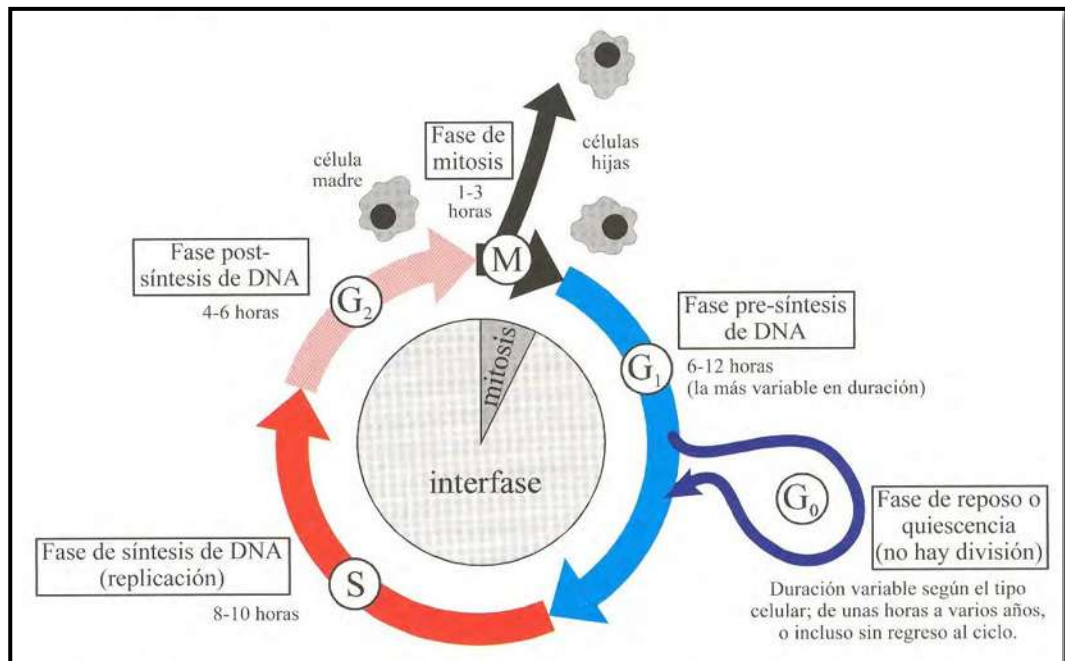


Figura 2. Fases del ciclo celular. Se muestran cada una de las fases del ciclo celular y el tiempo que transcurre entre ellas (Luque J, Herráez A, 2002).

2.2 – Control del ciclo celular

En los organismos multicelulares, el control preciso del ciclo celular durante el desarrollo y el crecimiento es crítico para determinar el tamaño y la forma de cada tejido. La replicación celular es controlada por una red compleja de vías de señalización que integran señales extracelulares acerca de la identidad y el número de las células vecinas, y señales intracelulares sobre el tamaño de la célula y el programa de desarrollo (Lodish H *et al.* 2005).

Los puntos de control se definen como los instantes del ciclo celular eucarionte en los que puede detenerse la progresión hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada puede producirse daño genético y/o celular (Lodish H *et al.* 2005). Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los

acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos en tres puntos de control bien definidos. Los dos puntos de control principales se sitúan en la interfase, concretamente en las transiciones de G1 a S y de G2 a M. El tercer punto de control se localiza en plena mitosis (Luque J, Herráez A, 2002).

Puntos de control del ciclo celular:

El primer punto de control se denomina **punto de control en G1/S**. Ocurre cerca del final de G1, antes de entrar en fase S, en este momento la célula se compromete a completar el ciclo de división celular, y una vez superado este punto de control se dispara la replicación del ADN (Moller MB, 2000). Este punto se llama *inicio* en levaduras de gemación (como *Saccharomyces cerevisiae*) y *punto R* o *de restricción* en mamíferos, y es el control principal del ciclo. Al ser la fase G1 la más prolongada del ciclo (6-12h), es en ella donde más intervienen las condiciones extracelulares, y el único punto donde el ciclo responde a señales externas (Luque J, Herráez A, 2002). Sin embargo, la cascada de regulación tiene otras opciones diferentes a las del avance a la fase S, ya que también se integra rutas alternativas hacia la detención temporal del ciclo celular, la quiescencia, la diferenciación y la apoptosis (Moller MB, 2000). Este punto de control esta modulado por la proteína Rb (retinoblastoma) y el factor E2F (factor de transcripción de genes para la entrada a la fase S). Una de las funciones principales de pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas: pRb impide por tanto la proliferación celular. El factor de transcripción denominado E2F activa genes que codifican muchas de las proteínas involucradas en la síntesis de DNA. Estimulan la transcripción de genes que codifican las ciclinas de la fase G1 (ciclinas E, A y la Cdk2, véase en este mismo capítulo proteínas reguladoras del ciclo celular). Además E2F estimula la transcripción de sus propios genes. La proteína Rb se mantiene unido al factor de transcripción E2F, pero la fosforilación de la proteína Rb en varios sitios disuelve la

asociación a E2F permitiendo por tanto el avance a la siguiente fase. (Luque J, Herráez A, 2002).

El segundo, o **punto de control en G2/M**, ocurre al final de G2, antes del inicio de la mitosis. Si la célula no supera este punto, permanece con ese complemento doble de dotación cromosómica (Luque J, Herráez A, 2002). Está regulado por Factor promotor de la mitosis (MPF en inglés, formado por Cdk1/ciclinaB véase en este mismo capítulo proteínas reguladoras del ciclo celular). En eucariontes multicelulares, la cinasa nuclear Wee1 fosforila el residuo inhibidor T14, mientras que la cinasa homóloga Myt1 fosforila los residuos T14 y Y15 de la CDK del MPF. Otra cinasa, denominada quinasa activadora de CDK (CAK), fosforila un residuo de serina o treonina (S/T 160 en animales y T161 en levaduras) en la subunidad Cdk del MPF. Cuando los tres residuos están fosforilados el complejo MPF es inactivo (figura 2). Por otro lado, las isoformas de la fosfatasa Cdc25 (Cdc25a, b y c) controlan la activación específica de distintos complejos Cdk-Cyc, desfosforilando los residuos T14 y Y15 en eucariontes multicelulares (Morgan DO, 2007). La ausencia de Cdc25c en el núcleo deja al complejo MPF en un estado inactivo y la célula se detiene en G2 (Lodish H *et al.* 2005).

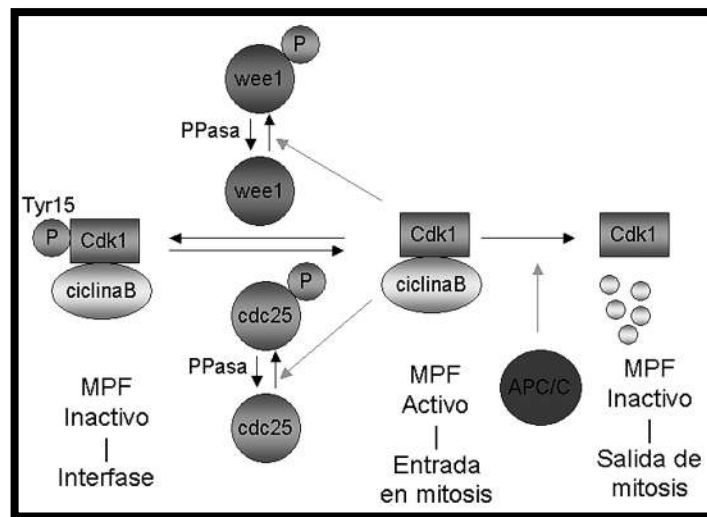


Figura 3. Segundo punto de control del ciclo celular. El factor promotor de la mitosis (MPF), conformado por el complejo ciclina B/Cdk1 es activado por medio de la desfosforilación en la Tyr 15 para la entrada a la fase M o “Mitosis”.

El tercer punto de control, **punto M**, se ejerce durante la mitosis, entre la metafase (cromosomas condensados dispuestos en el plano ecuatorial de la célula) y la anafase (separación de las cromátidas hermanas unidas al uso mitótico hacia cada polo celular). Asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial (Luque J, Herráez A, 2002). El complejo promotor de la anafase (APC, por sus siglas en inglés; también llamado APC/ciclosoma o APC/C) es una ligasa de ubiquitina formada por al menos 11 subunidades proteínicas en los vertebrados. El complejo APC^{Cdc20} se activa en esta transición, después de la síntesis de Cdc20/Fizzy (Cdc20/FZ) en la parte tardía de G₂. Cuando este último se une con el APC, el complejo enzimático poli-ubiquitina el inhibidor de la anafase llamado securina. La poliubiquitinación y la destrucción de la securina al final de la metafase libera una proteasa activa que se conoce como separasa, la cual degrada la subunidad Scc1 de las moléculas de cohesina que mantienen unidas las cromátidas hermanas, estableciendo la anafase. El último punto de control posibilita a la célula para iniciar un nuevo ciclo de división. Cerca del final de la mitosis, Cdc20/FZ es degradada y un factor de especificidad alternativo, Cdh1/FZR (Cdh1/ proteína relacionada a Fizzy), toma el control de la selección del sustrato de APC. Cuando Cdh1/FZR se une con APC, el complejo APC^{Cdh1} poliubiquitina las ciclinas mitóticas, las cuales son degradadas por el proteosoma 26S y la célula puede proseguir hacia la telofase y la citocinesis (Lodish H *et al.* 2005).

Componentes reguladores de ciclo celular

El ciclo celular es regulado principalmente por dos tipos característicos de proteínas, las **ciclinas** y las **proteínas quinasas dependientes de ciclina** (Cdk's), que se

asocian formando complejos Cdk/ciclina para controlar la actividad del ciclo celular (Schafer KA, 1998).

Ciclinas

Las ciclinas son una familia de proteínas de 56 kDa que están implicadas en la regulación del ciclo celular y que están estructuralmente identificadas por regiones conservadas denominadas "caja de ciclina". La caja de ciclina tiene aproximadamente 100 aminoácidos de longitud (la longitud total media de un polipéptido de ciclina de 300-500 aminoácidos) y está localizada en la porción media de cada ciclina. Si bien la secuencia de aminoácidos precisa de la caja de ciclina varía de familia a familia, e incluso dentro de los miembros de una familia, existe un motivo altamente conservado en la caja de ciclina que está constantemente presente en todas las cajas de ciclina. Las ciclinas son subunidades reguladoras de los complejos Cilina/Cdk y este complejo controla la progresión a través de los puntos de control del ciclo celular mediante la fosforilación de residuos de serina o de treonina y la inactivación de sustratos diana (Golias CH *et al.* 2004).

El nombre de este grupo de proteínas se debe a que su concentración en la célula fluctúa de acuerdo con la etapa del ciclo celular, de modo que están presentes en una etapa concreta y desaparecen durante el resto del ciclo. Debido a esta expresión cíclica, las Cdk pueden ser activadas sólo en momentos específicos del ciclo celular. Parte de esta expresión cíclica es debido a que su degradación es regulada. En general, antes de que una célula pueda avanzar a la siguiente fase, la ciclina correspondiente a la fase previa es degradada y la ciclina correspondiente a la siguiente fase es sintetizada (Schafer KA, 1998).

Existen numerosas ciclinas; las principales en humanos son las ciclinas A, B, D y E. Algunas de ellas están relacionadas entre sí; por ejemplo, las ciclinas B1 y B2, o las D1, D2, D3 y D4. La función exacta de otras ciclinas es poco conocida. En general las podemos dividir en las ciclinas de inicio o de fase G1 y las ciclinas mitóticas o de la fase G2 (Luque J, Herráez A, 2002).

Ciclinas de la fase G1 o de inicio. Son aquellas que intervienen regulando el punto de control en G1/S. En humanos pertenecen a este grupo las ciclinas D (D1, D2, D3 y D4) y la ciclina E. Ambas se sintetizan durante la fase G1 y su concentración se regula por transcripción. Debido a su degradación tienen una vida media muy corta (unos 25 min para las D). El balance entre síntesis y degradación hace que aparezcan en la célula al final de G1 y desaparezcan durante la fase S o al acabar ésta (Luque J, Herráez A, 2002).

Ciclinas mitóticas o de la fase G2. Este grupo, formado por las ciclinas A, B1 y B2, regula el punto de control G2/M. Se sintetizan durante las fases previas a la mitosis (S o G2) y se degradan rápida y específicamente durante la mitosis. La ciclina A participa en el control de la replicación del DNA y en la entrada en mitosis. La ciclina B, que solo participa en la mitosis, forma parte del factor promotor de la maduración o de la fase M (MFP en inglés) (Luque J, Herráez A, 2002).

Quinasas dependientes de ciclinas

Las Quinasas dependientes de cíclicas (Cdk's) constituyen una familia de proteínas con una gran homología de secuencia (superior al 50%), que fosforilan residuos serina y treonina de proteínas sustrato específicas. Se trata, por tanto, de serina/treonina quinasas. Sin embargo, sólo pueden ejercer su actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina; por ello, se las llama quinasas dependientes de ciclina, Cdk o CDK (de cyclin-dependent kinases) (Luque J, Herráez A, 2002). Las Cdk's son críticas para la progresión del ciclo celular debido a que su inactivación previene la mitosis (Schafer KA, 1998). De acuerdo con ello, se considera que en el complejo activo (Cdk/ciclina) la Cdk es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora (Luque J, Herráez A, 2002).

