



**Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo**

**Instituto De Investigaciones
Químico Biológicas**

*“Interacción física de la proteína eIF3f (factor de
iniciación eucariótico 3 subunidad f) con el receptor
adrenérgico Alfa-1B en células de mamífero”*

TESIS

para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS OPCIÓN:

“Biología Experimental”

Presenta:

M en .F. B. Mario Javier Gutiérrez Fernández

Asesor de Tesis:

D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván

Morelia Michoacán, marzo 2016.



TABLA DE CONTENIDO

Tabla de Contenido	i
Figuras y tablas.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Reconocimientos.....	iv
I.-R e s u m e n.....	v
II.-S u m m a r y.....	vi
III.- INTRODUCCIÓN	7
III.1.- El Ciclo Celular	7
III.2.- Las proteínas.....	8
III.3.- Estructura de las proteínas.....	10
III.4.- Dominios.....	12
III.5.- Complejos multiproteínicos.....	13
III.6.- Interacción Proteína-Proteína.....	14
III.7.- Métodos para investigar las interacciones proteína-proteína.....	16
III.8.- Síntesis de proteínas en eucariotes.....	17
III.9.- Complejo eIF3 (Factor De Iniciación Eucariótico 3).....	19
III.10.- eIF3f (Subunidad “F” Del Factor De Iniciación Eucariótico 3).....	21
III.11.- Dominios que conforman a eIF3f.....	24
IV.- JUSTIFICACIÓN.....	27
V.-HIPÓTESIS.....	28
VI.- OBJETIVOS.....	29
VII.- RESULTADOS.....	30
VIII.- DISCUSIÓN	40
IX.- PERSPECTIVAS	47
X.- RESUMEN DE RESULTADOS.....	48
XI.-CONCLUSIONES.....	49
IX.- ANEXOS	
CAPITULO I. MATERIALES Y METODOS.....	50
CAPITULO II. CICLO CELULAR.....	57
CAPITULO III. EL RECEPTOR ADRENÉRGICO ADRA1B.....	69
CAPITULO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
XIII.- REFERENCIAS	79
XIV.-BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	83

FIGURAS

Figura 1. Niveles de estructuración proteica.....	9
Figura 2. Correlación de estructura cuaternaria de la hemoglobina y su estructura primaria	11
Figura 3. Representación gráfica del Dominio.	12
Figura 4. Modelo 3D de la interacción entre la proteína	15
Figura 5. Mecanismo de iniciación de la síntesis de proteínas dependiente del “cap”	18
Figura 6. Propuesta del modelo de eIF3.....	19
Figura 7. Modelo de la interacción dinámica entre eIF3 y mTOR/raptor, S6K1.	22
Figura 8. Micrografía de células TBY2 y Células A549.....	23
Figura 9. Expresión de la proteína de eIF3f durante el ciclo celular de A549.....	24
Figura 10. Dominios de eif3f.....	25
Figura 11. Modelo propuesto para la inhibición del sitio de división del extremo 3' del mRNA del VIH-1	25
Figura 12. Representación esquemática de las interacciones intracelulares de la subunidad eIF3f.....	26
VII.- RESULTADOS	
Fig. 1 Immunodetección de eIF3f	34
Fig. 2 complejo de 120 kDa en diferentes líneas celulares	35
Fig. 3 eIF3f promueve la actividad del adrenoceptor.....	36
Fig. 4 Alineamiento de secuencias proteicas de eIF3f de varias especies.....	37
Fig. 5 El Poly PA de eIF3f no es esencial para la activación de alfa 1B-ADR.....	38
VIII.- DISCUSIÓN	
Figura 12 Immunodetección de eIF3f en gel nativo con extracto de A549,HepG2, Ramos y MC3T3-E1	40
Figura 13 Señales de la activación de proteína G mediada por la receptores adrenérgico tipo alfa 1	41
Figura 14 Distribución de a.a. en el dominio Poly PA de eIF3f.	42
Figura 15 Comparación aminoacídica de la región Poly PA de eif3f entre tres especies de mamíferos.....	43
Figura 16 Activación del Adrenoreceptor medida por la incorporación de construcción eIF3f Δ 91	44
Figura 17 Modelo propuesto de la estimulación de la actividad adrenérgica por la presencia de la proteína eIF3f.	45
Figura 18 Modelo propuesto de la ruta Akt/p27 inducida por eIF3f/alfa 1B-ADR.....	46

TABLAS

Tabla 1. Subunidades de eIF3 en humanos.....	20
Tabla 2. eIF3 consiste de al menos 13 subunidades no idénticas (humano).	21

AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores Marco Aurelio Pardo Galván y Ana Edith Higareda Mendoza por su colaboración en la preparación de este manuscrito y el acompañamiento durante este proyecto de investigación. Además, un agradecimiento especial a Mtro. Cesar Adrián Gómez Correa, cuya familiaridad con las necesidades e ideas resultó de enorme utilidad durante la fase final de experimentación de esta tarea. Gracias también a todos los integrantes del laboratorio de biología molecular del instituto de investigación químico biológica de la U.M.N.S.H. por sus valiosos comentarios, colaboración y apoyo.

Al comité tutorial del estudiante del Programa Institucional de Doctorado En Ciencias Biológicas Opción Biología Experimental, conformado por los doctores: Jesús Campos García, Carlos Sosa Aguirre, Sergio Gutiérrez Castellanos, Alejandra Ochoa Zarzosa, Carlos Cortes y Víctor Rocha.

A las autoridades de la Universidad Tecnológica de Morelia, Silvia Mendoza Valenzuela, Patricia Manríquez Zavala, Alfredo Rosales Rosales y José Hernández Arreola, por su apoyo y gestión para con el autor.

Los compañeros y amigos académicos y administrativos del I.I.Q.B, de la carrera de Biotecnológica de la U.T.M. al personal de PROMEP, a la maestra Marcela Álvarez y en particular a los miembros del consejo directivo de la Universidad Tecnológica de Morelia, encabezados por el Lic. Agapito Pérez Díaz, que por su determinación permitió que por primera vez en nuestra universidad se dieran las primeras condiciones para apoyos de doctorado al personal académico.

A los amigos del C.E. del gremio, a Gerardo Moreno, muchas gracias, ah! y también a Jerry.

RECONOCIMIENTOS

Reconocer y dar gracias al que todo lo puede por permitirme cumplir una meta tan anhelada por su servidor, ya que con mucha entrega, dedicación, esfuerzo y determinación, en estas páginas se ve el producto de varios años.

A mi querida familia, Rebeca, Paulina y Xavier, motivo de mi gran cariño, amor y entrega a lo que soy y seré siempre, un ser humano lleno de bendiciones que valoro día a día, hora con hora, minuto a minuto.

A mis padres que gracias a ellos, me han dado el cariño, los valores, las bases para poder considerarme un hombre en armonía con lo que me rodea y que con sus consejos y tutela, han contribuido en todo lo que soy.

A mis Hermanos, hombres íntegros y plenos a los cuales les he compartido parte de mi vida temprana y que ahora en la adultez me llenan de orgullo de su plenitud como seres humanos y que siempre me motivaron a ser alguien que buscara ser mejor persona.

A mis amig@s y colegas con los que hemos compartido momentos de alegría, de trabajo, estudio, de retos, de logros y también de momentos de oportunidades que se van dando en la vida, reconocer que siempre serán parte de mi mente y alma, y su compañía es de lo más valorado por su servidor.

I.- R E S U M E N

La presente Tesis centraliza su interés en eIF3f, proteína asociada a la síntesis de proteínas y al ciclo celular. La subunidad f de eIF3 (Factor De Iniciación Eucariótico 3), pertenece a la familia génica Mov34, que relaciona a sus miembros por contener un dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) en el extremo amino terminal de la proteína que le confiere según las referencias, la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteicos. eIF3f es una proteína multifuncional, capaz de interactuar con proteínas involucradas en diferentes procesos celulares, como la síntesis proteica, reparación de ADN y edición viral ARNm. En células humanas, eIF3f está relacionado con el ciclo celular y la proliferación, y su desregulación compromete la viabilidad celular. Reportamos, que en condiciones nativas, la proteína de eIF3f interactúa físicamente con el receptor alfa 1B-adrenérgico, una proteína de membrana plasmática considerada como protooncogen e involucrada con vasoconstricción y proliferación celular. El complejo formado por eIF3f y alfa 1B-ADR (120 kDa) es estable y no es tipo celular específico.

Mediante la estimulación por catecolaminas, eIF3f promueve la actividad adrenérgica “in vitro”, independientemente de la región eIF3f N-91 terminal rica en prolinas y alaninas (Poly PA). La interacción eIF3f/ alfa 1B-ADR aporta conocimiento novedoso y relevante respecto a las rutas de transducción relacionadas con adrenoceptores y el control de la proliferación en células humanas.

Palabras clave: eIF3f , complejos multiproteicos, receptor alfa 1B-adrenérgico, control de la proliferación.

I I.- S U M M A R Y

This thesis focuses its interest in eIF3f, a protein associated to protein synthesis and cell cycle. The f subunit of eIF3 (eukaryotic initiation factor 3), belongs to the Mov34 gene family, which relates its members as they contain a Mpr1p, Pad1p N-terminal domain (MPN, for its acronym) at the amino terminal region of the protein that gives, the ability of the protein to associate with multiprotein complexes. eIF3f is a multifunctional protein, able to interact with proteins involved in different cellular processes such as protein synthesis, DNA repair and viral mRNA editing. In human cells, eIF3f is associated with cell cycle and proliferation, and its deregulation compromises cell viability. We report that under native conditions, the eIF3f protein physically interacts with the alpha 1B-adrenergic receptor, a plasma membrane protein considered as a protooncogene, involved in vasoconstriction and cell proliferation. The complex formed by eIF3f and alpha 1B-ADR (120 kDa) is stable and not cell type specific.

Upon catecholamine stimulation, eIF3f promotes adrenergic activity "in vitro" regardless of its 91 eIF3f N-terminal alanine and proline-rich region (Poly PA). The eIF3f / alpha 1B-ADR interaction provides a novel and relevant knowledge regarding transduction pathways related to adrenoceptors and proliferation control in human cells.

Key words: eIF3f , multiprotein complexes, alpha 1B-adrenergic receptor, proliferation control.

III.- INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos básicos de la vida, es el que refiere la propiedad y acción de cualquier célula (como elemento básico de un ser vivo) a estar determinada su viabilidad por el conjunto de genes expresados en ella. En eucariontes, la regulación de la expresión génica es multifactorial y comprende varios niveles como son el control de la presencia y abundancia del transcrito, su procesamiento, su transporte al citoplasma, velocidad de traducción, así como la activación y estabilidad de su producto. Estos procesos se observan en la proliferación celular donde se lleva a cabo de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo. La proteína denominada subunidad f del factor eucariótico de iniciación 3 (eIF3f) tiene una función moduladora en el inicio de la traducción y en la progresión del ciclo celular. Algunos estudios sobre eIF3f indican que, en algunas muestras tisulares de neoplasias malignas, el nivel de expresión se encuentra alterado.

Para la progresión del ciclo celular es necesario se cumplan condiciones como biomasa, suficiencia energética y terminación correcta de la replicación y mitosis; mismas que son verificadas en los puntos de control del ciclo celular (G1/S, G2/M, metafase y anafase). En la presente tesis, abordamos la interacción de eIF3f con otra proteína y planteamos su posible rol en la proliferación celular.

III.1.- El Ciclo Celular.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Sus procesos complejos involucran al 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 irreversibles que culminan en la división celular y la producción de dos células hijas¹. Para nuestro grupo de trabajo es relevante su entendimiento y estudio, dado que la proteína eIF3f, que es nuestro modelo de investigación, está involucrada en varios procesos asociados a éste. Para mayor amplitud del tema ver anexos (Capítulo II).

III.2.- Las proteínas.

Las proteínas (del griego *proteios*, “prominente”, “de primera calidad”)² son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, capaces de llevar a cabo una gran variedad de funciones: como catalizadores enzimáticos, transporte, almacenamiento, movilidad, protección, transducción, etc. y sabemos que la función biológica de una proteína depende de su estructura. Las proteínas tienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y casi todas poseen también azufre, son consideradas como biopolímeros y están formadas por un gran número de unidades estructurales simples repetitivas (monómeros) denominado aminoácidos, unidas por enlaces peptídicos. Debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se dispersan en un disolvente adecuado, forman siempre dispersiones coloidales, con características que las diferencian de las disoluciones de moléculas más pequeñas. Muchas proteínas presentan carga neta en ciertos rangos de pH del medio.

Por hidrólisis, las moléculas de proteína se dividen en numerosos compuestos relativamente simples, de masa molecular pequeña, que son las unidades fundamentales constituyentes de la macromolécula. Estas unidades son los aminoácidos, de los cuales existen veinte especies diferentes y que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. Cientos y miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína.

El orden de los aminoácidos establece la diferencia entre las proteínas y este orden crea variantes en su conformación. Los aminoácidos se caracterizan por poseer un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo variable *R*. Estas características particulares tanto físicas como químicas permiten interacciones entre ellos según su secuencia y su posición espacial.

La organización de una proteína está definida por cuatro niveles de estructuración (figura1): a) primaria, está dada por la secuencia y orden de los aminoácidos que la conforman, b) secundaria, los grupos *R* de a.a. adyacentes de la secuencia primaria forman estructuras en el espacio de tipo alfa hélice y lámina beta; c) terciaria, las interacciones entre los aminoácidos establecen la conformación tridimensional o espacial. El análisis de la estructura terciaria de las proteínas ha permitido la identificación de regiones diferenciadas e independientes en su organización. Estas regiones actúan como unidades autónomas de plegamiento, sin

III.3.- Estructura de las proteínas.

Los aminoácidos, monómeros componentes del polímero proteína, son moléculas quirales constituidas por un átomo de carbono central, el C α , que portan en éste un grupo amino y un grupo carboxilo, lo cual les da su nombre, además de un átomo de hidrógeno y una cadena lateral que les confiere sus características definitorias, y en función de la cual se clasifican.³

En condiciones fisiológicas, el proceso de plegamiento de una proteína globular está claramente favorecido termodinámicamente, esto es, el incremento de energía libre global del proceso debe ser negativo (aunque alguno de sus pasos puede ser positivo).

Este cambio se consigue equilibrando una serie de factores termodinámicos como^{4,5}:

1. La entropía conformacional: Se define como la disminución de la entropía promueve la aleatoriedad en definitiva, durante el paso desde una multitud de conformaciones de ovillo aleatorio hasta una única estructura plegada.
2. Las interacciones carga-carga: se dan entre grupos polares y cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos componentes del polipéptido, puesto que los grupos carboxilo y amino del carbono alfa están implicados en el enlace peptídico.
3. Los puentes de hidrógeno internos: Las cadenas laterales de muchos aminoácidos se comportan como donadores o como aceptores de enlaces de hidrógeno
4. Las interacciones de van der Waals: El denso empaquetamiento en el núcleo de las proteínas globulares facilita la interacción débil entre grupos moleculares sin carga. Dichos enlaces son de baja energía, pero su abundante número suple su debilidad.
5. Las interacciones hidrofóbicas: cualquier sustancia hidrofóbica en contacto con el agua provoca que ésta huya y se agrupe en estructuras denominadas clatratos.⁶ Esta ordenación corresponde a una disminución de la entropía del sistema. En el caso de las proteínas, los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos quedan orientados, en su plegamiento, hacia el interior de la molécula.

Niveles de estructuración (figura 1):

1. Estructura primaria, que corresponde a la secuencia de aminoácidos.
2. Estructura secundaria, que provoca la aparición de motivos estructurales.
3. Estructura terciaria, que define la estructura de las proteínas compuestas por un sólo polipéptido.
4. Estructura cuaternaria, si interviene más de un polipéptido.

La estructura cuaternaria se refiere al número y el arreglo de las subunidades de proteína con respecto a uno con el otro⁶; esta estructura deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un ente, un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes. Dichas subunidades se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos. Para el caso de una proteína constituida por dos monómeros, un dímero, éste puede ser un homodímero, si los monómeros constituyentes son iguales, o un heterodímero, si no lo son. Los ejemplos de proteínas con estructura cuaternaria incluyen hemoglobina (figura 2), polimerasa de la DNA y canales iónicos.

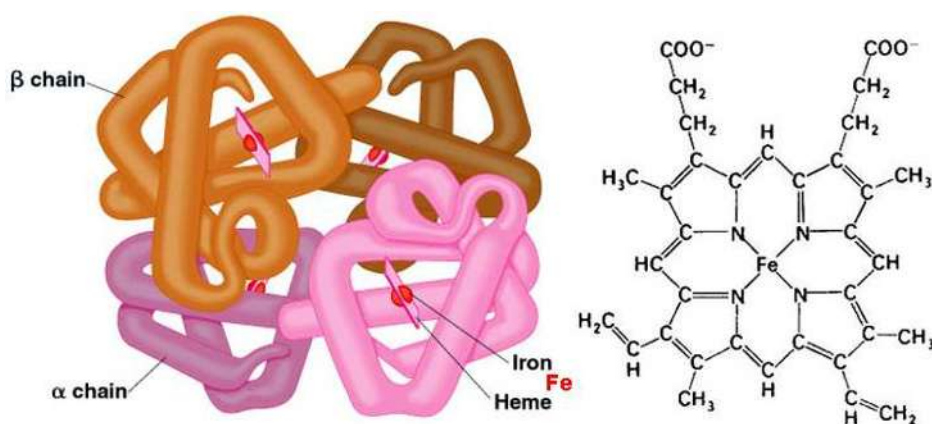


Figura 2.- Correlación de estructura cuaternaria de la hemoglobina y su estructura primaria.- http://web.cmh.ku.nl/pe/students/mmm/QUA_3.html

A través de la organización proteica cuaternaria se forman estructuras de gran importancia biológica como los microtúbulos, microfilamentos, capsómeros de virus y complejos enzimáticos. También las fibrillas colágenas encontradas en el espacio extracelular del tejido conjuntivo están constituidas por la agregación de cadenas polipeptídicas de tropocolágeno.

La estructura cuaternaria da la función de la proteína, pero hay ejemplos de las proteínas activas fuera de su complejo cuaternario. La estructura cuaternaria de proteína puede ser determinada mediante una variedad de técnicas experimentales que necesitan una variedad de condiciones experimentales. Los experimentos a menudo proporcionan una estimación de la masa de la proteína nativa y conocimiento de las masas y estequiometría de las subunidades polipeptídicas permite que la estructura cuaternaria sea dilucidada.

El número de subunidades de una proteína compleja puede a menudo determinarse midiendo el volumen molecular hidrodinámico o masa del complejo intacto, que requiere condiciones nativa. Para las proteínas plegadas, la masa se puede deducir de su volumen sin embargo, las mediciones de volumen son menos ciertas que las mediciones de masa, ya que las proteínas desplegadas parecen tener un volumen mucho más grande que las proteínas plegadas; experimentos adicionales se necesitan para determinar si una proteína está desplegada o ha formado un oligómero.

III.4.- Dominios.

Es común que algunas zonas de la proteína tengan entidad estructural independiente, y a menudo funciones bioquímicas específicas, como, por ejemplo, alguna actividad catalítica. Su naturaleza depende de las estructuras anteriormente citadas a todos los niveles. Muchos dominios son únicos y proceden de una secuencia única de un gen o una familia génica pero en cambio otros aparecen en una variedad de proteínas. Los dominios son, a menudo, seleccionados evolutivamente porque poseen una función prominente en la biología de la proteína; por ejemplo, "el dominio de unión a calcio de calmodulina"(figura 3). La ingeniería genética permite modificar los dominios de una proteína a otra para generar proteínas quiméricas con funciones novedosas⁷.

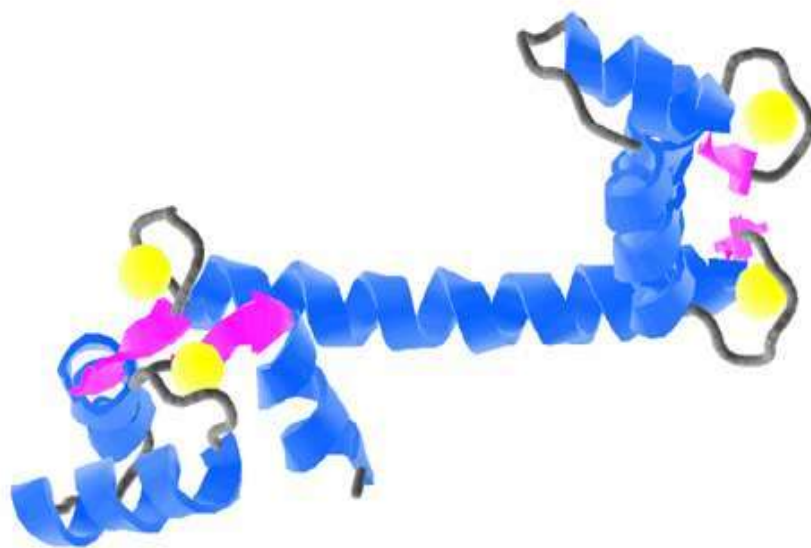


Figura 3.- Representación gráfica del Dominio de unión a calcio de proteína calmodulina; las esferas amarillas representan al Calcio.

https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_de_3a_prot%C3%ADDna#/media/Fichero:Calmodulin_X1L.png

Un motivo en este sentido se refiere a una combinación específica de elementos estructurales secundarios (como los hélice-giro-hélice). Estos elementos son llamados a menudo superestructuras secundarias. Suele denominarse motivo conformacional de forma global a un tipo de motivo, como los barriles- β . La estructura de los motivos a menudo consiste en solo unos pocos elementos, por ejemplo, las hélice-giro-hélice, que sólo tienen tres. Se denota que la “secuencia espacial” es la misma en todas las instancias del motivo. Su orden es bastante irregular dentro del gen subyacente. Los motivos estructurales de la proteína a menudo incluyen giros de longitud variable en estructuras indeterminadas, lo que en efecto crea la plasticidad necesaria para unir dos elementos en el espacio que no están codificados por una secuencia de ADN inmediatamente adyacente en un gen. Se denota también que incluso cuando están codificados los elementos estructurales secundarios de un motivo en el mismo orden en dos genes, la composición cuantitativa de aminoácidos puede variar. Esto no sólo es cierto debido a las complicadas relaciones entre la estructura terciaria y primaria, sino por cuestiones relativas al tamaño. Si bien en la base de datos de levadura hay descritas unas 6.000 proteínas⁸, hay muchos menos dominios, motivos estructurales y pliegues. Esto es, en parte, consecuencia de la evolución. Esto significa, por ejemplo, que un dominio de una proteína puede ser trasladado de una a otra, dando así una nueva función a las proteínas. Debido a estos mecanismos, los dominios o motivos estructurales pueden ser comunes a varias familias de proteínas.

III.5.- Complejos multiproteínicos.

