

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN POR  
FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA *PSIF* DE HUMANO”**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:**

**Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

**Presenta:**

**Biol. Andrea Farias Escalera**

**Asesor:**

**D.C. Marco A. Pardo Galván**

**Morelia Mich., Octubre de 2005.**

El presente trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Biología Molecular** del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del **D.C. Marco Aurelio Pardo Galván**. Fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como por la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H.

## RESUMEN

Uno de los genes implicados en la regulación del ciclo celular es el gen *psif*. Este gen tiene un patrón de expresión transcripcional circunscrito a la transición G2/M del ciclo celular, y su ausencia desacopla la división. Tales hechos indican, que la expresión de *psif* es requerida sólo para esta etapa de transición durante el ciclo y es indispensable para la progresión normal del mismo. La inducción de *psif* en cultivos celulares inhibe la síntesis de proteínas específica de la transición de G2 a M y ante esta función inhibitoria y su esencialidad en el ciclo celular, resulta de vital importancia conocer la manera en que la proteína *PSIF* es regulada. Mediante análisis bioinformáticos de la secuencia aminoacídica de *PSIF* se encontraron sitios probables de fosforilación por distintas cinasas implicadas en la regulación del ciclo celular, lo cual sugiere que la proteína *PSIF* es fosforilada por alguna de estas cinasas. Como primer paso, se realizó la subclonación del gen *psif* en vectores de alta expresión en *Escherichia coli* (Top10) y *Schizosaccharomyces pombe* (TCP1). Posteriormente, se indujo la expresión del gen en cultivos celulares de ambas cepas para el análisis de la proteína recombinante por medio de ensayos de electroforesis desnaturizante e inmunodetección. Al intentar sobreexpresar la proteína *PSIF* de humano en cultivos de levadura, se encontró que la proteína no pudo ser inducida más allá de los niveles de expresión basal, sin obtener un efecto negativo en el crecimiento celular. Dicho efecto se corroboró por análisis de densidad óptica en espectrofotometría a 600 nm, encontrando una reducción del 75% en el crecimiento celular de *S. pombe* en las muestras que contienen el gen *psif*, ya sea induciendo o no su expresión. Dicho resultado es congruente con la función inhibitoria de la proteína sobre la síntesis de proteínas y esencialidad en la regulación del ciclo celular. Ante la imposibilidad de sobreexpresar y purificar la proteína *PSIF*, lo cual permitiera realizar un ensayo de fosforilación *in vivo*, se diseñó un ensayo de fosforilación *in vitro* que permitió determinar que la proteína *PSIF* de Humano es fosforilada por el complejo CDK1/ciclinaB (MPF), el cual es un regulador universal de la transición G2/M en eucariontes.

## ÍNDICE TEMÁTICO

Página		
Capítulo I	Introducción	1
1.1	Ciclo celular	3
1.2	Regulación del ciclo celular	4
1.2.1	Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	4
1.2.2	Primer punto de control, transición G1/S	5
1.2.3	Reguladores de los complejos CDK/ciclina presentes en G1/S	8
1.2.4	Segundo punto de control, transición G2/M	9
1.2.5	Tercer punto de control, profase-metafase	12
1.2.6	Cuarto punto de control, anafase-telofase	15
Capítulo II	Antecedentes	19
2.1	Psif	19
Capítulo III	Hipótesis y objetivos	27
3.1	Hipótesis	27
3.2	Objetivo general	27
3.3	Objetivos particulares	27
Capítulo IV	Estrategia experimental	28
Capítulo V	Material y métodos	29
5.1	Material	29
5.1.1	Cepas y plásmidos	29
5.1.2	Medios	29
5.1.2.1	Medio de crecimiento para <i>E. coli</i>	29
5.1.2.2	Medios de crecimiento para <i>S. pombe</i>	35
	1) Medio EMM	35
	2) Medio PDM(-L)	35
5.2	Métodos	36
5.2.1	Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina (mini-prep.)	36
5.2.2	Electroforesis en gel de agarosa	36
5.2.3	Recuperación y lavado de DNA a partir de un gel de agarosa	37

5.2.4	Preparación de células electrocompetentes	38
5.2.5.1	Células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	38
5.2.5.2	Células electrocompetentes de <i>S. pombe</i>	38
5.2.6	Transformación por electroporación	39
5.2.6.1	Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	39
5.2.6.2	Transformación de <i>S. pombe</i> por electroporación	39
5.2.7	Digestiones enzimáticas	40
5.2.7.1	Digestión de plásmidos	40
5.2.7.2	Análisis de restricción	40
5.2.7.3	Liberación de fragmentos	40
5.2.8	Aislamiento de RNA con trizol	41
5.2.9	RT-PCR	42
5.2.10	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
5.2.11	Expresión protéica	43
5.2.11.1	Expresión protéica en <i>E. coli</i> (piloto)	43
5.2.11.2	Expresión proteica en <i>S. pombe</i>	44
5.2.12	Lisado celular	44
5.2.12.1	Lisado celular de <i>E. coli</i>	44
5.2.12.2	Lisado celular de <i>S. pombe</i>	45
5.2.13	Ensayo de Bradford	45
5.2.14	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante ( <i>SDS-PAGE</i> )	47
5.2.15	Tinción de gel de poliacrilamida-sds con azul de Coomassie	47
5.2.16	Ensayo de inmunodetección ( <i>Western blot</i> )	48
5.2.17	Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> para <i>psif-hm crm11</i>	49
5.2.17.1	Transcripción <i>in vitro</i> de <i>psif-Hm crm11</i>	49
5.2.17.2	Traducción <i>in vitro</i> de <i>psif-Hm crm11</i>	50
Capitulo VI	Resultados y discusión	51
6.1	Subclonación de <i>psif-Hm</i> en el vector pTrcHis2C	51

6.2	Secuenciación del plásmido pRCE104	53
6.3	Expresión y detección de <i>psif-Humano</i> en extractos de <i>E. coli</i>	54
6.4	Obtención y clonación de la copia del gen <i>psif-hm crm11</i>	55
6.5	Subclonación de <i>psif-Hm crm11</i> en el vector pTrcHis2B	58
6.6	Expresión y detección de <i>psif-Hm crm11</i> en extractos de <i>E. coli</i>	58
6.7	Subclonación de <i>psif-Hm crm2</i> en el vector pNMT1-topo	64
6.8	Secuenciación del plásmido pRCE103	67
6.9	Transformación de <i>psif-Hm crm2</i> en <i>S. pombe</i>	67
6.10	Expresión y detección de <i>psif-Hm crm2</i> en extractos crudos de <i>S. pombe</i>	68
6.11	Fosforilación <i>in vitro</i> de <i>psif-Hm crm11</i>	73
Capítulo VII	Conclusión	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Paginas		
Figura 1	Ciclo celular	2
Figura 2	Regulación de la transición G1/S en mamíferos.	7
Figura 3	Regulación de la transición G2/M en mamíferos	10
Figura 4	Regulación de la mitosis	13
Figura 5	Expresión de <i>psif</i> en el ciclo celular de células TBY2	20
Figura 6	Esencialidad de <i>psif</i> durante la mitosis	21
Figura 7	Síntesis <i>in vitro</i> de proteínas bajo la influencia de <i>psif</i>	22
Figura 8	Síntesis <i>de novo</i> de proteínas en cultivos de tabaco TBY2 bajo la influencia de <i>PSIF</i>	23
Figura 9	Inhibición de la síntesis proteica durante la mitosis	26
Figura 10	Sitios posibles de fosforilación de la proteína <i>PSIF-Humano</i>	26
Figura 11	Mapa físico del vector de expresión en <i>E. coli</i> pTrcHis2A, B, C	30
Figura 12	Mapa físico del vector de expresión en <i>S. pombe</i> pNMT1-TOPO	31
Figura 13	Mapa físico del plásmido pRCE051	32
Figura 14	Mapa físico del vector de clonación pTRIKan19	33
Figura 15	Mapa físico del plásmido pRCE021	34
Figura 16	Diagrama de localización de los oligonucleótidos en la secuencia de <i>psif-Hm</i>	43
Figura 17	Curva estándar de concentración de BSA	47
Figura 18	Subclonación de <i>psif-Hm</i> en el vector pTrcHis2C	52
Figura 19	Análisis de secuencia del plásmido pRCE104	53
Figura 20	Inducción de la expresión de <i>PSIF-Hm</i> en <i>E. coli</i>	55
Figura 21	Obtención de la copia del gen <i>psif-Hm</i> ubicada en el cromosoma 11	56
Figura 22	Clonación de <i>psif-Hm crm11</i> en el vector pTRIKan19	57
Figura 23	Subclonación de <i>psif-Hm crm11</i> en el vector pTrcHis2B	59
Figura 24	Inducción de la expresión de <i>PSIF-Hm crm11</i> en <i>E. coli</i> 1	61
Figura 25	Inducción de la expresión de <i>PSIF-Hm crm11</i> en <i>E. coli</i> 2	62
Figura 26	Inducción de la expresión de <i>PSIF-Hm crm11</i> en <i>E. coli</i> 3	63
Figura 27	Amplificación de <i>psif-Hm crm2</i>	64
Figura 28	Subclonación de <i>psif-Hm crm2</i> en el vector pNMT1-TOPO	65
Figura 29	Análisis de secuencia del plásmido pRCE103	66
Figura 30	Amplificación de <i>psif-Hm crm2</i> transformado en <i>S. pombe</i>	67
Figura 31	Expresión de <i>PSIF-Hm crm2</i> en extractos de <i>S. pombe</i>	69
Figura 32	Inmunodetección de <i>PSIF-Hm crm2</i> en extractos de <i>S. pombe</i> 1	70

Figura 33	Inmunodetección de <i>PSIF-Hm crm2</i> en extractos de <i>S. pombe 2</i>	71
Figura 34	Crecimiento celular de la clona pRCE103	72
Figura 35	Fosforilación <i>in vitro</i> de <i>PSIF-HM crm11</i>	75
Figura 36	Modelo hipotético sobre la función de <i>PSIF-Hm</i>	75

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

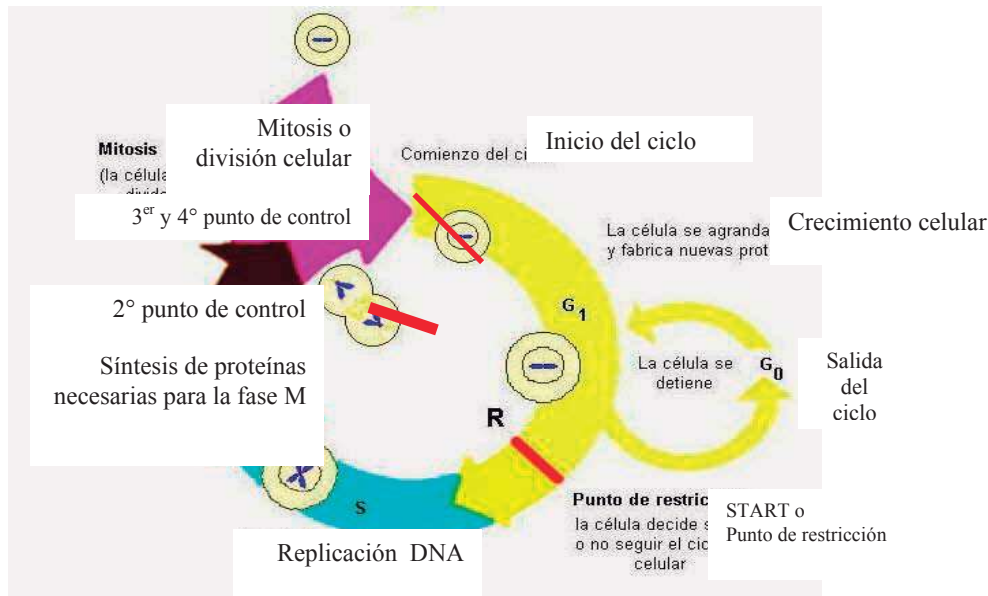
Todos los organismos están formados por células como su unidad fundamental. Las células poseen un parecido elemental entre sus componentes químicos y actividades metabólicas y se originan por división a partir de células preexistentes. Así, el proceso de la vida es continuo y debe existir una renovación de manera que este evento pueda repetirse una vez más. Cada célula inicia la vida a partir de la división celular de una célula preexistente, de manera tal que las células que crecen y se dividen pueden describirse en términos de ciclo de vida o ciclo celular. El ciclo celular es el periodo que va del inicio de una división al inicio de la siguiente y se representa en diagramas circulares de lapso variable en células eucariontes de crecimiento activo. Al ser el ciclo celular el responsable primario de la perpetuación de la vida, resulta de interés revisar el control de dicho proceso.