A diferencia de las ciclinas, la concentración de las Cdk's no varía de forma importante durante el ciclo celular, aunque puede estar regulada por ciertas señales estimuladoras e inhibitoras del crecimiento. En algunos organismos (levaduras, por ejemplo) existe una sola Cdk, que actúa tanto en el punto de control G1/S como en el G2/M (uniéndose a distintas ciclinas), mientras que en otros (mamíferos) esas funciones se

distribuyen entre varias Cdk's. En humanos se han encontrado al menos 9 miembros de esta familia, denominados Cdk1 a Cdk9, cada uno de los cuales forma complejos quinasa activos con ciclinas distintas (Luque J, Herráez A, 2002).

Actividad de los complejos Cdk-ciclina

Las ciclinas y las Cdk's, trabajan en cooperación para regular el ciclo positivamente, es decir, fosforilan serinas y treoninas de proteínas diana para desencadenar procesos celulares que llevan al avance entre las fases del ciclo celular. Al formarse el complejo, las Ciclinas activan la función de quinasa de las Cdk's. Las Cdk's presentan una estructura proteínica característica, consistente en dos lóbulos entre los cuales está el centro catalítico, donde se inserta el ATP (que será el donador de grupos fosfato). En el canal de la entrada al centro catalítico existe una treonina que debe estar fosforilada para que la quinasa actúe. No obstante, en el propio centro hay dos treoninas que, al ser fosforiladas, inhiben a la quinasa y una región de unión a la ciclina llamada PSTAIRE. Existe una tercera región en las CDK, alejada del centro catalítico, a la que se une las proteínas CKIS (véase más adelante inhibidores de los complejos Ciclina/Cdk), que regula la actividad kinasa de la CDK (Schafer KA, 1998).

La activación de las Cdk como proteína quinasas no consiste simplemente en su unión con una ciclina, sino que su regulación depende de otros mecanismos. La posibilidad de que se forme el complejo Cdk/ciclina depende de la disponibilidad de ambas proteínas; puesto que las Cdk están presentes de forma continua en la célula, son las ciclinas las que regulan (Luque J, Herráez A, 2002).

- **Tasa de síntesis de las ciclinas:** la síntesis está controlada en función de la etapa del ciclo, aumentando en ciertos puntos del mismo, diferentes para las ciclinas A y B que para D y E (Luque J, Herráez A, 2002).
- **Tasa de degradación de ciclinas:** determina, junto con la síntesis, la concentración disponible para su unión a las Cdk (Luque J, Herráez A, 2002).

Una vez formado el complejo Cdk/ciclina, su actividad como quinasa está sometida a regulación por otras proteínas.

- **Modificación de la Cdk por fosforilación y desfosforilación:** la actividad del complejo Cdk-ciclina precisa la fosforilación de ciertos residuos aminoacídicos de la Cdk y no de otros, lo cual está regulado por distintas quinasas y fosfatasas, que a su vez están reguladas por la propia Cdk activa (Luque J, Herráez A, 2002).
- **Interacción de las quinasas con proteínas inhibidoras:** el mecanismo regulador de la actividad de los complejos Cdk-ciclina se basa en la existencia de muchas proteínas que se unen a las Cdk, inhibiendo directamente su actividad; se les llama *inhibidores de los complejos Cdk-ciclina* o **CKI**. Su efecto es por tanto, bloquear el ciclo de división, por lo que funcionan como oncosupresoras (Luque J, Herráez A, 2002).

Inhibidores de los complejos Cdk-ciclina (CKI)

Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKI's) se agrupan en dos familias, en función de su estructura, modo de acción y especificidad de sustrato; la familia de proteínas INK4 y la familia Cip/Kip (Tabla 1) (Luque J, Herráez A, 2002).

Familia	Nombre de la proteína inhibidora	Otros nombres	Acción inhibidora
Cip/Kip	p21	CIP1 WAF1	Preferentemente sobre los complejos Cdk-ciclina de G1 y S. En menor medida sobre complejos Cdk-ciclina de G2.
	p27	KIP1	
	p57	KIP2	
INK4	p16	INK4a MTS1	Específicamente sobre los complejos de ciclinas de G1
	p15	INK4b MTS2	

p18	INK4c	con Cdk4 o Cdk6, pues
p19	INK4d ARF	compiten con las ciclinas D

Tabla 1. Inhibidores de los complejos Ciclina-Cdk. Divididos en dos familias; Cip/kip quienes actúan predominantemente en la fase G1 y S mientras que la familia INK4 actúan específicamente compitiendo con la ciclina D.

La **familia de proteínas INK4** (Inhibitors of CDK4) está conformada por las proteínas p16, p15, p18 y p19 (Canepa ET, 2007). Son polipéptidos de 15 a 19 kDa (de los que deriva su nombre) que comparten aproximadamente el 40% homología entre sí, bloquean la progresión del ciclo celular mediante la unión a cualquiera de Cdk4 o Cdk6 y por tanto la inhibición de la actividad de la ciclina D cuyo sustrato principal es la proteína Rb (Roussel MF, 1999). Estas proteínas comparten un parecido estructural que contiene varias repeticiones de anquirina. La diversidad sorprendente en el patrón de expresión de genes INK4 sugirió que esta familia de inhibidores de ciclo celular podría tener linaje específico de células o funciones en tejidos específicos. Las proteínas INK4 comúnmente se pierden o inactivan por mutaciones en diversos tipos de cáncer. Además de su capacidad de detener las células en la fase G1 del ciclo celular participan en un número creciente de procesos celulares (Cánepa ET *et al* 2007).

La **familia de proteínas Cip/Kip** (de sus siglas en inglés Cdk interacting protein/Kinase inhibitory protein) fueron identificadas por su capacidad de unirse a los complejos ciclina/Cdk, puede unirse tanto a Cdk2 y a Cdk4/6, para regular el ciclo celular. Comprende tres proteínas - p21^{Cip}, p27^{Kip} y p57^{Kip} - que se unen e inhiben al complejo ciclina/Cdk, que son reguladores clave del ciclo celular. Tienen un dominio amino terminal conservado por medio del cual se asocian e inactivan los complejos ciclina/Cdk, los dominios restantes de las tres proteínas no comparten similitud de secuencia, lo que sugiere que pueden tener distintas funciones o mecanismos de acción (Starostina NG, Kipreos ET, 2012).

En células quiescentes, las proteínas de la familia Cip/Kip pueden unirse e inhibir la actividad de Cdk2, lo que resulta en la detención del ciclo celular (Chim CS *et al.* 2005). En las células que se encuentran en división (ciclo celular), las proteínas de la familia Cip/Kip inhiben los complejos de G1 (CiclinaE/Cdk2 y Ciclina D/Cdk4-6), como resultado previene la fosforilación de la proteína Rb y el arresto celular en dicha fase, esto en respuesta a diversas señales anti-mitogénicas (Ikoma T *et al.*, 2001). Sin embargo, esta familia de proteínas no limita su acción a solo estos complejos de G1, si no que pueden unirse a la mayoría de los complejos de Ciclina/Cdk, al menos *in vitro* (Sheaff RJ *et al.* 1997).

Proteína 27 (p27^{kip1})

La proteína p27 pertenece a la familia Cip/Kip de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKIs) y es importante en el control de la proliferación celular. De hecho, p27 regula negativamente la acción de los complejos Ciclina/Cdk que son necesarias para el inicio de la replicación del ADN (Carrano AC *et al.* 1999).

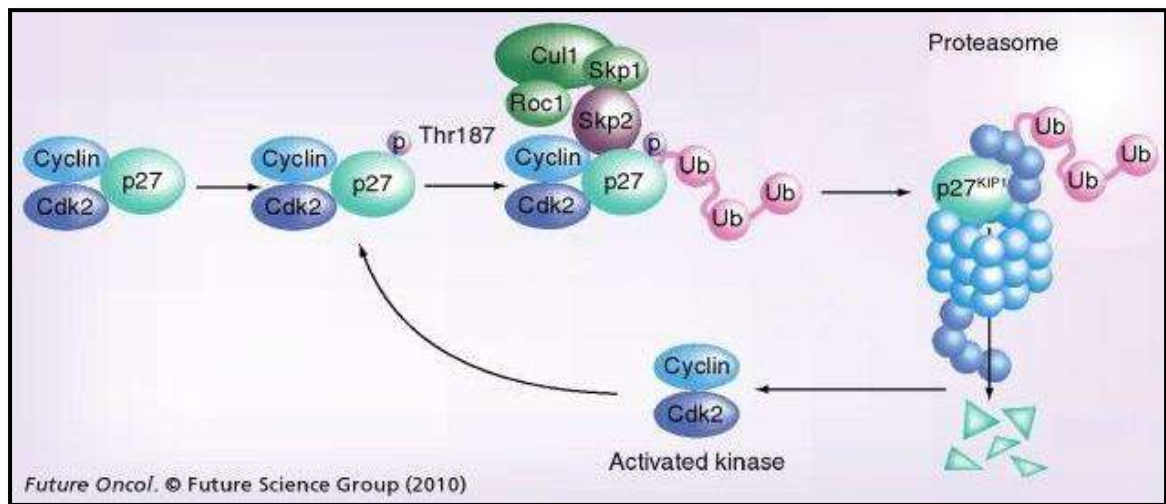
La proteína p27 fue identificada por primera vez como un CKI debido a su capacidad para bloquear la actividad de la ciclina E/cdk2 y la ciclina A/cdk2 en células detenidas en la fase G1 del ciclo celular. La estructura cristalina de p27 en el complejo con la ciclina A/cdk2 ha aportado pruebas sobre el mecanismo por el cual p27 bloquea la actividad de los complejos de ciclina/cdk. Cdk2 está compuesta por dos lóbulos que se unen para permitir la unión al sustrato y la catálisis. Cdk2 contiene un “T-loop” flexible (denominado así debido a que contienen una Treonina reguladora, Thr 160) que bloquea la unión del sustrato a cdk2 acomplexado. Cuando Cdk2 se une a ciclina A y Thr 160 de Cdk2 es fosforilada, el “T-loop” se desplaza de su posición de inhibidor y, en su lugar, actúa para orientar ATP para la fosforilación de los sustratos apropiados. p27 bloquea la actividad del complejo ciclina/Cdk2 mediante la unión tanto a la ciclina y entre los lobulos de Cdk2 para bloquear la unión de ATP en el sitio activo. Por tanto, p27 imita al ATP actuando como un inhibidor competitivo. Sin embargo, p27 no es un inhibidor puro del ciclo celular, ya que

también regula positivamente la progresión del ciclo celular, facilitando el ensamblaje de las ciclinas de tipo D, con Cdk4 y Cdk6. De hecho, las ciclinas de tipo D, a diferencia de la ciclina A y E, se unen con baja afinidad a las Cdk's en ausencia de p27 (o p21) (Bloom J, Pagano M. 2003).

Múltiples vías de transducción de señales mitogénicas y anti-proliferativas pueden regular la síntesis, estabilidad, localización o actividad de p27 (Jäkel H *et al.* 2012). En todas las células normales, los niveles de p27 se encuentran aumentados en aquellas células en estado quiescente, y disminuye rápidamente después de la entrada al ciclo de división celular luego de la estimulación con factores de crecimiento mitogénicos, lo que permite a los complejos ciclina/Cdk conducir a las células a la fase S (Sheaff RJ *et al.* 1997). Y por el lado contrario al recibir señales anti-mitogénicas su expresión aumenta y se une a los complejos ciclina/Cdk para inducir un arresto en la fase G1, y por tanto, el avance a la siguiente fase (Moller MB, 2000).

Los niveles mRNA de la proteína p27 no fluctúan durante el ciclo celular, lo que implica la existencia de mecanismos postraduccionales para el control de los niveles de expresión de esta proteína. Durante el ciclo celular el nivel intracelular de p27 se reduce rápidamente durante la transición de la fase G1/S. Y se ha demostrado que existen dos mecanismos postraduccionales participando en la degradación de esta proteína de forma independiente; la degradación vía proteosomal, por medio de ubiquitinación y un proceso proteolítico rápido que elimina el dominio de unión a la ciclina. Los objetivos para la ubiquitinación en la proteína p27 son la Lisina 134, 153 y 165. El proceso de ubiquitinación se realiza en la frontera de las fases G1/S (transición). De forma paralela a la ubiquitinación se lleva a cabo la proteólisis, sin embargo este mecanismo tiene mayor actividad durante la fase S del ciclo celular. La proteólisis se lleva a cabo en el extremo N-terminal de la proteína reduciendo la masa molecular de la proteína desde 27 hasta 22 kDa, proceso independiente del de ubiquitinación, y es dependiente de ATP. Al perder el extremo N-terminal la proteína pierde la capacidad de unión a la ciclina, y por tanto su actividad inhibidora (Shirane M, *et al.* 1999).

La degradación de p27 es crítica para el avance en la transición G1/S del ciclo celular (Bloom J, Pagano M. 2003). La proteína p27 es marcada para su degradación por medio de moléculas de ubiquitina y posteriormente trasladada al proteosoma. Para el marcaje de la proteína es necesaria su fosforilación en la Treonina 187 por medio del complejo ciclina E/Cdk2 (Carrano AC *et al.* 1999). Una vez fosforilado, la adición de moléculas de ubiquitina ocurre a través del complejo proteínico SCFskp2, y subsecuentemente su degradación en el proteosoma 26S. El complejo SCFskp2 representa



una clase de enzima ubiquitina ligasa E3 que contiene cuatro subunidades: Skp1(adaptador de la ubiquitin ligasa SCF y Skp2), Cul1(ubiquitin ligasa), una de las muchas proteínas “F-box”, y Roc1/Rbx1(dedo del anillo). A este complejo se une la proteína Skp2 que se ancla a p27 uniéndolo a él, por medio de una proteína adaptadora que modifica la conformación de p27 fosforilado (Treonina 187) para permitir la unión con la proteína Skp2, toda esta serie de eventos es llevada a cabo por la acción de estímulos mitogénicos. Una vez que se ha marcado la proteína es transportada al proteosoma 26S para su posterior degradación (Bloom J, Pagano M. 2003).