Los complejos multiproteicos es un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Las cadenas polipéptidas diferentes pueden tener diferentes funciones. Se trata, como por ejemplo, un polipéptido multienzimático, en el que varios dominios C catalíticos se encuentran en una cadena polipeptídica única. Las proteínas en un complejo están vinculadas por interacciones no covalentes, y complejos con diferentes proteínas tienen diferentes grados de estabilidad en el tiempo. Estos complejos son una piedra angular de muchos (si no la mayoría) los procesos biológicos y forman varios tipos de maquinaria molecular que realizan una gran variedad de funciones

biológicas^{9,10}. Ejemplos de complejos proteínicos serían el proteasoma (involucrado en la degradación proteica dirigida) y las ARN Polimerasas. Algunas proteínas individuales pueden participar en la formación de una variedad de complejos diferentes. Diversos complejos realizan funciones diferentes, y el mismo complejo puede realizar funciones muy diversas que dependen de una variedad de factores, como por ejemplo su localización celular, en cual fase del ciclo celular está presente el complejo, el estatus nutricional de la célula, etc.

III.6.- Interacción Proteína-Proteína.

Se refiere a la asociación de proteínas y el estudio de esas asociaciones desde las perspectivas de la Bioquímica, transducción de señales y redes de interacción de proteínas¹¹. Las interacciones entre proteínas son importantes en muchos procesos biológicos (figura 4). Por ejemplo, las interacciones proteína-proteína de las moléculas de señalización median el paso al interior de la célula señales procedentes del exterior. Este proceso, llamado “Transducción de señales”, juega un papel fundamental en muchos procesos biológicos y enfermedades (p. ej. el cáncer).

Las proteínas pueden interactuar durante mucho tiempo para formar parte de un complejo proteínico; o pueden transportar a otra proteína (por ejemplo, desde el citoplasma al núcleo o viceversa en el caso de las importinas de los poros nucleares), o pueden interactuar brevemente con otra proteína para modificarla (por ejemplo, una proteína quinasa puede fosforilar a una proteína objetivo). Esta modificación de proteínas puede cambiar por sí misma la interacción proteica. Por ejemplo, algunas proteínas con dominios SH2 sólo se unen a proteínas cuando están fosforiladas en el aminoácido tirosina.

Las interacciones proteína-proteína tienen una importancia capital en prácticamente todos los procesos en una célula viva. La información acerca de esas interacciones mejora nuestro conocimiento sobre las enfermedades y puede proporcionar las bases para nuevos enfoques de los tratamientos terapéuticos. Entender la forma en la que interactúan las proteínas y enzimas es un área muy importante a investigar en la bioquímica y en la biología celular. Con base en esto, han surgido nuevas áreas de

investigación especializada en el tema y nuevos conceptos, como el interactoma: el genoma nos indica las posibles proteínas que puede sintetizar un organismo en particular, el proteoma determina las proteínas que son expresadas en un momento concreto bajo condiciones establecidas y el interactoma como interactúan las proteínas para otorgar funcionalidad y sincronización de los múltiples procesos de la célula estudiada.

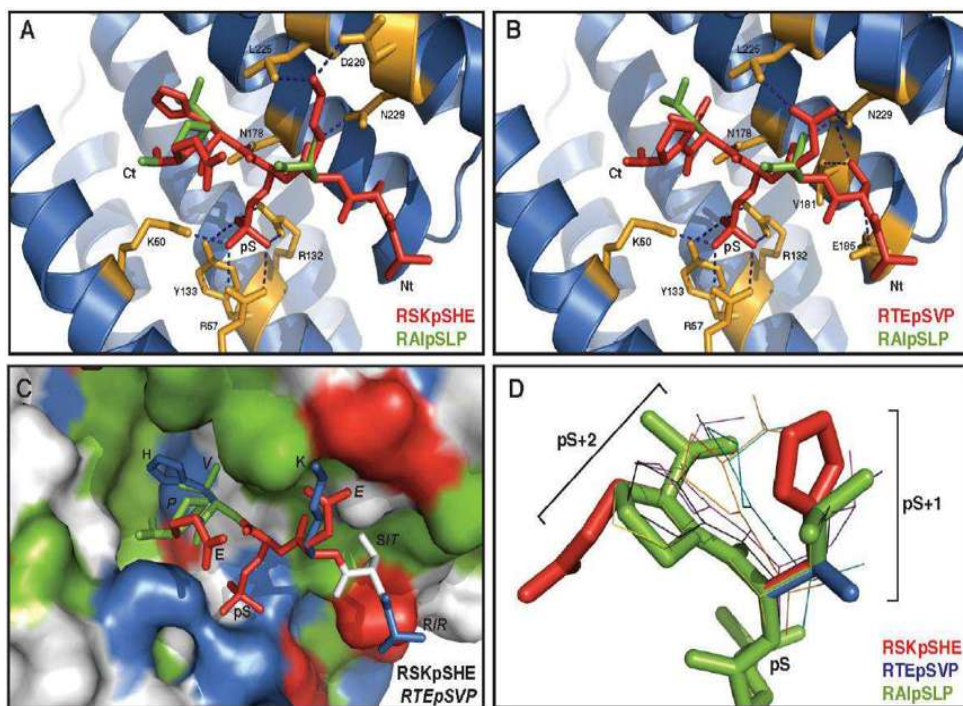


Figura 4. Modelo 3D de la interacción entre la proteína 14-3-3 γ y los fosfopéptidos RSKpSHE (PS297) (a y c) y RTEpSVP (PS392) (b). Modelo 3D conformacional comparativo de 14-3-3 con distintos fosfopéptidos (d). http://www.hmbq.unma.es/proct1/prodanc_memoria.html

III.7- Métodos para investigar las interacciones proteína-proteína.

Debido a que las interacciones proteicas son tan importantes, existen varios métodos para detectarlas¹³. Cada uno de los enfoques tiene sus propios pros y contras, especialmente en cuanto a la sensibilidad y especificidad del método. Una gran sensibilidad significa que muchas de las interacciones que ocurren en realidad son detectadas por el método, mientras que una gran especificidad indica que la mayoría de las interacciones detectadas ocurren realmente, con pocos falsos-positivos.

- **Ensayo de doble híbrido en levadura:** investiga la interacción entre proteínas de fusión artificiales en el interior del núcleo de una levadura. Este método tiene una considerable tasa de falsos-positivos, lo que hace necesario verificar las interacciones identificadas mediante otro ensayo.
- **Purificación por Afinidad en Tandem (TAP):** detecta interacciones en el ambiente celular real (ej. en el citosol de una célula de mamífero)(Rigaut et al., 1999). Esto supone una gran ventaja comparado con el ensayo de doble híbrido. Una desventaja importante es que la purificación de proteínas se realiza mediante dos lavados, de forma que no puede detectar interacciones proteína-proteína transitorias.
- **Inmunoprecipitación cuantitativa combinada con knock-out (QUICK - Quantitative Immunoprecipitation Combined with Knock-out):** se basa en la coimmunoprecipitación, la espectrometría de masa cuantitativa (SILAC) y la interferencia de ARN (RNA interference - RNAi). Este método detecta interacción entre proteínas endógenas sin marcar (Selbach and Mann, 2006), de modo que tiene la misma fiabilidad que la coimmunoprecipitación, aunque depende también de la disponibilidad de anticuerpos adecuados.
- **Interferometría por Polarización Dual (DPI):** puede usarse para medir interacciones proteína-proteína. DPI proporciona medidas de tamaño molecular, densidad y masa, en tiempo real y con alta resolución.
- **Geles Nativos *Blue Native* (BN-PAGE):** esta metodología se basa en la migración de los complejos proteicos en geles de poliacrilamida según su peso molecular. Dado que la migración también está definida por la carga, se utiliza como buffer catódico una solución que contiene azul de coomassie, el cual otorga carga negativa neta a las proteínas sin desnaturizar ni romper sus interacciones con otras proteínas. Una segunda dimensión desnaturizante en geles SDS-PAGE permite separar las manchas (spots) e identificar posteriormente la identidad de las subunidades componentes del complejo mediante espectrometría de masas.
- **Coimmunoprecipitación:** es considerado el mejor ensayo para detectar las interacciones proteína-proteína, especialmente cuando se realiza con proteínas endógenas (ni sobreexpresadas ni marcadas). La proteína de interés se aísla con un anticuerpo específico. Las moléculas que interaccionan con la proteína se identifican posteriormente mediante un Western blot.

III.8- Síntesis de proteínas en eucariotes.

La biosíntesis de proteínas es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas. El proceso consta de dos etapas, la traducción del ARN mensajero, mediante el cual los aminoácidos del polipéptido son ordenados de manera precisa a partir de la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN, y las modificaciones postraducción que sufren los polipéptidos así formados hasta alcanzar su estado funcional. Dado que la traducción es la fase más importante la biosíntesis de proteínas a menudo se considera sinónimo de traducción¹⁴. Este proceso es uno de los mecanismos celulares que está más estrechamente relacionado con el flujo de la información genética. 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 proteína¹⁵.

Es en los ribosomas que son estructuras subcelulares donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Los ribosomas eucariotes 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 forman al ribosoma funcional (80S).

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.¹¹ La fase de iniciación traduccional es el principal punto de control en la expresión genética relacionada a la síntesis de proteínas y regula su velocidad.

La iniciación de la traducción comprende cuatro pasos subsecuentes (figura 5):

- (I) La formación del complejo de preiniciación 43S, el cual incluye la subunidad ribosomal pequeña (40S), el ARN de transferencia iniciador (Met-ARN^{ti}Met), GTP y los factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 y eIF5;
- (II) El reclutamiento del complejo 43S al extremo 5' CAP del ARNm que previamente ha sido reconocido por eIF4F;

- (III) Escrutinio de la región 5' no traducida (5' UTR) del ARNm y el reconocimiento del codón de inicio; y
- (IV) Unión de la subunidad ribosomal grande (60S) para ensamblar un ribosoma completo (80S) ^{14, 15}.

A este mecanismo de inicio de la traducción se le denomina dependiente de cap (guanosina trifosfato metilada), también conocido como canónico o de barrido del ribosoma (en inglés ribosome scanning) es mediante el cual se sintetizan comúnmente las proteínas celulares en la mayoría de los RNAm eucarióticos. Hace algunos años se describió por primera vez la existencia de un mecanismo de inicio de la traducción alternativo, en el que el ribosoma interactúa con el RNA sin la participación de la estructura CAP, Este mecanismo denominado inicialmente como independiente de CAP, requiere de la presencia de un IRES y fue identificado por primera vez en la RNT 5' del RNA del virus de la polio (PV) y de la encefalomiocarditis (EMCV).¹⁶

Iniciación de la traducción en eucariotes.

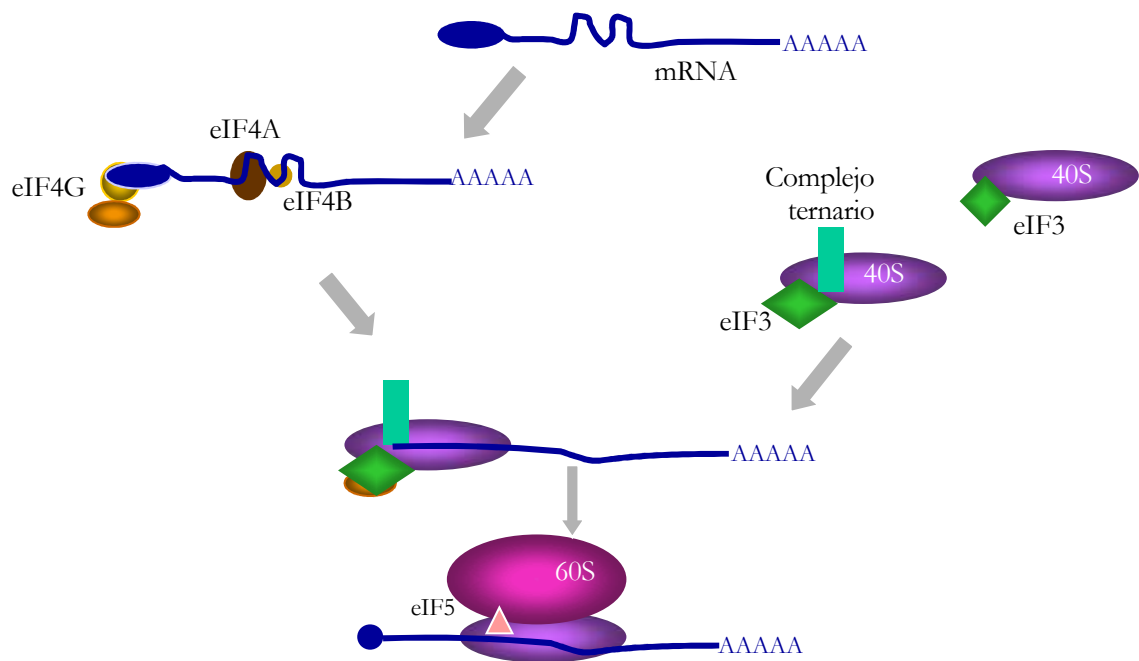


Figura 5. Mecanismo de iniciación de la síntesis de proteínas dependiente del "cap". El complejo ternario (rectángulo verde) formado por el tRNA iniciador, GTP y el eIF2, se asocia con el eIF3 (rombo verde), que mantiene libre a la unidad 40S ribosomal dando lugar a la formación del complejo de preiniciación 40S. La subunidad G del eIF4 reconoce la estructura "CAP" del mRNA, mientras que las subunidades A y B deshacen estructuras secundarias en el mRNA. El complejo de preiniciación 40S se une al eIF4G. La subunidad ribosomal 60S es unida al complejo anterior tras la liberación de los factores eIF2, eIF3 y eIF4 mediada por el eIF5 (triángulo rosa)

III.9-El Complejo eIF3 (Factor De Iniciación Eucariótico 3).

El factor de iniciación eucariótico 3 (eIF3) es un complejo multiproteico con una masa aproximada a los 800 kDa que forma parte del complejo de iniciación 43S y es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de síntesis de proteínas¹⁷. eIF3 sirve como andamio y catalizador de la unión entre el ARNm activado, la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario.¹⁴ 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 Browning¹⁸. 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)¹⁹. (Tabla 1.)

Modelo del Factor De Iniciación Eucariótico 3

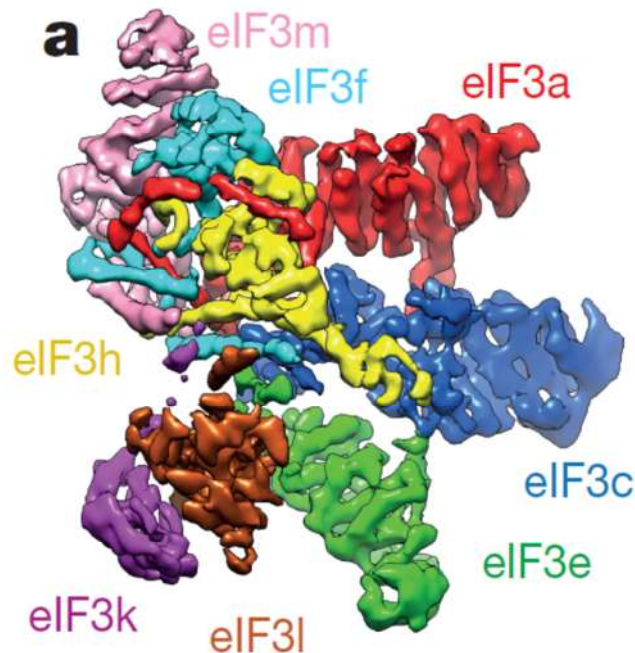


Figura 6. Propuesta del modelo de eIF3 por des Georges, Amedec, et al Nature (2015). Se muestra la forma en la que se organizan las subunidades, coloreadas por las diferentes subunidades lo que conforman.

Subunidades de eIF3

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

Tomada y modificada de Zhou et al., 2008

Tabla 1. Subunidades de eIF3 en *H. sapiens*. Primer columna de izquierda derecha refiere nomenclatura de las diferentes subunidades del factor de iniciación eucariótico 3, siguiente columna indica el peso de las proteínas en kilodaltones (kDa) y la última columna señala el dominio característico de la proteína.

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 mensajero²⁰.

El factor eIF3 ha sido purificado en diversas especies eucariotas, 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 eucariotas, forman el corazón catalítico y que el resto tiene funciones moduladoras en el proceso de síntesis de proteínas¹⁸. Sin embargo, 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 eIF3²¹. (Tabla 2)

eIF3f pertenece al complejo eIF3

Subunidades del **complejo multiproteico eIF3**: hasta 13 en humanos.

Subunidad	Motivo consenso	Humano	Trigo	<i>A. thaliana</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
eIF3a	PCI	p170	p116	p114	p110	p107
eIF3b	RBD	p116	p83	p82	p90	p84
eIF3c	PCI	p110	p107	p105	p93	p104
eIF3d	Ninguno	p66	p87	p66	Ninguna	Moe1p
eIF3e	PCI	p48	p45	p51	Ninguna	Int6p
eIF3f	MPN	p47	p34	p32	Ninguna	Csn6p
eIF3g	RBD, dedos de zinc	p44	p36	p33, p35	p33	Tif35p
eIF3h	MPN	p40	p41b	p38	Ninguna	p40
eIF3i	WD40	p36	p41a	p36	p39	Sum1p
eIF3j	Ninguno	p35	Ninguna	Ninguna	p30	Ninguna
eIF3k	PCI	p35	p28	p25	Ninguna	Ninguna
eIF3l	PCI	p28	p56	p65	Ninguna	Ninguna
eIF3m	PCI	GA17	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Csn7Bp

“Core” o centro catalítico

(Modificado de Burks y col., 2001)

Tabla 2. eIF3 consiste de al menos 13 subunidades no idénticas (humano), con sus correspondientes dominios y el comparativo entre las diferentes taxas que lo tienen.

III.10- Subunidad “f” Del Factor De Iniciación Eucariótico 3

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 multiproteicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción²². Así también, la característica particular de cada proteína la determinaría su extremo carboxilo terminal.

eIF3f es un gen altamente conservado y monogénico, y su organización génica varía. En el genoma humano, eIF3f se encuentra codificado en el cromosoma 11; es un gen con 8 exones y 7 intrones y codifica una proteína de 357 aminoácidos (aa).

La proteína eIF3f humana es de 37.5 kDa de masa molecular. Sin embargo, presenta un corrimiento electroforético aparente de 47 kDa; dicho retardamiento se debe a la región amino terminal, la cual es rica en prolina y alaninas.

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*” muestran que la sobreexpresión del gen eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica.^{24,25} por lo que se considera un modulador del proceso. Además de formar parte de eIF3, eIF3f es capaz de interactuar con proteínas diferentes a las de este complejo multiproteico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la 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) localizado en la región carboxilo de la proteína, y mTOR fosforila a S6K1 liberándola de eIF3f, y de esta manera fosforila a su segundo blanco, la proteína 4E-BP1.^{26,27}

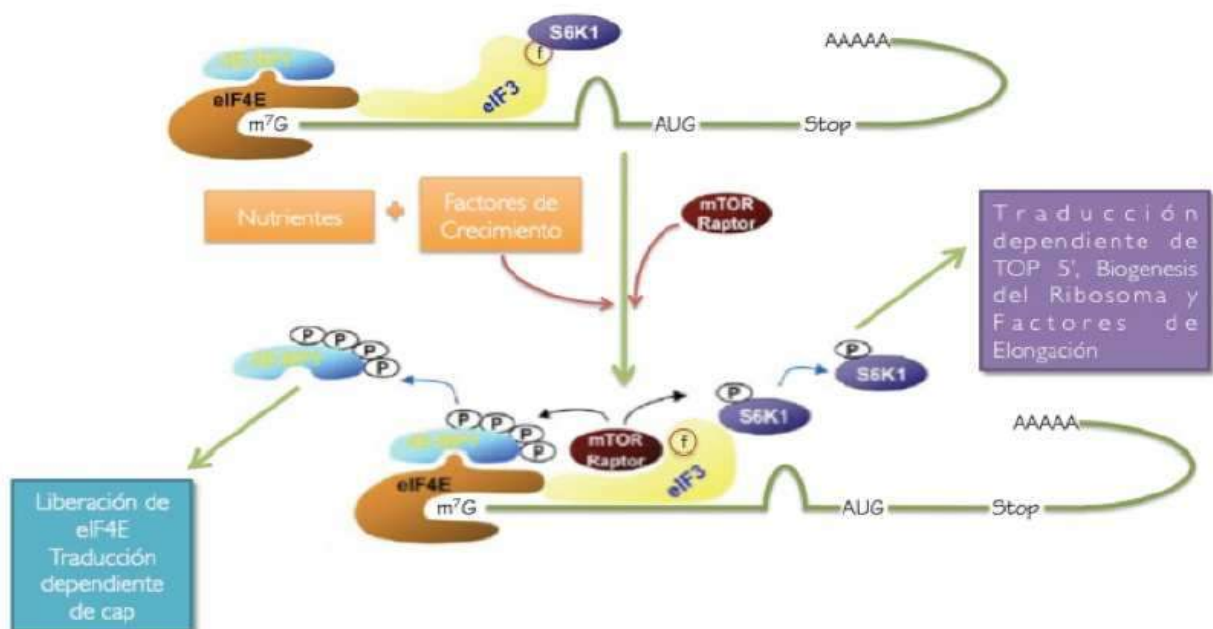


Figura 7. Modelo de la interacción dinámica entre eIF3f y mTOR/raptor, S6K1. Bajo condiciones basales S6K1 se une a eIF3f. Por estimulación de mitógenos, nutrientes, un complejo activo está formado, el cual recluta a mTOR/raptor y fosforila a S6K1 y 4E-BP1, la fosforilación de S6K1 conduce a la disociación de eIF3f.

La proteína eIF3f muestra características de unión proteína-proteína excepcionales, ya que también interactúa establemente con proteínas involucradas con procesos diferentes a los de 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 mide los niveles exógenos de colesterol y se localiza en el retículo endoplásmico²⁸. También, se 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 eIF3f²⁹.

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 Cdk1p46 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 procesamiento³⁰. En este sentido, un reporte previo indica que en células de melanoma humano A375 en estado apoptótico, la Cdk1p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio PolyPA²⁵.

Existe evidencia que la sobreexpresión del gen eIF3f afecta al crecimiento celular e induce apoptosis, en la línea celular humana A375²⁵, en la línea celular humana A549³¹ y en células de tabaco TBY-2 (Figura 8)³².