#### **1.1 CICLO CELULAR**

El ciclo celular se divide en cuatro fases consecutivas: la fase M corresponde a la división celular mitótica, y las fases G1 (“*gap*”, intervalo), S y G2 constituyen el tiempo de biosíntesis activa denominado interfase (Fig. 1). La replicación del DNA ocurre durante la fase S ( síntesis), y está separada de la mitosis por la fase de pre-replicación G1 y la fase de post-replicación premitótica G2 (Lewin 2000). Este arreglo permite que la entrada a los procesos críticos de replicación del DNA y la mitosis sean controlados de manera precisa.

Durante la primera fase de intervalo G1, la célula entra en un periodo de crecimiento en el cual se sintetizan proteínas, lípidos, carbohidratos, RNA y otras moléculas celulares. Asimismo, se presenta el primer punto de control del ciclo celular, denominado START en levadura y *punto de restricción* en células animales, que marca el momento en el cual la célula puede o no dividirse tomando en consideración estímulos externos (ej.: la disponibilidad de alimento) e internos (ej: masa crítica) que le permitan entrar en el proceso de división. De esta manera, queda asegurado que la célula no iniciará la replicación de DNA si no cuenta con sustratos suficientes para dar lugar a dos células hijas al finalizar el ciclo. Durante esta fase la expresión de los genes asociados con la síntesis de DNA

se encuentra sobrerregulada, asimismo, son expresados y/o activados factores de regulación requeridos para dar inicio a la replicación. G1 termina al iniciar, precisamente, la replicación del DNA (Stein *et al.*, 2002).



**Figura 1. Ciclo celular.** G1 corresponde a la primera fase de intervalo donde la célula aumenta su biomasa; G0 indica la salida de las células del ciclo celular; S indica la fase de síntesis de DNA; G2 corresponde a la segunda fase de intervalo y finalmente M es la fase de división celular mitótica. Los puntos de control se indican en rojo.

La fase S inicia con la activación transcripcional de genes esenciales para la duplicación y el empaquetamiento del material genético. Así, además de la replicación cromosómica, en esta fase tiene lugar la síntesis de histonas (H1, H4, H3, H2A y H2B) y otras proteínas cromosomales necesarias para la adecuada conformación del DNA en la cromatina (Ewen 2000).

La última etapa de la interfase, la fase G2 (segunda fase de intervalo), se caracteriza por la síntesis de proteínas necesarias para la progresión a mitosis, entre las cuales destaca la tubulina que dará lugar a los microtúbulos que a su vez constituirán el huso mitótico. Durante esta fase también ocurre la replicación de los centriolos, las mitocondrias y otros orgánulos, así como la síntesis de factores reguladores y modificaciones estructurales de la cromatina que facilitan la condensación de los cromosomas (Stein *et al.*, 2002). Un segundo punto de control tiene lugar en esta fase, cuyo objetivo es asegurar que la célula no se divida hasta que los eventos previos necesarios hayan concluido. Así, se verifica que la replicación del DNA sea correcta y no exista daño al genoma, de presentarse lesión genómica, la siguiente fase correspondiente a la mitosis se pospone hasta que el

DNA sea reparado. Si no es posible reparar el daño, la célula dará lugar a procesos de muerte celular programada. Así, se puede observar que cada punto de control representa un circuito de regulación que permite que el inicio de un evento en el ciclo celular dependa de la terminación exitosa del proceso anterior. Tales puntos de control ejercen una acción directa sobre los factores que median la progresión a través del ciclo (Novak *et al.*, 2002).

Al terminar la interfase, tiene lugar la última fase del ciclo celular correspondiente a la división mitótica donde los materiales duplicados se reparten en proporciones iguales entre las dos células hijas. Durante la mitosis, se observa una serie de eventos característicos que, a pesar de presentarse de manera continua, son convencionalmente divididos en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la transición de la metafase a la anafase, se presenta el primer punto de control de la mitosis que verifica el adecuado ensamblaje del huso mitótico. Un segundo punto de control se da durante la telofase, cuyo objetivo es asegurar la posición correcta del huso central donde se posicionará el anillo contráctil durante la citocinesis. La citocinesis o separación de los dos territorios citoplasmáticos es en ocasiones tomada como una fase más del ciclo celular, pero de manera general se ubica como la culminación de la división celular ((Nigg 2001).

Una vez finalizada la citocinesis, las células entran nuevamente a la fase G1 del ciclo celular y pueden iniciar un nuevo ciclo de división o suspender su crecimiento. Las células que detienen su ciclo celular después de la mitosis (M) y justo antes de la replicación del DNA (S) se encuentran en la fase G0 (Fig.1). Algunas células tienen la capacidad de reingresar al ciclo mediante un estímulo, pero otras se mantienen en G0 (Lodish *et al.*, 2002).

## **1.2 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR**

Los procesos moleculares que regulan la replicación cromosómica y la división celular son similares en células eucariontes, y esto ha contribuido al entendimiento de cómo estos eventos se coordinan y controlan. Durante el inicio del ciclo celular se consideran diferentes aspectos: una señal que indique el requerimiento y la posibilidad de generar una nueva célula, y las condiciones ambientales externas. Esto implica diferentes niveles de control, así como diferentes efectores de éste. A continuación revisaremos los puntos de control del ciclo celular y sus efectores.

### **1.2.1 CICLINAS Y CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)**

La progresión del ciclo celular es controlada en cuatro puntos de transición: uno en la fase G1 tardía, antes de la síntesis de DNA; un segundo en la transición G2/M; y el tercero y cuarto durante la mitosis (Fig. 1). La progresión a través de estos puntos de control es mediada por la activación secuencial de complejos heterodiméricos de proteínas cinasas conocidos como cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estos complejos CDKs constan de una subunidad catalítica CDK, y una reguladora denominada ciclina. Las ciclinas reciben su nombre debido a su patrón de expresión transcripcional en forma periódica a lo largo del ciclo celular, a diferencia de las cinasas cuya expresión se mantiene constante a través del mismo. Las proteínas CDKs monoméricas fosforilan residuos de serina y treonina en proteínas “blanco” y tienen por sí mismas una actividad reducida de cinasa, por lo que su activación completa requiere de la unión con las ciclinas. Cada CDK puede asociarse con distintas ciclinas lo que determina qué proteína será fosforilada por el complejo a partir del cambio conformacional que produzca la interacción CDK/ciclina (Kitazono *et al.*, 2001).

Todas las ciclinas comparten una región altamente conservada de aproximadamente 100 aminoácidos, denominada “caja de ciclinas”, requerida para su interacción con la subunidad catalítica de la CDK. De manera similar, las CDKs contienen una secuencia conservada de 16 aminoácidos fundamental para su unión con las ciclinas (Morgan 1996). Mecanismos transcripcionales y postranscripcionales son los responsables de la regulación de los niveles de ciclina presentes en la célula. El primer nivel de regulación es la transcripción de sus genes, e involucra factores transcripcionales específicos del ciclo celular, así como la actividad *per se* de los complejos CDK/ciclina. Una vez expresadas las ciclinas, su actividad se regula a nivel traduccional y postraduccional mediante su fosforilación, hasta ser degradadas rápidamente por el proteosoma en fases específicas del ciclo celular. La localización celular es otra manera de regular la función de las ciclinas, ya que algunas ciclinas requieren ser transportadas del citoplasma al núcleo para ser completamente activas (Takizawa y Morgan, 2000).

Existen diferentes clases de ciclinas que se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a su fase de acción: las ciclinas G1, con un patrón de expresión circunscrito a las fases G1 y S, y las ciclinas mitóticas presentes en las fases G2 y M (Shaul *et al.*, 1996). En cada organismo, la complejidad de la familia de genes de ciclina es enorme. En *Saccharomyces cerevisiae* existen cinco ciclinas G1, tres que promueven la fase G1 y se denominan CLN1 CLN2 y CLN3 y dos más reguladoras de la fase S llamadas CLB5 y CLB6; posee también cuatro ciclinas mitóticas, CLB1, CLB2, CLB3 y CLB4. Todas estas ciclinas forman complejos con una única CDK denominada cinasa “maestra” o CDC28 (Cdc2, en *Schizosacharomyces pombe*) (Millar y Cross, 2000).

En mamíferos, se han identificado hasta ahora ocho familias diferentes de ciclinas. Las ciclinas G1 comprenden la familia de ciclinas A, C, D, E, H y K que se dimerizan con las cinasas CDK2, CDK8, CDK4/6, CDK2/4, CDK7 y CDK9, respectivamente. En el grupo de las ciclinas mitóticas se

encuentran la familia de ciclinas B que se unen a CDK1 y la ciclina F, para la cual no se ha identificado la subunidad catalítica de unión (John *et al.*, 2001).

Finalmente, en vegetales se han localizado cinco familias de ciclinas tanto G1 como mitóticas homólogas a las ciclinas A, D, E, B y H de animales, que se unen a cinco cinasas diferentes denominadas con la letra A a la E (Rossi y Varotto, 2002).