Figura 4. Degradación de la proteína p27. Una vez que la proteína p27 marcada para su degradación (fosforilada en Thr187) el complejo SCFskp2 comienza el proceso de ubiquitinación para su posterior degradación en el proteosoma.

2.3 - Síntesis de proteínas en eucariontes

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

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

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

La fase de iniciación traduccional es el principal punto de control en la expresión genética relacionada a la síntesis de proteínas, regula su velocidad. La célula puede regular la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de algunos factores de iniciación, llamados “eIFs” en eucariontes (Mathews et al. 2007).

La iniciación de la traducción comprende cuatro pasos subsecuentes: (I) la formación del complejo de preiniciación 43S, el cual incluye la subunidad ribosomal pequeña (40S), el ARN de transferencia iniciador (Met-ARN^tMet), GTP y los factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 y eIF5; (II) el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5' cap del ARNm que previamente ha sido reconocido por eIF4F; (III) escrutinio de la región 5' no traducida (5' UTR) del ARNm y el reconocimiento del codón de inicio; y (IV) unión de la subunidad ribosomal grande (60S) para ensamblar un ribosoma completo (80S) (Pestova et al. 2000, Pestova et al. 2002, Preiss et al. 2003, Mathews et al. 2007).

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

El factor de iniciación 3 (eIF3) que forma parte del complejo de iniciación 43S, es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas (Hall et al. 2004). eIF3 sirve como andamio entre el ARNm y la subunidad ribosomal 40S interactúa físicamente con eIF4F (Pestova et al. 2002). Una vez que se ha colocado el complejo de inicio 43S sobre el ARNm, se desliza sobre el transcrito en busca del codón de inicio de la traducción y al encontrarlo se coloca el primer ARN^t sobre éste.

El factor de iniciación 5 (eIF5) unido a la subunidad ribosomal 40S hidroliza el GTP unido a eIF2, de tal manera que se estimula la disociación del complejo de

preiniciación 43S, libera al eIF2-GDP y al eIF3. El factor de iniciación 1 (eIF1) y eIF1A actúan sinérgicamente y media el ensamblaje del ARNt en el codón de inicio. Una vez liberado el factor eIF3, se une la subunidad ribosomal mayor 60S a la subunidad ribosomal menor 40S, formándose el ribosoma funcional 80S y continua con la elongación de la cadena peptídica (Korneeva et al. 2000).

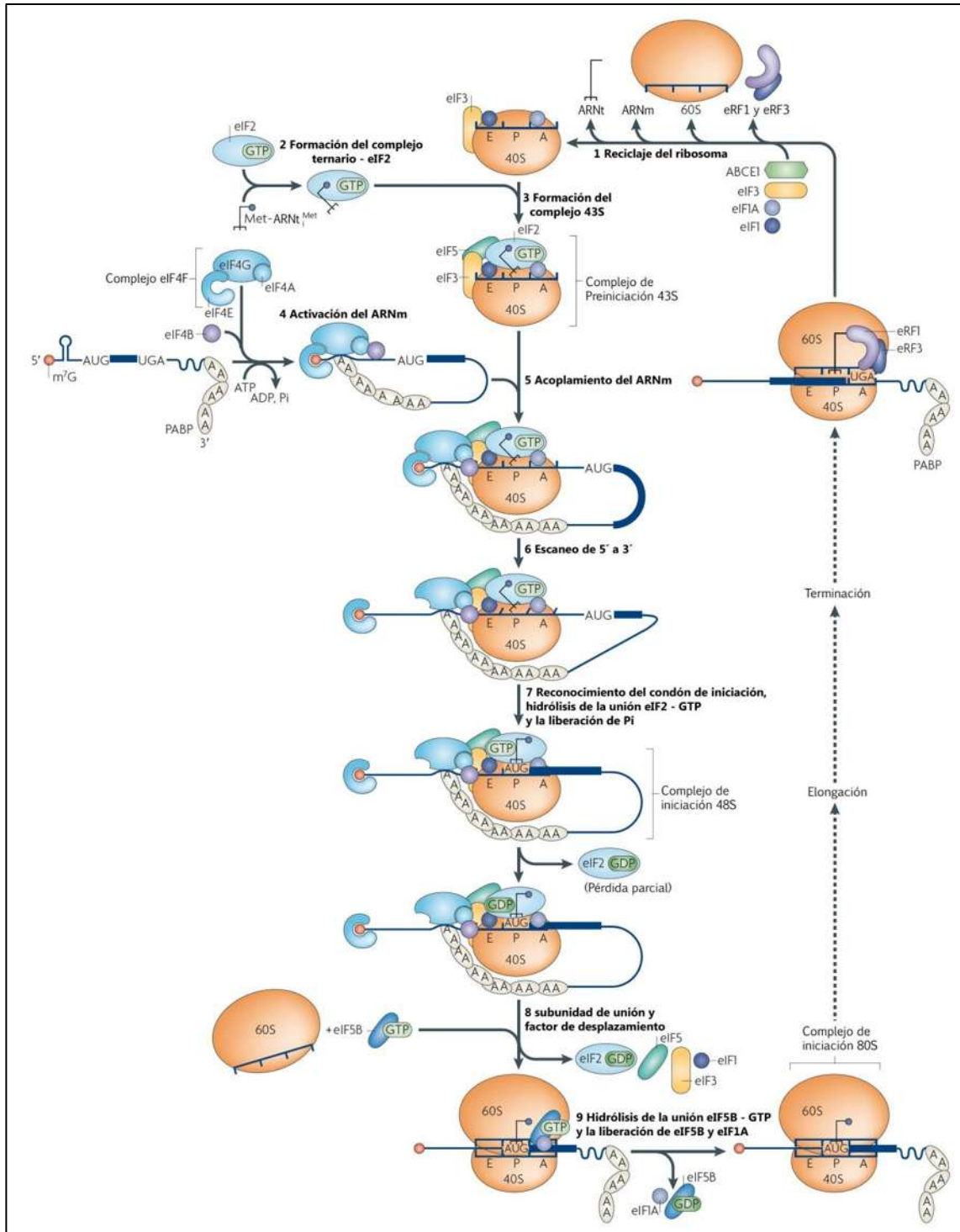


Figura 5. Traducción. Proceso de traducción o síntesis de proteínas en eucariontes.

Características del complejo eIF3

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

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

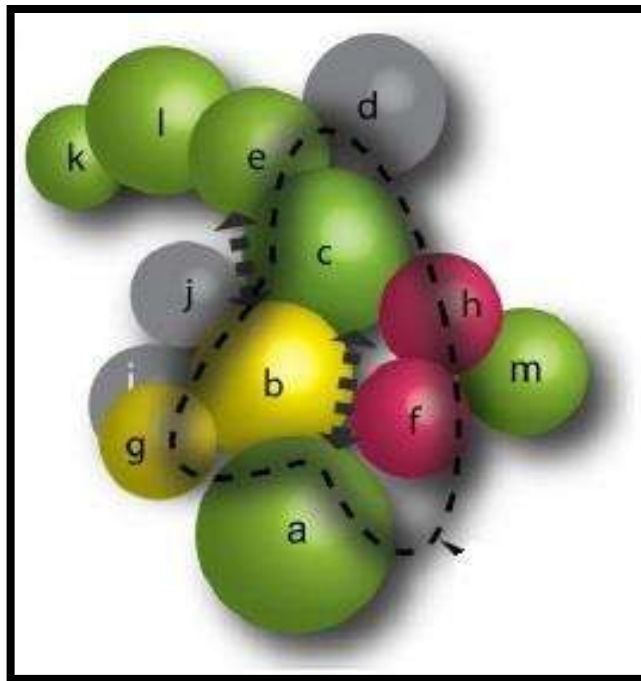


Figura 6. Propuesta del modelo de eIF3 por Zhou en 2008. Se muestra la forma en la que se organizan las subunidades, coloreadas de acuerdo a los dominios que contiene. Dominios PCI (verdes), dominios MPN (rojo), que contienen motivos de reconocimiento de ARN (amarillo).

eIF3f

El gen *eIF3f* (p47) pertenece a la familia génica *Mov34*, que relaciona a sus miembros por contener un dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) hacia el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteínicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind et al. 1998). Así también, la característica particular de cada proteína la determinaría su extremo carboxilo terminal.

En el genoma humano, eIF3f se encuentra codificado en el cromosoma 11; es un gen con 8 exones y 7 intrones (Hernández P, 2005) y codifica una proteína de 357

aminoácidos (aa). Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2 que sólo presenta la secuencia codificante (sin intrones) de una proteína de 361 aa. La identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos es del 97%. En las líneas celulares humanas A549 y 293H se ha demostrado que la copia en el cromosoma 2 no es funcional (Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galván MA 2010), tratándose de un retropseudogen.

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la sobreexpresión del gen de *eIF3f* disminuye la velocidad de síntesis proteínica (Higareda-Mendoza AE et al. 2003, Shi et al. 2006), por lo que se considera un modulador del proceso. La proteína eIF3f forma parte de eIF3, y es capaz de interactuar con proteínas diferentes a las de este complejo multiproteínico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la quinasa ribosomal S6K1 interactúa con eIF3f a través del dominio MPN. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la quinasa mTOR interacciona con eIF3f a través del dominio señalizador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés) y mTOR fosforila a S6K1 liberándola de eIF3f, y de esta manera fosforila a su segundo blanco, la proteína 4E-BP1 (Holz et al. 2005; Harris et al. 2006). La proteína eIF3f muestra características de unión proteína-proteína excepcionales, ya que también interactúa establemente con proteínas involucradas con procesos diferentes a los del complejo eIF3 y la síntesis proteínica. Por ejemplo, recientemente se reportó que eIF3f se relaciona físicamente con la proteína TRC8, que es una ubiquitin-E3 ligasa, la cual sensa los niveles exógenos de colesterol y se localiza en el retículo endoplásmico (Lee et al. 2010). También, Lagirand-Cantaloube y colaboradores (2008) reportan que en células de mioblasto de ratón (C2C12), la ubiquitin-E3 ligasa Atrogin 1/MAFbx interacciona, a través de un dominio rico en residuos de leucina, con el dominio MPN de eIF3f. El dominio MPN de eIF3f humano abarca del aminoácido 90 hasta el 248. Sin embargo, posee un dominio en sus primeros 90 aminoácidos con un peculiar contenido de aminoácidos, con un 60% de prolinas y alaninas (dominio poly PA). Aunque aún se desconoce su función, se sabe que este dominio interactúa con la proteína quinasa relacionada a la apoptosis Cdk11p46 y ésta con la proteína 9G8, perteneciente a la familia de proteínas ricas en serina y arginina (proteínas SR) que agrupa factores de corte y empalme durante la edición del extremo 3'

del pre-ARNm del virus HIV, e impide su procesamiento (Valente et al. 2009). En este sentido, un reporte previo indica que en células de melanoma humano A375 en estado apoptótico, la Cdk11p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio polyPA (Shi et al. 2006). Desde el punto de vista evolutivo, el hecho de que este dominio se conserve infiere un alto valor de selección.

Por otro lado, existe evidencia de que el sobre-expresar al gen eIF3f afecta al crecimiento celular e induce apoptosis, como fue reportado por Shi et al. (2006) en la línea celular A375, por Higareda y Pardo (2010) en la línea celular A549 y por Llanderal-Mendoza (2003) en células de tabaco TBY-2. Asimismo, se reportó que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular y que su expresión en G0 está abatida, esto en línea celular A-549. Este perfil de expresión fue corroborado mediante estudios en cultivos asincrónicos y sincronizados en G0, M y S transfectados con la región promotora inmediata al gen eIF3f fusionada transcripcionalmente al gen reportero de luciferasa (Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galván MA 2010). Por otro lado, también sabemos que la sobre-expresión del gen inhibe la síntesis global de proteínas (Higareda- Mendoza AE *et al*, 2003) y si consideramos que la síntesis global de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular en mamíferos (Fan H, Penman S. 1970) es coherente hacer la relación con su perfil de expresión y sugerir su contribución en este proceso. Es conveniente recordar que además del máximo de expresión en M, está el máximo en la fase S del ciclo celular y que durante esta fase no disminuye la síntesis de proteínas, por lo que se plantea una función diferente durante la misma (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010).

Recientemente, (Gutiérrez-Fernández MJ, Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galván MA. 2011) al analizar en la línea celular A-549 interacciones proteínicas diferentes a la del complejo eIF3 con eIF3f se encontró una asociación de un complejo de 105 kDa. Una vez que se inmunodetectó la banda de 105kDa, se separaron las proteínas que se encontraban en esa región, encontrando bandas en la región de 55 kDa, otra en ~47 kDa que corresponde a eIF3f, otras bandas casi imperceptibles en la región ~25 kDa. Se procedió luego a aislar la banda de la región de 55 kDa, con la finalidad de realizar un análisis de secuenciación. Del

resultado de esta secuencia se llevó a cabo un BLAST en la base de datos del NCBI, a resultado de esta búsqueda para se le aplicaron los siguientes criterios: Secuencia, inicio de la secuencia. (Región N-terminal) y Peso Molecular. La única proteína que cubrió estos criterios, correspondió al Receptor adrenérgico $\alpha 1B$. Con este dato se procedió a realizar la inmunodetección contra el Receptor adrenérgico $\alpha 1B$, en gel desnaturalizante, producto de elusión de banda de 105 kDa, y posterior inmunoprecipitación con eIF3f e inmunodetectando el IP con el anticuerpo primario contra el receptor adrenérgico $\alpha 1B$. Se replicaron los experimentos en dos líneas celulares más la HepG2 y la Ramos mostrando los mismos resultados. Este dato nos confirma que el complejo de 105 kDa (eIF3f-receptor adrenérgico $\alpha 1B$) no es tipo celular específico. Este dato sugiere que eIF3f podría participar en otros procesos celulares, además del inicio de síntesis de proteínas.