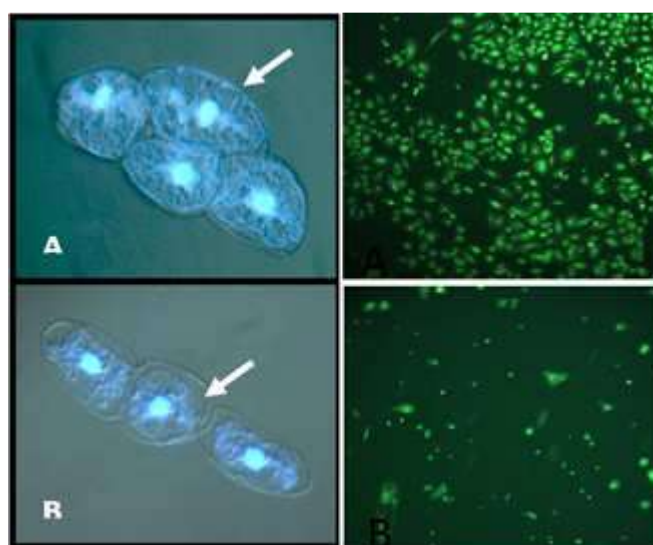


Figura 8. Micrografía de células TBY2 y de A549. A (izquierda): células de tabaco TBY2 sin transformar. B (izquierda): células TBY2 transformadas con eIF3f. A (derecha) células humanas A549 sin transfectar. B (derecha): células humanas A549 transfectadas con eIF3f. (Pardo 2003, Higuera y col., 2010)

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito que la función o funciones del gen eIF3f están relacionadas a la división celular debido a que en células de tabaco TBY-2 la expresión transcripcional del gen eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular,³¹ y en células humanas la expresión transcripcional y traduccional del gen eIF3f están circunscritas a las transiciones G2/M y G1/S del ciclo celular³¹ (Figura. 9).

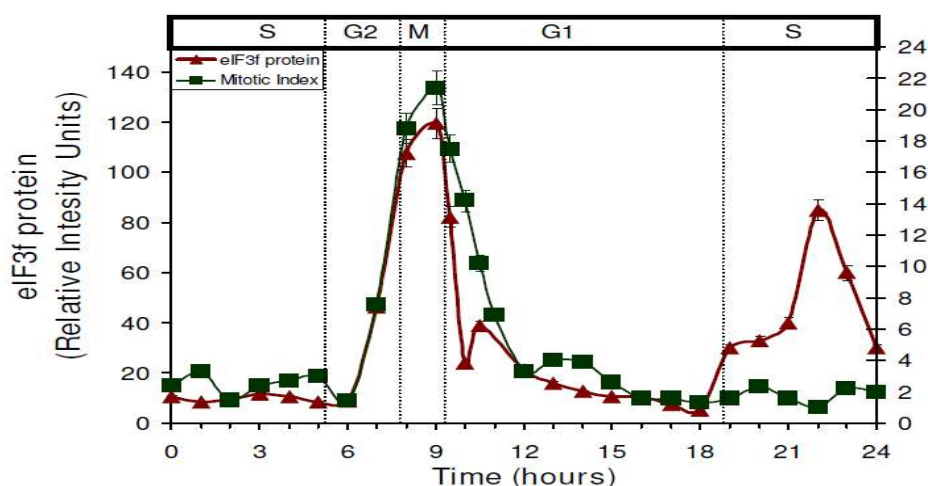


Figura 9. Expresión de la proteína de eIF3f durante el ciclo celular de A549. Rojo proteína de eIF3f, Verde índice mitótico (Higareda y col., 2010)

III.11- Dominios que conforman a eIF3f.

eIF3f es un miembro de la familia génica de Mov34 y como tal contiene al dominio MPN (Mrp-1Pad1N-terminal sequence) de la arginina 90 a la isoleucina 248 ;^{19,25,29} contiene además un segundo dominio carboxi-terminal, al que se le infiere su función particular. Sin embargo, en amniotas se ha encontrado la adquisición de un tercer dominio que por sus características de aminoácidos lo denominamos Poly PA (N-91 eIF3f) (figura 10). Existen reportes en la literatura de proteínas con regiones ricas en prolínas (aunque no tan extensas como el dominio PolyPA). Estas regiones están presentes en proteínas de localización membranal como es el caso de las acuoporinas, involucradas en el transporte de agua³³. De nuestro conocimiento reciente se reporta de la asociación de la región Poly PA con proteínas relacionadas a la edición de pre-ARNm 3' en el núcleo³⁰, siendo esta la única referencia reportada hasta ahora con respecto a la funcionalidad de este dominio.

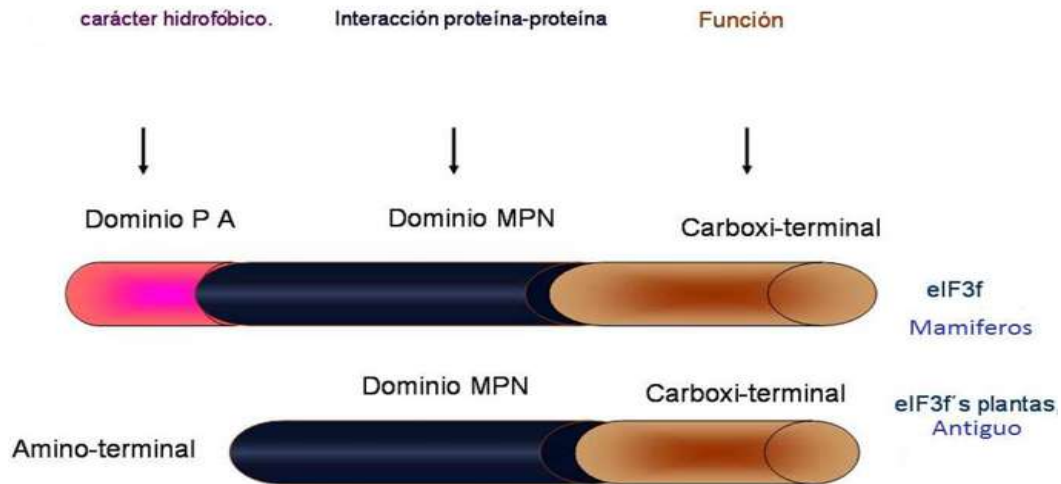


Figura 10. Esquema comparativo de los Dominios que conforman a la proteína eIF3f de mamífero y la proteína eIF3f de plantas (Pardo y col 2008)

Valente reportó que la sobreexpresión de eIF3f o su amino terminal (al que denominamos Poly PA), bloquean la replicación del virus del VIH-1 en su extremo 3'. El mecanismo por el cual eIF3f inhibe el procesamiento del extremo 3' del mRNA del VIH-1 fue sugerido por la observación de que eIF3f interacciona tanto in vivo como in vitro con CDK11 y que CDK11 a su vez interacciona directamente con 9G8 (que es una proteína que pertenece a la familia SR que agrupa a factores de splincing). Debido a que el virus del VIH-1 contiene una secuencia consenso en el extremo 3' para 9G8 esta beneficiaría al procesamiento de mRNA del VIH-1. Al existir una expresión alta de eIF3f, interaccionará directamente con 9G8, bloqueando sus interacciones con las proteínas que participan en el procesamiento del extremo 3' del mRNA del virus del VIH-1. (Figura 11).

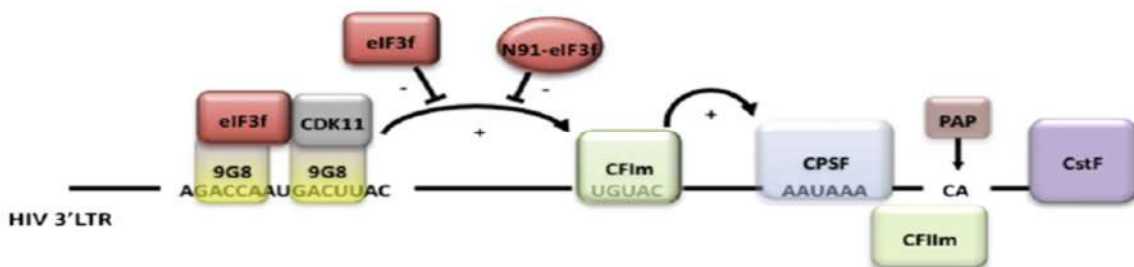


Figura 11. Modelo propuesto para la inhibición del sitio de división del extremo 3' del mRNA del VIH-1. Valente et al. 2010

En una revisión reciente sobre la proteína eIF3f (Marchione R y colaboradores, 2013) la señala como una proteína ambivalente; postulando la necesidad de realizar un análisis global del interactoma de eIF3f³⁴.

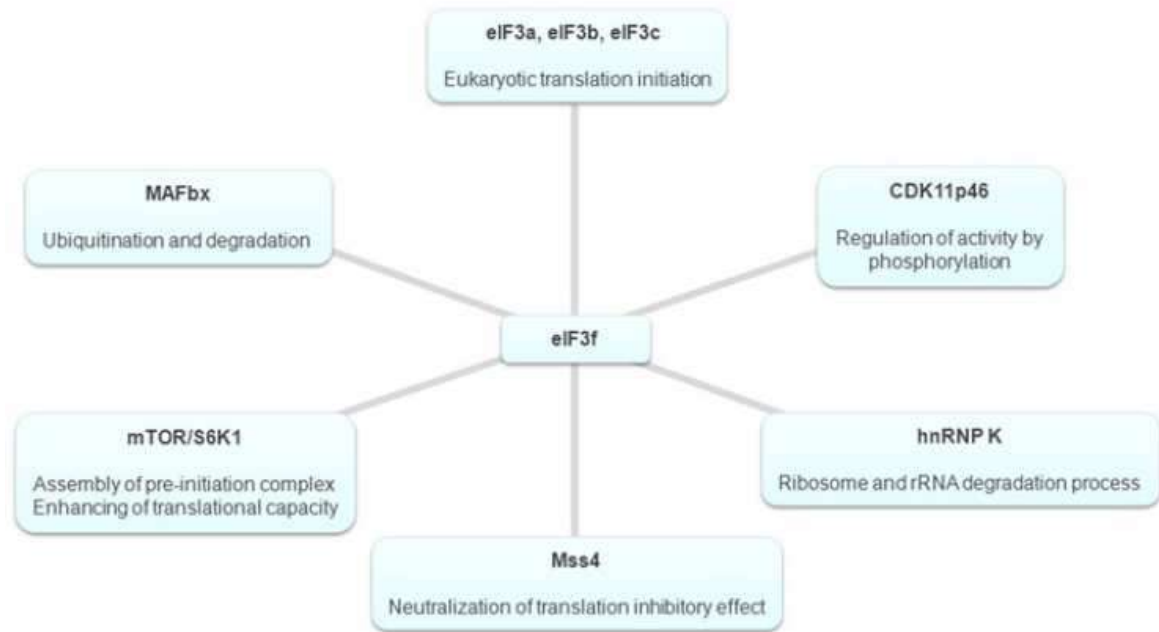


Figura 12. Representación esquemática de las interacciones intracelulares de la subunidad eIF3f. Marchione et al. 2013

Con estos elementos de referencia, dada la conformación de los dominios de eIF3f, la adquisición del dominio N-terminal rico en prolinas y alaninas, la ubicuidad subcelular, su participación en diferentes procesos fundamentales para la proliferación celular y la capacidad de interacción que le confiere su dominio MPN, es de hacer el planteamiento de en ¿En qué otros procesos puede estar involucrada esta proteína?

IV.-JUSTIFICACIÓN

eIF3f es esencial para la supervivencia de los organismos que lo contienen. Se ha encontrado que es capaz de interactuar con proteínas involucradas en procesos celulares distintos a la síntesis de proteínas. Dado que se ha demostrado que es un gen adscrito y esencial para la proliferación celular, es de interés dilucidar si existe o existen complejos proteínicos de eIF3f, distintos a los descritos, que participe(n) en la regulación de este proceso.

PREGUNTA:

¿Existe algún complejo proteínico estable de eIF3f que esté relacionado a proliferación celular?

V.-HIPÓTESIS

Existe al menos un complejo proteínico estable de eIF3f, no descrito aún, que está involucrado en la regulación de la proliferación celular y el dominio POLY PA participa en ello.

VI.- O B J E T I V O S

GENERAL

Identificar un nuevo complejo proteínico estable de eIF3f involucrado en la regulación de la proliferación celular.

ESPECÍFICOS

- Identificar en células humanas y en condiciones nativas, un nuevo complejo proteínico de eIF3f.
- Identificar a los componentes que conforman el complejo proteínico de eIF3f.
- Elucidar la posible función de eIF3f en el complejo proteínico identificado
- Determinar si la región N-91 de eIF3f (Poly PA), participa en la función del complejo identificado.
- Vincular la función elucidada del complejo con la proliferación celular.

VII.- RESULTADOS

Gutiérrez-Fernández et al. *BMC Biochemistry* (2015) 16:25
DOI 10.1186/s12858-015-0054-5



RESEARCH ARTICLE

Open Access



The eukaryotic translation initiation factor 3f (eIF3f) interacts physically with the alpha 1B-adrenergic receptor and stimulates adrenoceptor activity

Mario Javier Gutiérrez-Fernández^{1,2}, Ana Edith Higuera-Mendoza³, César Adrián Gómez-Correa^{2,3}
and Marco Aurelio Pardo-Galván^{1*}

Abstract

Background: eIF3f is a multifunctional protein capable of interacting with proteins involved in different cellular processes, such as protein synthesis, DNA repair, and viral mRNA edition. In human cells, eIF3f is related to cell cycle and proliferation, and its deregulation compromises cell viability.

Results: We here report that, in native conditions, eIF3f physically interacts with the alpha 1B-adrenergic receptor, a plasma membrane protein considered as a proto-oncogene, and involved in vasoconstriction and cell proliferation. The complex formed by eIF3f and alpha 1B-ADR was found in human and mouse cell lines. Upon catecholamine stimulation, eIF3f promotes adrenoceptor activity *in vitro*, independently of the eIF3f proline and alanine-rich N-terminal region.

Conclusions: The eIF3f/alpha adrenergic receptor interaction opens new insights regarding adrenoceptor-related transduction pathways and proliferation control in human cells. The eIF3f/alpha 1B-ADR complex is found in mammals and is not tissue specific.

Keywords: eIF3f, Alpha 1B-ADR, Gαq/11, Adrenoceptors, Protein-protein interaction

Background

The eukaryotic translation initiation factor 3f (eIF3f) is an ancient and conserved gene reported to be present in most eukaryotic organisms studied so far [1]. It was originally identified as a subunit of the protein synthesis related eIF3 complex [2], where it is suggested to function as a protein synthesis inhibitor [3, 4]. In contrast, eIF3f acts as a translational enhancer by increasing protein synthesis efficiency in muscle hypertrophy [5]. Shut-off experiments in *Schizosaccharomyces pombe* showed that in a long-term period, eIF3f is essential for viability, and that depleting the expression of this gene markedly decreases global protein synthesis [6]. In accordance to this, cell viability was also compromised when eIF3f

expression was decreased in proliferating human A549 cells [7].

The eIF3f protein is a member of the Mov-34 family. Members of this family contain an MPN (Mpr1/Pad N-terminal) motif, which is found in subunits of other macromolecular complexes such as the proteasome and the COP9 signalosome; it has been related to complex assembly promotion and to mediating protein-protein interactions [8–10]. The MPN domain of human eIF3f protein is flanked by a proline- and alanine-rich N-terminal region and by the C-terminal region.

During terminal muscle differentiation, eIF3f interacts with hypophosphorylated S6K1 through its MPN domain and with the mTOR/Raptor complex (mTORC1) by interacting with a TOS site contained in its C-terminal region [11]. As a consequence of this interaction, mTOR/Raptor phosphorylates S6K1, and thus

* Correspondence: mapardo@umich.mx

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3 Ciudad Universitaria Avenida Francisco J. Múgica S/N, Morelia, Michoacán 58030, México
Full list of author information is available at the end of the article



regulates downstream effectors of mTOR and cap-dependent translation initiation [5, 11].

eIF3f shows a remarkable ability to interact with many other proteins involved in a variety of cellular functions which are not directly involved in protein synthesis. For instance, it has been reported that eIF3f participates in the deubiquitination and activation of the development-related transmembrane protein Notch 1 [12]. In addition, it has been shown that HIV-1 replication is inhibited by eIF3f, through its proline and alanine-rich N-terminal region [13, 14]. This inhibition was observed with the full-length eIF3f protein and with the 91 amino acid N-terminal region of the protein. In both cases, HIV-1 mRNA levels were reduced as a result of eIF3f interfering with the HIV-1 mRNA 3'-end processing [13, 14]. Furthermore, a recent report indicates that eIF3f is capable of interacting with the DNA repair-related protein hMSH4, facilitating hMSH4 stabilization [15]. These authors demonstrate that the eIF3f-hMSH4 interaction is through the N-terminal regions of both proteins.

Considering the ubiquitous nature of eIF3f, the aim of this work was to investigate other stable eIF3f-protein interactions in native cellular conditions. In this study, we found a novel physical interaction between human eIF3f and the alpha 1B-adrenergic receptor (alpha 1B-ADR) and that eIF3f stimulates adrenoceptor activity.

Materials and methods

Chemicals and materials

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich [St. Louis, MO, USA], unless otherwise noted. Materials were mainly purchased from Corning [Corning, NY, USA], Bio-Rad [Hercules, CA, USA], EMD Millipore [Billerica, MA, USA], and Eppendorf [Hauppauge, NY, USA], unless otherwise noted.

Cell cultures

All cell lines were purchased from the American Type Culture Collection [ATCC, Manassas, VA, USA]. Human lung carcinoma A549 cells (ATCC CCL185), human hepatocellular carcinoma HepG2 cells (ATCC HB-8065), Burkitt's Lymphoma Ramos cells (ATCC CRL-1596), and murine pre-osteoblast MC3T3-E1 Subclone 4 cells (ATCC CRL-2593) were thawed every month and routinely passaged twice per week into 75 cm² flasks (Corning, Corning, NY, USA) to maintain them in a logarithmic growth phase at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ (NuAire, Plymouth, MN, USA). A549, HepG2, and Ramos were cultured in MEM medium supplemented with 10 % heat-inactivated FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, and 1.5 g/L sodium bicarbonate. MC3T3-E1 cells were cultured in MEMalpha medium

(Invitrogen) without ascorbic acid, supplemented with 10 % heat-inactivated FBS. At 85 % confluence, cells were harvested using 0.25 % Trypsin-EDTA solution and were sub-cultured or collected for subsequent experimental analysis. Since this study does not involve humans, human data or animals, an ethics committee approval was not required.

Native western blot analysis

Cells were lysed with ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas, Hanover, MD, USA), following the manufacturer's protocol, to obtain total native conformation proteins. Protein concentrations were determined using a Bio-Rad Protein Assay Kit. A molecular weight (kDa) standard (NativeMark - Novex, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and equal amounts of protein extracts (50 µg) were subjected to electrophoresis on a 8 % SDS-free polyacrylamide gel (PAGE) and electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane following the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blocking non-specific binding sites with 5 % skimmed milk, blots were incubated with primary rabbit polyclonal antibody specific to eIF3f (Biolegend, San Diego, CA, USA) or primary goat antibody specific to alpha 1B-ADR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Biolegend) or rabbit anti-goat secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). The bound antibody was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) on an X-ray film (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Complex member identification

After native electrophoresis, the 120 kDa region of the gel was excised and eluted overnight at 4 °C in 1 mL of ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent. For non-specific bound protein removal, the elution was incubated 1 h at 4 °C with a non-specific IgG and 100 µL of 50 % Protein A-Sepharose 4B beads (Invitrogen). After centrifugation, the supernatant was incubated at 4 °C with the antibody against eIF3f and 100 µL of 50 % Protein A-Sepharose 4B beads, washed 4 times with lysis buffer, resuspended in sample buffer (2 % SDS, 20 % glycerol, and 0.5 % bromophenol blue in 62 mM Tris HCl buffer, pH 6.8), boiled for 5 min, and subjected to electrophoresis on a 10 % SDS-polyacrylamide gel (10 % SDS-PAGE). A PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was included in all SDS-PAGEs. The resolved proteins were detected by Coomassie blue R250 staining (Bio-Rad); the unknown protein bands were excised and sent for N-terminal protein/peptide sequencing (Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA, USA). After sequencing service, the partial amino acid sequences

were subjected to a NCBI Blastp search to identify possible protein partners of eIF3f.

Immunoprecipitate western blot analyses

As describe above, after a native electrophoresis, the 120 kDa region of the gel was excised, eluted, cleared with a non-specific IgG and Protein A-Sepharose 4B beads and centrifuged. The supernatant was incubated with the corresponding primary antibody (anti-eIF3f or anti-alpha 1B-ADR) and Protein A-Sepharose 4B beads, washed, resuspended in sample buffer, boiled, and subjected to electrophoresis (10 % SDS-PAGE). Proteins from the gel were electrophoretically transferred to a PVDF membrane and blotted with anti-eIF3f or anti-alpha 1B-ADR antibodies, and the corresponding secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies. The bound antibody was detected by ECL on an X-ray film.

Plasmids

To express human eIF3f, we used the previously described pSK11F plasmid [7]. To express alpha 1B-ADR, we used plasmid AR0A1B0000 (Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA). To obtain plasmid eIF3f Δ 91 (eIF3f lacking first 91 AA of the N-terminal region), template pSK11F and the forward 5'-CCCTTCCCCGGCGGCAGC ATGGTC-3' and reverse 5'-CAGGTTTACAAGTTTTTCATTG-3' oligonucleotides were used to amplify the eIF3f coding sequence corresponding to amino acids 92–357. The forward oligo was designed to contain a classic Kozak consensus sequence (see underlined nucleotides), by modifying only 2 nucleotides. The amplicon was cloned in pGEM vector (Promega, Fitchburg, WI, USA) and verified by DNA sequencing (Elim Biopharmaceuticals, Hayward, CA, USA).

[gamma-32P]GTP Binding Assay

Membranes from A549 human cells were obtained using ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Cal-biochem, La Jolla, CA, USA), as described by the manufacturer. To obtain membranes with over expressed alpha 1B-ADR, before membrane extraction, cells were transiently transfected (48 h) with plasmid AR0A1B0000 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications and as described previously [7]. For *in vitro* translation of eIF3f and eIF3f Δ 91, mRNA was synthesized *in vitro* using T3 and T7 RNA polymerase (Invitrogen), respectively, and according to the manufacturer's instructions. The respective proteins were synthesized *in vitro* with a Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega), using 1 μ g of mRNA. For the [gamma-32P]GTP binding assay [16], 20 μ g of membrane protein and 5 μ L of the translation reaction were

resuspended in 55 μ L of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 μ M GDP, 3 mM MgCl and 30 nM the [gamma-32P]GTP (Institute of Isotopes Co Ltd, Budapest, Hungary). As a control, the reaction was also performed using water instead of a mRNA. The reactions were incubated at 30 °C for 5 min in the presence or absence of agonist (100 nM adrenaline). The re- action was terminated by adding 600 μ L of ice cold stop solution (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂,

150 mM NaCl, 0.5 % Nonidet, 100 μ M GDP, and 100 μ M GTP) and incubating for 30 min in ice. To each reaction, non-specific IgG and 100 μ l of Protein A- Sepharose 4B beads were added and further incubated on ice for 20 min. Non-specifically bound protein was removed by centrifugation. The supernatant was then incubated 1 h at 4 °C with 1 μ g of G α q/11 antibody (Santa Cruz Biotechnology) and immunoprecipitated with 100 μ l of Protein A-Sepharose 4B beads for 1 h at 4 °C. Immunoprecipitates were collected, washed 4 times in buffer without detergent, and resuspended in a TE buffer. The samples were analyzed in a scintillation counter (Wallac, Oy, Turku, Finland).