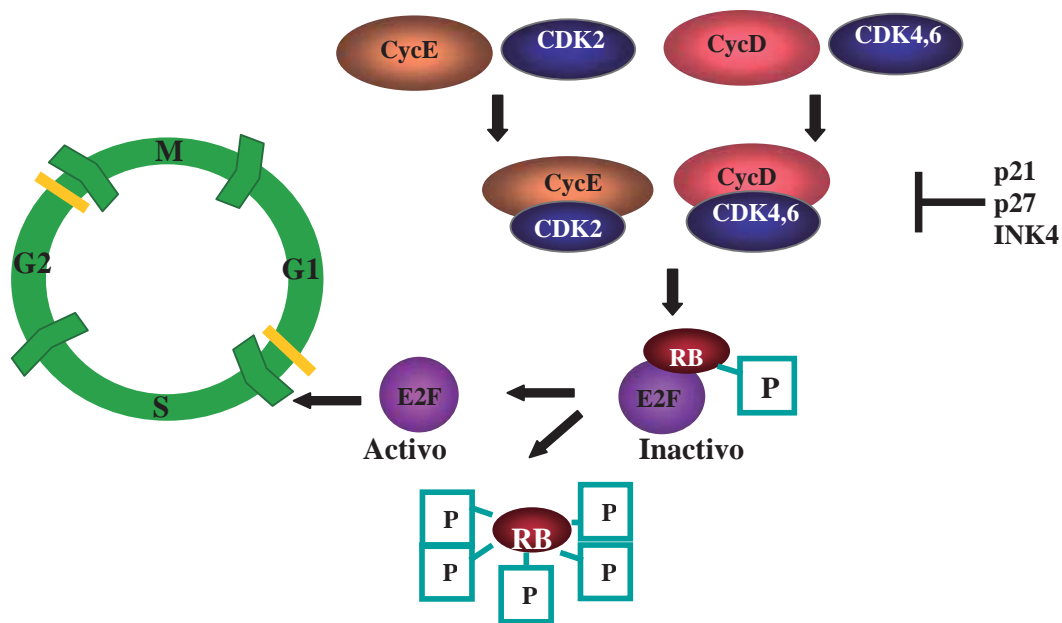
### 1.2.2 PRIMER PUNTO DE CONTROL, TRANSICIÓN G1/S

Como se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae*, la enzima que regula el ciclo celular es la proteína cinasa CDC28 (de "*Cell Division Cycle*") y en *S. pombe* Cdc2, que se ensamblan con diferentes ciclinas. En presencia de una cantidad suficiente de sustratos, las células en G1 con una masa crítica adecuada inician la replicación y se preparan para la división subsiguiente. En *S. cerevisiae* se requieren tres ciclinas diferentes denominadas CLN1, CLN2 y CLN3, las cuales regulan la progresión de G1 así como la transición G1/S, y representan el primer punto de control del ciclo celular. Cuando la célula se encuentra lista para entrar en un nuevo ciclo, el complejo CDC28/CLN3 dispara la transcripción de los genes CLN1 y CLN2, los que a su vez participan en la activación de genes específicos necesarios para la replicación del DNA, dando lugar a un circuito de retroalimentación positiva a través de la fosforilación del factor de transcripción SBF ("*Swi4-Swi6 cell cycle binding factor*"), que es responsable de la activación de un total de 235 genes durante G1/S. Este fenómeno condiciona la transición por el punto de control START, de manera que sea irreversible. Las ciclinas CLN1 y CLN2 son expresadas en niveles elevados durante la fase G1 y su unión con la CDC28 permite la entrada y salida de la célula de G0 a G1 y viceversa. La degradación de estas ciclinas se lleva a cabo durante la fase S (Horak *et al.*, 2002).

Posterior a START, es decir, en la fase G1 tardía, se expresan dos ciclinas más, CLB5 y CLB6, las cuales son necesarias durante la fase S. La expresión de ambas ciclinas también es activada mediante un circuito positivo de retroalimentación, que en este caso involucra un segundo factor de transcripción denominado MBF ("*MluI binding factor*"), el cual comparte una subunidad y función con SBF. Sin embargo, el complejo CDC28/CLB5 se encuentra inicialmente inactivo debido a la unión de un inhibidor de CDK denominado p40<sup>Sic1</sup>. Al inicio de la fase S, p40<sup>Sic1</sup> es fosforilado por CDC28/CLB5 lo que dispara su destrucción por la vía de la ubiquitina y permite la entrada a la fase S (Queralt e Igual, 2004).

En células animales, la progresión a través del punto de restricción G1/S es mediada por la vía Rb/E2F (Fig 2). La proteína Rb (pRB) es una fosfoproteína nuclear de 105 a 110 kDa que es

forforilada por los complejos de CDK2/ciclinaD y E en múltiples residuos de serina/treonina y funciona como supresor de tumores en estado hipofosforilado o activo. La proteína Rb hipofosforilada atrapa al factor transcripcional E2F y posterior a este evento, el complejo E2F/pRB promueve la unión de la histona desacetilasa a los promotores de los genes regulados por E2F. La desacetilación de las histonas centrales da como resultado una estructura más compacta de la cromátide impidiendo la unión del complejo de transcripción a los promotores y por lo tanto inhibe la transcripción de los genes regulados por E2F (Harbour y Dean, 2000). Se ha reportado que el E2F activa la transcripción de varios genes cuyos productos son importantes para la entrada a la fase S así como para la replicación, algunas de estas proteínas son: p107, PCNA, topo1, DNA polimerasa  $\alpha$ , dihidrofolato reductasa (DHFR), ciclina D1, ciclina A, ciclina E, p21<sup>Cip1</sup>, Cdk2, Cdc2 y Cdc25. El factor E2F puede activar la transcripción de estos genes sólo si se encuentra en estado libre, ya que su unión a Rb lo inactiva. Sin embargo, la activación completa de E2F tiene lugar al dimerizarse con otra proteína denominada DP (Sherr y Roberts, 1999).



**Figura 2. Regulación de la transición G1/S en mamíferos.** Una vez formados los complejos CDK4, 6/ciclina D y CDK2/ciclina E se inicia la hiperfosforilación de la proteína Rb, permitiendo la liberación del factor transcripcional E2F y por tanto la activación transcripcional de los genes requeridos para llevar a cabo la fase S. Ambos complejos cinasa/ciclina pueden ser inhibidos por la unión secuencial de moléculas de p27, p21 o INK4.

Diferentes complejos de CDK/ciclina fosforilan pRb en fases específicas de ciclo celular. Durante la fase temprana y media de G1 existen tres tipos de ciclinas D (D1, D2, D3) que físicamente interactúan con pRb inactivándola, a través de su unión con las cinasas CDK4 o CDK6. Estas ciclinas,

además, integran señales extracelulares, ya que la presencia continua de factores de crecimiento induce no sólo su transcripción, sino su asociación con las cinasas CDK4 y CDK6. La síntesis de las ciclinas D inicia durante la transición de G0 hacia G1 y presentan una vida media corta de aproximadamente 30 min, tan pronto como cesa la estimulación por factores de crecimiento, son degradadas rápidamente (Ewen 2000).

Otro grupo de ciclinas presentes en este proceso son las de tipo E, se unen a CDK2 y su pico de actividad máxima como complejo CDK2/ciclina E coincide con el inicio de la fase S. La proteína Rb es también sustrato de dicho complejo de manera que su fosforilación es iniciada por CDK4/ciclina D y complementada posteriormente por CDK2/ciclina E, siendo este último evento el responsable de iniciar la síntesis de DNA (Fig. 2). Una vez que la célula entra en la fase S, la ciclina E es degradada y la cinasa CDK2 forma posteriormente complejos con la ciclina A (Moroy y Geisen, 2004). La ciclina A aparece durante la fase G1 tardía, se acumula durante la fase S y G2 y se degrada en la mitosis; así que se ha encontrado que participa tanto en la transición de G1/S fosforilando a pRb, como en la progresión de la fase S (Nelson *et al.*, 2002).

La mayoría de los elementos claves en la vía de Rb/E2F se encuentran conservados a través de la evolución de los organismos multicelulares (den Boer y Murray, 2000); en distintas especies de plantas se han aislado proteínas relacionadas con pRb (RBRs), E2F y activadores transcripcionales de la familia DP. De igual manera, recientemente en plantas se ha logrado obtener CDKs capaces de fosforilar RBRs, entre las que se encuentra la CDKA;1 (homóloga de CDK1 de mamífero) en asociación con la ciclina de tipo D (Stals e Inzé, 2001).

### 1.2.3 REGULADORES DE LOS COMPLEJOS CDK/CICLINA PRESENTES EN G1-S

Las CDKs presentes y encargadas de la regulación de la fase G1, así como la transición G1/S, pueden ser moduladas por reguladores negativos o inhibidores de las cinasas CDKs (CKIs). En levadura existen dos proteínas inhibitorias: Far1, que actúa sobre los complejos CDC28/CLN2 y p40<sup>Sic1</sup> sobre CDC28/CLN5.

En células animales los CKIs se dividen en dos grupos: la familia INK4 (inhibidores de cinasa dependiente de ciclina 4) y la familia Kip/Cip (proteína inhibidora de cinasa cdc2) (Sher y Roberts, 1999). La familia INK4 está compuesta por proteínas de 15-20 kDa que poseen motivos repetidos y sitios conservados de ankirina, que participan en interacciones proteína-proteína. El primer integrante descrito para esta familia fue p16 o INK4a, el cual inhibe la actividad de CDK4 y CDK6 a través de su unión competitiva con la ciclina D justo antes del punto de restricción, además de impedir la

fosforilación de activación realizada por CAK (cinasa activadora de CDK) (Mitra *et al.*, 1999). Por otra parte, la familia Kip/Cip consiste de tres miembros: p21/Cip1, p27/Kip1 y p57/Kip2. El primer integrante caracterizado fue p21 que es una proteína de 21 kDa, llamada también Cip1 o Waf1. La p21 se une a los complejos CDK4, 6/ciclina D y CDK2/ciclina E durante la fase G1. Mientras los complejos contengan una molécula de p21 serán catalíticamente activos, en tanto que aquellos que posean más de una subunidad serán inactivos. Esta proteína bloquea también la activación de los complejos CDK/ciclina por CAK, pero además inhibe la actividad de aquellos complejos que ya fueron activados (Andrews *et al.*, 2004). En células normales p21 se encuentra formando parte de un complejo cuaternario que incluye, además de la ciclina y la cinasa, al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que es una subunidad de la polimerasa  $\delta$  que interviene en la replicación y reparación del DNA. La expresión de p21 está directamente regulada por la proteína supresora de tumores p53. El segundo integrante de la familia Kip/Cip, p27 o Kip1, es una proteína de 27 kDa que presenta un 42% de aminoácidos idénticos a p21<sup>Cip1</sup> en su extremo N-terminal. Esta proteína presenta dominios de unión tanto para las ciclina A y E como para las distintas CDKs del ciclo celular y, al igual que p21, su estequiometría con los complejos CDK/ciclina determina si actuará o no como inhibidor de su actividad. La regulación de esta proteína parece variar de un tipo celular a otro, siendo esta regulación predominantemente a nivel protéico. Se sabe que su degradación ocurre a través de la vía de ubiquitina al ser fosforilada en la Tre187 por el complejo CDK2/ciclina E, quedando así marcada para ser ubiquitinada y posteriormente degradada (Bird y Deinnocentes, 2004) (Fig. 2).

El antagonista de las cinasas que actúa como inhibidor, al desfosforilar residuos específicos de las proteínas, es el producto del gen Cdc25A. Esta proteína fosfatasa, es específica para los complejos CDK2/ciclina A y CDK2/ ciclina E, promoviendo de esta manera la entrada en la fase S (De Veylder *et al.*, 2001).

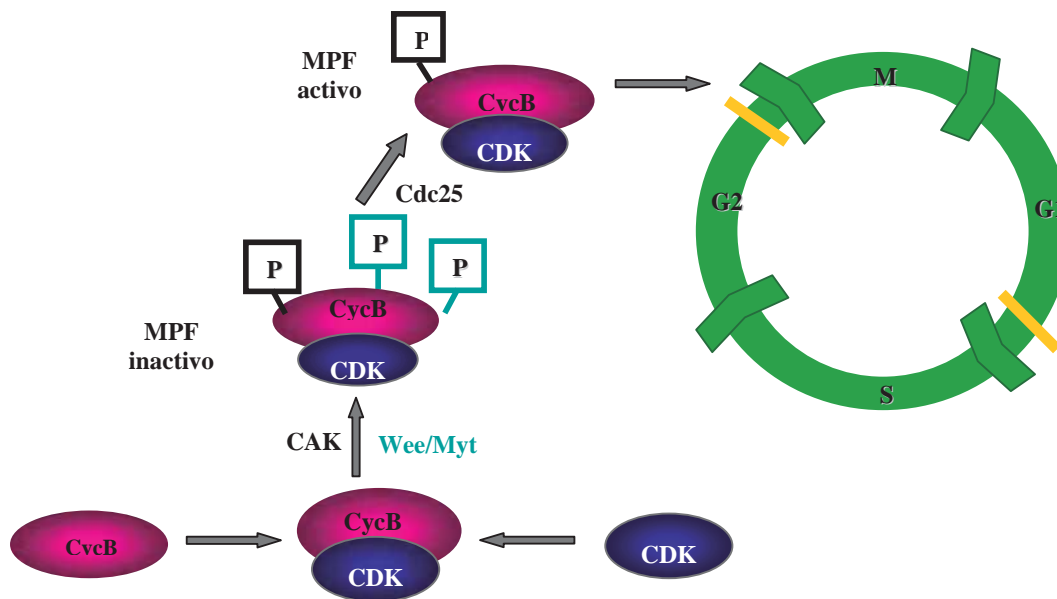
En cuanto a los activadores de los complejos CDK/ciclina que intervienen en esta fase, se encuentra la cinasa activadora de CDK o CAK. Esta proteína está formada por una subunidad catalítica denominada CDK7 y una subunidad reguladora o ciclina H y fosforila específicamente a los complejos CDK4,6/ciclina D y CDK2/ciclina E en el residuo de treonina (Tre 161) ubicado en la CDK, lo cual permite su total activación. En levadura esta cinasa activadora consiste de una sola subunidad denominada Cak1 o MO15 (Kaldis 1999).