2.4 – Receptores de superficie celular

Los mecanismos de comunicación celular son imprescindibles para establecer relaciones adecuadas entre un organismo y su entorno. En el caso de los organismos pluricelulares, además, ha de ocurrir que cada célula del organismo funcione dependiendo de las necesidades del conjunto, para ello se necesita un sistema capaz de generar, transmitir y recibir señales de distinta índole, pero además estas señales han de producir una respuesta en la célula diana de manera que adecue su funcionamiento a las señales que recibe. Por lo general, los sistemas de comunicación se basan en la existencia de receptores capaces de reconocer con una elevada afinidad y especificidad una determinada señal, cuya naturaleza no siempre es química. Por otro lado, estos receptores han de ser capaces de desencadenar una serie de eventos intracelulares como consecuencia de esta señal extracelular. Los mecanismos por los cuales se transforma en el interior de la célula un tipo de señal extracelular (primer mensajero) en otro intracelular (segundo mensajero) se conocen como mecanismos de transducción celular.

Los receptores son moléculas de elevado tamaño de carácter proteínico las cuales normalmente atraviesan la membrana plasmática, al menos una vez, aunque se encuentran receptores en otros órganos subcelulares (receptores intracelulares), como es el caso de los receptores de hormonas esteroideas o los receptores de IP3 del retículo endoplásmico. Estos receptores, al igual que las enzimas, poseen sitios estereo-selectivos para el reconocimiento de ligandos específicos, de tal forma que el primer mensajero ejerce su efecto sobre la célula diana al unirse a su receptor específico formando un complejo ligando-receptor. A partir de esta primera unión se desencadenan una serie de procesos en la célula diana que varían en función de la naturaleza del primer mensajero, del receptor y del tipo celular al que llega el mensaje. Por tanto un mismo mensaje puede desencadenar respuestas distintas, incluso opuestas, dependiendo de la célula diana que lo reciba.

En general, existen dos tipos de respuestas celulares ante una determinada señal en función del tipo de receptor que la recibe. Por un lado, los receptores metabotrópicos, tras la detección de la señal, interaccionan de forma compleja con una serie de proteínas,

denominadas proteínas G, las cuales interaccionan a su vez con distintos sistemas enzimáticos que, en último término, producen alteraciones bioquímicas en el interior celular en los niveles de segundos mensajeros. Por otro lado, los receptores ionotrópicos constituyen canales iónicos, los cuales, como consecuencia de la unión de su ligando, podrían variar su estado funcional permitiéndose la entrada o la salida de iones, lo que variaría el potencial de membrana (Castillo-Sarmiento CA. 2009).

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés: G protein-coupled receptors), también son conocidos como receptores transmembrana de siete dominios, receptores 7TM, receptores heptahelicoidales, receptor serpiente, y receptores ligados a proteínas G (GPLR, del inglés: G protein-linked receptors), comprenden una gran familia de proteínas de receptores transmembrana que perciben moléculas afuera de la célula y activan las vías de transducción de señales y, finalmente, las respuestas celulares. Los receptores acoplados a proteínas G sólo se encuentran en células eucariotas, incluyendo la levadura, choanomonadas (eucariotas unicelulares) y animales.

Estructura de los GPCRs

Todos los receptores englobados en esta superfamilia presentan una arquitectura común, su cadena polipeptídica atraviesa la membrana plasmática 7 veces, formando un motivo también llamado dominio heptahélico. La secuencia polipeptídica comienza en el extremo N-terminal, el cual se expone hacia el espacio extracelular. Los dominios transmembrana están formados por secuencias de 25 a 35 aminoácidos de carácter hidrófobo que adquieren la disposición de α -hélice, las cuales se encuentran conectadas por 6 bucles, 3 intra y 3 extracelulares, de longitud variable quedando el extremo C-terminal en el interior celular (Figura 7). Esta disposición permite que una parte del receptor quede expuesta al lado externo de la membrana plasmática, la cual será responsable de la interacción con el ligando, mientras que otra parte se expone hacia el lado intracelular,

siendo esta responsable de la interacción con las proteínas G. En algunos receptores, los que reconocen ligandos de tamaño pequeño, esta estructura es suficiente para el correcto funcionamiento, ya que lo reducido del tamaño permite el correcto reconocimiento por los bucles extracelulares de esta estructura. Los receptores que reconocen ligandos de mayor tamaño presentan un extremo N-terminal más largo que, proyectado hacia el espacio extracelular, proporciona los sitios de reconocimiento necesarios.

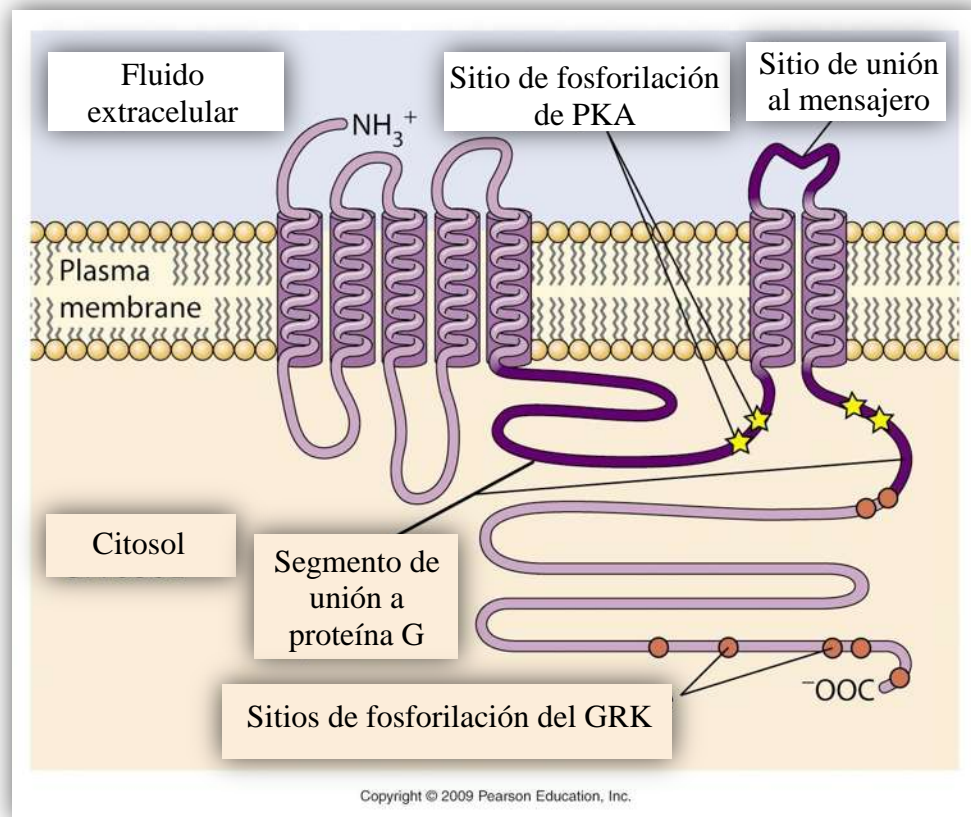


Figura 7. Estructura de un receptor acoplado a proteínas G.

Los GPCRs no sólo comparten este motivo estructural común, sino también un método intracelular de amplificación de la señal. Este método se basa en la interacción por parte de cada receptor con proteínas G específicas. Para ello es necesario que el extremo C-

terminal interacción con las cavidades formadas por los bucles intracelulares 2 y 3 (Bourne HR, 1997), siendo la secuencia de estas cavidades particularmente importante para el reconocimiento de proteínas G características.

El primer receptor acoplado a proteínas G cuya estructura cristalina se resolvió fue el receptor de rodopsina bovino (Palczewski *et al*, 2000), desde entonces se ha recopilado abundante información acerca de la estructura, los residuos conservados a lo largo de la evolución y la funcionalidad en estos motivos tan conservados. No obstante, el estudio de estos receptores todavía arroja sorpresas, de hecho, se ha descrito la estructura del receptor A2A humano y en ella se ha observado que los bucles extracelulares y las hélices transmembrana forman un “bolsillo” de unión del ligando distinto al de todos los GPCRs caracterizados hasta la fecha (Jaakola y col., 2008).

Clasificación de los GPCRs.

En la actualidad no existe un acuerdo global acerca de cómo organizar la clasificación de los GPCRs. Las clasificaciones realizadas hasta la fecha han respondido bien a aspectos biológicos, farmacológicos o computacionales. La dificultad de su clasificación radica en que, a pesar de que la estructura tridimensional se ha mantenido a lo largo de la evolución, la secuencia primaria de estos receptores apenas se parece (Milligan G. 2006). Una de las clasificaciones más ampliamente utilizada es la establecida en la base de datos de la IUPHAR (de sus siglas en inglés, Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica), accesible en <http://www.guidetopharmacology.org>, que divide los GPCRs en 6 familias. La familia A, B y C, además los GPCRs de adhesión, la familia de receptores denominada *Frizzled* y otros receptores transmembrana de siete hélices (7TM). Según esta clasificación la familia A o “similares a rodopsina” (*rhodopsin-like*) es la más abundante, agrupando más del 80% de los GPCRs en humanos y dentro de esta familia localizamos a los receptores Adrenérgicos. La familia B son los “similares a secretina” (*secretin-like*) y la C recibe el nombre por los receptores metabotrópicos de glutamato, aunque contiene otros receptores como los de GABA (ácido γ -aminobutírico), estas tres familias se encuentran en mamíferos.

Familia de las GTPasas. Mecanismos de transducción de los GPCRs.

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

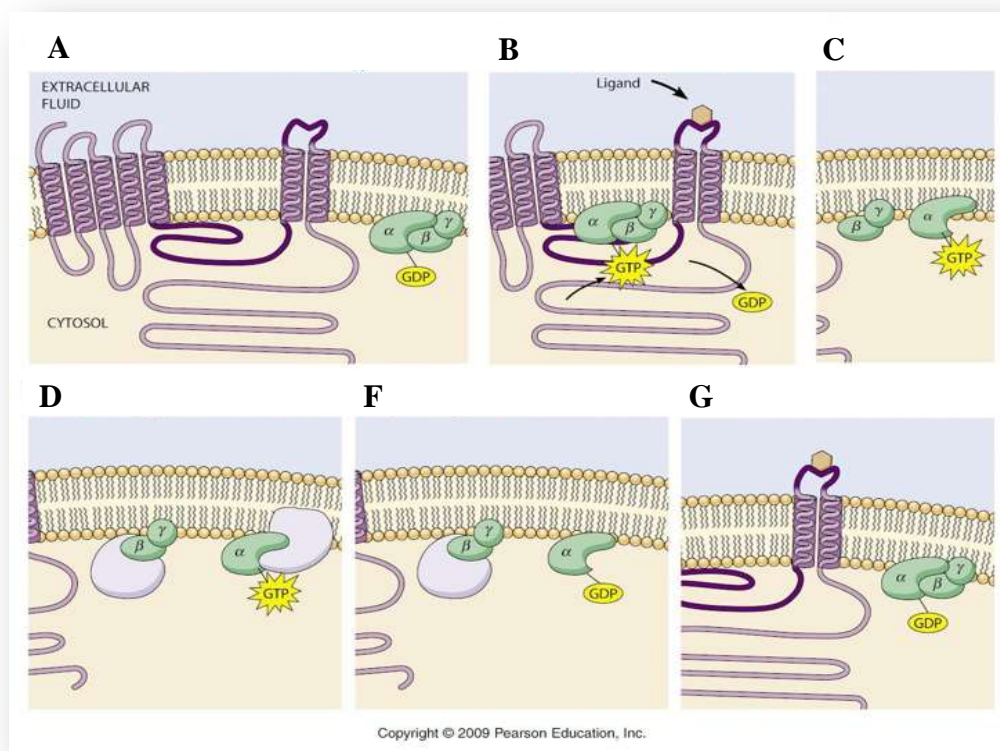


Figura 8. Mecanismo de transducción de señales de los GPCRs. A) Estado de reposo. B) El receptor unido a ligando, se libera GDP, G_{α} adquiere a GTP. C) Separación de las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$. D) La subunidad G_{α} activa o inhibe su proteína diana E) La hidrólisis de la subunidad G_{α} que contiene el GTP cambia a GDP y devuelve a su estado inactivo. F) Se recombinan las subunidades de la proteína G.

Desde su descubrimiento se ha considerado a estas proteínas como unos “interruptores moleculares” capaces de “encender” o “apagar” la actividad de otras moléculas. En realidad el proceso es más complicado ya que estas proteínas sólo ejercen su actividad cuando ellas mismas están activadas y ese tiempo, como se comentará a continuación, es determinado. En el estado inactivo la proteína G presenta una elevada afinidad por el GDP, no es hasta que un receptor activado por un ligando induce un cambio conformacional en la proteína G cuando se favorece la salida del GDP, dando lugar a un estado neutro de activación transitorio que termina con la rápida entrada de GTP en el complejo. Al aumentar la afinidad por el GTP también disminuye la interacción entre la subunidad α y el complejo estable $\beta\gamma$. De este modo tanto la subunidad α , unida a GTP, como el dímero $\beta\gamma$ ejercen sus efectos singulares sobre sus correspondientes dianas. Sólo mientras la subunidad α está activada (unida a GTP) es capaz de ejercer estos efectos, sin embargo, en este estado también es capaz de catalizar la hidrólisis de GTP a GDP, siendo la tasa de hidrólisis de cada proteína G la que determina el tiempo que este sistema esté activado. Una vez que se ha producido esta hidrólisis la subunidad α unida a GDP sufre un nuevo cambio conformacional que aumenta su afinidad por el complejo $\beta\gamma$, volviendo el sistema completo al estado inactivo o “apagado”. Este sistema permite que se amplifique la señal, obteniéndose a partir de un único mensajero primario la liberación de múltiples mensajeros secundarios en el citosol. Por último, otras proteínas de esta familia no están ligadas a GPCRs, como p21Ras, y en ellas el intercambio GDP por GTP y la posterior hidrólisis de éste están regulados por otras proteínas denominadas GNRP (guanine release proteins) y GAP (GTPase-activating proteins). Esta familia de proteínas está formada por unos cien miembros. Además existen 5 subtipos de subunidades β y 14 tipos de subunidades γ (Milligan G, Kostenis E. 2006). Dado que cada subunidad ejerce una influencia característica sobre su(s) sistema(s) efector(es) y que una proteína G está

formada por tres subunidades, la respuesta a una determinada señal podría variar en función del tipo de célula que la reciba y de las proteínas G acopladas a ese hipotético receptor, lo que confiere al sistema, además de una gran capacidad de amplificación, una gran flexibilidad de respuesta.