Statistical analysis

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

Results

eIF3f is immunodetected in a protein complex of approximately 120 kDa in native electrophoretic conditions

In denaturing electrophoresis conditions, mammalian eIF3f shows an apparent electrophoretic mobility of 47 kDa, albeit its molecular mass deduced from its amino acid sequence is 38.5 kDa. eIF3f migrates anomalously in SDS-PAGE, possibly due to the high proline content in the N-terminal region [2]. Human A549, HepG2, and Ramos, as well as murine pre-osteoblasts (cell line MC3T3-E1 Subclone 4), were independently lysed with a buffer that respects native protein conformation, as well as protein-protein interactions. Total protein from each cell type was subjected to a SDS-free PAGE and immunoblotted with eIF3f antibody. Figure 1 shows one major immunodetected band, of approximately 120 kDa, in each cell type. Other bands were observed in over-exposed blots (data not shown) and slightly appear in the blot shown in Fig. 1, around the 150 and 250 kDa region. The lower band intensity of these other complexes may be due to lower concentration, complex instability, or a transitory event. The eIF3

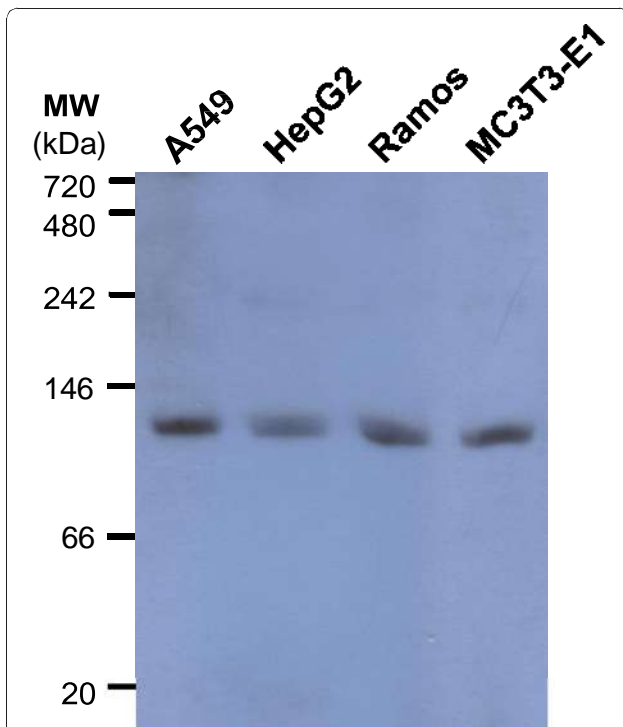


Fig. 1 eIF3f is immunodetected in a protein complex of approximately 120 kDa in native conditions. Cells under exponential growth were lysed in a native-permissive buffer and 50 μ g of total protein were subjected to electrophoresis in native 8 % polyacrilamide gels. Western blots were performed with an anti-eIF3f antibody (MW: protein molecular weight standard). Immunodetected protein complex in human A549 cells, a human lung carcinoma epithelial cell line; HepG2, a human hepatocellular carcinoma cell line; Ramos, a human Burkitt's lymphoma cell line; and in murine MC3T3-E1 pre-osteoblast cells. A single prominent band of approximately 120 kDa is evident in all cell types

complex remained in the stacking gel. We tested several cell types to rule out the possibility that this immunodetected band may correspond to a specific cell line or organism. These results suggest that the 120 kDa complex may be present in mammalian organisms, and is not tissue specific.

The 120 kDa complex is composed by eIF3f and the alpha 1B-adrenergic receptor

To identify the protein partners in the 120 kDa complex, total protein extracts under native conditions were used. Each of the 120 kDa regions were excised directly from the native gel, eluted in a protein-protein interaction permissive buffer, and immunoprecipitated with a specific antibody against eIF3f. After exhausting washes to eliminate unspecific protein binding, the immunoprecipitates were eluted in a non-reducing buffer, and run in a SDS-polyacrilamide gel. For proteins extracts from A549, Fig. 2a shows

two eluted proteins, a 47 kDa protein (eIF3f) and a second protein of approximately 60 kDa; similar results were obtained with the other cell lines (data not shown). The 60 kDa protein resolved from each cell type was excised from the denaturing gel and sent to N-terminal sequencing service. The partial amino acid sequence [MNPDLDT] (which was the same in A549, HepG2, Ramos, and MC3T3-E1), its protein position, and the expected molecular weight were the criteria used in a NCBI Blast search. Results of this search showed that the human protein that fulfilled these criteria was the alpha-1B adrenergic receptor (alpha 1B-ADR), a 56.836 kDa (520 amino acids) plasma membrane protein. To verify this, the 120 kDa complex was immunoprecipitated with eIF3f antibody and then immunodetected using an alpha 1B-ADR antibody and with eIF3f antibody (Fig. 2b). In addition, the 120 kDa complex was immunoprecipitated with alpha 1B-ADR antibody and then immunodetected with eIF3f antibody and alpha 1B-ADR antibody (Fig. 2c). Both assays were positive. These results show that alpha 1B-ADR physically and stably interacts with eIF3f. Furthermore, under native conditions the 120 kDa complex from A549 cell extracts was immunodetected with alpha 1B-ADR antibody (Fig. 2d), confirming that this complex is composed by eIF3f and alpha 1B-ADR.

eIF3f promotes adrenoceptor activity upon catecholamine stimulation

The stable interaction between eIF3f and alpha 1B-ADR raised the question if this interaction had a functional consequence. That is, if eIF3f stimulates or inhibits Alpha 1B-ADR activation. Alpha 1B-ADR is a member of the G protein-coupled receptor family of alpha 1-adrenergic receptors (alpha 1-ADRs), which is composed by the subtypes 1A, 1B, and 1D; all of which signal through the Gq/11 family of heterotrimeric G proteins [17]. The Gq/11 G proteins are membrane bound GTPases that are linked to 7-TM receptors and are formed by an alpha-, beta- and gamma-subunit [18]. In its inactive form, GDP is bound to the alpha subunit; when catecholamine binds to the receptor it causes a conformational change, which is recognized by the inactive form of the G protein complex and binds to it. The receptor triggers the exchange of bound GDP for GTP on the alpha subunit of the G-protein, which induces the GTP-alpha subunit to dissociate from the beta and gamma subunits. The GTP-alpha subunit (active form) then associates to downstream proteins involved in second messenger signaling cascades [18]. To determine adrenoceptor activity, *in vitro* experiments were performed using radiolabeled [gamma-

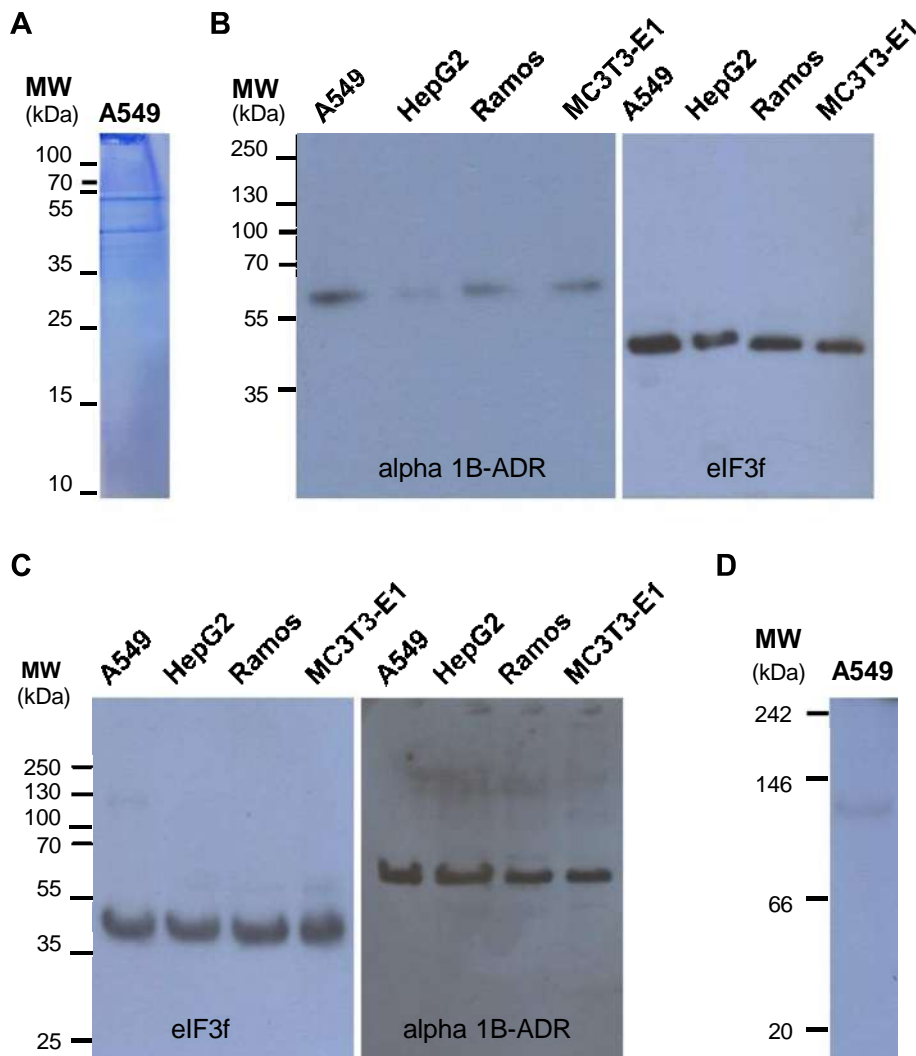


Fig. 2 The 120 kDa complex is composed by eIF3f and the alpha-1B adrenergic receptor. a Resolved proteins in a SDS-PAGE from anti-eIF3f immunoprecipitate of the 120 kDa region: the expected 47 kDa corresponding to eIF3f, and an unknown ~60 kDa protein. The ~60 kDa protein was sent for N-terminal sequencing and a Blastp showed that it could be the alpha 1B-ADR. MW, prestained protein ladder; A549, resolved proteins in the 120 kDa complex obtained from total native protein extracts. b The 120 kDa complex was immunoprecipitated in native conditions with anti-eIF3f, and immunodetected with anti-alpha 1B-ADR or anti-eIF3f in denaturing conditions. c The 120 kDa complex was immunoprecipitated in native conditions with anti-alpha 1B-ADR, and immunodetected with anti-eIF3f or anti-alpha 1B-ADR in denaturing conditions. d Immunodetection of alpha 1B-ADR in native conditions using A549 cell extracts (MW: native protein standard), where the 120 kDa band is present. Results show that alpha 1B-ADR is the eIF3f partner in the 120 kDa complex

32P]GTP, and its transfer to $G\alpha_q/11$ upon catecholamine stimulation, with or without the presence of eIF3f protein, and with or without over expressed alpha 1B-ADR membranes from A549. Reticulocyte-based translated eIF3f protein was added where indicated or the reticulocyte extract alone where eIF3f protein was not present. Individual assays were further distinctively immunoprecipitated with a $G\alpha_q/11$ antibody and the [γ -32P]GTP binding to $G\alpha_q/11$ was quantified. This assay was based on a previous report [16], where the selectivity and significance in coupling of receptor to GTP-binding regulatory proteins (receptor

activation) was demonstrated. Figure 3 shows that the presence of eIF3f promotes adrenoceptor activation.

The proline- and alanine-rich N-terminal region of eIF3f is not essential for adrenoceptor activation

eIF3f appeared early in Eukaryota, being identified as early as in protists [1]. eIF3f is present in most eukaryotic organisms, except in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [1, 6]. All eIF3fs reported to date include the MPN domain [1, 8–10] and a relatively conserved C-terminal region (Fig. 4). However, by

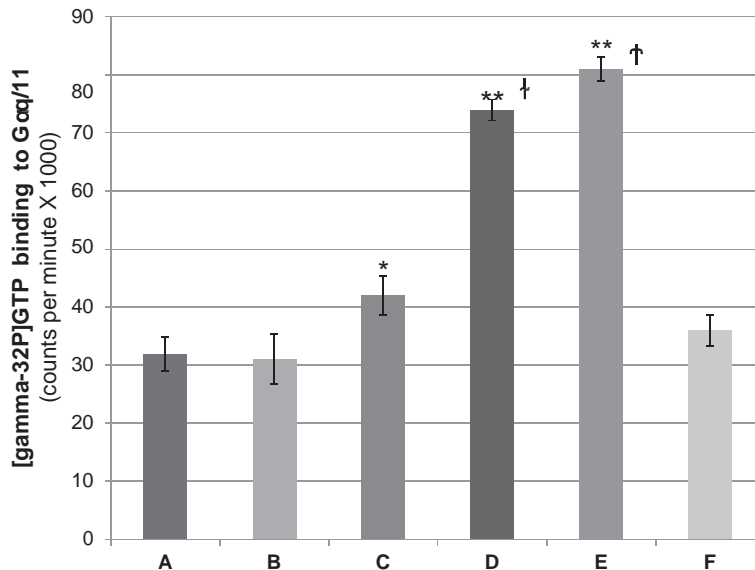


Fig. 3 eIF3f promotes adrenoceptor activity upon catecholamine stimulation. Adrenoceptor activity is measured on the basis of *in vitro* agonist-promoted binding of [gamma-32P]GTP to G protein alpha subunits [16], in the presence of cell membrane fractions, and isolated subsequently by immunoprecipitation. In each condition, Gαq/11 immunoprecipitates were analyzed by scintillation for radiolabeled GTP binding. a Standard Gαq/11 activity reaction without catecholamine stimulation. b Standard Gαq/11 activity reaction with catecholamine stimulation. c Gαq/11 activity reaction without catecholamine stimulation and added eIF3f protein. d Gαq/11 activity reaction with catecholamine stimulation and added eIF3f protein. e Gαq/11 activity reaction with catecholamine stimulation and added eIF3f protein, using membrane fractions obtained from alpha 1B-ADR over-expressed A549 cultures. f Standard Gαq/11 activity reaction with catecholamine stimulation, using membrane fractions obtained from over-expressed alpha 1B-ADR A549 cultures. Data and error bars represent means ± standard error (S.E.) for three independent experiments; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ with respect to the controls (A and F), † $p < 0.005$ between C and D, and ‡ $p < 0.005$ between D and E

comparing protein sequence alignments of eIF3f from the N-terminal region to the beginning of the MPN domain (Fig. 4), it is evident that the proline- and alanine-rich N-terminal region of human eIF3f is a relatively recent evolutionary acquired region. Figure 4 shows the eIF3f protein alignment of some selected organisms. The proline- and alanine-rich N-terminal is present in mammals, non-avian reptiles, and birds, but not in amphibians or lower organisms, which suggests that this region was possibly acquired during the amniote clade. The proline- and alanine-rich N-terminal region of eIF3f has been reported to be important in the functional relationship between eIF3f and other proteins (see introduction), so we then asked if this N-terminal region could be relevant for adrenoceptor activation. To answer this question, we constructed an eIF3f clone that was devoid of this N-terminal region (indicated in Fig. 4), and tested *in vitro* for its ability to promote adrenoceptor activity upon catecholamine stimulation. Figure 5 clearly shows that the N-terminal region of eIF3f is not essential for adrenoceptor activation.

Discussion

As pointed out earlier, eIF3f has a remarkable ability to interact with many proteins involved in a variety of

cellular functions [5, 8–15]. In this work, we report that in native undisturbed conditions, eIF3f stably interacts with the alpha 1B-adrenergic receptor (alpha 1B-ADR) and prompts Gαq/11 activation upon catecholamine stimulation. Previously, eIF3f was located in different subcellular compartments, including the plasma membrane fraction [19], which suggested a different function for eIF3f in addition to the protein synthesis process. Protein immunodetection of eIF3f in native conditions showed a clear single band in A549, HepG2, Ramos, and MC3T3-E1 cells, which localized approximately in the 120 kDa region. Specific immunoprecipitation with anti-eIF3f resolved two clearly distinguished protein bands, a

47 kDa protein corresponding to eIF3f and a 57 kDa protein that, by protein sequencing and specific immunodetection (Fig. 2), was identified as the alpha 1B-ADR. Interestingly, in native conditions we found no free unbound eIF3f protein, which confirms its high ability to interact with other proteins. In fact, most eIF3f is found in the eIF3 complex (data not shown).

In the presence of catecholamine, eIF3f stimulates adrenoceptor activity. The eIF3f/alpha 1B-ADR interaction represents a novel and fascinating event in the control of adrenoceptor transducing activity, and disclose the possibility of new insights regarding alpha 1B-

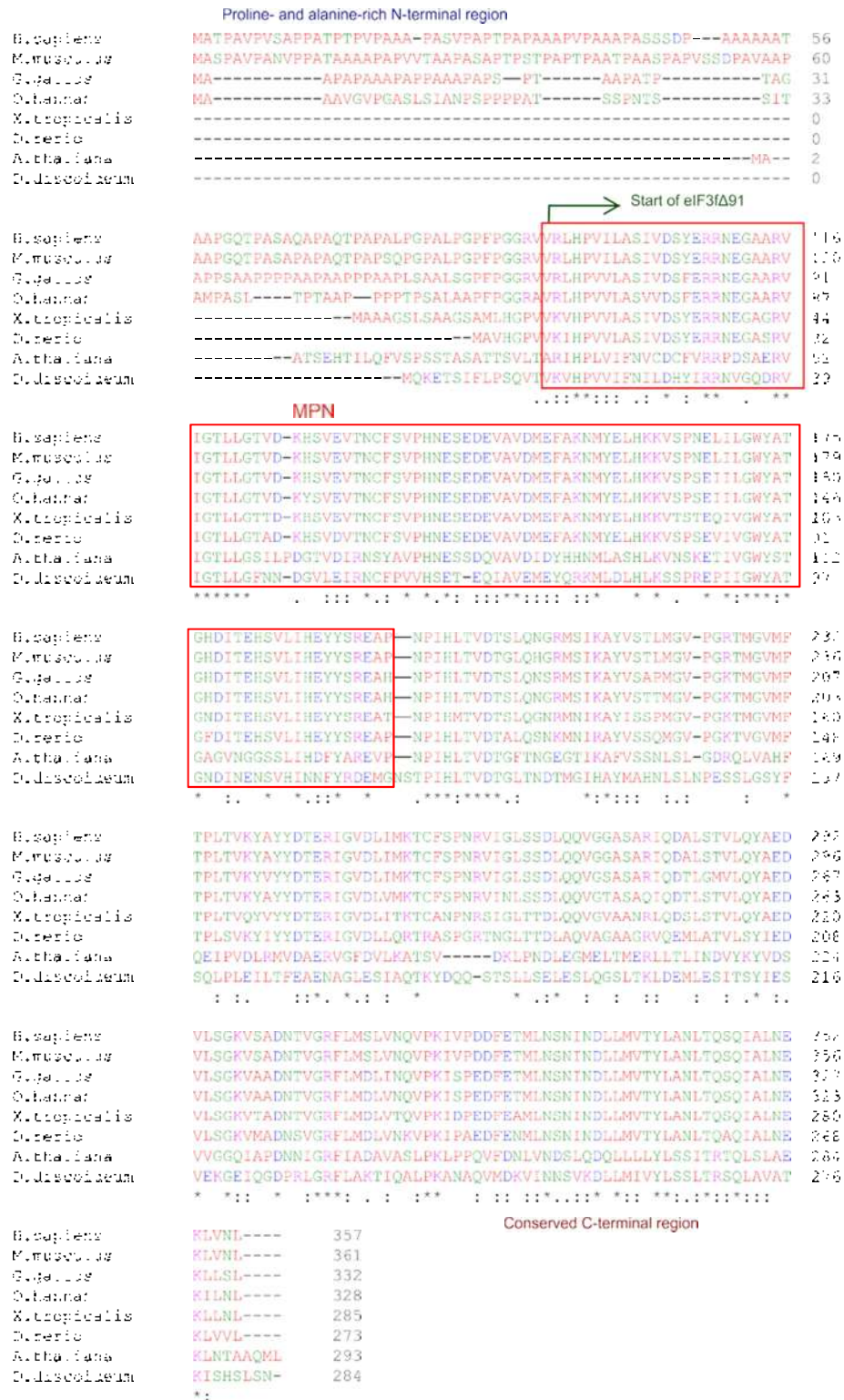


Fig. 4 Protein sequence alignment of eIF3f orthologues. eIF3f sequences were obtained from NCBI (*Homo sapiens* gi:6685511, *Mus musculus* gi:341940488, *Gallus gallus* gi:50749406, *Ophiophagus hannah* gi:565315948, *Xenopus tropicalis* gi:62859127, *Danio rerio* gi:317108137, *Arabidopsis thaliana* gi:23396614, *Dictyostelium discoideum* gi:74850733) and Clustal Omega (EMBL-EBI) was used for multiple sequence alignment. The red box represents the MPN domain. The proline-and alanine-rich N-terminal is present in mammals, non-avian reptiles, and birds, but not in amphibians or lower organisms.