#### 1.2.4 SEGUNDO PUNTO DE CONTROL, TRANSICIÓN G2/M

De forma similar a la fase S, la entrada de las células a la división o fase M, está sujeta a distintos controles que regulan: tiempo, masa celular, velocidad de crecimiento y terminación de la

replicación del material genético. El componente clave de esta fase en todos los eucariontes es el factor promotor de la mitosis o MPF formado por la subunidad catalítica p34<sup>Cdc2</sup> y su regulador positivo, la ciclina B. Así, esta activación ó inhibición se lleva a cabo de manera similar en eucariontes superiores e inferiores (Uversax *et al.*, 2003).

Para generar un MPF activo, la subunidad p34<sup>Cdc2</sup> debe unirse a la ciclina B y ser fosforilado en el residuo de Tre161 o en un sitio homólogo. La cinasa encargada de fosforilar este sitio es CAK o cinasa activadora de CDK, al igual que ocurre con algunas CDKs de la fase G1. Una vez activo, el MPF conduce a varios eventos de la fase M incluyendo la condensación de los cromosomas, la reorganización del citoesqueleto, el rompimiento de la envoltura nuclear y los cambios en la estructura celular. Sin embargo, no todos estos eventos ocurren en todas las células eucariontes (Kong *et al.*, 2000) (Fig. 3).



**Figura 3. Regulación de la transición G2/M en mamíferos.** Una vez formado el factor promotor de la maduración (MPF), conformado por la cinasa CDK1 y la ciclina B1 para su completa activación requiere ser fosforilado en el residuo de Tre161 por CAK. Sin embargo para evitar una entrada prematura en mitosis el complejo es mantenido en estado inactivo mediante su fosforilación en Tre14 por la cinasa Myt1 y en la Tir15, por la cinasa Wee1. Una vez verificada la completa y correcta replicación y la presencia de todos los componentes para la mitosis, el MPF es desfosforilado en Tre14 y Tir15 por la fosfatasa Cdc25, misma que requiere ser fosforilada por el MPF para ser activa, teniendo así lugar la mitosis.

Además de la ciclina B, la ciclina A también es capaz de unirse con Cdc2 (CDK1 en mamíferos) formando complejos que son acumulados en el núcleo tan pronto como es sintetizada la ciclina, dichos

complejos se localizan en los sitios de replicación del DNA. Lo antes mencionado sugiere que el complejo Cdc2/ciclina A regula la expresión génica a través de la fosforilación de ciertos factores de transcripción, por lo que la función de estos complejos no es redundante. Finalmente, la ciclina A es activada y degradada de forma previa a la ciclina B (Mitra y Enders, 2004).

Durante la fase G2 en organismos animales, los complejos de Cdc2/ ciclina B son mantenidos en estado inactivo por fosforilación de la cinasa en dos sitios regulatorios negativos, Tre14 y Tir15 (Suda *et al.*, 2000) (Fig. 3). En levaduras Cdc2 es fosforilada a nivel de Tir15, este residuo de tirosina se encuentra ubicado en el sitio de unión con el ATP en la cinasa, por lo cual su fosforilación interfiere en la transferencia del grupo fosfato al sustrato de unión. De forma inversa, la fosforilación a nivel de Tre14 interfiere en la unión del ATP. Esta inactivación de Cdc2 representa una función importante para el control del inicio de la mitosis en eucariontes superiores e inferiores, ya que el cambio de Tir15 por fenilalanina provoca el inicio prematuro de mitosis, aun cuando la célula no haya completado la replicación del DNA (Sagata 2002).

La fosforilación de Cdc2-Tir15 es realizada por la familia de proteínas cinasas Wee1/Mink1. La cinasa Wee1 (en compañía de la cinasa Mik1 en levadura) es responsable de la fosforilación de la Tir15, mientras que la cinasa Myt1 lo es de la fosforilación en la Tre14. Se ha visto que Wee1 es una proteína nuclear, en tanto que Myt1 se encuentra asociada a membranas en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Esta diferencia en cuanto a la localización celular de estas cinasas, probablemente garantiza la inactivación de múltiples subpoblaciones de Cdc2 antes del inicio de la mitosis. Las cinasas Wee1 son en sí mismas reguladas por fosforilación, uno de estos reguladores es la proteína Nim1 o Cdr1 la cual directamente inactiva a Wee1. Hasta ahora, no se han identificado homólogos de Nim1, a excepción de levadura donde fue inicialmente identificada (Ito, 2000) (Fig. 3).

Al comienzo de la fase M, Cdc2 es rápidamente desfosforilada tanto en Tre14 como en el sitio de Tir15, en tanto que la Tre161 permanece fosforilada. Como resultado MPF es completamente activo y las células son llevadas a mitosis. La defosforilación de la Tre14 y la Tir15 es realizada por la fosfatasa Cdc25, misma que presenta una alta especificidad por el MPF (Daga y Jiménez, 1999) (Fig. 3). Las levaduras contienen sólo una proteína Cdc25, a diferencia de las células animales en que se han identificado tres genes (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) con distintas funciones, activando diferentes CDKs en diferentes fases del ciclo celular en los cuales Cdc25C es quien realiza la activación de MPF (Wolfe y Gould, 2004).

En eucariontes superiores, la Cdc25, es activada post-traduccionalmente por la fosforilación efectuada por el MPF en el dominio no catalítico del extremo N-terminal de la misma. A lo largo de la fase S se mantiene un nivel basal de la actividad fosfatasa, pero es cerca del inicio de la mitosis que

Cdc25 es fosforilada y por consiguiente altamente activa. Esto trae consigo la defosforilación de los residuos de Thr14 y Tyr15 en Cdc2, permitiendo la activación del MPF. Una vez activo el MPF fosforila y activa más Cdc25, misma que, a su vez, activa al factor MPF (Fig. 3). Este circuito de activación permite la regulación de ambos de manera que tenga lugar la mitosis (Peter *et al.*, 2002).

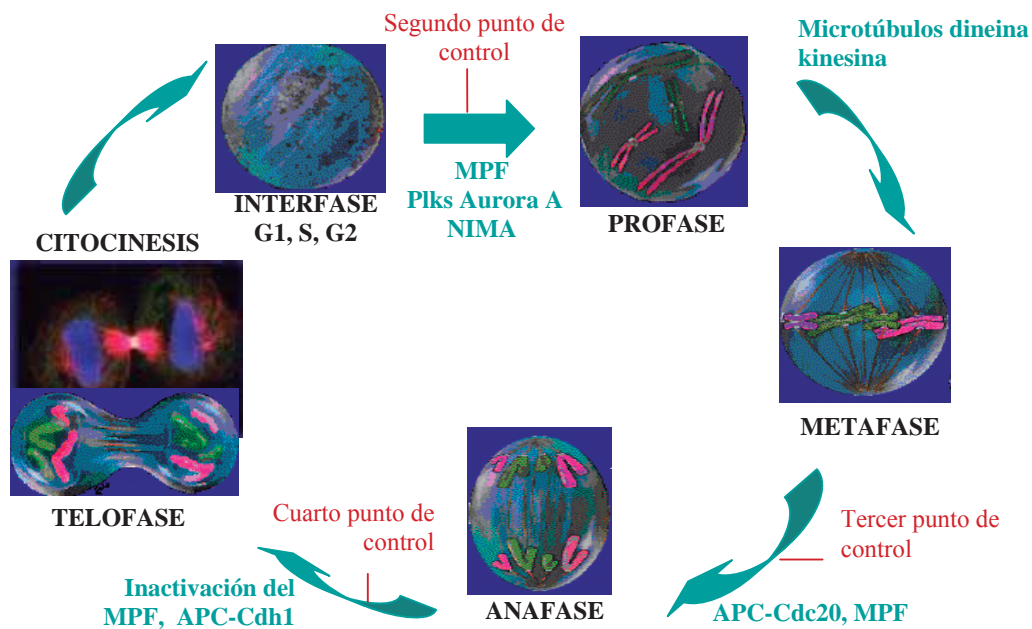
Por otra parte, otro mecanismo de control de los complejos CDK/ciclina durante este periodo del ciclo celular, es su localización, y la de sus reguladores en compartimentos celulares particulares. De esta manera, la ciclina A aparece en el núcleo desde la fase S en que inicia su síntesis hasta su degradación en la metafase. Por el contrario, la ciclina B se localiza inicialmente en el citoplasma durante las fases S y G2 y es translocada hacia el núcleo al inicio de la mitosis lo cual se cree evita una entrada prematura en mitosis (Kong *et al.*, 2000).

#### 1.2.5 TERCER PUNTO DE CONTROL, PROFASE-METAFASE

Una vez que la célula ha proseguido a través de G2/M entra en el ciclo mitótico, cuya progresión se controla por dos mecanismos postraduccionales: la fosforilación y la proteólisis. De manera general, el ciclo mitótico puede ser definido por tres transiciones que involucran al factor MPF (CDK1/ciclina B). En la primera transición, la ciclina B en unión con cinasas Polo activan al MPF e inicia la profase; posteriormente MPF activa el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina, provocando la destrucción de la ciclina B y el inicio de la anafase; y finalmente esta maquinaria de destrucción de la ciclina B es apagada y el ciclo celular es reiniciado. La primera de estas tres fases ha sido descrita previamente, por lo que a continuación se describirán únicamente la segunda y tercera transición (Fig. 4).

En la mayoría de los diferentes tipos celulares, los centrosomas duplicados se mantienen próximos y actúan como un solo centro de organización microtubular durante G2. Al finalizar G2 inician su separación y migran hacia regiones opuestas de la célula. La maduración de los centrosomas requiere de la acción de cinasas similares a Polo o Plks. La proteína Polo, que fue originalmente identificada en *Drosophila*, regula a la proteína Asp que se encuentra asociada a los microtúbulos y tiene como función mantener unidos los complejos de anillos de  $\gamma$ -tubulina al centrosoma (do Carmo-Avides y Glover, 1999). Las proteínas Plks están presentes en todos los eucariontes, *S. cerevisiae* contiene una proteína homóloga a Polo de *Drosophila* denominada Cdc5p y *S. pombe* posee Plo1p, localizadas ambas en los cuerpos polares del huso mitótico. En mamíferos se han encontrado tres distintas Plks localizadas en los centrosomas: Plk1, con función durante la mitosis; Snk (Plk2) y Fnk/Prk (Plk3) cuyas funciones no han sido determinadas (Glover *et al.*, 1996). Todas estas proteínas comparten un dominio catalítico en el extremo N-terminal y un segundo motivo altamente conservado

denominado “*caja polo*” (polo-box) en el extremo C-terminal. Se ha propuesto que este último motivo es requerido para guiar su localización subcelular o para regular las interacciones con otras proteínas (Nigg 1998). Estudios en *Xenopus* las proteínas Polo han mostrado que se asocian transitoriamente con varias estructuras mitóticas incluyendo los polos del huso mitótico en metafase, los cinetocoros en prometafase, la zona media durante anafase y el cuerpo medio formado en la transición telofase/citocinesis, resultando así esenciales para la formación de un huso bipolar (Donalson *et al.*, 2001).