Regulación de los GPCRs

Está establecido que la mayoría de los GPCRs se regulan por fosforilación. Desde un punto de vista clásico, el fenómeno de la regulación de los GPCRs se ha asociado con los procesos de desensibilización como consecuencia de la exposición de estos receptores a su ligando, los cuales implican el desacoplamiento del receptor de las proteínas G efectoras (Hausdorff WP *et al.* 1989), la internalización del receptor a compartimentos intracelulares (Trejo J. 2005) y la disminución del número de receptores debido a una menor tasa de síntesis así como una disminución en su expresión (Pak Y *et al.* 1999). Este mecanismo de desensibilización protege frente a la sobre-estimulación aguda y crónica, aunque el concepto de exposición aguda a agonista varía entre cada receptor, observándose que algunos se desensibilizan en minutos mientras que otros receptores necesitan horas de activación para observarse esta pérdida de respuesta (Tsao P *et al.* 2001).

Las primeras quinasas encontradas capaces de mediar estos procesos de fosforilación fueron quinasas dependientes de segundo mensajero, como la PKA o la PKC. Sin embargo, el modelo evolucionó tras el descubrimiento de una nueva quinasa capaz de medir fenómenos de desensibilización independiente de segundos mensajeros (Benovic y col., 1986 y Kelly E *et al.*, 2008). Esta quinasa se englobó con posterioridad dentro de una familia de quinasas intracelulares denominadas GRK (del inglés, G protein-coupled receptor kinase). Sin embargo, la fosforilación del GPCR producida por estas quinasas no era condición suficiente para que se produjera la desensibilización, sino que esta fosforilación promueve la unión de unas proteínas denominadas β -arrestinas (Loshe MJ *et al.* 1990) que desacoplan los receptores de las proteínas G iniciando así la desensibilización de la respuesta. Estas proteínas, al funcionar como adaptadores moleculares, marcan al receptor al que se han unido para que sufra un proceso de endocitosis por vesículas de

clatrina. Una vez internalizados, la mayoría de los GPCR son desfosforilados en compartimentos endosomales y bien son reciclados de nuevo a la membrana plasmática, se envían a lisosomas para su degradación o, en algunos casos, se retienen en endosomas para ser reciclados lentamente a la superficie celular (Dhami GK, Ferguson SS. 2006). Ahora se han descrito otros mecanismos moleculares de desensibilización más complejos que dependen del tipo de receptor estudiado, como por ejemplo la internalización en caveolas (Kelly E. *et al.* 2008).

Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos (ARs) pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Veulens, Rodríguez, 2009), encontrándolos en la subfamilia A según la clasificación de la IUPHAR antes mencionada. La familia de los ARs incluye nueve productos de genes diferentes:

- Receptores β :
 - Receptor β_1
 - Receptor β_2
 - Receptor β_3
- Receptores α_1 :
 - Receptor α_1A
 - Receptor α_1B
 - Receptor α_1D
- Receptores α_2 :
 - Receptor α_2A
 - Receptor α_2B
 - Receptor α_2C

Los receptores adrenérgicos median los efectos funcionales de catecolaminas, como la epinefrina y la norepinefrina. Las catecolaminas son neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo. Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina,

la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Contienen un grupo catecol y un grupo amino. El precursor de todos ellos es la tirosina, que se usa como fuente en las neuronas catecolaminérgicas (productoras de catecolaminas). La adrenalina y noradrenalina median las funciones del sistema nervioso simpático mediante la activación de receptores adrenérgicos (ARs) acoplados a proteínas G. En cuanto a la fijación de ligandos, marcación y mutagénesis de sitio dirigido han mostrado que las regiones de ampliación de transmembrana conservadas tienen una participación crucial en la fijación de ligandos (Strader et al., 1994; Hutchins, 1994). Estas regiones parecen crear un saco para la fijación de ligandos que colocan las catecolaminas en sentido horizontal o perpendicular respecto a la bicapa lipídica. Cada subtipo muestra mayor preferencia por una clase particular de proteínas G, por ejemplo, los receptores adrenérgicos $\alpha 1$ a Gq, los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ a Gi y los receptores adrenérgicos β a Gs.

Receptores adrenérgicos β :

Los tres receptores β comparten una identidad de secuencia de aminoácidos cercana a 60% dentro de las regiones transmembrana, donde se encuentra el saco de fijación de ligandos para adrenalina y noradrenalina. Con base en resultados de mutagénesis de sitio dirigida, se han identificado aminoácidos individuales en el receptor adrenérgico $\beta 2$ que interactúan con cada uno de los grupos funcionales sobre la molécula agonista de catecolamina (Goodman & Gilman. 2007).

Los receptores β regulan innumerables respuestas funcionales que incluyen la frecuencia y la contractilidad cardíacas, la relajación de músculo de fibra lisa y múltiples funciones metabólicas. Los tres subtipos de receptores β ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) se acoplan a Gs y activan la adenilciclase. Sin embargo, datos recientes sugieren diferencias en las señales “corriente abajo” y fenómenos activados por los tres receptores β . Las catecolaminas estimulan la regulación retroalimentaria de receptores β , es decir, sensibilización y regulación negativa de los receptores adrenérgicos β (Goodman & Gilman. 2007).

Los receptores β difieren en el grado en que experimentan dicha regulación y el más susceptible es el receptor $\beta 2$. La estimulación de los receptores adrenérgicos β culmina en

la acumulación de AMP cíclico, la activación de PKA y la alteración de la función de innumerables proteínas celulares como consecuencia de su fosforilación. Además, Gs intensifica directamente la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje en la membrana plasmática del músculo de fibra estriada y el cardíaco (Goodman & Gilman. 2007).

Receptores adrenérgicos α :

Las secuencias “deducidas” de aminoácidos a partir de los tres genes de receptores de $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$) y los tres genes del receptor $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$) concuerdan con el paradigma establecido para GPCR. Aunque no se han investigado tan a fondo como los receptores β , los aspectos estructurales generales y su relación con la función de la fijación del ligando y la activación de proteína G parecen concordar con los establecidos sobre los receptores β . Dentro de los dominios transmembrana, los tres receptores $\alpha 1$ comparten una identidad aproximada de 75% en cuanto a residuos aminoácidos, al igual que los tres receptores $\alpha 2$, pero los subtipos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ no son más semejantes que lo que son los subtipos α y β (aproximadamente 30 a 40%) (Goodman & Gilman. 2007).

Receptores adrenérgicos α_1 :

Los receptores adrenérgicos alfa-1 (α_1 ARs) son receptores adrenérgicos presentes en la membrana plasmática de ciertas células, cuya función principal es la vasoconstricción; juegan un papel importante en la fisiología normal y en muchos estados de enfermedad y la comprensión de sus vías de señalización y los mecanismos de regulación es de importancia considerable, en particular para la identificación de dianas farmacológicas para la modulación terapéutica (Toews ML *et al*, 2003).

En humanos, los receptores α_1A , α_1B y α_1D están codificados por distintos genes que se encuentran localizados en los cromosomas 8, 5 y 20 respectivamente (Guimarães S, Moura D. 2001). Los subtipos de α_1 ARs se expresan en varios órganos, incluidos cerebro, corazón, vasos sanguíneos, el hígado, los riñones, la próstata y el bazo, en el que

intervienen una gran variedad de efectos funcionales, tales como la modulación de la neurotransmisión, la vasoconstricción, inotropismo cardíaco (Cotecchia S. 2010). Se le atribuye también la regulación de varias funciones centrales incluyendo la transmisión sináptica, la plasticidad, la actividad motora, así como la atención y la memoria. Por ejemplo, se cree que la activación de AR- α_1 atenúa la excitabilidad piramidal de neuronas en el hipocampo, mientras que en las zonas de la corteza cerebral, la activación α_1 ARs potencia de excitación en respuesta al glutamato o acetilcolina. La activación α_1 ARs es principalmente excitatoria en regiones como el núcleo reticular talámico, dorsal de rafe y las neuronas motoras espinosas, en gran medida debido a la conductancia disminución de potasio. Estas características funcionales implican una complejidad creciente de la señalización y la regulación de los subtipos de α_1 ARs que podrían representar la base mecánica de su especificidad funcional en diversos tejidos (Cotecchia S. 2010).

El discernimiento de la función de los α_1 ARs se expresa en respuesta del crecimiento en los tejidos que expresan varios subtipos de receptores y se ve obstaculizada por la falta de agonistas selectivos para los α_1 ARs. Una complejidad añadida en el estudio de la función específica de los subtipos α_1 ARs en las respuestas a largo plazo es la observación de que AR- α_1 endógenos están regulados diferencialmente por los agonistas expuestos de las células musculares lisas vasculares y del miocardio. (Waldrop BA *et al.* 2002).

En general, los receptores acoplados a proteínas G han emergido como una clase de factores de crecimiento que pueden modular las vías de señalización de control de la proliferación celular. (Allen LF *et al.* 1991). Y aunque se sabe poco sobre el mecanismo molecular por el que distintos subtipos de α_1 ARs regulan la proliferación celular, en el 2004 González-Cabrera y colaboradores encontraron en fibroblastos Rat-1, cuyas vías están estimuladas por α_1 ARs, que la activación por epinefrina altera la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, entre estos genes se incluyen: ciclina E, la ciclina D1, ciclina B, quinasas dependientes de ciclina (CDK2 y CDK1), antígeno de proliferación nuclear (PCNA), promotor de Cdc2, inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (p27_{Kip1}, p21_{Cip1}) y ADN polimerasas I-IV (Tabla 2). Estos productos de los genes son

reguladores clave de la progresión del ciclo celular a través de la fase G1, la transición en la fase S (síntesis de ADN), y la progresión a través de la fase G2 antes de la mitosis (M). Y de acuerdo a lo mencionado en el capítulo 2.2 la progresión a través de G1 se da por la formación y la activación de los complejos ciclina/CDK, predominantemente de ciclina D/CDK 4-6 y ciclina E/CDK2. Además de la unión de subunidades reguladoras (ciclinas), la actividad de las enzimas CDK está regulada por la fosforilación-desfosforilación y la interacción con los inhibidores de CDK (CKIs), incluyendo p27^{Kip1} y p21^{Cip1}. Estos últimos son reguladores negativos de la actividad CDK, que se unen a los complejos ciclina/CDK y conducen a la detención del ciclo celular. Los receptores adrenérgicos α_1A y α_1D fueron encontrados como inhibidores de genes involucrados en la síntesis y en el control de la progresión a través de las fases del ciclo celular y por tanto arrojando el ciclo celular, en contraste, el receptor adrenérgico α_1B causa una desregulación o avance en el ciclo celular.

Gen	$\alpha_{1A}AR$	$\alpha_{1B}AR$	$\alpha_{1D}AR$
Ciclina E	- 3.3 ± 0.7	SC	- 4.4 ± 0.2
CDK2-α	- 2.4 ± 0.7	SC	- 4.1 ± 0.3
PCNA	- 2.1 ± 0.1	SC	- 3.3 ± 0.0
DNA pol. Subunidad αI	- 2.5 ± 0.1	SC	- 2.0 ± 0.1
DNA pol. Subunidad αII	- 4.9 ± 1.0	SC	- 3.9 ± 1.0
DNA pol. Subunidad αIII	- 2.6 ± 0.5	SC	- 4.2 ± 0.2
DNA pol. Subunidad αIV	- 2.6 ± 0.1	SC	- 4.2 ± 0.1
Ciclina B	- 4.0 ± 0.1	SC	- 6.7 ± 1.0
Promotor de Cdc2	- 2.4 ± 0.3	SC	- 3.5 ± 0.1
CCND1	SC	7.3 ± 0.4	SC
Ciclina D1	SC	4.8 ± 0.7	SC
p27^{Kip1}	13.7 ± 1.2	6.5 ± 1.2	13.4 ± 0.7
p21^{Cip1}	SC	4.7 ± 1.7	SC

Tabla 2. **Expresión de genes del ciclo celular.** Cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular luego de la exposición de los α_1ARs a epinefrina (10 μM , 1h). Los datos indican un incremento (valores positivos) o un decremento (valores negativos) en la transcripción de

los genes antes mencionados. Dichos cambios son en comparación con células no transfectadas. SC, sin cambios; Pol, polimerasa.

Receptor Adrenérgico α_1B :

Los receptores Adrenérgicos α_1B (α_{1B} ARs) acoplan a las proteínas $G_{q/11}$, al unir a sus agonistas, y llevan a la activación de diversas rutas de señalización como lo son la de la Fosfolipasa C (PLC) y la estimulación de la hidrolisis fosfoinositido (PI), con aumentos en el Calcio intracelular libre y la activación de proteína quinasa C (PKC), siendo estos algunos de los eventos clásicamente descritos de su función (Toews ML. 2003).