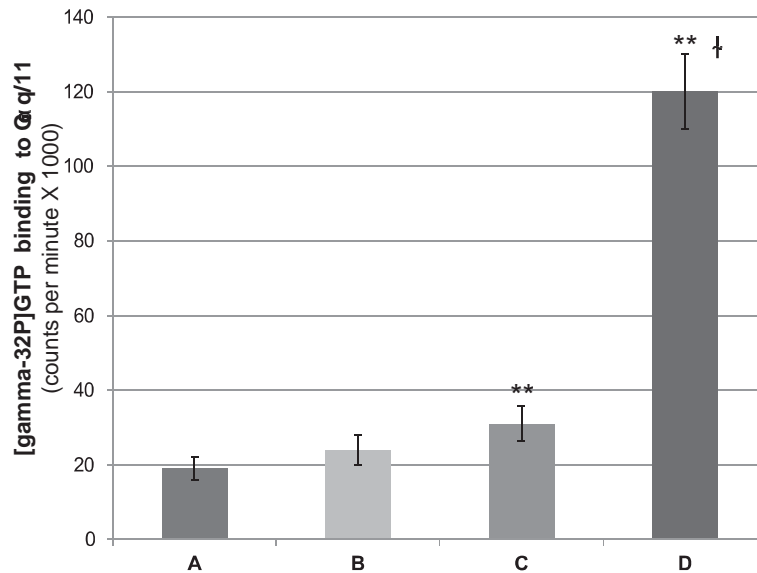


Fig. 5 The proline-alanine rich amino terminal of eIF3f is not essential for adrenoceptor activation. The experimental conditions were the same as in Fig. 3. eIF3fΔ91 is a genetic construct where the first 91 amino acids of eIF3f were removed (proline- and alanine-rich N-terminal region). a Standard Gq/11 activity reaction without catecholamine stimulation. b Standard Gq/11 activity reaction with catecholamine stimulation. c Gq/11 activity reaction without catecholamine stimulation and added eIF3fΔ91 protein. d Gq/11 activity reaction with catecholamine stimulation and added eIF3fΔ91 protein. Data and error bars represent mean ± S.E. for three independent experiments; ** $p < 0.005$ with respect to the control (a), and † $p < 0.0005$ between C and D

ADR function in different cellular processes. Our results demonstrate that the proline and alanine-rich N-terminal region of eIF3f is not required for adrenoceptor activation. Moreover, comparing the GTP binding to Gq α /11 in the presence of native eIF3f (Fig. 3 e) or truncated eIF3f (Fig. 5 D) under catecholamine stimulation, we observed that truncated eIF3f stimulates more GTP binding. Our interpretation is that the N-terminal region of eIF3f lowers its affinity for the adrenoceptor, possibly due to a steric impediment. Other studies should be conducted to elucidate if this has a functional cellular consequence. According to reported eIF3f amino acid sequences, this N-terminal region appeared during the amniote clade (Fig. 4). This was relevant to investigate, since this region was found important for other eIF3f- protein interactions [13, 14]. Taking in account that alpha 1B-ADR is present in vertebrates (Blast in NCBI and UniProtKB EMBL-EBI) it is possible that the eIF3f/ alpha 1B-ADR interaction would have arisen since then.

To explain the possible cellular function(s) derived from the eIF3f/alpha 1B-ADR interaction, we considered the following facts. The plasma membrane is an organized biological system that serves as a structural barrier and communication interface with the extracellular environment, and the alpha1-adrenergic receptors are embedded in this membrane. Alpha 1- adrenergic receptors bind to and are activated by endogenous catecholamine hormones, which are mainly involved in vasoconstriction [17]. They are coupled to phospholipase C, c-Jun N-

terminal kinase, and the mitogen-activated protein kinase downstream signal transduction pathways [17, 20, 21]; and have an important function in stress response that affects lipid, carbohydrate, and amino acid metabolism [22]. In addition to these effects, there is substantial evidence indicating that stimulation of alpha 1-ADRs by catecholamines generally enhances growth-related gene expression and cell growth in a variety of cells, including cardiac myocytes [23], vascular smooth muscle cells [24–26], hepatocytes [20, 27], and adipocytes [28].

Alpha 1B-ADR mediates co-mitogenic effects with catecholamines in different cells. For instance, activation of alpha 1B-ADR increases DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes [27], and promotes malignancy in alpha 1B-ADR transfected Rat-1 fibroblasts [29, 30]. Induction of neoplastic transformation by the alpha 1B- ADR, thus, identifies this normal cellular gene as a proto-oncogene. Also, in Rat-1 fibroblasts, alpha 1- ADRs affect the expression of cell cycle-related genes in a differential manner: the over expression of alpha 1A- ADR and alpha 1D-ADR downregulated genes ascribed to the G1/S transition phase, such as Cyclin E and DNA polymerase; this over expression upregulated p27 kip and induced G1/S cell cycle arrest. In contrast, over expressed alpha 1B-ADR transfected cells did not affect Cyclin E or DNA polymerase expression; they showed downregulated p27 kip and stimulated cell cycle progression [30]. On the contrary, CHO cells over expressing human alpha1-adrenergic receptors showed that

upon catecholamine activation, alpha 1A-ADR or alpha 1B-ADR - transfected cells exhibit inhibition of serum-promoted cell proliferation and were arrested at G1/S phase, whereas alpha 1D-ADR did not show any effect [31].

eIF3f is also a cell division and proliferation-related gene. In human A549 cells, eIF3f exhibits a fluctuating expression pattern in cycling cells, with maximum expression peaks in G1/S and in G2/M; transient expression analysis showed that eIF3f deregulation compromises cell viability and induces apoptosis [7]. In addition, altered expression of eIF3f has been reported in several human tumors, being found downregulated in some cell lines [32, 33] and upregulated in others [19].

The fact that eIF3f expression is induced in G1/S, that alpha 1B-ADR affects functions related to G1/S, and that both gene products relate physically and functionally, establish the interesting possibility that this relationship might be involved in the regulation of G1/S functions. We are presently exploring this possibility. In addition, since alpha 1B-ADR is considered as a proto-oncogene [29], and the deregulation of eIF3f is frequently associated to oncogenesis, it would be interesting to investigate if and how the interaction of these two proteins affects the control of cell proliferation, and eventually use these gene products as potential targets for cancer therapy.

Conclusions

In the present work, we report that eIF3f physically and stably interacts with the alpha 1B-ADR, and that eIF3f stimulates adrenoceptor activity. This novel protein-protein interaction may represent a regulatory link between adrenoceptor-related signal transduction and, for instance, cell proliferation and protein synthesis control.

Abbreviations

alpha 1-ADRs: alpha 1-adrenergic receptors; alpha 1B-ADR: alpha 1B-adrenergic receptor; eIF3f: eukaryotic translation initiation factor 3f.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MJGF participated in the design of the study, carried out most of the molecular studies, and participated in the draft of the manuscript. AEHM carried out the cellular studies, performed the statistical analysis, and participated in the draft of the manuscript. CAGC participated with molecular experiments. MAPG conceived the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read, revised, and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was partially financed by the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo through its CIC Research Program in favor of MAPG and AEHM. MJGF was a recipient of a PROMEP Doctoral Scholarship and CAGC of a CONACYT Masters Scholarship. PROMEP and the Universidad Tecnológica de Morelia financed the publication fee.

Author details

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3 Ciudad Universitaria Avenida Francisco J. Múgica S/N, Morelia, Michoacán 58030, México. ²Present address: Universidad Tecnológica de Morelia, Morelia, Michoacán 58200, México. ³División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán 58020, México.

Received: 2 July 2015 Accepted: 19 October 2015

Published online: 23 October 2015

References

1. Rezende AM, Assis LA, Nunes EC, da Costa Lima TD, Marchini FK, Freire ER, et al. The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates - identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. *BMC Genomics*. 2014;15:1175.
2. Asano K, Vomlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27042-52.
3. Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, et al. Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. 2006;25:4923-36.
4. Higareda-Mendoza AE, Farias AE, Llanderal JM, Mendez AB, Pardo-Galvan MA. A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition. *Miami Nat Biotech Short Rep*. 2003;14:111.
5. Csibi A, Tintignac LA, Leibovitch MP, Leibovitch SA. eIF3-f function in skeletal muscles: to stand at the crossroads of atrophy and hypertrophy. *Cell Cycle*. 2008;7(12):1698-701.
6. Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, et al. PC1 proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biol*. 2005;3:14.
7. Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galvan MA. Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. *Cell Div*. 2010;5:10.
8. Aravind L, Ponting CP. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci*. 1998;7:1250-4.
9. Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J*. 2001;20(24):7096-107.
10. Sanches M, Alves BS, Zanchin NI, Guimarães BG. The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *J Mol Biol*. 2007;370(5):846-55.
11. Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AM, et al. The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS One*. 2010;5(2):e8994.
12. Moretti J, Chastagner P, Gastaldello S, Heuss SF, Dirac AM, Bernards R, et al. The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS Biol*. 2010;8(11):e1000545.
13. Valente ST, Gilmartin GM, Mott C, Falkard B, Goff SP. Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4071-8.
14. Valente ST, Gilmartin GM, Venkatarama K, Arriagada G, Goff SP. HIV-1 mRNA 3' end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. *Mol Cell*. 2009;36(2):279-89.
15. Chu YL, Wu X, Xu Y, Her C. MutS homologue hMSH4: interaction with eIF3f and a role in NHEJ-mediated DSB repair. *Mol Cancer*. 2013;12:51.
16. Barr AJ, Brass LF, Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem*. 1997;272(4):2223-9.
17. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res*. 1996;78(5):737-49.
18. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):60-71.
19. Harvey S, Zhang Y, Landry F, Miller C, Smith JW. Insights into a plasma membrane signature. *Physiol Genomics*. 2001;5(3):129-36.
20. Spector MS, Auer KL, Jarvis WD, Ishac EJ, Gao B, Kunos G, et al. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress activated protein

- kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3556–65.
21. Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Distinct pathways of Gi- and Gq- mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 1995;270(29):17148–53.
 22. Kunos G, Ishac EJN, Gao B, Jiang L. Inverse regulation of hepatic alpha 1B- and beta 2-adrenergic receptors. Cellular mechanisms and physiological implications. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;757:261–71.
 23. Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, et al. Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):10109–13.
 24. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*. 1992;20(6):713–36.
 25. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Chen J, Hoffman BB. alpha1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(1):28–37.
 26. Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R. Alpha 1-adrenergic stimulation and beta 2-adrenergic inhibition of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1990;37(1):30–6.
 27. Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoceptor by norepinephrine. *Science*. 1985;227(4688):749–51.
 28. Thonberg H, Zhang SJ, Tvrdik P, Jacobsson A, Nedergaard J. Norepinephrine utilizes alpha 1- and beta-adrenoreceptors synergistically to maximally induce c-fos expression in brown adipocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(52):33179–86.
 29. Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11354–8.
 30. Gonzalez-Cabrera PJ, Shi T, Yun J, McCune DF, Rorabaugh BR, Perez DM. Differential regulation of the cell cycle by alpha1-adrenergic receptor subtypes. *Endocrinology*. 2004;145(11):5157–67.
 31. Shibata K, Katsuma S, Koshimizu T, Shinoura H, Hirasawa A, Tanoue A, et al. alpha 1-Adrenergic receptor subtypes differentially control the cell cycle of transfected CHO cells through a cAMP-dependent mechanism involving p27Kip1. *J Biol Chem*. 2003;278(1):672–8.
 32. Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Cunningham JT, Nelson MA, et al. Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Mol Carcinog*. 2008;47(3):235–44.
 33. Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Leong SP, Nelson MA, et al. Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. *Mol Carcinog*. 2008;47(10):806–13.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



VIII.- D I S C U S I Ó N

El objetivo central del presente trabajo fue identificar un complejo proteínico estable de eIF3f que esté relacionado a proliferación celular, diferentes a las ya reportadas previamente. Para tal efecto, implementamos una estrategia distinta y relativamente novedosa: la identificación y el aislamiento de complejos proteicos en geles nativos, que respetan las interacciones proteína-proteína celulares endógenas. Previamente, eIF3f había sido identificada como parte de eIF3 por métodos bioquímicos¹⁹, y por doble híbrido con Atrogin1/MAFbx²⁹. En geles nativos identificamos a eIF3f en varios complejos, entre ellos a eIF3, siendo el complejo de 120 kDa, después de eIF3, el más abundante, y es el menor de ellos (ver figura 12).

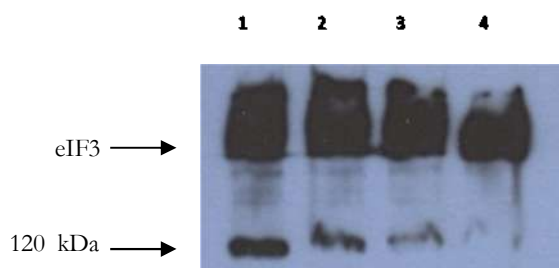


Figura 12.- Inmunodetección de eIF3f en gel nativo con extracto de A549 (carriles representa diferentes concentraciones en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 1: 100, 2:50, 3:30 y 4:10. y sobreexponiendo la placa.

Se observan otras bandas de mucha menor intensidad, mayores de 120 kDa (aprox. de entre 200 y 350 kDa). Las condiciones del gel impiden que eIF3 (aprox. 800 kDa) entre al gel separador, y se retiene en el gel concentrador. La menor intensidad de estos otros complejos puede deberse a una menor concentración, una inestabilidad del complejo, o bien a eventos transitorios.

El complejo de 120 kDa, además de ser el segundo más abundante, su tamaño nos sugería una posible relación de eIF3f con una sola proteína, lo cual resultó ser cierto. Así, determinamos que eIF3f interactúa física y establemente con el Receptor Adrenérgico alfa 1B ($\alpha 1\text{B-ADR}$).

El Receptor Adrenérgico $\alpha 1\text{B}$ (ADRA-1B ó $\alpha 1\text{B-ADR}$), son glucoproteínas de membrana con peso de 54-68 kDa. Reciben selectivamente a las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina, y a

la sintética isoprenalina. Se considera como su rol principal a su actividad en la vasoconstricción³⁵, y al unir a sus agonistas, llevan a la activación de diversas rutas de señalización como lo son la de la fosfolipasa C (PLC) y la estimulación de la hidrolisis fosoinositido (PI), con aumentos en el calcio intracelular libre y la activación de proteína quinasa C (PKC), siendo estos algunos de los eventos clásicamente descritos en su función de vasoconstricción³⁶. (Figura 13)

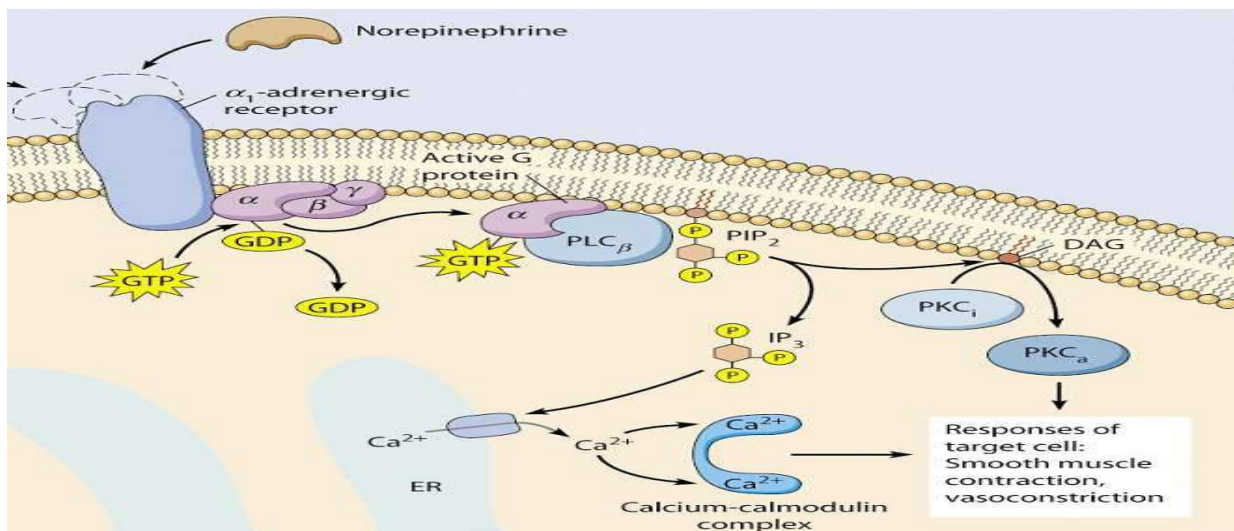


Figura 13.- Señales de la activación de proteína G mediada por la receptores adrenérgico tipo alfa 1.

Es importante hacer notar que el antagonista prazosina inhibe la acción de vasoconstricción de los tres adrenoreceptores alfa 1. Gonzáles-Cabrera reporta que la inhibición de la proliferación por sobreexpresión de ADRA 1A y ADRA 1D en fibroblastos de rata, es revertida por la adición del antagonista prazosina³⁷. Sin embargo, la estimulación de la proliferación por sobreexpresión de ADRA 1B es contraria y sorprendentemente, insensible a prazosina. En nuestro laboratorio, datos en vía de publicación nos indican que la estimulación de la actividad adrenérgica mediada por eIF3f es también insensible a prazosina. Ante estos datos, nos planteamos la posibilidad de proponer una ruta diferente a la vasoconstricción para ADRA 1B, donde eIF3f tiene un rol relevante en su activación.

Se ha reportado que la adición de catecolaminas induce proliferación celular e incremento en las tasas de síntesis de ADN, en una variedad de tipos celulares como: células de músculo liso, hepatocitos y osteocitos^{38,39,40}. Por otro lado,, el receptor adrenérgico $\alpha 1B$ puede funcionar como un protooncogen y ser activado por alguna alteración mutacional (tercer bucle intracelular (*Arg²⁸⁸ - Lys, Lys²⁹⁰ - His, y Ala²⁹³ - Leu*), importante para el acoplamiento de la proteína G), generando cáncer. La identificación de tales receptores mutantes puede proporcionar marcadores específicos de la enfermedad y metas terapéuticas para su tratamiento⁴¹.

También en el presente trabajo se realizaron estudios acerca del dominio Poly PA de eIF3f; un análisis de contenido aminoacídico de esta región nos dió el siguiente resultado:

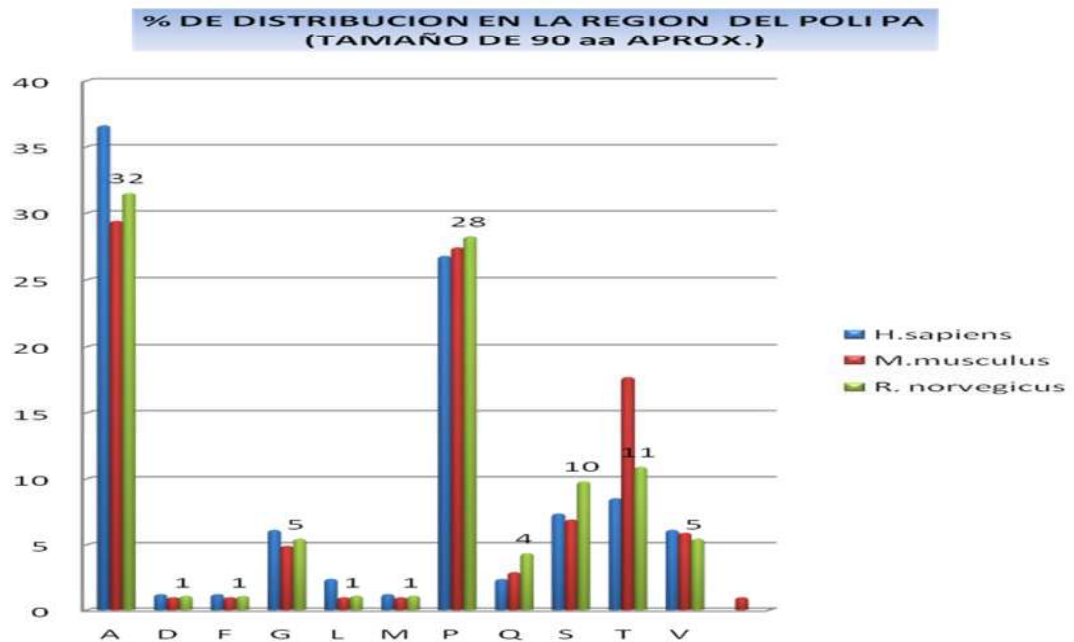


Figura 14.- Distribución porcentual de aminoácidos en el dominio N91 eIF3f ó Poly PA de eIF3f de *H. sapiens* ((Humano, (azul)) *M. musculus* ((Ratón (rojo)) y *R. norvegicus* ((Rata (amarillo))

El resultado de este análisis nos muestra una distribución aminoacídica de 66 % de prolina y alanina, y 26% de treonina, serina y valina. (Figura 14)

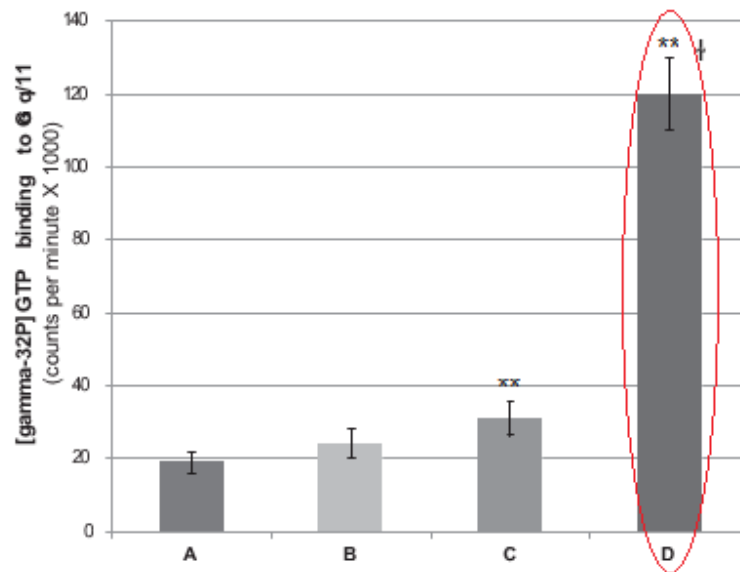
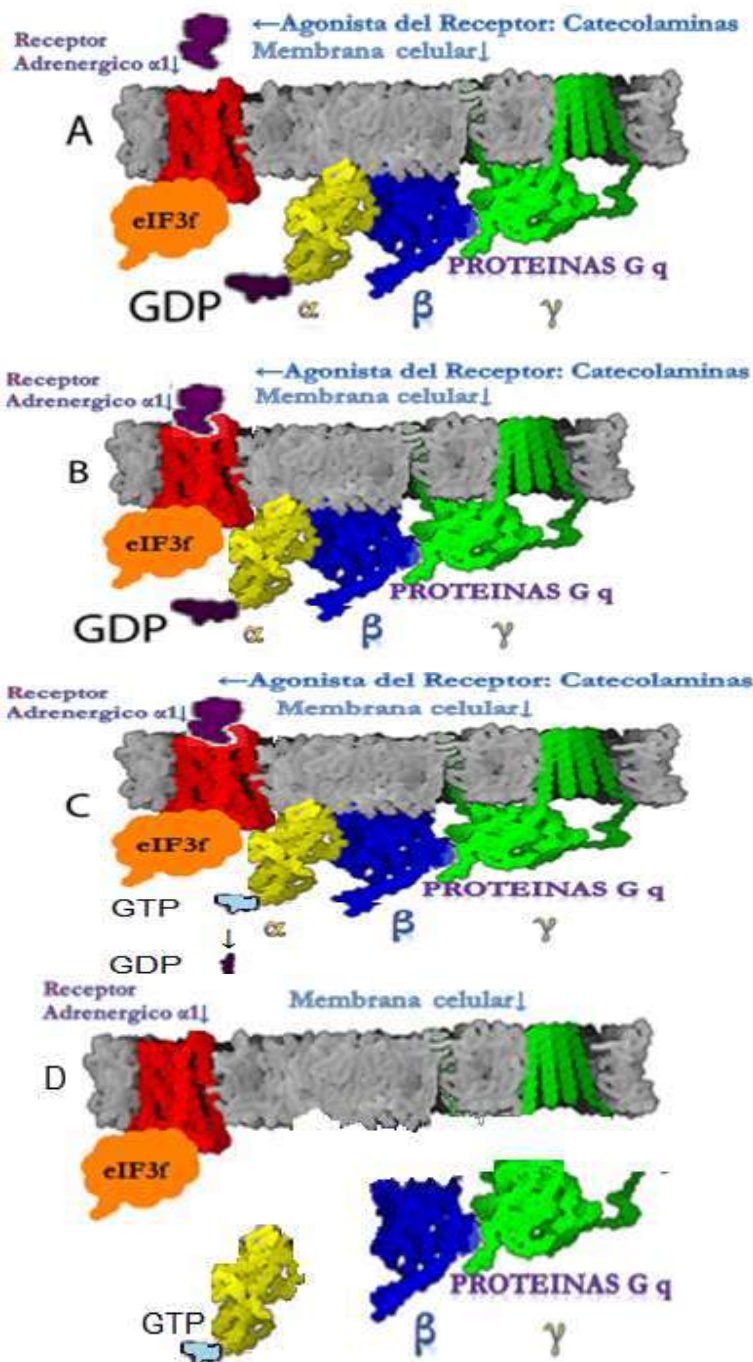


Figura 16 Activación del Adrenoreceptor medida por la incorporación de construcción eIF3fΔ91

Existen al menos dos posibilidades que explicarían este dato: Primero la adquisición del dominio Poly PA no compromete la función activadora de eIF3f y por lo tanto, no fue seleccionada en contra, y/o; segundo el dominio Poly PA modula la función activadora de eIF3f. El primer caso indicaría que el dominio Poly PA estaría implicado en una función distinta (y aún desconocida) al de la activación adrenérgica. El segundo caso indicaría que la adquisición del dominio Poly PA generaría un nuevo y más complejo nivel de regulación de la actividad adrenérgica por eIF3f.