**Figura 4. Regulación de la mitosis.** La figura muestra las distintas cinasas requeridas para la transición de la mitosis (MPF, Aurora A, Plks) así como los eventos de proteólisis realizados por el complejo promotor de la anafase o APC en unión con diferentes subunidades reguladoras. Se indican también los diferentes puntos de control. En el segundo punto de control se verifica el DNA; en el tercero la estructura del huso mitótico; y en el cuarto el posicionamiento del huso medio y la estructura del anillo contráctil.

Se han descrito otras cinasas implicadas en el proceso de separación de los centrosomas como son algunos de los integrantes de la familia NIMA (de Nunca en Mitosis A). Se postula que Nek2, de la familia NIMA, fosforila la proteína centrosomal C-Nap1, lo que lleva a la disolución de la estructura dinámica que une entre sí a los centrosomas duplicados (Fry *et al.*, 1998). Se ha identificado también un grupo de la familia de cinasas reconocida como Aurora (grupo A). El grupo A, puede estar implicado en este proceso de separación ya que las proteínas se han encontrado asociadas tanto a los

centrosomas como a distintos componentes del huso mitótico en la transición desde la profase hasta la telofase (Giet y Prigent, 1999).

Una vez que los centrosomas se han separado, tiene lugar el rompimiento de la envoltura nuclear. Durante la interfase, la envoltura nuclear es estabilizada por la estructura carioesquelética conocida como lámina nuclear, pero al inicio de la mitosis esta estructura pierde su ensamblaje a consecuencia de su hiperfosforilación por el MPF, lo cual reduce la estabilidad de la envoltura nuclear y contribuye finalmente a su ruptura (Nigg 1995).

De manera simultánea se inicia la condensación de los cromosomas que se acompaña de numerosos procesos de fosforilación proteica tanto en histonas como en proteínas no histonas. La histona de unión H1 representa uno de los sustratos para el MPF, sin embargo, se desconoce su función (Giet y Glover, 2001). Recientemente, la fosforilación de la histona central H3 (en el residuo de serina 10) ha adquirido gran interés, en base a que representa un sitio de fosforilación altamente conservado y se encuentra asociado con la condensación cromosómica tanto en mitosis como en meiosis. Además, se requiere para la adecuada segregación de los cromosomas en algunos organismos. Este proceso de fosforilación se lleva a cabo mediante cinasas integrantes de la familia Aurora, que al igual que la familia de Plks, han sido localizadas en los centrosomas, en los polos del huso mitótico y en los microtúbulos que lo conforman; específicamente Ip11p de *S. cerevisiae* y AIR-2 de *C. elegans* pueden controlar la fosforilación de la histona H3 en contraposición con la fosfatasa de tipo 1 (PP1) (Hsu *et al.*, 2000).

A partir de la condensación de los cromosomas da inicio el ensamblaje del huso mitótico, así como el desplazamiento de los cromosomas. Ambos procesos dependen de: 1) las características de la dinámica microtubular; 2) el equilibrio entre proteínas accesorias estabilizadoras y desestabilizadoras de microtúbulos y 3) de la acción de proteínas con actividad motora dependientes de los microtúbulos, como las familias de las dineínas y las kinesinas. Así, el ensamblaje del huso acromático y la migración de los cromosomas culminarán en la unión de las cromátidas con los microtúbulos a través del cinetocoro, contribuyendo a la orientación de los mismos en el plano ecuatorial del huso mitótico en el proceso conocido como metafase (Nigg 2001).

#### 1.2.6 CUARTO PUNTO DE CONTROL, ANAFASE-TELOFASE

Para la progresión durante la mitosis media y tardía, así como para la salida de la fase M, se requiere la culminación de tres procesos consecutivos generales: 1) la separación de las cromátidas hermanas, 2) el desensamblaje del huso acromático y 3) la citocinesis. El inicio y coordinación de

estos procesos son controlados por el proteosoma mediante proteólisis dependiente de ubiquitina de proteínas reguladoras clave.

El proteosoma es un complejo de proteasas que se encuentra altamente conservado tanto en estructura como en función en arqueas, bacterias y eucariontes. En células eucariontes el proteosoma 20S tiene una estructura en forma de barril y el sitio activo de sus múltiples subunidades catalíticas se encuentra orientado frente a la cavidad central. Este sitio denominado centro del proteosoma, se asocia típicamente con uno o dos complejos de la fracción 19S o “cap” para formar un complejo más grande llamado proteosoma 26S. El complejo 19S contiene varias subunidades de ATPasas que están involucradas en el desdoblamiento de las proteínas blanco. El complejo 19S contiene también por lo menos 11 subunidades no-ATPasas, las cuales participan en la regulación y el reconocimiento del blanco. Una de estas subunidades se une a la ubiquitina, que funciona como una señal universal para el marcaje de proteínas que serán degradadas por el proteosoma (Hofmann y Bucher, 1998). Sin embargo, la degradación proteosomal no se encuentra dirigida exclusivamente hacia proteínas ubiquitinadas, otros sustratos incluyen: proteínas no plegadas o que han perdido su plegamiento, antígenos y proteínas marcadas por otros mecanismos como fosforilación (Baumeister *et al.*, 1998).

La ubiquitina es una proteína altamente conservada de estructura pequeña. Se une a residuos de lisina de las proteínas blanco de degradación por el proteosoma mediante un proceso secuencial que requiere de tres eventos en cascada realizados por las enzimas: E1, E2 y E3. La enzima E1 (de activación) forma un enlace tioéster de alta energía entre la cisteína del sitio activo y la glicina del C-terminal de la ubiquitina. Posteriormente la ubiquitina es transferida a la enzima E2 (de conjugación o UBC). Finalmente, la ubiquitina es transferida directamente de la E2 a una lisina del sustrato específico requiriendo para ello de la actividad de la enzima E3 (enzima ligasa) (Peters 1999).

Por otra parte, la ligasa de ubiquitina o E3, denominada también ciclosoma o complejo promotor de la anafase (APC) es una supramolécula 20S capaz de marcar por sí sola proteínas para su degradación (Golan *et al.*, 2002). El ciclosoma está constituido por un grupo de 8 a 12 proteínas diferentes activadas por asociación secuencial de dos proteínas conocidas como Cdc20 (Slp1/p55C/fizzy) y Cdh1 (Hct1/Srw1/fzr), respectivamente. Mientras APC<sup>Cdc20</sup> es activo en la transición metafase/anafase, APC<sup>Cdh1</sup> es activado en las etapas finales de la mitosis manteniéndose en este estado hasta la fase G1. Esta activación diferencial se encuentra bajo control del MPF, lo cual permite establecer el orden de actividad temporal del APC (Morgan 1999). La asociación de Cdc20 con el APC depende de su síntesis y degradación al final de la mitosis y requiere ser sintetizada nuevamente en las fases S y G2. Se ha encontrado, además, que la activación del APC<sup>Cdc20</sup> requiere de fosforilación por el MPF y por otras proteínas como Plks, previniendo así la activación del APC<sup>Cdh1</sup> (Donaldson *et al.*, 2001).

Una vez alineados los cromosomas en el plano ecuatorial del huso mitótico, con orientación polar de las cromátidas hermanas, el APC<sup>Cdc20</sup> es activado e inicia la anafase, ya que permite la separación de las cromátidas hermanas por destrucción de una proteína inhibitoria llamada securina (Pds1/Cut2 en levadura). Este inhibidor, previene la actividad de una proteasa, denominada separasa (Esp1/Cut1 en levadura), la cual se encarga de eliminar la cohesión entre las cromátidas hermanas por destrucción de un componente del complejo multiprotéico conocido como cohesina. De esta manera, el inicio de la anafase se encuentra inhibido hasta que la vía del APC es activada (Uhlman *et al.*, 2000). Se ha reportado, además, que la cohesina es removida de los brazos de los cromosomas desde la profase lo que permite la extensa condensación característica de los cromosomas de algunos vertebrados. Sin embargo, esta primera remoción observada no depende del APC, sino de la fosforilación de la cohesina por el MPF (Kramer *et al.*, 2000).

El APC es responsable no sólo de la destrucción de los inhibidores de la anafase sino también de otras proteínas de gran importancia como son las ciclinas, cinasas mitóticas, cinasas Plks, elementos de la familia NIMA y cinasas Aurora, lo cual resulta esencial para revertir o anular su función (condensación de los cromosomas, rompimiento de la envoltura nuclear, formación del huso) y así permitir la conclusión de la fase de división (Kandli *et al.*, 2000).

La destrucción de las ciclinas mitóticas (ciclinas A y B) permite la inactivación de los complejos CDK/ciclina, como es el caso del MPF. Dicho mecanismo depende de una secuencia de nueve aminoácidos localizada en el extremo N-terminal de la proteína denominado “caja de destrucción” (de destruction box o D box), la cual se encuentra altamente conservada entre las distintas ciclinas mitóticas y funciona como blanco para la proteólisis mediada por la ubiquitina. Los tiempos de degradación difieren entre las ciclinas: las ciclinas de tipo A son degradadas durante la metafase mientras que las ciclinas de tipo B son destruidas a partir del inicio de la anafase. Específicamente, APC<sup>Cdh1</sup> realiza la degradación de las ciclinas de tipo B, formadoras del MPF (Kitazono *et al.*, 2001).

### 2.3 CITOCINESIS

En cuanto a la regulación de la citocinesis a través de cinasas y fosfatasa, en *S. pombe* se ha documentado que las células detenidas en la transición G2/M por inactivación de los genes de Cdc2 o Cdc25, continúan elongándose sin sufrir división del núcleo y no pueden realizar el ensamblaje del anillo de actinmiosina que permite la adecuada separación de las células hijas durante la citocinesis. Esto sugiere que las proteínas formadoras del anillo podrían ser fosforiladas por el MPF, permitiendo así el ensamblaje del mismo. Dos efectores potenciales son los componentes Plo1p (Plk) y la

fosfoproteína Cdc15p, ya que la sobreexpresión de ambas proteínas permite el ensamblaje del anillo en células detenidas en G2. Contrariamente, la eliminación de Plo1p da como resultado un ensamblaje defectuoso del anillo (Simanis 2003). Plo1p, como se ha mencionado anteriormente, es un componente de los cuerpos polares de huso (SPB, Spinde Pole Body), así como del huso mitótico. Tales hechos han permitido sugerir que la proteína Plo1p podría acoplar el ensamblaje del anillo de actinmiosina con la formación del huso mitótico o la duplicación de los SPBs, eventos que ocurren sobre la transición de la fase M. Asimismo, se ha propuesto que la cinasa Polo podría fosforilar otros componentes del citoesqueleto como las septinas o proteínas asociadas a actina, para modificar directamente la estructura del aparato de constricción, así como la del huso central (Mulvihill y Hyams, 2002).