El receptor adrenérgico α_1B puede funcionar como un protooncogen y ser activado por alguna alteración mutacional. La alteración mutacional de aminoácidos claves en el carboxilo terminal del tercer bucle intracelular, importante para el acoplamiento de la proteína G, puede llegar a ser un mecanismo generalizado para la inducción de la actividad constitutiva y la activación de este protooncogen. En el caso del receptor adrenérgico α_1B , la sustitución de tres residuos de aminoácidos: Arg²⁸⁸ - Lys, Lys²⁹⁰ - His, and Ala²⁹³ - Leu. In vivo, estas mutaciones se pueden presentar espontáneamente alterando la función normal de estos receptores y resultando en estados de enfermedades en las cuales existe un crecimiento celular incontrolado, es decir, se encuentra asociados a cáncer. Además la identificación de tales receptores mutantes puede proporcionar marcadores específicos de la enfermedad y metas terapéuticas para intervención (Allen LF *et al.* 1991).

En el 2011 Gutiérrez-Fernández y colaboradores encontraron una interacción de la proteína eIF3f y el α_{1B} AR en un complejo de 105 kDa en la línea celular A-549. El hecho de que eIF3f presente un perfil bifásico circunscrito a las fases S y G2/M del ciclo celular (véase capítulo 2.2 eIF3f) y que ahora se conozca que α_1 ARs regulan la proliferación celular alterando la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, sugiere que

el complejo proteínico formado por eIF3f y el receptor adrenérgico α_1B participa en el ciclo celular.

Por otro lado un estudio reciente mostro que al estimular los α_1ARs con los agonistas fenilefrina y noradrenalina activan a la proteína Akt mediante la fosforilación de su serina 473 (Strittmatter F *et al.* 2012). La proteína quinasa B o también denominada Akt es una serina/treonina quinasa que tiene un rol crucial en el balance celular de supervivencia o apoptosis. Akt constituye un nodo importante en diversas cascadas de señalización corriente abajo de los receptores celulares, juega un papel importante en procesos tales como la proliferación y supervivencia celular, transcripción y síntesis de proteínas y la progresión a través del ciclo celular (Liao Y, Hung MC. 2010).

En el año 2010 Shanmugasundaram y colaboradores describieron una ruta de transducción de señales que lleva como producto final la destrucción de un regulador clave del ciclo celular, la proteína p27^{kip}, en la que interviene como uno de los intermediarios de la vía la proteína Akt activada (fosforilada en la serina473) (Figura 9). La vía comienza con la activación de la proteína PI3K (fosfoinositol 3 quinasa), son enzimas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de las moléculas llamadas en conjunto fosfatidilinositol (PIP2). La fosforilación de PIP2 o su cambio a PIP3 activa a la proteína denominada mTORC2. mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es una serina treonina kinasa que toma su nombre por encontrarse blanco de la rapamicina (inmunosupresor utilizado para el rechazo de trasplantes), y controla procesos celulares de supervivencia. Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (también llamado complejo *mTOR-1* o *mTORC1*), que se define por su interacción con la proteína Raptor ("*regulatory-associated protein of mTOR*"), y un complejo insensible a rapamicina (también llamado complejo *mTOR2* o *mTORC2*), que se define por su interacción con Rictor ("*rapamycin-insensitive companion of mTOR*"). Al contrario que mTORC1, que fosforila los efectores de mTOR como la quinasa S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 4EBP1 (por medio de eIF3f), mTORC2 controla el citoesqueleto de actina así como a la proteína Akt. La vía de mTOR se encuentra regulada entonces en células eucarióticas a través de la vía PI3K/Akt y es

estimulada en respuesta a mitógenos y nutrientes. Al activarse la proteína Akt esta promueve a su vez una fosforilación en la proteína Skp2 (descrita en el capítulo 2.1 proteína p27^{kip}), una vez activada la proteína se une a su complejo SCF para adicionar moléculas de ubiquitina a la proteína p27 y subsecuentemente su degradación en el proteosoma 26S.

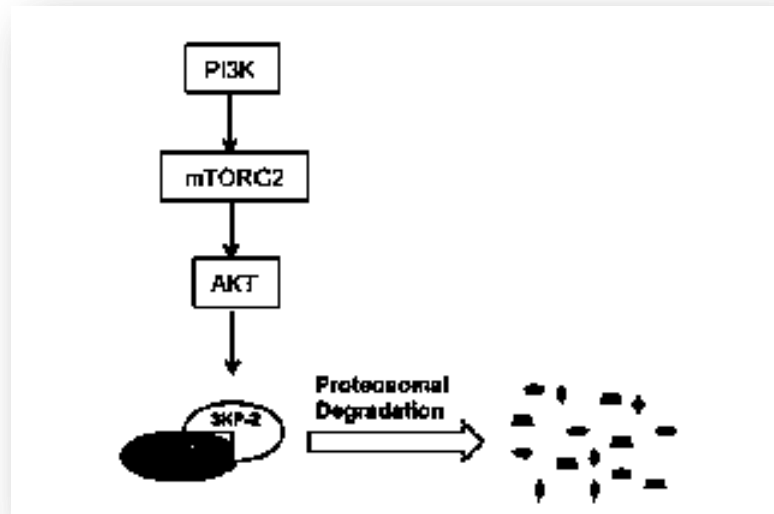


Figura 9. **Ruta de señalización para la degradación de p27.** PI3K regula la actividad de mTORC2 que altera el balance entre la proteína SKP-2 y p27, llevando a esta última a su destrucción. (Shanmugasundaram et al, 2010)

Derivado de que la ruta de señalización propuesta por Shanmugasundaram y colaboradores lleve a la destrucción de un regulador clave del ciclo celular como lo es p27 en la fase S del ciclo celular, momento justo donde aparece uno de los picos máximos de la expresión de eIF3f, y además que dicha vía tenga como uno de sus intermediarios a la proteína Akt que ahora se sabe su activación es controlada por los receptores adrenérgicos α_1 . Nos lleva a preguntarnos sí; ¿La interacción de eIF3f/receptor adrenérgico α_1 está

involucrada en la vía de señalización que tiene como producto final la destrucción de la proteína p27?

Capítulo III – Justificación

Los antecedentes de eIF3f indican que se asocia a membrana y específicamente al receptor Adrenérgico α_{1B} , el conocimiento de las vías de señalización de la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico α_{1B} en células humanas nos permitiría profundizar en el entendimiento de las funciones que desempeñan durante el ciclo celular.

Capítulo IV – Hipótesis

La relación que se establece entre eIF3f/Receptor adrenérgico α_{1B} en células humanas participa en la modulación de la vía de señalización PI3K/mTORC2/Akt para la destrucción de la proteína p27 durante el ciclo celular.

Capítulo V – Objetivos

5.1 - Objetivo general

Determinar si la interacción entre eIF3f/Receptor adrenérgico α_{1B} en células humanas participa en la modulación de la vía de transducción de señales PI3K/mTORC2/Akt durante el ciclo celular.

5.2 – Objetivos específicos

- 1.- Determinar si existe la asociación de eIF3f/Receptor adrenérgico α_{1B} en células en estado proliferativo (fibroblastos y linfocitos).
- 2.- Determinar, durante la división celular, de qué manera se afecta la expresión de genes específicos de la vía de regulación PI3K/mTORC2/Akt/p27 al modificar la expresión de eIF3f y el receptor adrenérgico α_{1B} .
- 3.- Determinar si existe algún efecto en la expresión de los genes de la vía de regulación PI3K/Akt/mTORC2/p27 al antagonizar y agonizar al Receptor adrenérgico α_{1B} .

Capítulo VI – Materiales y Métodos

6.1 - Material Biológico

Para la identificación de la vía de transducción de señales modulada por eIF3f/Receptor adrenérgico $\alpha 1B$ se utilizaron como modelos de estudio a elegir las líneas celulares A-549 y Ramos; de origen humano y con un nivel de bioseguridad 1. La línea celular A-549 proviene de un adenocarcinoma pulmonar y su morfología de crecimiento en cultivo es adherente. La línea celular Ramos proviene de un linfoma de Burkitt y su morfología de crecimiento en cultivo es el de linfocitos B en suspensión.

Las dos líneas celulares se propagan en Medio Mínimo Esencial (MEM por sus siglas en inglés) de Sigma, suplementado con NaHCO_3 18 mM (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma), 10 Hepes mM (Sigma), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen). Los cultivos se mantienen en este medio con una atmósfera de CO_2 al 6% a 37°C, realizando recambio de medio de dos a tres veces por semana y manteniendo la concentración celular en la fase log de crecimiento. Para la criopreservación (nitrógeno líquido) de células se utiliza una mezcla del 80% del mismo medio MEM suplementado, con SFB al 10% y DMSO (Dimetil sulfóxido) al 10 %.

6.2 – Técnicas celulares

Mantenimiento y manejo de las líneas celulares A-549 y Ramos.

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

Descongelado de células

Se descongela al criovial en termobañó a 37°C y se transfieren las células a un frasco T-75 cm² ó T-25 cm² con 5 ml ó 15 ml, respectivamente, de medio MEM-SFB 10%, que se atempera previamente en incubadora a 37°C y 6% de CO₂ por 10 minutos. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja para oxigenar y que los gases circulen en su interior permitiendo así que el medio alcance las condiciones de pH 7.5. Cuando el cultivo llega a la población esperada se resiembra.

Resiembra

Se descarta el medio viejo del cultivo y se hacen 2 lavados con 2 ml de PBS 1X frío por cada 25cm². Para desprender las células se impregnan con 0.5 ml de una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25cm² y se incuba a 37°C por 2-5 minutos (esto únicamente para la línea celular A-549). Enseguida se resuspenden las células con 2 ml de medio MEM-SFB10%, se calcula la concentración y viabilidad celular para determinar el volumen a tomar de la cosecha y resembrar a una concentración inicial de 0.2X10⁶ células por cada mililitro para un frasco T-25cm² ó 0.6X10⁶ células por cada mililitro para T-75cm². El volumen determinado de resiembra se deja en el frasco y se descarta el resto, se agrega al frasco MEM, 5 ml en T-25 ó 15 ml en T-75. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja.

Determinación de concentración celular y viabilidad

Cada muestra de cultivo se lava 2 veces con una solución tampón de fosfatos (PBS) estéril con un pH de 7.4 a 1M. Las células se desprenden con tripsina, añadiendo 0.5 ml del regulador por cada 25 cm² de superficie de cultivo y posteriormente es incubando a 37°C por un lapso de 3 min. Para inhibir la acción enzimática de la tripsina se añaden 3.5 ml de medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Las células resuspendidas se dividen en tres tubos y se realiza una dilución 1:1 con el azul de tripano, para realizar la determinación por triplicado. Las células viables no permitirán el paso del colorante a través de la

membrana celular, mientras que las células no viables se tiñen de azul. Se transfiere una pequeña cantidad de la mezcla a una cámara de Neubauer, dejando que la cámara se llene por capilaridad. La cámara de Neubauer se coloca en un microscopio óptico invertido (LEICA) a 40X y se cuentan las células vivas y muertas encontradas en el cuadro del centro y en los cuatro cuadrados de las esquinas de ambos lados de la cámara. La concentración celular se determina de la siguiente forma:

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

Donde:

FC = Factor de conversión de la cámara = 0.001

FD = Factor de dilución

Y:

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

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

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{No. de células viables} / \text{No. de células totales}) * 100$$

Sincronización de cultivos

Para sincronizar el cultivo durante tiempos y fases específicas del ciclo celular se le agrega al cultivo un agente sincronizante, se incuba a 37°C y 6% de CO₂ y posteriormente se libera el cultivo mediante tres o más lavados con medio de cultivo fresco.

La sincronización y la acumulación de las células en fase S se llevó a cabo mediante la adición de afidicolina 0.5µg/uL. Después de 36 h de arresto con el agente sincronizante

para la línea celular A-549, se procedió a su liberación mediante dos lavados con el buffer PBS, para luego coleccionar las muestras antes (0 h), durante (1 h) y después (6 h) de la expresión máxima de eIF3f.

Transfección

La transfección se realizó utilizando el plásmido pMSG subclonado y orientado con secuencias sentido y antisentido para el caso de eIF3f.

Agregar imágenes del plásmido

La transfección para el receptor adrenérgico $\alpha 1B$ se realizó con el plásmido...

Las transfecciones se realizaron en la línea celular A-549, a partir de Cultivos con una confluencia del 80%. Se utilizó como agente de transfección la Lipofectamina2000. Para cada millón de células se utilizan 5 μ g de DNA (plásmido a transfectar) y 5 μ L Lipofectamina2000 en medio OptiMEM. En el caso específico de la transfección de eIF3f sentido y antisentido se utilizó además 0.1 μ M de dexametasona (utilizado para desenrollar el promotor del plásmido). Se incubaron a 37°C y 6% de CO₂ durante 36-48hrs. Y se procede a cosechar las células haciendo primero 3 lavados con solución de PBS. Para desprender las células se impregnan con 0.5 ml de una solución de tripsina (Sigma) por cada 25cm² y se incuban a 37°C por 2-5 minutos. Luego se coleccionan las células en tubos eppendorf para su posterior uso.

Agonismo y antagonismo del receptor adrenérgico

El fármaco de elección para el agonismo del $\alpha 1B$ -RA fue adrenalina. Para el caso del Antagonismo se utilizó prazosina. Se agregó a los cultivos celulares de A-549 10⁻⁷ Molar y se dejaron los cultivos por al menos 40 horas antes de cosechar las células.