La relación de eIF3f/alfa 1B-ADR nos obliga a replantearnos, el papel de los receptores adrenérgicos en la fisiología celular, especialmente en el caso de alfa 1B-ADR. En la figura 17 se presenta un modelo propuesto de la estimulación de la actividad adrenérgica por la presencia de la proteína eIF3f, mostrando una interacción física estable con el receptor durante el proceso de translocación de GTP a la proteína Gq alfa.



A.- El receptor adrenérgico (rojo) es inactivo. eIF3f (naranja) está asociado al receptor de manera estable. La proteína Gq α (amarillo) está unida a GDP. No hay transducción de señal.

B.- El receptor adrenérgico (rojo) es activado por el agonista. eIF3f (naranja) al estar asociado al receptor estimula la señalización. La proteína Gq α está unida a GDP, se une al receptor. Inicia transducción de señal.

C.- El receptor adrenérgico (rojo) activo es estimulado por eIF3f. (naranja) La proteína Gq α inicia para la translocación de GDP por GTP. La Transducción de señal Continua a la activación de la señal.

D.- El receptor adrenérgico (rojo) queda libre de agonista y permanece asociado a eIF3f. (naranja) La proteína Gq α se separa por incorporación de GTP. y Gq β y γ quedan libres.

Figura 17.- Modelo propuesto de la estimulación de la actividad adrenérgica por la presencia de la proteína eIF3f. **A.** Actividad adrenérgica en reposo, hay asociación con la proteína eIF3f con el adrenoceptor, la proteína Gq α está unida a GDP, se mantiene asociada a las proteínas Gq β y Gq γ . **B.** Se activa el adrenoceptor por acción de catecolaminas, se promueve la translocación de GDP por GTP, eIF3f se mantiene asociado con el adrenoceptor estimula la translocación. **C.** La proteína Gq α se une a GTP. **D.** Gq α unida GTP se separa del receptor y se disocia de Gq β y Gq γ , eIF3f mantiene la interacción con adrenoceptor.

Con las referencias reportadas anteriormente y datos preliminares de nuestro grupo de trabajo, nos indican que esta ruta probablemente involucre a Akt- p27 kip, ambas proteínas son claves para la transición G1/S. Se propone una acción directa de la interacción de eIF3f/alfa 1B-ADR sobre un intermediario (el cual actualmente desconocemos) que incide sobre la vía Akt, que al activarse, promueve la degradación de p27, y de esta manera, facilita la progresión del ciclo al activar el complejo Ciclina E/Cdk2.

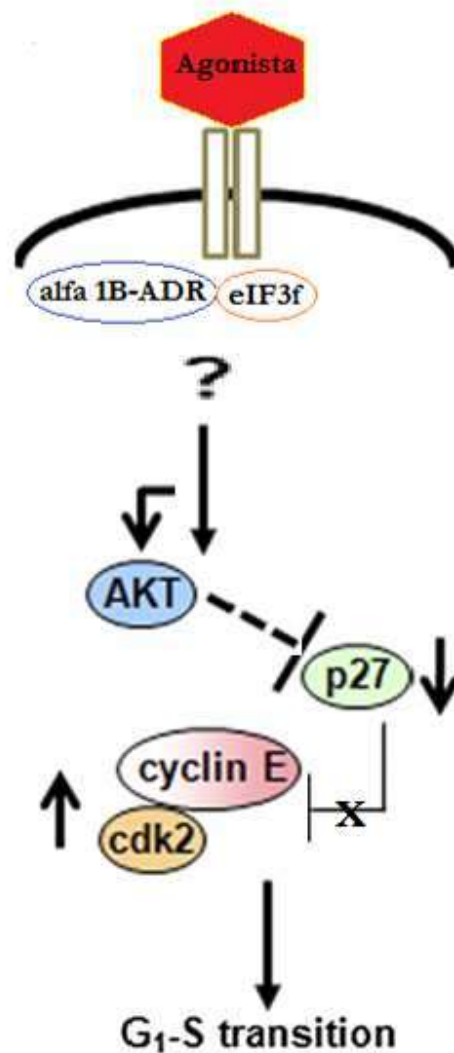


Figura 18.- Modelo propuesto de la ruta Akt/p27 inducida por eIF3f/alfa 1B-ADR. La asociación con de la proteína eIF3f con el adrenoreceptor activado por el agonistas, la proteína alfa 1B-ADR promueve la degradación de p27 vía Akt, facilitando la progresión del ciclo celular en la transición G1/S.

IX.- P E R S P E C T I V A S

En el presente trabajo, se reporta que la proteína multifuncional eIF3f, se une físicamente al receptor alfa 1B-ADR y estimula la actividad adrenérgica in vitro en presencia de catecolaminas. Lo anterior implica el descubrimiento de una nueva asociación con un adrenoreceptor. La relación de eIF3f/alfa 1B-ADR nos obliga a replantearnos, el papel de los receptores adrenérgicos en la fisiología celular, especialmente en el caso de alfa 1B-ADR, además de su rol en la vasoconstricción. De hecho, es posible que la vasoconstricción sea una función secundaria o particular de alfa 1B-ADR, debido a que este receptor se encuentra presente en prácticamente todos los tipos celulares e incluso, el único presente en hepatocitos. Siguiendo este razonamiento, un proceso que comparten prácticamente todos los tipos celulares es la proliferación.

Así, la ruta de señalización que controlaría la relación eIF3f/alfa 1B-ADR, sería una implicada en la proliferación celular. Nosotros proponemos que esta ruta se presenta durante el ciclo celular, específicamente durante la transición G1/S. (ampliamente señalado en Resultados). De inicio, será necesario definir la ruta per se. Datos preliminares de nuestro grupo de trabajo, nos indican que esta ruta probablemente involucre a Akt1- p27 kip, ambas proteínas son claves para la transición G1/S. Consecuentemente, habremos de investigar qué procesos celulares son regulados, modulados ó afectados por esta ruta de señalización, adscritos a la síntesis de DNA, etc.

Asimismo, será interesante determinar si el complejo se forma con eIF3f en especies que no contienen el dominio Poly PA, pero que expresan alfa 1B-ADR.

Finalmente, una vez conocida más a detalle la manera en que la relación eIF3f/alfa 1B-ADR, afecta o controla a estos procesos celulares, podríamos preguntarnos si es posible usar esta relación como blanco terapéutico a patologías agudas o crónicas de relevancia para el ser humano, como aquellas relacionadas con la pérdida del control de la proliferación celular, como por ejemplo el cáncer.

X.- RESUMEN DE RESULTADOS.

El complejo multiproteínico de 120 kDa está formado por eIF3f y el receptor adrenérgico $\alpha 1B$.

Mediante la estimulación por catecolaminas, eIF3f promueve la actividad adrenérgica “in vitro”.

La estimulación de la actividad adrenérgica por eIF3f “in vitro”, es independiente de la región eIF3f N-91 terminal (Poly PA).

XI.- CONCLUSIÓN

La proteína eIF3f se asocia con el receptor adrenérgico $\alpha 1B$, involucrado en proliferación celular, y estimula la actividad adrenérgica, esta estimulación es independiente del dominio POLY PA de eIF3f.

XII.- ANEXOS:

CAPÍTULO I. MATERIALES Y METODOS.

Para la identificación de la interacción entre por eIF3f/Receptor adrenérgico α 1B se utilizaron como modelos de estudio a las líneas celulares A-549, HEP G2, Ramos, de origen humano y con un nivel de bioseguridad 1, así como la línea MC3T3-E1 de ratón, bioseguridad 1. La línea celular A-549 proviene de un adenocarcinoma pulmonar y su crecimiento en cultivo es adherente; la línea celular Ramos proviene de un linfoma de Burkitt y su morfología de crecimiento en cultivo es en suspensión, y HEP G2 una línea epitelial del hígado (designación HB-6065) de crecimiento adherente. Finalmente, la línea MC3T3-E1 es un preosteoblasto de ratón de crecimiento adherente.

Las tres líneas celulares humanas se propagan en Medio Mínimo Esencial (MEM por sus siglas en inglés) de Sigma, suplementado con 18 mM NaHCO₃ (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma), 10 mM Hepes (Sigma), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen), y la MC3T3-E1 en MEM-alfa. Los cultivos se mantienen en este medio con una atmósfera de CO₂ 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 (o MEM alfa) suplementado con SFB al 10% y DMSO (Dimetil sulfóxido) al 10 %.

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.

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:

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

Dónde:

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:

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

Cosecha y Lisis celular.

Para la cosecha y lisis celular se llevan 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 25 cm² 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 25 cm², 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 Reagent, Fermentas). 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 (10 cm²): Se descarta el medio 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 Fermentas) por cm² y se realiza un raspado al plato hasta desprender (pudiendo verificar este proceso en el microscopio). Una vez desprendidas se transfieren a un tubo eppendorf y se centrifuga a 14,000 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

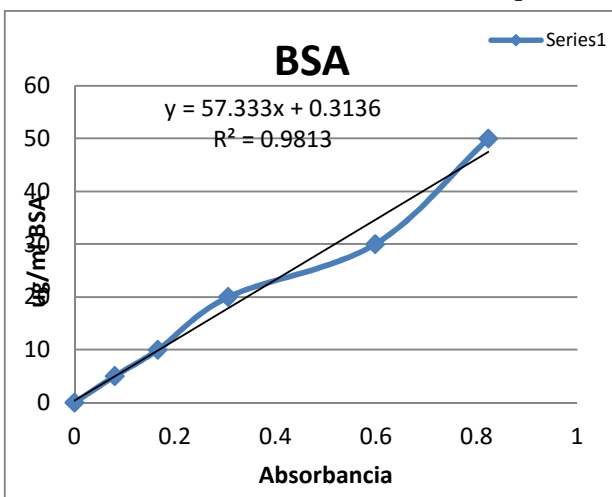
La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. Para el blanco buffer lisis se utilizaron 799 µL de agua destilada estéril, 1 µL de ProteoJET y 200 µl de reactivo de Bradford. La absorbancia se determinó a 595 nm de 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.



CONCENTRACIÓN de PROTEÍNA (ug/uL)	Muestra Buffer de lisis ul con BSA	Absorbancia a 595 nm
0 (blanco)	0	0
5	2	0.08
10	4	0.166
20	8	0.306
30	12	0.598
50	20	0.823

Ensayo Western Blot

Electroforesis

El corrimiento electroforético se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes 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/Glisina/Trisbase a pH 8.3) a 80V de 90 a 120 min.

Gel nativo al 8%

El gel nativo es una herramienta que nos permite separar los complejos proteicos con base a su peso molecular sin alterar las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas.

Para elaborar un gel nativo al 8% se ensamblaron las placas de vidrio, seguido se preparó el gel con las siguientes cantidades:

- a). Gel separador al 8%: En un tubo falcon se agregó 2.3mL de H₂O tridestilada, 1.3mL de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1.3mL de 1.5M Tris pH 8.8, 50µL de 10% de persulfato de amonio (APS) y 3µL de N,N,N,N-Tetrametil-Etilendiamino (TEMED). Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en las placas de vidrio y se esperó a que polimerice (aproximadamente 30 minutos).
- b). Gel concentrador al 5%: En un tubo falcón se adicionó 1.4mL de H₂O tridestilada, 330µL de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 250µL de 1M Tris pH 6.8, 20µL de 10% de APS y 2µL de TEMED. Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en las placas de vidrio, se puso el peine de teflón y se esperó a que polimerice (aproximadamente 30 minutos).
- c) Gel desnaturizante al 8%: Para preparar un gel desnaturizante al 10% se preparó de la misma manera que el gel nativo solamente se agregó dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, a el gel separador 50µL y a su concentrador 20µL, además de que el buffer de corrida Tris-Gly se le agregó 0.5% SDS.

Transferencia (Electroblotting)

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 (Inmunodetección)

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 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.

Tabla A. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Marca
eIF3f	Conejo	1:1000	Biolegend
GAPDH	Ratón	1:2000	Millipore
ADRA1B	Cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology

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 necesario para cubrir la 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 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 de la reacción permite detectar la actividad enzimática.

Tabla B. Anticuerpos secundarios.

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

Inmunoprecipitación

Esta técnica consiste en la incubación de un anticuerpo (Ab) específico para una proteína dentro de un homogenado clarificado o mezcla de proteínas, en donde se espera que se forme un complejo inmune con la proteína problema (antígeno). La proteína problema debe interactuar con uno o más proteínas en un complejo. Después de la unión al anticuerpo, el complejo entero puede ser aislado de la mezcla usando proteínas inmovilizadoras como la proteína A o la proteína G.

Después de lisar las células, se incubó con 5 μ L de anticuerpo contra eIF3f durante toda la noche, a 4°C con agitación suave. Se añadió 50 μ L de la proteína A sefarosa y se incubó por 6 horas, 4°C y agitación vigorosa. Se centrifugó a 14000xg a 4°C durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 μ L de buffer de lavados (50mM Tris- HCl pH 7.5,150mM NaCl y 1% Tritón X-100). Se repitieron los pasos desde la centrifugación de 14000xg tres veces. A la muestra se le adicionó 25 μ L de buffer de carga (50mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol, 12.5 mM EDTA y 0.02 % azul de bromofenol) y se calienta en baño maría durante 5 minutos, se centrifugó a 14000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo y se guardó a 4°C para resolverlo en geles desnaturalizantes.

Protocolo de eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de Western blot (Mild stripping)

Incubación de la Membrana: Use el volumen suficiente para cubrir la membrana con Mild stripping Buffer. (Mild stripping, 15 g glycine, 1 g SDS, 10 ml Tween 20, Adjust pH to 2.2, Bring volume up to 1 L with ultrapure water.) Incubar a temperatura ambiente por 5-10 minutos, Descartar el buffer, Agregar de nuevo Mild stripping Buffer por 5-10 minutos, Descartar el buffer., Lavado con PBS por 10 minutos, Descartar el buffer, Lavado con PBS por 10 minutos, Descartar el buffer., Lavado con TBST 5 minutos, Descartar el buffer, Lavado con TBST 5 minutos, Descartar el buffer, Listo para bloqueo de la membrana.

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 de 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 con el software de Kodak Digital Science ID.

Tinción con Azul Brillante de Coomassie

El gel se sumergió en un volumen que cubra el gel de azul brillante Coomassie, se incubó toda la noche y al otro día se hicieron 4 lavados cada media hora con la solución de destinción [30% metanol (CH₃OH) grado industrial, 10% ácido acético glacial grado industrial y 60% H₂O destilada].

CAPÍTULO II. CICLO CELULAR

El ciclo celular de eucariontes es el conjunto de eventos responsables de la duplicación de la célula y está definido por el periodo que ocurre entre dos divisiones mitóticas⁴². El ciclo celular se ha dividido en cuatro fases diferentes: G1 (G de gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (gap 2) y M (mitosis), y consiste en una cascada de eventos genéticos y bioquímicos finamente regulados en tiempo y espacio por puntos de control. La eliminación de los puntos de control puede resultar en muerte celular, distribución incorrecta de los cromosomas u otros orgánulos o incremento en la susceptibilidad a perturbaciones ambientales^{43,44}. 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. Las células también duplican su masa y todos sus orgánulos citoplasmáticos⁴⁵.

Una vista global del ciclo celular permite observar dos etapas bien diferenciadas

- Mitosis (para células somáticas)
- Interfase

Durante éstas, 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, salen del ciclo y entran en un estado de reposo en el que no se dividen conocido como G0⁴⁶.



Figura II.1. Fases del ciclo celular. Se muestran cada una de las fases del ciclo celular. <http://ocw.unam.mx/ocw/unam/2013/06/d-eol-celular.html>

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.

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 G₂⁴⁷.

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 G₂⁴⁵.

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 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 M⁴⁷.

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. Para garantizar el correcto inicio y progresión 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 anterior⁴⁸.

Los puntos de control se definen como los instantes del ciclo celular eucariote en los que puede detenerse la progresión del mismo hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada puede producirse daño genético y/o celular. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos 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 mitosis⁴⁷.

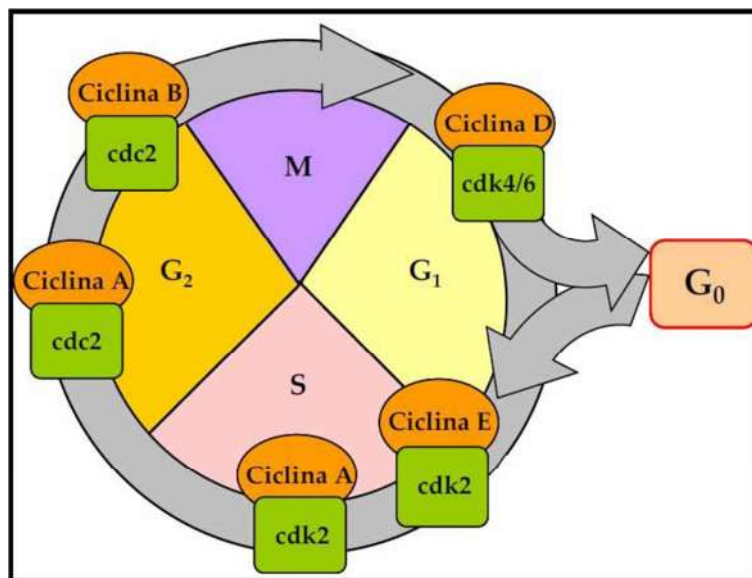


Figura II.2. Complejos enzimáticos CDK/Ciclina. Regulan la progresión del ciclo en las diferentes fases y transiciones del ciclo celular.

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 y la biosíntesis de otras biomoléculas como los ácidos grasos. 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. Sin embargo, la cascada de regulación tiene otras opciones diferentes a las del avance a la fase S, ya que también se integran rutas alternativas hacia la detención temporal del ciclo celular, la quiescencia, la diferenciación y la apoptosis⁴⁹. Este punto de control está 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 a S. E2F activa genes que codifican muchas de las proteínas involucradas en la síntesis de ADN. Por ejemplo, estimula la transcripción de genes que codifican a las ciclinas de la fase G1 (ciclinas E y A) y a la quinasa dependiente de ciclina 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.

El segundo punto de control ocurre al final de G2, antes del inicio de la mitosis (G2/M). Si la célula no supera este punto, permanece con ese complemento doble de dotación cromosómica. Está regulado por el factor promotor de la mitosis (MPF en inglés, formado por Cdk1/ciclinaB; véase en este mismo capítulo proteínas reguladoras del ciclo celular). En eucariotes multicelulares, la quinasa nuclear Wee1 fosforila el residuo inhibidor T14 de la Cdk del MPF, mientras que la quinasa homóloga Myt1 fosforila los residuos T14 y Y15. Otra cinasa, denominada quinasa activadora de Cdk (CAK), fosforila un residuo de serina o treonina (S/T 160 en animales y T161 en levaduras). Cuando los tres residuos están fosforilados el complejo MPF es inactivo. Por otro lado, las isoformas de la fosfatasa Cdc25 (Cdc25a, b y c) controlan la activación específica de distintos complejos Cdk-

Cyc, desfosforilando los residuos T14 y Y15⁵⁰. La ausencia de Cdc25c en el núcleo deja al complejo MPF en un estado inactivo y la célula se detiene en G2⁴⁹.

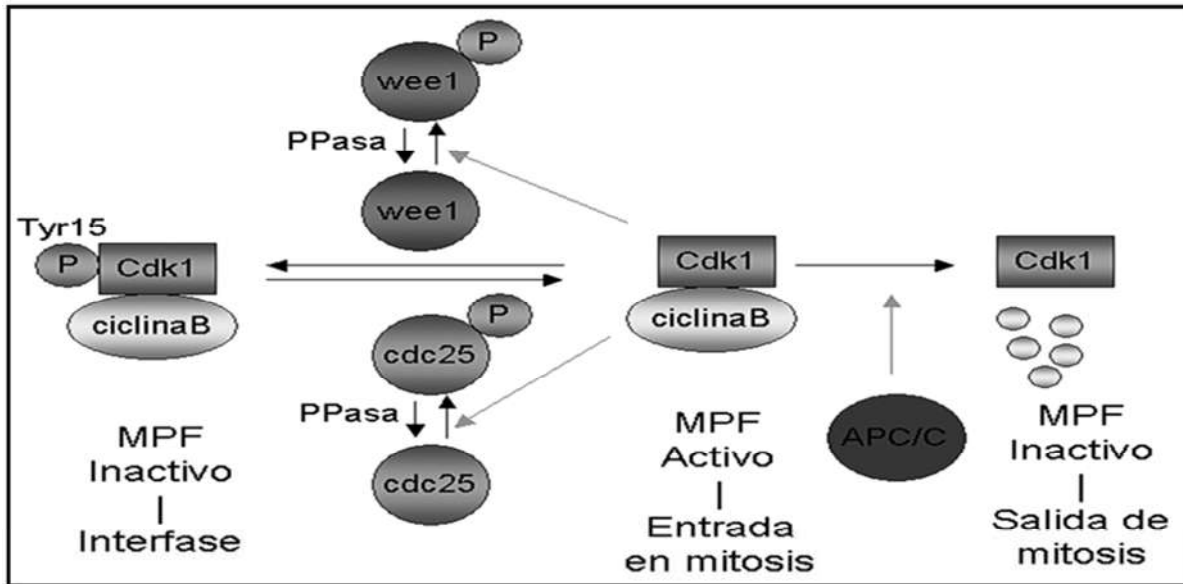


Figura II.3. Segundo punto de control del ciclo celular. El factor promotor de la mitosis (MPF), conformado por el complejo ciclina B/Cdk1 es activado por medio de la desfosforilación en la Tyr 15 para la entrada a la fase M o "Mitosis" (http://es.wikipedia.org/wiki/Punto_de_control_de_la_mitosis#mediaviewer/Archivo:MPF_regulation.png).