Otra proteína involucrada en el posicionamiento adecuado del anillo de actinmiosina es el producto del gen *mid1*. Estudios en mutantes de este gen muestran defectos en la ubicación celular del anillo. En la interfase, Mid1p reside en el núcleo y posteriormente, hacia la entrada en mitosis, es fosforilada lo cual permite su expulsión del núcleo y la localiza en la corteza que lo cubre. Una vez ahí, atrapa proteínas involucradas en el ensamblaje del anillo de actinmiosina marcando de esta manera el sitio de división celular (Berlin *et al.*, 2003).

Mediante estudios de mapeo genético, cuyo objetivo es identificar genes que regularan la división celular, se encontró un grupo de genes denominados *sid* (defectuosos en el inicio de la septación) (Balasubramanian *et al.*, 2000). Los análisis moleculares de estos genes revelan que dan lugar a una elaborada red de transducción de señales que indica la inactivación del MPF y la formación del septo de división. Se encontró, además, que las mutaciones en dichos genes bloquean la citocinesis pero las células continúan realizando múltiples ciclos dando como resultado células multinucleadas y altamente elongadas (Simanis 2004).

Esta vía de transducción *sid* incluye tres proteínas cinasas (Cdc7, Sid1p y Sid2p) y una GTPasa (Spg1g). El estado nucleotídico de esta última parece ser de vital importancia en la activación del anillo de constricción, así como en la formación del septo, ya que la expresión constitutiva de Spg1g da lugar a una septación incontrolada, mientras que las células que expresan una forma dominante negativa del gen previenen el ensamblaje del mismo. De esta manera, el efecto de la unión de GTP a Spg1p es regulado a través de su proteína efectora Cdc7p, además de requerir la función de los productos de los genes Sid1p, Sid2p, Sid4p, Cdc14p (Krapp *et al.*, 2003) así como de Cdc16 y Byr4p, las cuales forman un complejo de dos componentes de proteína activadora de GTPasa denominada complejo GAP (Fournier *et al.*, 2001).

Por otra parte, análisis citológicos sugieren que las proteínas de la vía de *sid* regulan la constricción del anillo de actinmiosina y el ensamblaje del septo de división en respuesta a señales que se originan en los SPBs mitóticos (Simanis 2003). De esta manera, la localización de todos los componentes depende de la función de Sid4p, proteína que se encuentra asociada al SPB, de la misma forma que la GTPasa Spg1p, y las cinasas Sid1p y Sid2p. Sin embargo, la localización de Sid1p en dichos cuerpos polares tiene lugar únicamente durante la anafase a diferencia de los demás, que se encuentran tanto en interfase como a lo largo de la mitosis, y se da solamente después de la degradación de las ciclinas y la proteólisis del MPF. Por su parte, la Sid2p además de los SPBs es detectada en el sitio de división durante la constricción del anillo y el ensamblaje del septo. Esta última localización, así como su activación de proteína cinasa, requiere del funcionamiento de toda la vía de *sid*, lo cual ha permitido sugerir que dicha proteína interviene al final de la ruta, cuyo orden parece ser el siguiente: Spg1p, Cdc7p, Sid1p-Cdc14p, Sid2p (Balasubramanian 2000).

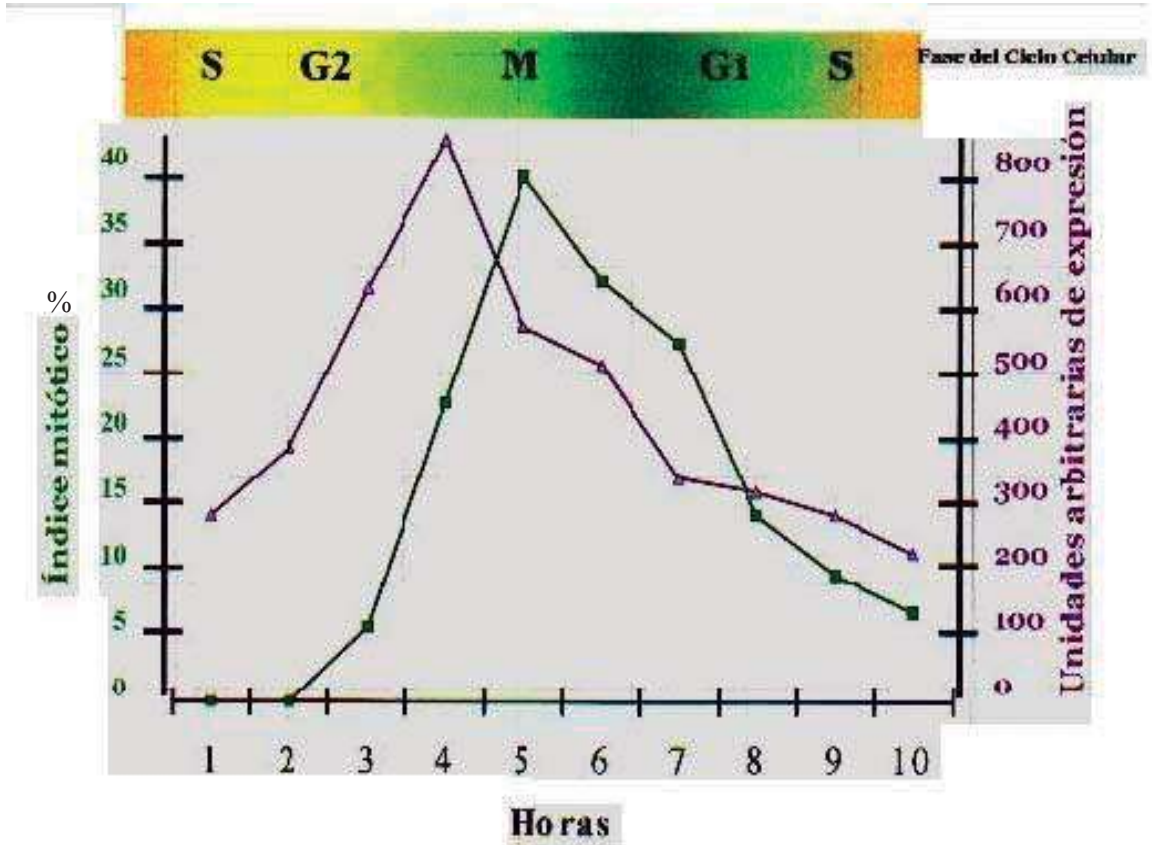
## CAPITULO II

### ANTECEDENTES

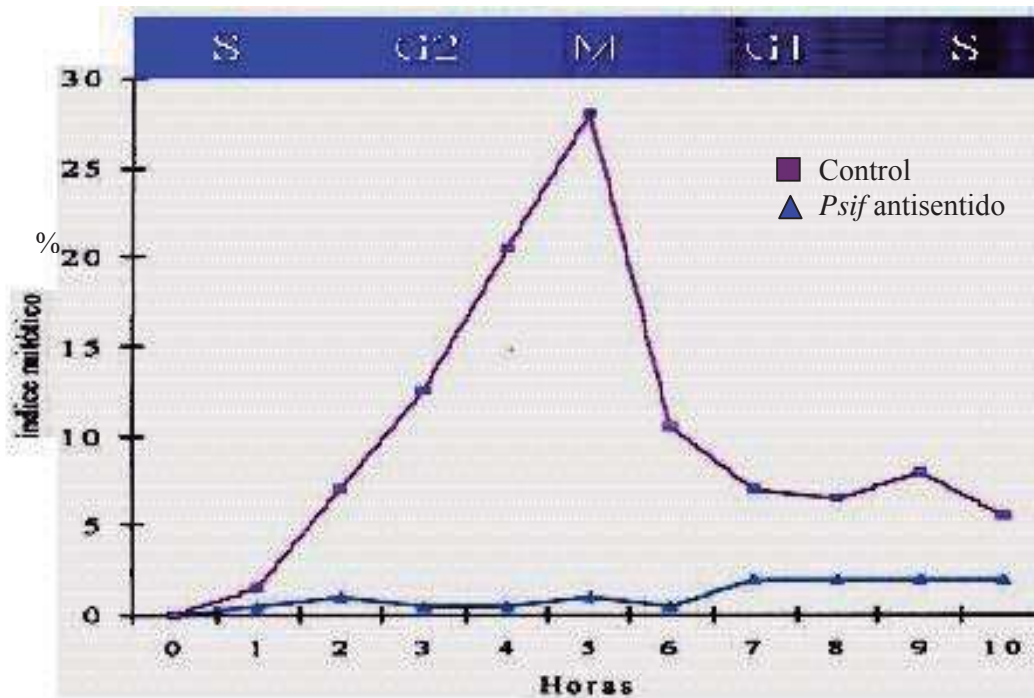
#### 2.1 PSIF

Dentro de los genes implicados en el ciclo celular se encuentra el gen *psif*. Este gen presenta un patrón de expresión circunscrito a la transición G2/M del ciclo celular, y se demostró que su ausencia desacopla la división celular (Higareda *et al.*, 2003). Tales hechos indican, que la expresión de *psif* es requerida sólo para esta etapa de transición durante el ciclo celular y es indispensable para la progresión normal del mismo (Fig. 5 y 6).

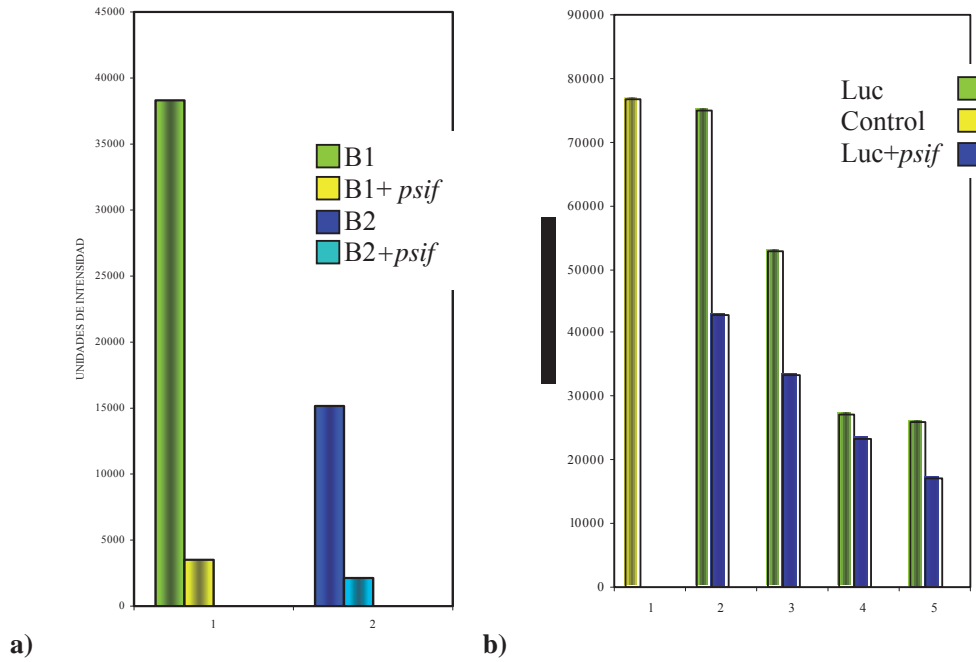
En un análisis comparativo por alineamiento tipo *BLAST* de la secuencia aminoacídica de la proteína *PSIF* con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), se encontró que dicha proteína corresponde a la subunidad p47 del factor de iniciación eucariótico 3 (eIF3) (Asano *et al.*, 1997). Al reportar a la proteína *PSIF* (p47) como parte del factor eIF3, se planteó su posible intervención en la síntesis de proteínas, ya que este último tiene una función esencial en el proceso de traducción, al unir el complejo de iniciación (eIF2/GTP/RNAt + 40S) al RNAm. Para probar dicha hipótesis, se realizó la traducción *in vitro* de proteínas específicas y esenciales durante el periodo de expresión de *psif* (G2/M), como son las ciclinas mitóticas de tipo B, en presencia y ausencia del gen *psif*. Se encontró que al añadir *psif* a la reacción acoplada de transcripción y traducción de las ciclinas, la síntesis de ambas proteínas se vio fuertemente inhibida (Fig. 7a). Para analizar si la proteína PSIF presentaba un efecto inhibitorio específico para las ciclinas, es decir para proteínas involucradas en el ciclo celular, se llevó a cabo el experimento antes descrito con un gen ajeno al ciclo celular. Así, se realizó la traducción del gen de Luciferasa (LUC) a lo largo de un gradiente de concentración de *psif*, obteniendo, nuevamente, una fuerte inhibición en los patrones de síntesis, lo cual permitió sugerir que PSIF funciona como un inhibidor de la síntesis de proteínas *in vitro* y que la concentración requerida de dicha proteína es mínima para tener una alta efectividad en función (Fig. 7b) (Farias 2002).