Cosecha y Lisis celular

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

- Para los frascos T25 y T75: se descarta el medio de cultivo. Para desprender las células se impregnan con 0.5 ml de una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25cm² y se incuba a 37°C por 2-5 minutos (esto únicamente para la línea celular A-549). Luego se pasan las células a un tubo falcon y se centrifugan a 250 g durante 5 min. Luego se realizan dos lavados con PBS con 2 ml de PBS 1X frío por cada 25cm², entre cada lavado se repite el procedimiento de centrifugar a 250 g durante 5 min. Después del segundo lavado y centrifugación se decanta el PBS y el pellet celular se resuspende y se pasa a un tubo eppendorf y se agregan 20 volúmenes de buffer de lisis (P1 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagen). Las células se agitan en shaker 900-1200 rpm durante 10 minutos. Luego se centrifugan las muestras a 20000 g durante 15 min con la finalidad de quedarnos únicamente con el sobrenadante, almacenándose a -70 °C.
- Para los platos (10cm²) Se descarta el medio viejo del cultivo y se hacen 2 lavados con PBS 1X frío (esto utilizando una pipeta para hacer los descartes). Para desprender las células se resuspenden en 20 volúmenes de buffer de lisis (P1 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagen) y se realiza un raspado al plato con un policia hasta desprender (pudiendo verificar este proceso en el microscopio), una vez desprendidas se transfieren a un tubo eppendorf se centrifuga a 20000 g durante 15 min con la finalidad de quedarnos únicamente con el sobrenadante, almacenándose a -70 °C.

Determinación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y utilizando albúmina sérica de Bovino (BSA) como estándar. Para el Blanco buffer lisis se utilizaron: 799 µL de agua destilada estéril, 1 µL de proteoJET y 200 ml de reactivo de

Bradford. La absorbancia se determinó a 595 nm de longitud de onda. A cada una de las absorbancias de los lisados se le restó la absorbancia del buffer de lisis y a la absorbancia resultante se sustituyó con la ecuación de la recta obtenida de nuestra curva estándar:

$$Y = 57.333X + 0.3136$$

Donde:

X = Absorbancia de la muestra y

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

Ensayo Western Blot

Electroforesis

El corrimiento electroforético se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando el gel separador al 10% y el gel concentrador al 5%. De cada lisado se cargaron 20 µg de proteína en el gel para separar las muestras; el corrimiento electroforético se realizó (solución SDS/Glicina/Trisbase a pH 8.3) a 80V de 90 a 120 min.

Transferencia

Luego de la electroforesis los geles se colocan en buffer Towbin o de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) con agitación recíproca de 3 a 5 min, mientras que por otro lado la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se hidrató en MeOH con agitación recíproca durante 20 seg, se lavó dos veces con agua tridestilada y se colocó en buffer Towbin con agitación recíproca por 5 min. La proteína fue transferida a una membrana de PVDF, colocando el gel en un “emparedado” de papeles filtro humedecidos previamente en buffer Towbin que llevó el siguiente orden ascendente dentro de una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad trans-blot SD semi-dry transfer cell): papel Criterion, papel Bio-Rad 920, membrana PVDF, gel de poliacrilamida, papel Bio-Rad 920 y Criterion, eliminando las burbujas en cada capa. Se limpió el exceso de buffer de la placa de transferencia, se cerró la cámara y se corrió por 60 min a 20 V. La membrana se

dejó secar por 30 min, se hidrató con MeOH, se lavó dos veces con agua tridestilada y se colocó en TBS 1X durante 5 min para su posterior bloqueo.

Bloqueo e incubación de anticuerpos

El bloqueo se llevó a cabo en solución de leche en polvo sin grasa al 5%, Tween 20 al 0.05%, disuelto en TBS 1X o en una solución de BSA (albúmina sérica de Bovino) al 4% disuelto en TBS-T (TBS más Tween 20 al 1%) ambas en un lapso entre 60 y 120 min a T.A con agitación recíproca suave. Una vez terminado el bloqueo se desechó la solución de bloqueo y se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla no 3). La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C en agitación suave. El anticuerpo es disuelto en solución de bloqueo y en un volumen que cubra la membrana.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Marca
Akt Ser473	Conejo	1:500	Biolegend
Akt Total	Conejo	1:1000	Biolegend
eIF3f	Conejo	1:1000	Biolegend
GAPDH	Ratón	1:2000	Millipore
P27	Conejo	1:1000	Biolegend
RA α1A	Cabra	1:1000	
RA α1B	Cabra	1:500	
RA α1D	Cabra	1:1000	
S6K	Conejo	1:1000	

Tabla 3. **Anticuerpos primarios.**

Luego de la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 5 lavados de 7 min cada uno con TBS-T (TBS más Tween 20 al 1%), con agitación vigorosa. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) (volumen a cubrir membrana) en agitación suave durante 60 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 4 lavados de 6 min cada uno con TBS-T en agitación vigorosa. Los anticuerpos secundarios se unen a una región específica de los anticuerpos primarios y además están unidos a peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza cataliza la oxidación del luminol en

presencia de peróxido de hidrógeno, reacción que genera luz. Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la exposición a la luz que se desprende en la reacción permite detectar la actividad enzimática.

Anticuerpo secundario	Origen	Dilución	Marca
HRP anti-conejo	Cabra	1:2000	SantaCruz
HRP anti-ratón	Cabra	1:2000	Biolegend
HRP anti-cabra		1:2000	

Tabla 4. **Anticuerpos secundarios.**

Revelado y digitalización

Una vez terminados 4 lavados se impregnó la membrana con solución de detección del kit de revelado ECL Plus Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (Amersham) que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó la membrana por 1 min y se fijó sobre egapack dentro un cassette. En cuarto oscuro se colocó una película de rayos X sobre la membrana, cerrando entre 5 y 10 minutos el cassette. Finalmente la película se reveló (soluciones de revelado FujiFilm), se enjuagó en agua destilada, se colocó en solución fijadora por aproximadamente 2 min y se volvió a enjuagar. Una vez seca la película se procedió a digitalizar la señal en el software de Kodak Digital Science ID.

6.3 - Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos tres veces y cada muestra se tomó por triplicado, para determinar promedios y desviaciones estándar a cada muestra. Para la comparación de variables numéricas se utilizará la prueba t de Student y se consideraran diferencias estadísticamente significativas las asociadas a un valor de $p \leq 0.05$

Capítulo VII – Resultados

7.1 – Complejo proteínico en células en estado proliferativo

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar si la asociación de la proteína eIF3f y el receptor adrenérgico α_{1B} ($\alpha_{1B}AR$) es una característica celular humana o solo está presente en las líneas celulares continuas.

Para poder determinar la expresión del complejo eIF3f/ receptor adrenérgico α_{1B} se utilizó una línea celular primaria normal humana de células epiteliales de vías respiratorias ATCC:PCS-301-010 cuyas propiedades de crecimiento son adherentes.

7.2 – Determinación de la vía de transducción de señales

Elección de la línea celular

Primero se llevó a cabo la elección de la línea celular para los procesos experimentales, entre la línea celular A-549 y la línea celular Ramos. Para ello se llevó a cabo la determinación de la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 , buscando que la línea celular de elección tuviera una mínima expresión de los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1D} , debido a que uno de los objetivos del presente trabajo era evaluar la vía de transducción de señales mediante el agonismo y antagonismo del receptor adrenérgico α_{1B} , y debido a la falta de agonistas y antagonistas selectivos para este receptor, se buscaba una mínima expresión de los receptores adrenérgicos antes mencionados. Para esto se utilizaron cultivos asincrónicos de ambas líneas celulares sin tratamiento posteriores y se evaluó la expresión mediante experimentos tipo Western blot.

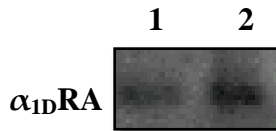


Figura 10. Expresión del receptor adrenérgico α_{1D} ($\alpha_{1D}RA$). Se muestra **1** la línea celular A-549 y **2** la línea celular Ramos.

Al realizar la determinación de la expresión para el receptor adrenérgico α_{1A} no se obtuvo señal en el Western blot para ninguna de las líneas celulares (dato no mostrado). En cuanto al receptor adrenérgico α_{1D} se muestra **xxx** más expresado en la línea celular Ramos (figura 10), por lo cual, se decidió por la línea celular A-549 como modelo de elección.

Modificación de la expresión de eIF3f

Una vez elegida la línea celular, se procedió a modificar la expresión de la proteína eIF3f sobreexpresándola o silenciándola en cultivos celulares asincrónicos A-549. Obtenidas las muestras de proteína se realizó la evaluación de cada uno de los componentes de la vía de transducción de señales propuesta por medio de experimentos tipo western blot. Al sobreexpresar eIF3f en cultivos asincrónicos se encontró que hay una modificación de la proteína p27

En cultivos asincrónicos, se obtuvo un 47% de aumento en la expresión de eIF3f en los cultivos transfectados con la construcción sentido de eIF3f (figura 1A), en comparación con cultivos no transfectados (cultivo control). Con respecto a p27, se encontró una disminución del 89% en la expresión de la proteína p27 y una disminución de 35% en la proteína p27 marcada con una ubiquitina (p27-Ub). En cambio, en los cultivos transfectados para el silenciamiento de eIF3f (figura 1B), donde se obtuvo un 15% de disminución en la expresión de eIF3f con respecto al cultivo control, no se encontró diferencia en la expresión de p27, pero sí se encontró un aumento del 84% en la expresión de p27-Ub.

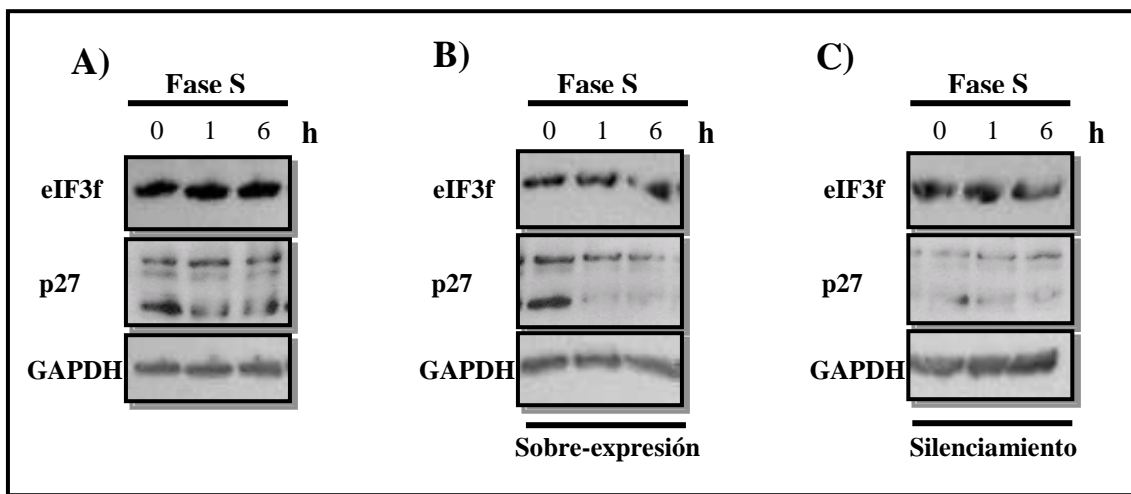
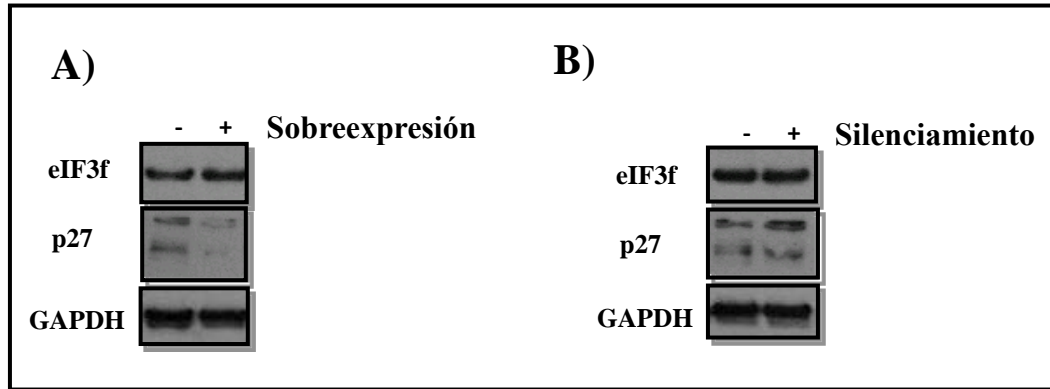


Figura 1. Expresión de p27 durante la sobre-expresión y silenciamiento de eIF3f en cultivos A549 asincrónicos. A) Cultivos A549 fueron transfectados para la sobreexpresión de eIF3f. B) Cultivos A549 fueron transfectados para el silenciamiento de eIF3f. En ambos casos se utilizó el vehículo pMSG como control; se lisaron las muestras y se determinó proteína para la posterior inmunodetección de eIF3f y p27; GAPDH se utilizó

Para relacionar el efecto de la expresión de eIF3f con la expresión y degradación de p27 durante la progresión del ciclo celular a la fase S, se sincronizaron cultivos A549 en esta fase y se liberaron para coleccionar muestras antes (0 h), durante (1 h) y después (6 h) de la expresión máxima de eIF3f. En la figura 2A se observa el comportamiento esperado (Higareda y Pardo 2010) de la expresión de eIF3f. Con respecto a p27 se observa que su

concentración es dependiente de la concentración de eIF3f; específicamente, se observa que cuando eIF3f está en su máxima expresión (1 h) la expresión de p27 disminuye un 61% (figura 2A).