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 huso 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. El complejo promotor de la anafase (APC, por sus siglas en inglés; también llamado APC/ciclosoma o APC/C) es una ligasa de ubiquitina formada por al menos 11 subunidades proteicas en los vertebrados. El complejo APCCdc20 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 poliubiquitina 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.

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 APCCdh1 poliubiquitina las ciclinas mitóticas, las cuales son degradadas por el proteosoma 26S y la célula puede proseguir hacia la telofase y la citocinesis⁴⁹.

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 celular⁵¹.

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 Ciclina/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 diana⁵². 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's 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 sintetizada⁵¹.

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.

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 transcripcionalmente. 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.

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 ADN 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).

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). Las Cdk's son críticas para la progresión del ciclo celular debido a que su inactivación previene la mitosis⁵¹. 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.

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 distintas⁴⁷.

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 quinasa de la Cdk ⁵¹.

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.

- 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.

- Tasa de degradación de ciclinas: determina, junto con la síntesis, la concentración disponible para su unión a las Cdk.

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 fosfatasa, que a su vez están reguladas por la propia Cdk activa.

- 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.

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)⁴⁷.

Tabla II.1. Inhibidores de los complejos Ciclina-Cdk.

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 con Cdk4 o Cdk6, pues compiten con las ciclinas D
	p15	INK4b MTS2	
	p18	INK4c	
	p19	INK4d ARF	

La familia de proteínas INK4 (Inhibitors of Cdk4) está conformada por las proteínas p16, p15, p18 y p19 (Canepa 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 Cdk4 o Cdk6 y por tanto la inhibición de la actividad de la ciclina D cuyo sustrato principal es la proteína Rb (Roussel 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 ⁴⁶.

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 - p21Cip, p27Kip y

p57Kip - 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 acción⁵³.

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 celular⁵⁴. 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 la detención celular en dicha fase, esto en respuesta a diversas señales anti-mitogénicas⁵⁵. Sin embargo, esta familia de proteínas no limita su acción a solo estos complejos de G1, sino que pueden unirse a la mayoría de los complejos de Ciclina/Cdk, al menos in vitro⁵⁶.

Proteína 27 (p27kip1): 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 ADN⁵⁷.

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 acoplejado. 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) ⁵⁸.

Múltiples vías de transducción de señales mitogénicas y anti-proliferativas pueden regular la síntesis, estabilidad, localización o actividad de p27 ⁵⁹. 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 ⁵⁶. Por lo contrario, al recibir señales anti-mitogénicas su expresión aumenta y se une a los complejos ciclina/Cdk para inducir una detención en la fase G1, y por tanto, el avance a la siguiente fase⁶⁰.

Los niveles de ARNm 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. 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 blancos para la ubiquitinación en la proteína p27 son las lisinas 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 inhibidora⁶¹.

La degradación de p27 es crítica para el avance en la transición G1/S del ciclo celular⁵⁸. 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 ⁵⁷. 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 degradación⁵⁸.

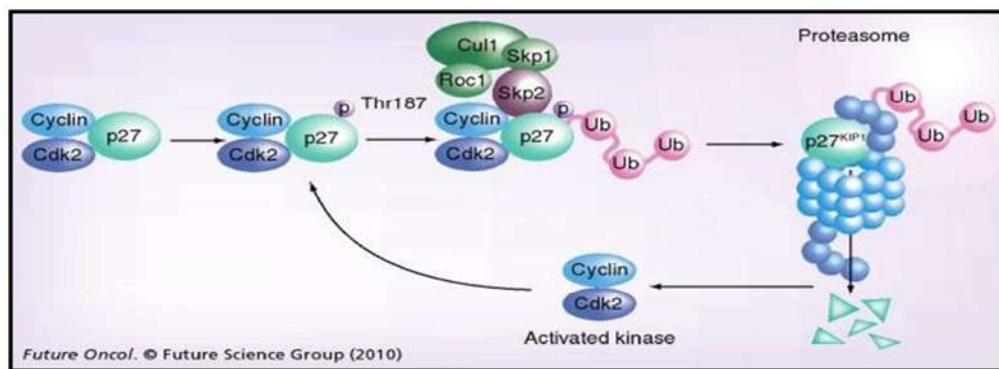


Figura II.4. Degradación de la proteína p27. Una vez que la proteína p27 marcada para su degradación (fosforilada en Thr187) el complejo SCFskp2 comienza el proceso de ubiquitinación para su posterior degradación en el proteosoma (Hersko 2010)⁶²

CAPÍTULO III. EL RECEPTOR ADRENÉRGICO ADRA1B

Los adrenoreceptores son las estructuras moleculares que en las células del organismo reciben selectivamente la señal de la adrenalina y la noradrenalina, y responden transformándola en una respuesta celular específica. A partir de las respuestas obtenidas en diversos órganos a las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina, y a la sintética isoprenalina, Ahlquist en 1948 clasificó los receptores adrenérgicos en dos clases, a y b. Se definieron como receptores α (α -adrenoceptores) los que eran estimulados por las tres catecolaminas con el orden de potencia: adrenalina > noradrenalina >> isoprenalina, y como receptores β (β -adrenoceptores) los que eran estimulados con el orden de potencia isoprenalina > adrenalina > noradrenalina.

Así, por ejemplo, la contracción del músculo liso causada por moléculas adrenérgicas es consecuencia de la activación de receptores α , mientras que la relajación del músculo liso o la activación cardíaca son debidas a la activación de receptores β . Posteriormente, se confirmó la existencia de estos receptores por la aparición de fármacos antagonistas que bloquean de una manera selectiva las acciones α (ergotamina y fenoxibenzamina) o las β (dicloroisoprenalina y propranolol). Hoy en día se acepta la existencia de tres tipos principales de receptores adrenérgicos: los α 1, α 2 y β -adrenoceptores cada uno de los cuales presenta a su vez varios subtipos. Los adrenoceptores son glucoproteínas de membrana de 64-68 kD, cuyas cadenas polipeptídicas (402-525 aminoácidos) poseen secuencias fuera de la célula (terminal-NH₂), en la membrana celular (siete hélices transmembranales) y en el citoplasma (terminal-COOH).

Estas estructuras poseen, por un lado, los grupos funcionales para fijar agonistas y, por el otro, los encargados de activar la transducción de señales a través de proteínas G.

Los receptores α se dividieron inicialmente en dos grupos: α 1 y α 2. En diversos órganos se comprobó que la adrenalina, la noradrenalina y otros agonistas con acción α (pero no los que tenían acción exclusiva β), eran capaces de inhibir la liberación de noradrenalina provocada por estimulación de fibras noradrenérgicas. Esta acción α es presináptica. Sin embargo, no todos los fármacos agonistas α ejercían este efecto y se comprobó la existencia de una buena diferenciación de potencia; por un lado, agonistas α cuya capacidad de inhibir la liberación de noradrenalina tenían el siguiente orden de potencia: clonidina >> a-metilnoradrenalina > adrenalina > noradrenalina >> fenilefrina = metoxamina y, por el otro, agonistas α cuya capacidad de contraer fibra muscular lisa

era: adrenalina > noradrenalina > fenilefrina > a-metilnoradrenalina > clonidina = oximetazolina > isoprenalina = dopamina.

A los receptores responsables de la inhibición presináptica se les denominó α_2 , y a los del efecto constrictor, α_1 . Como se verá posteriormente, existen también receptores α_2 de localización postsináptica, por lo que el concepto anatómico se ha sustituido por una clasificación farmacológica y funcional.

La existencia de receptores α_1 y α_2 fue confirmada por la aparición de antagonistas específicos (p. ejemplo: prazosina para α_1 -adrenoceptores y rauwolscina y yohimbina para los α_2). La caracterización de nuevos subtipos de α -adrenoceptores (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}) pone de manifiesto la complejidad de esta familia de receptores, expresión probable de la multitud de funciones asociadas.

Los β -adrenoceptores se dividieron inicialmente en dos grupos: β_1 y β_2 . Los receptores β_1 , que predominan, por ejemplo, en el corazón, se caracterizan por tener una afinidad alta y prácticamente idéntica por la adrenalina y la noradrenalina; en cambio, los β_2 , localizados sobre todo en el músculo liso, tienen unas 10-50 veces mayor afinidad por la adrenalina que por la noradrenalina. Esta subdivisión se confirmó por la existencia de fármacos antagonistas específicos (p. ej., metoprolol para receptores β_1 y butoxamina para los β_2). Más recientemente se ha identificado un nuevo subtipo de β -adrenoreceptor (β_3 - adrenoreceptor) que predomina en tejido adiposo y es unas 10 veces más sensible a la noradrenalina que a la adrenalina y presenta escasa afinidad por el propranolol⁶³. Las secuencias “deducidas” de aminoácidos a partir de los tres genes de receptores de α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) y los tres genes del receptor α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{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 fijación del ligando y la activación de proteína G parecen concordar con los establecidos sobre los receptores β . Dentro de los dominios transmembranales, los tres receptores α_1 comparten una identidad aproximada de 75% en cuanto a residuos aminoácidos, al igual que los tres receptores α_2 , pero los subtipos α_1 y α_2 no son más semejantes que lo que son los subtipos α y β (aproximadamente 30 a 40%)⁶⁴.

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 son de importancia considerable, en particular para la identificación de dianas farmacológicas para la modulación terapéutica⁶⁵.

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. Los subtipos de α 1ARs 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. 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 1ARs potencia de excitación en respuesta al glutamato o acetilcolina. La activación α 1ARs es principalmente excitatoria en regiones como el núcleo reticular talámico, dorsal de rafe y las neuronas motoras espinosas. Estas características funcionales implican una complejidad creciente de la señalización y la regulación de los subtipos de α 1ARs que podrían representar la base mecánica de su especificidad funcional en diversos tejidos⁶⁶.

El discernimiento de la función de los α 1ARs 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 1ARs. Una complejidad añadida en el estudio de la función específica de los subtipos α 1ARs 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 miocardio⁶⁷.

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 celular⁶⁸. Aunque se sabe poco sobre el mecanismo molecular por el que distintos subtipos de α 1ARs regulan la proliferación celular, en el 2004 González-Cabrera y colaboradores encontraron en fibroblastos Rat-1, cuyas vías están estimuladas por α 1ARs, que la activación por epinefrina altera la

transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, entre estos genes se incluyen: ciclina E, 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 (p27Kip1, p21Cip1) 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 II “Puntos De Control Del Ciclo Celular”, 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 (CDKIs), incluyendo p27Kip1 y p21Cip1. 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 arretando el ciclo celular, en contraste, el receptor adrenérgico α 1B causa una desregulación o avance en el ciclo celular.

Tabla III.1. Expresión de genes del ciclo celular.

Gen	α 1AAR	α 1BAR	α 1DAR
Ciclina E	- 3.3 \pm 0.7	SC	- 4.4 \pm 0.2
CDK2- α	- 2.4 \pm 0.7	SC	- 4.1 \pm 0.3
PCNA	- 2.1 \pm 0.1	SC	- 3.3 \pm 0.0
DNA pol. Subunidad α I	- 2.5 \pm 0.1	SC	- 2.0 \pm 0.1
DNA pol. Subunidad α II	- 4.9 \pm 1.0	SC	- 3.9 \pm 1.0
DNA pol. Subunidad α III	- 2.6 \pm 0.5	SC	- 4.2 \pm 0.2
DNA pol. Subunidad α IV	- 2.6 \pm 0.1	SC	- 4.2 \pm 0.1
Ciclina B	- 4.0 \pm 0.1	SC	- 6.7 \pm 1.0
Promotor de Cdc2	- 2.4 \pm 0.3	SC	- 3.5 \pm 0.1
CCND1	SC	7.3 \pm 0.4	SC
Ciclina D1	SC	4.8 \pm 0.7	SC
p27 ^{kip1}	13.7 \pm 1.2	6.5 \pm 1.2	13.4 \pm 0.7
p21 ^{Cip1}	SC	4.7 \pm 1.7	SC

Cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular luego de la exposición de los α 1ARs a epinefrina (10 μ M, 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.

Los adrenoreceptores fueron primeramente divididos en dos subtipos, alfa1A y alfa1B, basados en la afinidad diferenciada de los receptores para el urapidil metílico 5 (5-MU), WB-4101^{69,70} y el antagonista irreversible cloroetilclonidina⁷¹. Los alfa1A demostraron alta afinidad para 5-MU y WB-4101 y eran insensibles a cloroetilclonidina, y los alfa1B eran sensibles a la CCE y tenían afinidad baja para 5-MU y WB-4101.

Actualmente, se ha alcanzado un consenso, a la subdivisión de adrenoreceptores alfa 1 en tres subtipos que está generalmente aceptada: alfa1A (ADRA1A) (antes $\alpha 1c$ ⁷²), alfa1B (ADRA1B)⁶⁶, y alfa1D (ADRA1D) (antes $\alpha 1a/d$;^{72,73}) (Figura 1)⁷⁴



Figura III.1 subdivisiones de adrenoreceptores alfa 1.

En seres humanos, alfa1A-, alfa1B-, y alfa1D son codificados por genes distintos situados en los cromosomas 8, 5, y 20, respectivamente⁷⁵. Además, la heterogeneidad humana de adrenoreceptores alfa 1 viene de la existencia de variantes múltiples que diferencian en longitud y la secuencia de sus dominios del C-terminal⁷⁶. Se ha postulado un cuarto, el alfa1L^{77,78}, basado exclusivamente en los criterios farmacológicos (afinidad relativamente baja para el prazosin y otros antagonistas tales como RS-17053). Es bien sabido que los adrenoreceptores alfa 1 están acoplados principalmente a la familia de proteínas Gq/11 para estimular actividad del fosfolipasa C y que esta enzima promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato produciendo el trifosfato y el diacilglicerol de inositol. Estas moléculas actúan como segundos mensajeros que median la liberación intracelular de Ca^{2+} de vesículas no mitocondriales y que activan a la cinasa de proteína C, respectivamente^{79,80}.

Los tres subtipos de adrenoreceptores alfa 1 tienen diversa actividad en la fosfolipasa C. Según Theroux y otros, el orden de eficacia de señalización (aumento en la formación del trifosfato del inositol y Ca^{2+} intracelular) posterior a la unión del agonista a adrenoreceptores recombinantes expresados en células embrionarias humanas del riñón 293 son el siguiente orden: alfa1A después alfa1B y finalmente alfa1D⁸¹.

Otras vías señalan que al ser activados los adrenoreceptores: hay Afluencia Ca^{2+} , liberación del ácido araquidónico, activación del fosfolipasa D, y activación de la proteína-cinasa activadora de mitógeno⁸². Los tres subtipos de Adrenoreceptores alfa 1 se regulan de manera distinta, en los casos anteriores.

En células sin estimular, los ADRA1B se localizan sobre todo en la membrana plasmática, pero la exposición del agonista conduce a los cambios rápidos en accesibilidad de la superficie de la célula y la localización de la membrana. La localización y el tráfico de ADRA1B se pueden detectar por su accesibilidad a los ligandos hidrofílicos que no cruzan fácilmente las membranas de la célula⁶⁵.

(Figura 2)

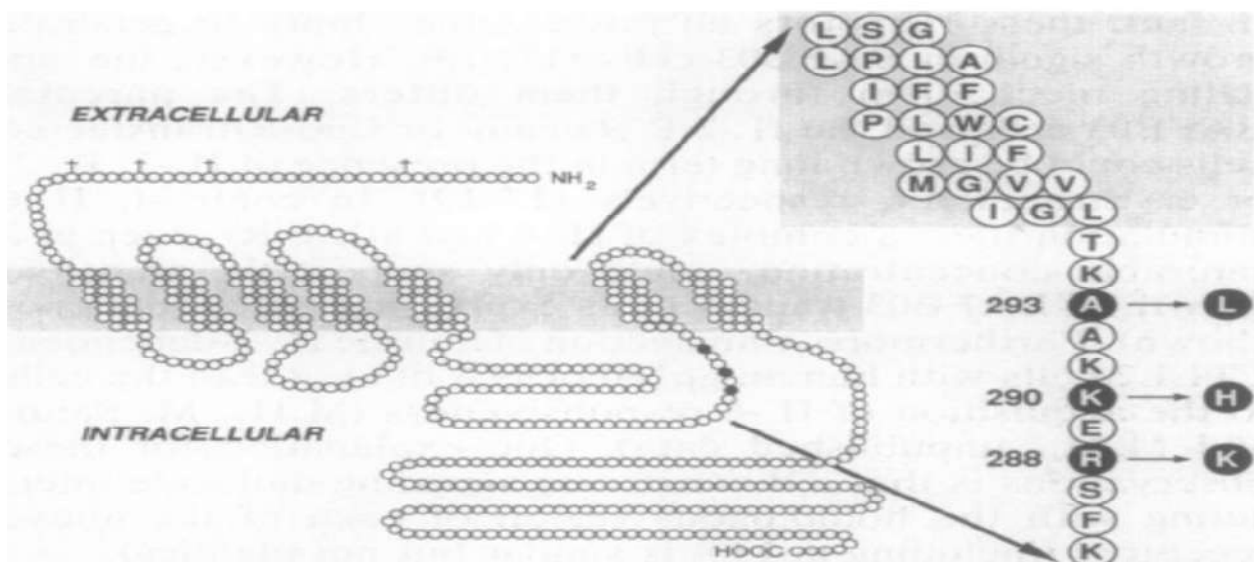


Figura III.2 Modelo estructural de ADRA1B, con una región agrandada ilustrando el carboxy terminal del tercer lazo intracelular y del sexto dominio del transmembranal. Las cruces representan sitios potenciales del glicosilación cerca del término amino.

ADRA1B señala a las cinasas señal-reguladas extracelulares (ERKs) similares a GPCRs, la activación de los ADRA1B puede conducir a la fosforilación y activación de miembros múltiples de la familia cinasa de proteína mitogeno-activado del (MAPK), de los mediadores críticos del crecimiento de la célula, de la regulación del factores de la transcripción que controla, del apoptosis, y de la diferenciación⁸³. Debido a múltiples estudios sugieren como requisito la endocitosis del receptor ADRA1B para la activación de GPCR por ERK de la familia de MAPK⁸⁴.

Los subtipos de adra se acoplan a Gq/11 e hidrólizan del IP, exhiben patrones distintos de la activación de varios MAPKs⁶⁷. Finalmente, hay evidencia de que los ADRAS pueden unirse a múltiples proteínas de señalización y quizás generar señales de la activación de proteína G de forma independiente⁸⁵. (Figura 3) El Rol de los ADRAS en fisiología y en muchos estadios de enfermedades, serán determinantes en las distribuciones diferenciadas del tejido, propiedades de unión a otros ligandos, señalización de rutas, y los mecanismos reguladores, para los diversos subtipo de ADRAS se hacen blancos atractivos de ajustes terapéuticos específicos⁸⁶. Los mecanismos y las herramientas establecidos con ADRA1B deben permitir progreso rápido en entender señalar, la localización, y la regulación diferenciados que puede ocurrir para los otros subtipos, quizás identificando las nuevas blancos moleculares para la intervención terapéutica.

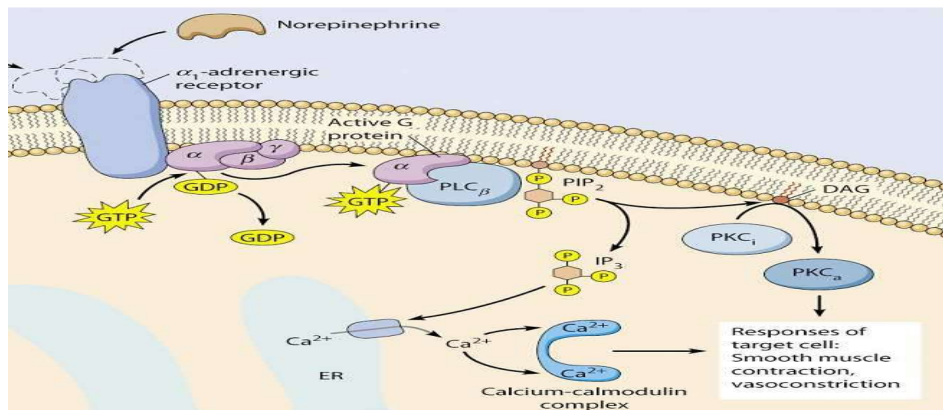


Figura III.3 señales de la activación de proteína G mediada por la receptores adrenérgico tipo alfa 1

Poco se sabe sobre el mecanismo molecular por el cual los distintos subtipos de ADRAS regulan la proliferación celular. En un ensayo de microarreglos previsto para identificar nuevas rutas estimulando los subtipos ADRA, se descubrió en fibroblastos Rat-1 que expresaban los subtipos

individualmente de los ADRA (A, B Y D), la activación por epinefrina alteró diferencialmente la transcripción de varios genes reguladores del ciclo de la célula, incluyendo: ciclinas E, ciclinas D1, cinasa dependiente de ciclinas- 2 alfa (CDK) - 2 α , antígeno nuclear celular de proliferación (PCNA), ciclinas B, CDK-1, p27Kip1, p21Cip1, y polimerasas I-IV de la DNA contra células no transfectadas. La expresión de estos genes reguladores son la clave para la progresión del ciclo celular, en la fase gap1 (G1), para la transición a la fase de S (síntesis de la DNA), y de la progresión a la fase G2 antes de la mitosis (m). La progresión con G1 ocurre por la formación y la activación de los complejos de G1 ciclinas/CDK, predominante ciclinas D - CDK-4/6 y diclina E - CDK-2. Adicionalmente a la unión de las reguladoras (ciclinas), la actividad de las enzimas de CDK está regulada por la fosforilación - desfosforilación por los inhibidores de CDK (CKIs), incluyendo p27Kip1 y p21Cip1. Estos últimos son los reguladores negativos de la actividad de CDK que unen a los complejos de ciclinas/CDK que conducen al arresto del ciclo celular, una función que se ha demostrado en la regulación del crecimiento, la reparación de lesiones y remodelación vascular “*in vitro*”⁸⁷.