**Figura 5.** Expresión de *psif* en el ciclo celular de células de tabaco. Células meristemáticas de tabaco (línea celular TBY2), fueron sincronizadas al final de la fase S con afidicolina. El índice mitótico (%) se determinó por microscopía de fluorescencia después de la liberación con afidicolina por tinción del DNA con DAPI (cuadros). La expresión de *psif* fue determinada por "Northern Blot" (triángulos) (Higareda *et al.*, 2003).

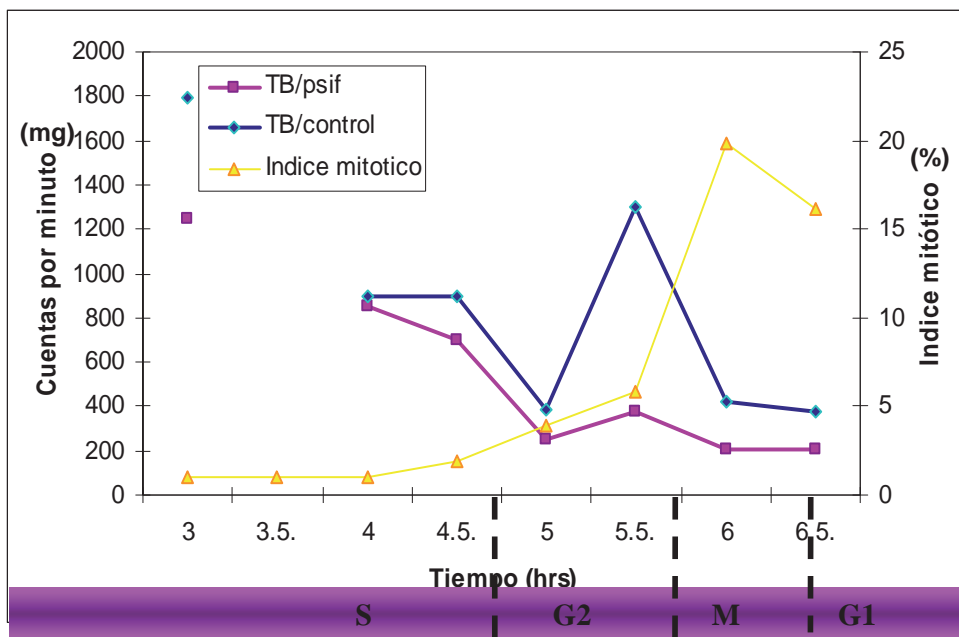


**Figura 6. Esencialidad de *psif* durante la mitosis.** Células vegetales de tabaco (TBY2) fueron sincronizadas al final de la fase S con tratamiento con afidicolina y transformadas independientemente con el vector (control) o con el plásmido que contiene *psif* en antisentido. La inducción de la expresión se logró mediante la adición de metil-jasmonato. (Higareda *et al.*, 2003).



**Figura 7. Síntesis de proteínas *in vitro* bajo la influencia de *psif*.** El porcentaje de síntesis, indicado como unidades de intensidad, fue obtenido por análisis de opacidad en el programa EDAS a partir de la placa radiográfica expuesta al gel de poliacrilamida que contenía las reacciones de transcripción y traducción con  $S^{35}$ . a) Efecto de *PSIF* sobre la síntesis de ciclinas. b) Efecto de *PSIF* sobre la síntesis de luciferasa. La banda amarilla indica el 100% de síntesis de Luciferasa. Las concentraciones utilizadas son: (2) 1/100, (3) 1/2, (4) 1/10 y (5) 1/1 de LUC y *psif* respectivamente (Farias 2002).

Con el fin de determinar si el efecto inhibitor de *PSIF* observado *in vitro* se conservaba *in vivo*, se utilizaron cultivos celulares sincronizados de tabaco (línea celular TBY2) y mediante experimentos de “pulso y caza”, que permiten determinar la síntesis *de novo* de proteínas, se encontró que la inducción de *psif* inhibe la síntesis de proteínas específica de la transición de G2 a M (Fig. 8). Dicho efecto no es observado en células donde la expresión del gen *psif* se encontraba anulada o en aquellas que llevan únicamente el vector, permitiendo así corroborar la función inhibitoria de la proteína *PSIF*. Estos datos sugirieren, además, que *PSIF* no forma parte del factor de iniciación eIF3 como se ha reportado, ya que su función inhibitoria sobre la síntesis contradice la propia actividad del factor, que es precisamente promover dicho proceso (Llanderal 2003).

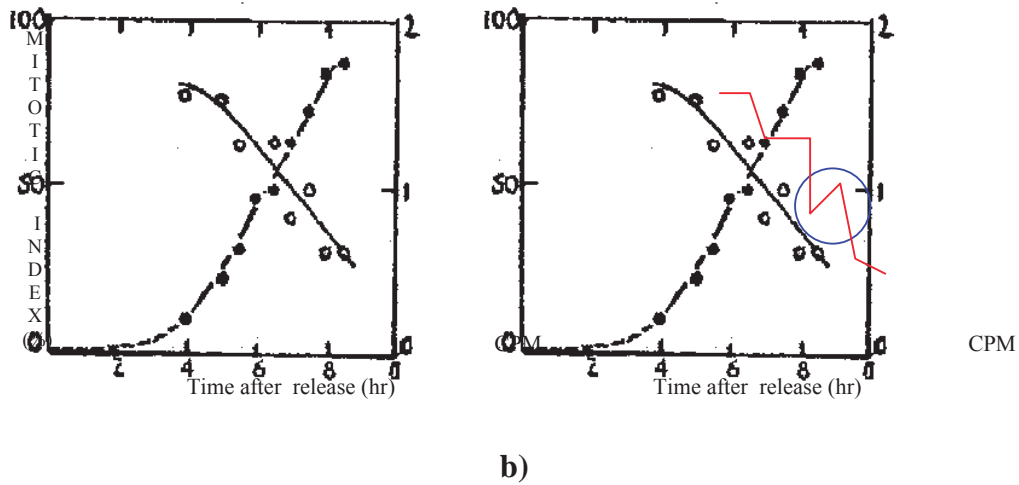


**Figura 8. Síntesis *de novo* de proteínas en cultivos de tabaco TBY2 bajo la influencia de *PSIF*.** La gráfica muestra la incorporación específica normalizada, registradas por contador de centelleo que indica la cantidad de proteína sintetizada con respecto al tiempo de toma de la muestra. La línea azul corresponde al control (células + vector) y la línea rosa a la síntesis de proteínas de las células que donde se indujo la expresión de *PSIF*. En amarillo se indica el índice mitótico (%) (Llanderal, 2003).

Fan y Penman (1970), reportan un descenso del 70% en la síntesis de proteínas durante la mitosis en células eucariontes en cultivo, comparado con los índices de síntesis obtenidos para la interfase. En este trabajo indican que la cantidad de RNAm y el número de ribosomas funcionales no son significativamente diferentes en las células en mitosis de aquellas en interfase, por lo cual ninguno de los dos funciona como un factor limitante en el proceso de síntesis durante la mitosis; de igual manera, no se observa una diferencia en la velocidad de síntesis de la cadena polipeptídica. La diferencia principal, concluyen, debe estar en la unión de los ribosomas al RNAm en la fase de inicio de la síntesis, por lo cual la regulación debe estar en el inicio del proceso a través de algún componente de iniciación (Fig. 9). De igual manera, Rao y colaboradores (1977) intentaron elucidar este mecanismo que lleva a la inhibición del inicio de la síntesis de proteínas en la mitosis, y concluyeron que esta inhibición puede darse como resultado de la liberación de RNAs de bajo peso molecular ante el rompimiento de la membrana nuclear, los cuales tienen un efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas, sin embargo, presentan un porcentaje de inhibición muy bajo comparado con el reportado para las células en mitosis, por lo cual dichos RNAs tienen posiblemente sólo una contribución parcial y se requieren elevadas concentraciones de los mismos para que su efecto tenga lugar. Posteriormente, Tarnowka y Baglioni (1979) reportaron datos más específicos. Dichos autores encuentran que el primer paso de inicio de la traducción, que consiste en la unión del tRNA que lleva la metionina de inicio de la traducción (Met-tRNA<sub>i</sub>) a la subunidad 40S del ribosoma, no presentó ningún defecto en las células mitóticas *in vivo*, ni diferencias entre los extractos de la fase S y la fase M. Una diferencia pequeña se observó en la unión del RNAm a la subunidad ribosomal 40S, diferencia que incrementó enormemente ante la adición de un análogo de “cap” en los extractos celulares. Por consiguiente, propusieron que en las células en mitosis debe existir un bajo nivel de inhibidores del proceso de iniciación, como pueden ser los RNAs de bajo peso molecular reportados por Rao (1977), que ante la presencia de un análogo de “cap” se presente un efecto aditivo que conlleve a una pronunciada inhibición en la unión del RNAm con la subunidad ribosomal 40S.

A la luz de estos datos obtenidos, así como los publicados por Asano y colaboradores (1997), quienes reportaron que en purificaciones del complejo eIF3 la proteína p47 se encontró en menor proporción que el resto de los componentes, y sabiendo, además, que para la entrada de las células en mitosis se presentó una reducción en la síntesis de proteínas, así como el paro en la maquinaria de transcripción (Fan y Penman 1970; Rao *et al.*, 1977; Tarnowka y Baglioni, 1979; Bonneau y Sorenberg, 1987; Pause *et al.*, 1994; Mader y Sorenberg, 1995; Haghghat *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1996; Marcotrigiano *et al.*, 1999;) se propuso, que *PSIF* (p47) no forma parte del eIF3 sino que se une a éste en la transición de la fase G2 a M, donde presenta su pico de expresión máxima, lo cual provoca la inhibición de la síntesis de proteínas y permite la entrada a la fase M (Farias, 2002).