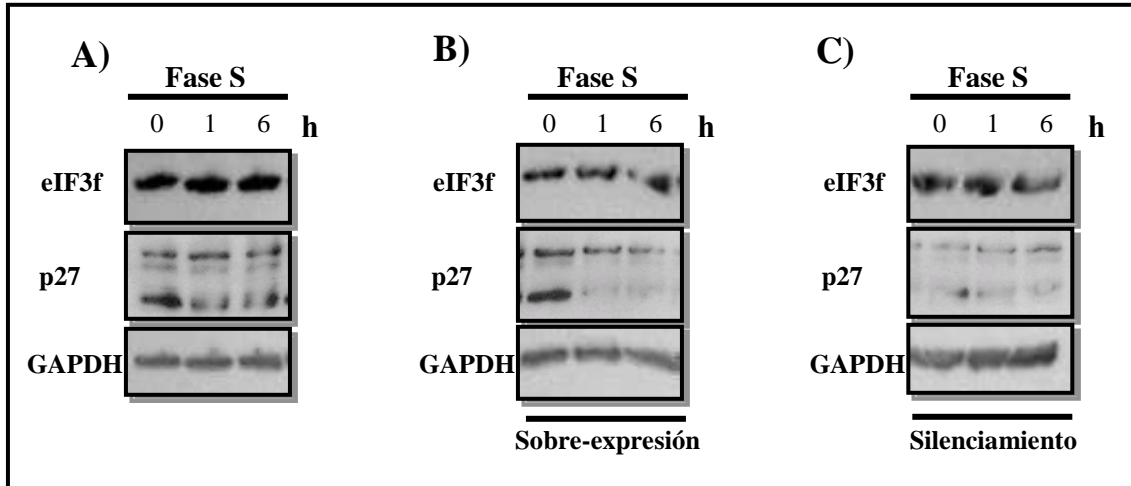


Figura 2. Expresión de p27 durante la fase S del ciclo celular y durante la sobre-expresión y silenciamiento de eIF3f en cultivos A549 asincrónicos. A) Cultivos control sin transfectar. B) Cultivos A549 transfectados para la sobreexpresión de eIF3f. C) Cultivos A549 transfectados para el silenciamiento de eIF3f. Todos los cultivos se sincronizaron en la fase S temprana del ciclo celular mediante afidicolina; se cosecharon células en la liberación del cultivo (0 h), a la primer hora y a la hora seis; se lisaron las muestras y se determinó proteína para la posterior inmunodetección de eIF3f y p27; GAPDH se utilizó para normalizar la expresión relativa de eIF3f y p27.

Este resultado se corrobora ya que durante la sobre-expresión de eIF3f (figura 2B) la concentración de p27 disminuye al aumentar la de eIF3f. Es decir, la expresión de eIF3f aumenta con respecto al tiempo (0, 1 y 6 h), mientras que la proteína p27 disminuye su expresión a la primera hora en un 90% y p27-Ub en un 29%; para la hora 6, p27-Ub disminuye en un 34% más (63%).

Comparativamente, con el silenciamiento de eIF3f (figura 2C) se observa que, mientras la expresión de eIF3f disminuye con respecto al tiempo (0, 1 y 6 h), la proteína p27 disminuye su expresión a la primera hora en un 64% mientras que p27-Ub mantiene su expresión constante al pasar el tiempo.

Capítulo VIII – Discusión

El resultado global de este trabajo nos indica que la concentración de p27-Ub es inversamente proporcional a la concentración de eIF3f. Esto se puede explicar si se considera que la expresión de eIF3f es cíclica y bifásica, con uno de sus máximos de expresión en la fase S temprana del ciclo celular (Higareda y Pardo 2010), momento que coincide con la destrucción de la proteína p27-Ub. La proteína p27 es marcada por medio de la adición de moléculas de ubiquitina en la fase G1 tardía, y es señalizada para su destrucción en la fase S del ciclo celular (Shirane *et al.* 1999). En general, un aumento en la expresión de eIF3f genera una disminución drástica en la expresión de p27, mientras la disminución de la expresión de eIF3f ocasiona un aumento en la expresión de la proteína p27, lo cual nos lleva a proponer que la proteína eIF3f se encuentra involucrada en la degradación de la proteína p27 marcada para su destrucción.

Capítulo IX - Conclusión

Los resultados sugieren que eIF3f modula la degradación de la proteína p27 durante la fase S del ciclo celular. Este hallazgo revela un nuevo actor en la regulación del crecimiento y división celular humana. Estudios posteriores son necesarios para elucidar el mecanismo por el cual eIF3f participa en la degradación de p27.

Capítulo X - Referencias Bibliográficas

A

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Barcelona: Omega S.A. pp 925.
- Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S. 1991. *G-protein-coupled receptor genes as proto-oncogenes: constitutively activating mutation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity*. Medical Sciences. 88:11354-11358.
- Aravind L, Ponting CP. 1998. *Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation*. Protein Sci. 7(5):1250-1260.
- Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. 1997. *Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly*. J Biol Chem. 272(43):27042-52.

B

- Bloom J, Pagano M. 2003. *Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation*. Semin Cancer Biol. 13(1):41-7.
- Bourne HR. 1997. *How receptors talk to trimeric G proteins*. Curr Opin Cell Biol 9(2): 134-142.
- Browning KS, Gallie DR, Hershey JW, Hinnebusch AG, Maitra U, Merrick WC, Norbury C.. 2001. *Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3*. Trends Biochem Sci. 26(5):284.
- Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR, Browning KS. 2001. *Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit*. J Biol Chem. 276(3):2122-31.

C

- Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF. 2007. *INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions*. IUBMB Life. 59(7):419-26.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. 1999. *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27*. Nat Cell Biol. 1(4):193-9.
- Castillo-Sarmiento CA. 2009. *Mecanismos de regulación de los receptores de adenosina y Metabotrópicos de glutamato en células neuronales y de glía. Implicación en procesos de excitotoxicidad y muerte celular*. Ed de la UCLM. Pp. 3-12.
- Chim CS, Liang R, Fung TK, Kwong YL. 2005. *Infrequent epigenetic dysregulation of CIP/KIP family of cyclin-dependent kinase inhibitors in multiple myeloma*. Leukemia. 19(12):2352-5.
- Cotecchia S. 2010. *The $\alpha 1$ -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation*. J Recept Signal Transduct Res. 30(6):410-9.

D

- Dhami GK, Ferguson SS. 2006. *Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis*. Pharmacol Ther 111(1): 260-271.

F

- Fan H, Penman S. (1970). *Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis*. Journal of Molecular Biology 50(3): 655-670.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG y Schioth HB. 2003. *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol 63, 1256-1272.

G

- Guimarães S, Moura D. 2001. *Vascular adrenoceptors: an update*. Pharmacol Rev. 53(2):319-56.
- Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. 2004. *Cell proliferation and cell cycle control: a mini review*. Int J Clin Pract. 58(12):1134-41.
- Gómez-Correa CA. 2013. *Análisis de fosforilación en eIF3f humano por CDK1/Ciclina B*. Trabajo para optar por el título de Maestro en ciencias de la salud. Universidad michoacana de San Nicolas de Hidalgo Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.
- Gonzalez-Cabrera P, Shi T, Yun J, Mccune DF, Rorabaugh BR, Perez DM. 2004. *Differential Regulation of the Cell Cycle by $\alpha 1$ -Adrenergic Receptor Subtypes*. Endocrinology 145(11):5157–5167
- Goodman & Gilman. 2007. *Neurotransmisión. Sistema nervioso autónomo y motor somático*. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. McGraw-Hill. Pp. 167-170.

H

- Hall MN, Raff MC y Thomas G. 2004. *Cell growth: control of cell size*. Vol. 42. Cold Spring Harbor Monograph Series. CSHL Press. China. Pp 652.
- Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC. 2006. *mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin*. EMBO J. 25(8):1659-68.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1989. *Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization*. J Biol Chem 264, 12657-12665.

- Hernández P. (2005). *Análisis estructural del gen y la proteína psif en eucariontes superiores*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 46 pp.
- Higareda-Mendoza AE, Farias A., Llanderal J, Méndez A, Pardo-Galván MA. 2003. *A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition*. Miami Nature Biotechnology Short Reports 14: 111
- Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galván MA. 2010. *Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability*. Cell Div 5: 10.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell. 123(4):569-80.
- Hutchins C. 1994. *Three-dimensional models of the D1 and D2 dopamine receptors*. Endocr. J., 1994, 2:7–23.

I

- Ikoma T, Ito T, Okudela K, Hayashi H, Yazawa T, Kitamura H. 2001. *Modulation of the expression of the Cip/Kip family of cyclin-dependent kinase inhibitors in foetal developing lungs of hamsters*. Cell Prolif. 34(4):233-41.

J

- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP y Stevens RC. 2008 *The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist*. Science 322, 1211-1217.
- Jäkel H, Peschel I, Kunze C, Weinl C, Hengst L. 2012. *Regulation of p27Kip1 by mitogen-induced tyrosine phosphorylation*. Cell Cycle 11(10):1910-1917.

K

- Kelly E, Bailey CP, Henderson G. 2008. *Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization*. Br J Pharmacol 153 Suppl 1, S379-388.
- Kolakowski LF. 1994. *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors Channels 2, 1-7.
- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Rhoads RE. 2000. *Mutually Cooperative Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF) 3 and eIF4A to Human eIF4G-1*. J Biol Chem. 275(52):41369-76.

L

- Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. 2008. *The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy*. EMBO Journal 27(8):1266-1276.
- Lee JP, Brauweiler A, Rudolph M, Hooper JE, Drabkin HA, Gemmill RM. 2010. *The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways*. Mol Cancer Res. 8(1):93-106.
- Lewin B. 2007. *Los genes codifican proteínas*. En: Genes IX . 9ª Ed. México: Jones & Bartlett Publishers. Pp. 23-36.
- Liao Y, Hung MC. 2010. *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res. 2(1):19-42.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2005. *Regulación del ciclo celular eucarionte*. En: Biología celular y Molecular. 5ª Ed. Buenos Aires: Medica panamericana. Pp 854-881.
- Loshe MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. *beta-Arrestin: a protein that regulates betaadrenergic receptor function*. Science 248, 1547-1550.
- Luque J, Herráez A. 2002. *Biología molecular e ingeniería genética*. 1ª ed. España: Elsevier Science. Pp 97-106, 422-431.

M

- Mathews M. B., N. Sonenberg & J.W.B. Hershey. 2007. *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Pp. 934.
- Merrick W. C. 2003. *Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes*. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31: 378-385.
- Milligan G. 2006. *G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery*. *Drug Discov Today* 11, 541-549.
- Milligan G, Kostenis E. 2006. *Heterotrimeric G-proteins: a short history*. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55.
- Morgan DO. 2007. *Cell Cycle: Principles of Control*. *Yale J Biol Med*. 80(3): 141–142.
- Møller MB. 2000. *p27 in cell cycle control and cancer*. *Leuk Lymphoma*. 39(1-2):19-27.

P

- Pak Y, O'Dowd BF, Wang JB, George SR. 1999. *Agonist induced, G protein-dependent and -independent down regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase*. *J Biol Chem* 274, 27610-27616.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. 2000. *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. *Science* 289, 739-745.
- Pestova TV, Hellen CU. 2000. *The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis*. *Cell Mol Life Sci*. 57(4):651-74.
- Pestova TV, Kolupaeva VG. 2002. *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection*. *Genes Dev*. 16(22):2906-22.
- Pin JP, Galvez T, Prézeau L. 2003. *Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors*. *Pharmacol Ther* 98, 325-354.

Preiss T, W Hentze M. 2003. *Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation*. *Bioessays*. 25(12):1201-11.

R

Roussel MF. 1999. *The INK4 of cell cycle inhibitors in cancer*. *Oncogene*. 18: 5311-5317.

S

Schafer KA. 1998. *The cell cycle: a review*. *Cell Prolif*. 35(6):461-78.

Shanmugasundaram K, Block K, Nayak BK, Livi CB, Venkatachalam MA, Sudarshan S. 2010. *PI3K regulation of the SKP-2/p27 axis through mTORC2*. *Oncogene*. 32(16):2027-36.

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. 1997. *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1*. *Genes Dev*. 11(11):1464-78.

Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, Nelson MA. 2006. *Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells*. *Oncogene*. 25(35):4923-36.

Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M. 1999. *Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing*. *J Biol Chem*. 274(20):13886-93.

Starostina NG, Kipreos ET. 2012. *Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors*. *Trends Cell Biol*. 22(1):33-41.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. 1994. *Structure and function of G protein-coupled receptors*. *Annu Rev Biochem*. 63:101-132.

Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. 2012. *Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate*. *Life Sci*. 90(11-12):446-53.

T

- Toews ML, Prinster SC, Schulte NA. 2003. Regulation of alpha-1B adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability. *Life Sci.* 74(2-3):379-89.
- Trejo J. 2005. *Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors.* *Mol Pharmacol* 67, 1388-1390.
- Tsao P, Cao T, Von Zastrow M. 2001. *Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors.* *Trends Pharmacol Sci* 22, 91-96.

U

- Uberti MA, Hall RA, Minneman KP. 2003. *Subtype-Specific dimerization of α 1-adrenoreceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties.* *Mol Pharmacol.* 64(6):1379-90.

V

- Valente ST, Gilmartin GM, Mott C, Falkard B, Goff SP. 2009. *Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(11):4071-4078.
- Veulens de la Nuez A., Rodríguez R. 2009. *G Protein-coupled receptors as targets for drug design.* *Biotechnología Aplicada.* Vol.26, No.1

W

- Waldrop BA, Mastalerz D, Piascik MT, Post GR. 2002. *Alpha(1B)- and alpha(1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts.* *J Pharmacol Exp Ther.* 300(1):83-90.