Hay evidencia en la literatura que la estimulación de los ADRA1 induce la proliferación y aumenta el porcentaje de síntesis de ADN en una gran variedad de tipos celulares: células lisas vasculares del músculo, hepatocitos, e incluso células de hueso. Con la carencia de antagonistas suficientemente selectivos para los subtipos ADRA1, nadie sabe el subtipo específico que controla estas respuestas, y en la mayoría de los casos, un tipo particular de célula que exprese una combinación de los subtipos de ADRA1. Sin embargo, nadie habían pensado previamente que los subtipos ADRA1 controlan la proliferación directamente sobre el ciclo de la célula, sino de forma indirecta involucrando a menudo reguladores transcripcionales.

El control mediado los ADRA1 sobre el ciclo celular es inverosímil con estos factores comunes de la transcripción porque estos genes fueron regulados de la misma forma que por los tres subtipos de ADRA1³⁷. Los subtipos 1A- y 1D controlan el ciclo celular no sólo disminuyendo la transcripción de las ciclinas E y B, también sus cinasas (CDK-2 y CDK-1). El 1B demostró un perfil diferente en la regulación del ciclo de la célula. En un análisis de microarreglos se demostró que muchos de los genes que regulados negativamente por el estímulo de 1A y 1D en 1B no se encontraron cambios. Sin embargo, un sistema totalmente independiente de genes fue regulado positivamente por el estímulo del subtipo 1B, que se asocian a la progresión desenfrenada del ciclo celular:

CCND1/cíclicas D1. De hecho, en las células Rat-1 y PC12, el 1B causó una progresión desenfrenada del ciclo celular. La Cíclica D1 está implicada en la transición de G1 a S formando un complejo activo con CDK4/6, que fosforila a la proteína del retinoblastoma, así lanzando el complejo del factor de la transcripción, DP1/EF2, dando como resultado la transactivación de los genes de la fase de S (es decir. Polimerasas de la DNA). CCND1 con frecuencia se amplifica y se sobreexpresa en una variedad de los carcinomas humanos, correlativos con pronóstico desfavorable, y se considera un oncogene⁸⁸. Tal desregulación favorece el crecimiento y realza la tumorigénesis⁸⁹. La actividad CDK-2 era alta e insensible al bloqueo del estímulo de epinefrina y/o prazosin, adicionalmente a las células 1B que tenían altos niveles básicos de la actividad CDK-2, eran también constantes con la progresión desenfrenada del ciclo celular. Para confirmar que estos efectos sobre el ciclo celular se podrían traducir a un resultado fenotípico, se determinaron tasas de proliferación en los fibroblastos. En 1B, los índices básicos de la proliferación eran dos veces a los de las líneas 1A y/o 1D. Mientras que el estímulo de epinefrina de las variedades de células 1A y 1D disminuyó la proliferación, constante con la detención del ciclo celular, la variedad de células 1B causó un aumento modesto en la tarifa de la proliferación. Todos estos efectos se podían invertirse con prazosin a excepción de la alta tasa de proliferación en las células 1B-AR. Con estos antecedentes el 1B fue etiquetado un protooncogene y era capaz tumores⁹⁰.

El hígado es el único tejido conocido por expresar predominio de un subtipo 1B; el resto de los tejidos se componen de los tres subtipos, y así, el cociente de subtipos podría también ser el factor que decidía que se determina si las catecolaminas inducen la proliferación o la detención. Las rutas de transducción de señales que pudieron ser responsables de las diferencias en la regulación mediada transcripcionalmente por los ADRA sobre los genes del ciclo celular son desconocidas. Con estos antecedentes tenemos que en varios tipos celulares, los subtipos de ADRA (A, B Y D) desempeñan un papel directo en la regulación del ciclo de la célula. Sin embargo, esta regulación puede ser específica del subtipo, con el 1A- y el 1D causan la detención del ciclo de la célula, mientras que el 1B causa la progresión del ciclo de la célula.

Este gene abarca 2 exones y un solo intron grande por lo menos de 20 KB que interrumpa la región de la codificación. Su peso molecular es de ~55 KDa⁹¹.

CAPITULO IV. 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 $p \leq 0.05$.

XIII.- REFERENCIAS

1. Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology Online*, 35(6), 461-478
2. Real Academia Española (2014), «proteína», *Diccionario de la lengua española* (23.ª edición), Madrid: Espasa.
3. Lehninger, Albert (1993). *Principles of Biochemistry*, 2nd Ed. Worth Publishers. ISBN 0-87901-711-2.
4. Pickett, S.D.; Sternberg, M.J. (1993), «Empirical scale of side-chain conformational entropy in protein folding» (w), *J Mol Biol* 231 (3): 825–39, doi:10.1006/jmbi.1993.1329
5. Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003). «6». *Bioquímica* (3ª edición). pp. 204 y ss. ISBN 84-7892-053-2.
6. Chou, Kuo-Chen; Cai, Yu-Dong (1 November 2003). "Predicting protein quaternary structure by pseudo amino acid composition". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 53 (2): 282–289. doi:10.1002/prot.10500. PMID 14517979
7. Casado-Vela, J. (12 de diciembre de 2012). «Protein chimerism: Novel source of protein diversity in humans adds complexity to bottom-up proteomics». *Proteomics* 13 (1): 5–11. doi:10.1002/pmic.201200371
8. Payne, W.E.; Garrels, J.I. (1997), «Yeast Protein database (YPD): a database for the complete proteome of *Saccharomyces cerevisiae*», *Nucleic Acids Research* 25 (1): 57–62, doi:10.1093/nar/25.1.57, PMID 9016505
9. Price NC, Stevens L (1999). *Fundamentals of enzymology: The cell and molecular biology of catalytic protein*. Oxford ; New York: Oxford University Press. ISBN 0-19-850229-X.
10. Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW (December 1999). "From molecular to modular cell biology". *Nature* 402 (6761 Suppl): C47–52. doi:10.1038/35011540. PMID 10591225
11. Phizicky EM, Fields S (1995). «Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiological reviews*
12. Selbach M, Mann M. (2006) Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat Methods*. 3:981-3. PMID: 17072306
13. Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4
14. Wade, J. T., Hall, D. B., & Struhl, K. (2004). The transcription factor Iff1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature*, 432(7020), 1054-1058.
15. Pestova, T. V., & Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & development*, 16(22), 2906-2922.
16. Gutiérrez-Escolano, A. L. Inicio de la traducción dependiente de IRES: un mecanismo alternativo para la síntesis de proteínas. *REB* 2006, 12.
17. Browning, K. S., Gallie, D. R., Hershey, J. W., Hinnebusch, A. G., Maitra, U., Merrick, W. C., & Norbury, C. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends in biochemical sciences*, 26(5), 284.
18. Burks, E. A., Bezerra, P. P., Le, H., Gallie, D. R., & Browning, K. S. (2001). Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2122-2131.
19. Asano, K., H. P. Vornlocher, N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick, A. G. Hinnebusch y J.W. B. Hershey. 1997. Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 27042-27052.
20. Martin, D. E., Soulard, A., & Hall, M. N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell*, 119(7), 969-979.
21. Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO journal*, 26(14), 3373-3383.
22. Koonin, E. V., Wolf, Y. I., & Aravind, L. (2000). Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Advances in protein chemistry*, 54, 245-275.
23. Zhou, M., Sandercock, A. M., Fraser, C. S., Ridlova, G., Stephens, E., Schenauer, M. R., ... & Doudna, J. A. (2008). Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18139-18144.
24. Higareda-Mendoza A. E., A. Fariás, J. Llanderal, A. Méndez y M. A. Pardo-Galván. 2003. A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/Mtransition. *Miami. Nature Biotechnology Short Reports* 14: 111.
25. Shi J., A. Kahle, J. W. B. Hershey, B. M. Honchak, J. A. Warneke, S. P. L. Leona y M. A. Nelson. 2006. Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 25: 4923-4936.
26. Holz M. K., B. A. Ballif, S. P. Gygi y J. Blenis. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123: 569-580.84
27. Harris T. E., A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E.R. Rhoads y Jr. J. C. Lawrence. 2006. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *The EMBO Journal* 25: 1659-1668.

28. Lee J. P., A. Brauweiler, M. Rudolph, J. E. Hooper, H. A. Drabkin y R. M. Gemmill. 2010. The TRC8 Ubiquitin Ligase Is Sterol Regulated and Interacts with Lipid and Protein Biosynthetic Pathways. *Molecular Cancer Research* 8(1): 93-106.
29. Lagirand-Cantaloube J., N. Offner, A. Csibi, M. P. Leibovitch, S. Batonnet-Pichon, L. A. Tintignac, C. T. Segura y S. A. Leibovitch. 2008. The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO Journal* 27: 1266-1276.
30. Valente, S. T., Gilmartin, G. M., Venkataraman, K., Arriagada, G., & Goff, S. P. (2009). HIV-1 mRNA 3' end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. *Molecular cell*, 36(2), 279-289.
31. Higareda-Mendoza, A. E., & Pardo-Galván, M. A. (2010). Research Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability.
32. Llanderal-Mendoza J. 2003. Estudios in vivo sobre la Función de la Proteína Psif en la División Celular de *Nicotiana tabacum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 64 pp.86
33. Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., & Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 173-194
34. Valente, S. T., Gilmartin, G. M., Venkataraman, K., Arriagada, G., & Goff, S. P. (2009). HIV-1 mRNA 3' end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. *Molecular cell*, 36(2), 279-289.
35. Marchione, R., Leibovitch, S. A., & Lenormand, J. L. (2013). The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3603-3616.
36. Clapham, D. E., & Neer, E. J. (1993). New roles for G-protein ($\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling.
37. 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.
38. Gonzalez-Cabrera P, Shi T, Yun J, Mccune DF, Rorabaugh BR, Perez DM. 2004 Differential Regulation of the Cell Cycle by α 1-Adrenergic Receptor Subtypes. *Endocrinology* 145(11):5157-5167
39. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB 1996_1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271:8977-8982
40. Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK 1985 Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of α 1-adrenoceptor by norepinephrine. *Science* 227:749-751
41. Suzuki A, Palmer G, Bonjou JP, Caverzasio J 1998 Catecholamines stimulate the proliferation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblastlike cells. *Bone* 23:197-203.
42. Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., ... & Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, 14(4), 529-644.
43. Lewin B. 2007. Los genes codifican proteínas. En: *Genes IX*. 9a Ed. México: Jones & Bartlett Publishers. Pp. 23-36.
44. Weinert, T., & Hartwell, L. (1989). Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 1989(Supplement 12), 145-148.
45. Paulovich A. G., D. P. Toczyski y L. H. Hartwell. 1997. When checkpoints fail. *Cell* 88:315-321.
46. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Barcelona: Omega S.
47. Cánepa, E. T., Scassa, M. E., Ceruti, J. M., Marazita, M. C., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., & Ogara, M. F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB life*, 59(7), 419-426.
48. Luque y Herráez (2002): *Biología molecular e ingeniería genética*. 1ª ed. España: Elsevier Science. Pp 97-106, 422-431.
49. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, A. C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Sipursky y J. Darnell. 2005. *Biología Celular y Molecular*. 5ª. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 853-973.
50. Gerdes, K., Möller-Jensen, J., & Jensen, R. B. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology*, 37(3), 455-466.
51. Morgan DO. 2007. Cell Cycle: Principles of Control. *Yale J Biol Med.* 80(3): 141-142.
52. Schafer KA. 1998. The cell cycle: a review. *Cell Prolif.* 35(6):461-78.
53. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* 58(12):1134-41.
54. Starostina NG, Kipreos ET. 2012. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* 22(1):33-41.
55. 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.
56. 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.

56. 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.
57. 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.
58. Bloom J, Pagano M. 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol.* 13(1):41-7.
59. Jäkel H, Peschel I, Kunze C, Weini C, Hengst L. 2012. Regulation of p27Kip1 by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle* 11(10):1910-1917.
60. Möller MB. 2000. p27 in cell cycle control and cancer. *Leuk Lymphoma.* 39(1-2):19-27.
61. 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.
62. Hershko DD (2010) Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27 as a Prognostic Biomarker and Potential Cancer Therapeutic Target. *Future Oncol.* 6(12):1837-1847.
63. García-Sevilla, J. A., & Meana, J. J. (2008). Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. *Farmacología humana*, 5, 295-319.
64. Goodman & Gilman. 2007. Neurotransmisión. Sistema nervioso autónomo y motor somático. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. McGraw-Hill. Pp. 167-170.
65. Toews, M. L. (1987). Comparison of agonist-induced changes in beta-and alpha 1-adrenergic receptors of DDT1 MF-2 cells. *Molecular pharmacology*, 31(1), 58-68.
66. Cotecchia S. 2010. The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res.* 30(6):410-9.
67. 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.
68. Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S. 1991. G-protein-coupled receptor genes as proto-oncogenes: constitutively activating mutation of the α 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Medical Sciences.* 88:11354-11358.
69. Chide, H., Jinling, L., & Minneman, K. P. (1990). Subtypes of α 1 adrenoceptors in rat blood vessels. *European journal of pharmacology*, 190(1), 97-104.
70. Gross, G., Hanft, G., & Mehdorn, H. M. (1989). Demonstration of α 1A-and α 1B-adrenoceptor binding sites in human brain tissue. *European journal of pharmacology*, 169(2), 325-328.
71. Han, C., Abel, P. W., & Minneman, K. P. (1987). α 1Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle.
72. Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Fremeau, R. T., Yang-Feng, T. L., ... & Cotecchia, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 8183-8189.
73. Schwinn, D. A., Johnston, G. I., Page, S. O., Mosley, M. J., Wilson, K. H., Worman, N. P., ... & Parry-Smith, D. J. (1995). Cloning and pharmacological characterization of human alpha-1 adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparison with other species homologues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272(1), 134-142.
74. Michel, M. C., Kenny, B., & Schwinn, D. A. (1995). Classification of α 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 352(1), 1-10.
75. Foglar, R., Shibata, K., Horie, K., Hirasawa, A., & Tsujimoto, G. (1995). Use of recombinant α 1-adrenoceptors to characterize subtype selectivity of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 288(2), 201-207.
76. Guimarães, S., & Moura, D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 319-356.
77. Muramatsu, I., Kigoshi, S., & Oshita, M. (1990). Two distinct α 1-adrenoceptor subtypes involved in noradrenaline contraction of the rabbit thoracic aorta. *British journal of pharmacology*, 101(3), 662-666.
78. Piascik, M. T., & Perez, D. M. (2001). α 1-Adrenergic receptors: new insights and directions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 403-410.
79. Hague, C., Uberty, M. A., Chen, Z., Hall, R. A., & Minneman, K. P. (2004). Cell surface expression of α 1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with α 1B-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15541-15549.

80. Theroux, T. L., Esbenshade, T. A., Peavy, R. D., & Minneman, K. P. (1996). Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Molecular pharmacology*, 50(5), 1376-1387.
81. Zhong, H., & Minneman, K. P. (1999). α 1-Adrenoceptor subtypes. *European journal of pharmacology*, 375(1), 261-276.
82. Chalothorn, D., McCune, D. F., Edelman, S. E., García-Cazarín, M. L., Tsujimoto, G., & Piascik, M. T. (2002). Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the α 1-adrenoceptor subtypes. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1008-1016.
83. Belcheva, M. M., & Coscia, C. J. (2002). Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals*, 11(1), 34-44.
84. Higuchi, S., Tanimoto, A., Arima, N., Xu, H., Murata, Y., Hamada, T., ... & Sasaguri, Y. (2001). Effects of histamine and interleukin-4 synthesized in arterial intima on phagocytosis by monocytes/macrophages in relation to atherosclerosis. *FEBS letters*, 505(2), 217-222.
85. Michelotti, G. A., Price, D. T., & Schwinn, D. A. (2000). α 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics*, 88(3), 281-309.
86. Tanner, F. C., Yang, Z. Y., Duckers, E., Gordon, D., Nabel, G. J., & Nabel, E. G. (1998). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circulation Research*, 82(3), 396-403.
87. Lansky, E. P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Froom, P., Yu, W., ... & Campbell, M. J. (2005). Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Investigational new drugs*, 23(1), 11-20.
88. Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., & Cotecchia, S. (1991). G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11354-11358.
89. Michels, E., Vandesompele, J., De Preter, K., Hoebbeck, J., Vermeulen, J., Schramm, A., ... & Combaret, V. (2007). ArrayCGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(12), 1098-1108.
90. Hawi, Z., Matthews, N., Barry, E., Kirley, A., Wagner, J., Wallace, R. H., ... & Bellgrove, M. A. (2013). A high density linkage disequilibrium mapping in 14 noradrenergic genes: evidence of association between SLC6A2, ADRA1B and ADHD. *Psychopharmacology*, 225(4), 895-902.
91. Price, D. T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Berkowitz, D., & Schwinn, D. A. (1994). Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Molecular pharmacology*, 45(2), 171-175.

XIV.- BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. Akiyoshi, Y., J. Clayton, L. Phan, M. Yamamoto, A. G. Hinnebusch, Y. Watanabe y K. Asano. 2001. Fission Yeast Homolog of Murine Int-6 Protein, Encoded by Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site, Is Associated with the Conserved Core Subunits of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10056-10062.
2. Aravind L. y C. P. Ponting. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Science* 7: 1250-1260.
3. Asano, K., H. P. Vornlocher, N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick, A. G. Hinnebusch y J. W. B. Hershey. 1997. Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 27042-27052.
4. Benne R. y Hershey J.W. 1978. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 3078-3087.
5. Bourne HR. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 134-142.
6. Buchanan, B. B., W. Gruissem y R. L. Jones. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists USA. 1367: 528-565.
7. Csibi A., K. Cornille, M. P. Leibovitch, A. Poupon, L. A. Tintignac, A. M. J. Sanchez y S. A. Leibovitch. 2010. The Translation Regulatory Subunit eIF3f Controls the Kinase-Dependent mTOR Signaling Required for Muscle Differentiation and Hypertrophy in Mouse. *PLoS One* 5(2): e8994.
8. Dhami GK, Ferguson SS. 2006. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* 111(1): 260-271
9. Dong, Z., Z. Liu, P. Cui, R. Pincheira, Y. Yang, J. Liu y J.T. Zhang. 2009. Role of eIF3a in regulating cell cycle progression. *Experimental Cell Research* 315:1889-1894.
10. Fan H. y S. Penman. 1970. Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *Journal of Molecular Biology* 50: 655-670.
11. 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.
12. Filmore D. 2004. It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery (American Chemical Society)* pp. 24–28.
13. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG y Schiöth 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.
14. Fingar D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou y J. Blenis. 2004. Mtor Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4EBP1/ Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular and Cellular Biology* 24(1): 200-216.83
15. Garcia-Cortes J. C., A. E. Higuera-Mendoza y M. A. Pardo-Galvan. 2009. Rat (*Rattus norvegicus*) eukaryotic initiation factor 3f (eIF3f) knockdown affects liver regeneration. *Hepatology*.
16. Guimarães S, Moura D. 2001. Vascular adrenoreceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53(2):319-56.
17. 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 Nicolás de Hidalgo Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.
18. Hartwell L. H. y T. A. Weinert. 1989. Checkpoints, controls that ensures the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-633.
19. Harris T. E., A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E.R. Rhoads y Jr. J. C. Lawrence. 2006. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *The EMBO Journal* 25: 1659-1668.
20. 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.
21. Hernández-Soto P. 2005. Análisis estructural del gen y la proteína psif en eucariontes superiores. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 46 pp.
22. Hong F., M. D. Larrea, C. Doughty, D. J. Kwiatkowski, R. Squillace y J. M. Slingerland. 2008 mTOR-Raptor Binds and Activates SGK1 to Regulate p27 Phosphorylation. *Molecular Cell* 30: 701-711.
23. Hutchins C. 1994. Three-dimensional models of the D1 and D2 dopamine receptors. *Endocr. J.*, 1994, 2:7–23.
24. 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.
25. Jackson JR, Hellen CU y Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 113-127.
26. Jiménez Alcántar Paola. 2014. Identificación de la vía de transducción de señales modulada por la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico- α 1B en células humanas. Trabajo para optar por el título de Maestro en ciencias de la salud. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
27. Kim T. H., B. H. Kim, A. Yahalom, D. A. Chamovitz y A. G. von Arnim. 2004. Translational regulation via 5' mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the Arabidopsis translation initiation factor subunit eIF3h. *Plant Cell* 16:3341-3356.
28. King, R. W., P. K. Jackson y M. W. Kirshner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571.

29. Korneeva, N. L., B. J. Lamphear, F. L. Colby-Hennigan y R. E. Rhoads. 2000. Mutually Cooperative Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF) 3 and eIF4A to Human eIF4G-1. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 41369-41376.
30. Kelly E, Bailey CP, Henderson G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S379-388
31. Kolakowski LF. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1-7.
32. Llanderal-Mendoza J. 2003. Estudios in vivo sobre la Función de la Proteína Psif en la División Celular de *Nicotiana tabacum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 64 pp.
33. Loshe MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates betaadrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.
34. Milligan G. 2006. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov Today* 11, 541-549.
35. Milligan G, Kostenis E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55.
36. Morgan D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 261-291.
37. Morgan D. O. 2007. *The cell cycle: principles and control*. New Science Press Ltd. And Oxford University Press. Corby, Northants, UK. 297: 2-54, 111-137.
38. Morris C. y Jalinet P. 2005. Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. *Oncogene* 24: 1203-1211.
39. Murray A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116: 221-234.
40. Nigg E. A. 2001. Mitosis. En: Zheng Y. (Ed.) *Encyclopedia of Life Sciences*. 1a. ed. John Wiley & Sons, Ltd. USA. <http://www.els.net> [DOI: 10.1038/npg.els.0001356].
41. Norbury C. y P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry* 61: 441-470.
42. 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.
43. 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.
44. Pardee A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608.
45. 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.
46. Preiss T. y M. W. Hentze. 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25: 1201 – 1211.
47. Pyronnet S., L. Pradayrol y N. Sonenberg. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular Cell* 5: 607-616.
48. Russell P. y P. Nurse. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45(1): 145-153.
49. Shi, J., Y. Feng, A. C. Goulet, R. R. Vaillancourt, N. A. Sachs, J. W. Hershey y M. A. Nelson. 2003. The p34cdc2-related Cyclin-dependent kinase 11 Interacts with the p47 Subunit of Eukaryotic Factor 3 during Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 5062-5071.
50. 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.
51. 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.
52. Trejo J. 2005. Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 67, 1388-1390.
53. 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.
54. Valente S.T., G. M. Gilmartin, C. Mott, B. Falkard y S. P. Goff. 2009. Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(11):4071-4078.
55. Veulens de la Nuez A., Rodríguez R. 2009. G Protein-coupled receptors as targets for drug design. *Biocología Aplicada*. Vol.26, No.1
56. Zhou C., F. Arslan, S. Wee, S. Krishnan, A. R. Ivanov, A. Oliva, J. Leatherwood y D.A. Wolf. 2005. PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biology* 3:14.