Ante la función descrita de *PSIF* y su esencialidad en el ciclo celular, resulta de vital importancia conocer la manera en que dicha proteína es regulada. En este sentido, se realizó un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína *PSIF* para obtener, a partir de una base de datos, sitios que pueden sufrir modificaciones postraduccionales, lo cual permitiera inferir sobre la regulación de su actividad. De dicho análisis se encontraron sitios probables para miristilación, glicosilación y fosforilación (Hernández 2005). Las dos primeras modificaciones, generalmente están asociadas con la ubicación celular de proteínas a organelos específicos, que posiblemente tiene que ver con el sitio de acción o procesamiento, en caso de presentarlo, más que con la propia regulación de la función de la proteína. Por otro lado, la fosforilación está implicada en la activación o desactivación de proteínas y es uno de los procesos fundamentales de regulación del ciclo celular. De esta manera, resulta trascendental que la proteína contenga diferentes secuencias consenso de reconocimiento para su probable fosforilación por distintas cinasas implicadas en la regulación del ciclo celular (Fig. 10). Dentro de éstas, destaca la cinasa Plk ya que dicha proteína es un regulador específico de la transición G2/M, así como de mitosis, coincidiendo con el tiempo de expresión de *psif*. De igual manera, se encontró un sitio probable de fosforilación por una CDK, y un sitio de unión a ciclina. Para que una proteína sea fosforilada por un complejo CDK/ciclina se requiere que además del sitio de fosforilación, contenga un sitio de unión a ciclina lo que potencia la fosforilación por el complejo. Al contener la proteína *PSIF* ambos sitios, se incrementa la posibilidad de que dicha región corresponda a una secuencia real de fosforilación. A partir de estos datos, nos preguntamos si la proteína *PSIF* es fosforilada por proteínas cinasas implicadas en la regulación del ciclo celular.



**Figura 9. Inhibición de la síntesis proteica durante la mitosis.** El gráfico en (a) muestra el descenso en la síntesis de proteínas conforme las células entran en mitosis (Fan y Penman 1970). La grafica (b) es una modificación de la anterior para indicar, en azul, la inhibición del pico específico de la transición G2/M debida a *PSIF*.

MATPAVPVSA	PPATPTPVPA	AAPASVPAPT	PAPAAAPVPA
AAPASSSDPA	AAAAATAAPG	QTPASAQAPA	QTPAPALPGP
ALGPFPGGR	VVRLHPVILA	SIVDSYERRN	EGAARVIGTL
LGTVDKHSVE	VTNCFVPHN	ESEDEVAVDM	EFAKMNYELH
KKVSPNELIL	GWYATGHDIT	EHSVLIHEY	SREAPNPIHL
TVDTSLQNGR	MSIKAYVSTL	MGVPGRTMGV	MFTPLTVKYA
YYDTERIGVD	LIMKTCFSPN	RVIGLSSDLQ	QVGGASARIQ
DALSTVLQYA	EDVLSGKVSA	DNTVGRFLMS	LVNQVPKIVP
DDEFETMLNSN	INDLLMVTYL	ANLTQSQIAL	NEKLVNLW

**Figura 10. Sitios posibles de fosforilación de la proteína *PSIF-Humano*.** Mediante un análisis de la secuencia aminoacídica en los sitios “ExPaSy-Prosites” y “ELM” ([www.expasy.org](http://www.expasy.org); [elm.eu.org/](http://elm.eu.org/)), se obtuvieron sitios de reconocimiento para las siguientes cinasas: cinco sitios posibles de fosforilación por la caseína cinasa 2 (**CK2**); cinco sitios para la proteína cinasa C (**PKC**); tres sitios de fosforilación por proteínas semejantes a polo (**Plk**); un sitio de fosforilación por una cinasa dependiente de ciclina (**CDK**). Se indica también un sitio de reconocimiento para la unión de ciclina y un dominio **WW** que permite la interacción proteína-proteína (Hernández 2005).

## **CAPITULO III**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPÓTESIS**

La proteína PSIF de humano sufre fosforilación

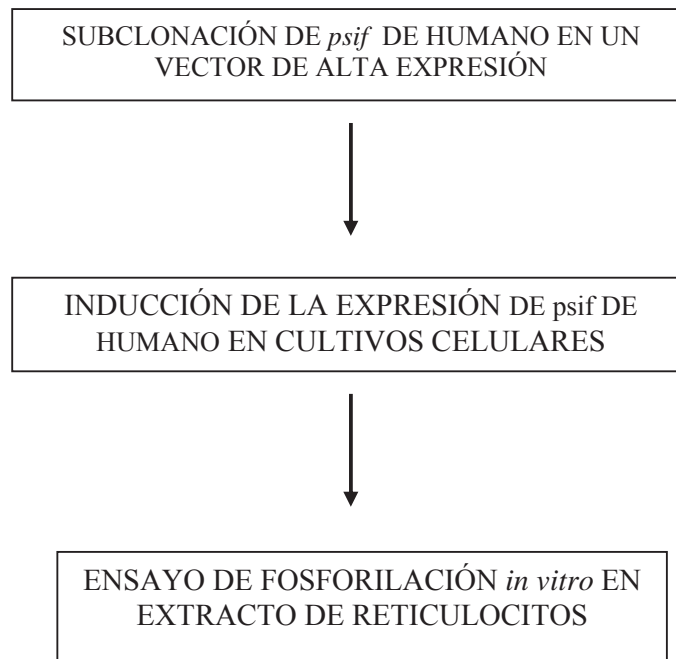
#### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la proteína *PSIF* de humano es fosforilada.

#### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Clonar el gen *Psif-Humano* en un vector de alta expresión
- Inducir la expresión de *Psif-Humano* en cultivos celulares para la obtención de la proteína.
- Determinar la fosforilación *in vitro* de la proteína *PSIF-Humano*

**CAPITULO IV**  
**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



## **CAPITULO V**

### **MATERIAL Y MÈTODOS**

#### **5.1 MATERIAL**

##### 5.1.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

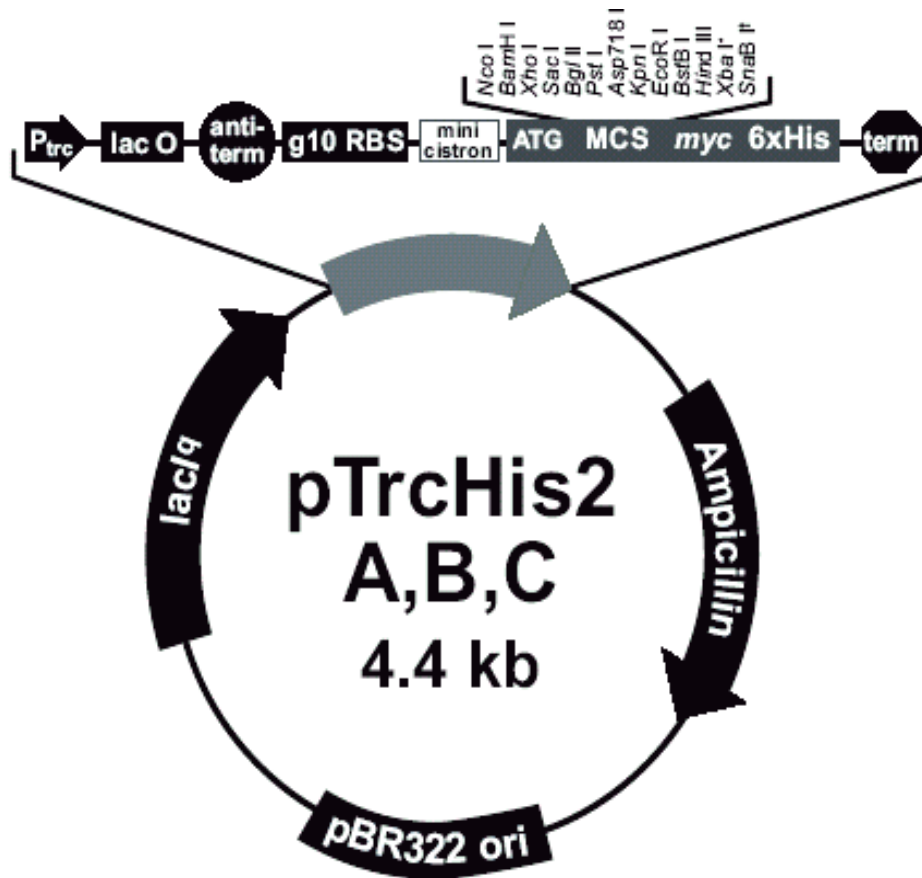
Como receptoras se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* JM101, JM109, XLblue, DH5 $\alpha$  y TOP10. Mientras que de *Schizosaccharomyces pombe* se empleó la cepa TCPI (h<sup>-</sup>, leu1-32) (K180-01 Invitrogen).

Para la sobreexpresión en *E. coli* se utilizó el vehículo pTrcHis2A, B, C (V365-20 Invitrogen) (Fig. 11), mientras que para la expresión y purificación de la proteína PSIF-humano en *S. pombe* se empleó el vector de alta expresión pMNT1-TOPO (K180-01 Invitrogen) (Fig. 12). Por otra parte, el plásmido pRCE051 (Fig. 13) se empleó como molde para la amplificación de la región codificante del gen *psif-Humano* del cromosoma 2 (*psif-Hm crm2*), mientras que el vector pRCE021 para la obtención del transcrito de *psif-Hm crm11* (Fig. 15). El vector pTRIKan19 (Ambion) fue utilizado para la clonación de la copia de *psif-Hm* del cromosoma 11 (*psif-hm crm11*) (Fig. 14).

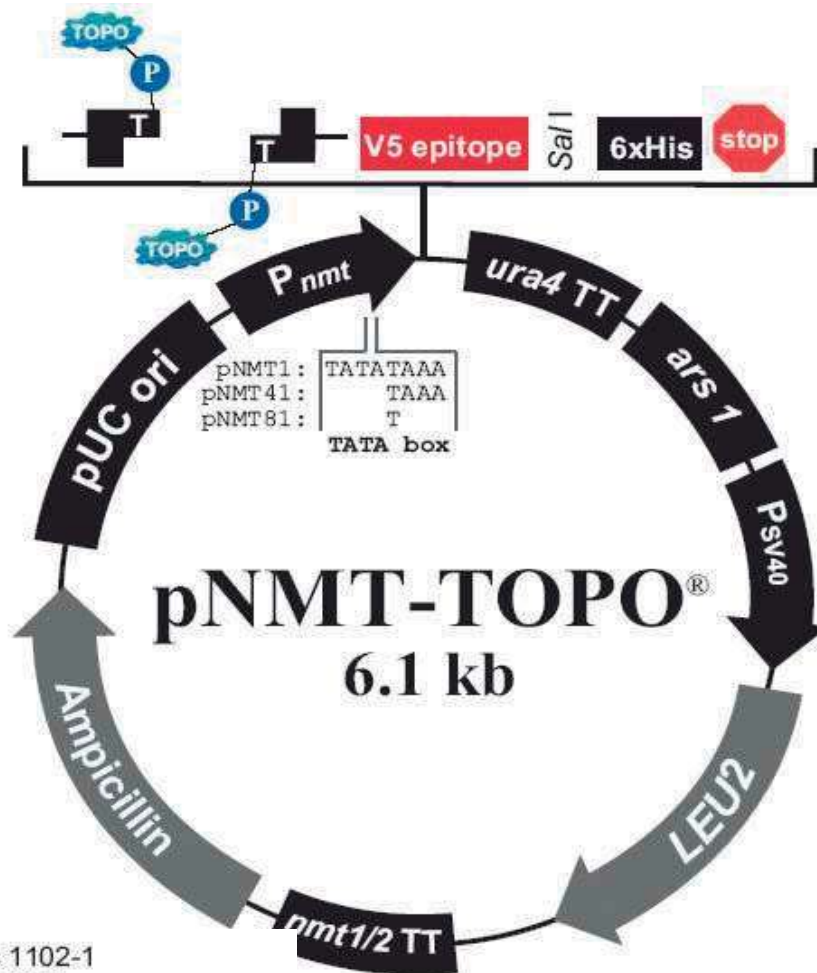
##### 5.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

###### 5.1.2.1 MEDIO DE CRECIMIENTO PARA *E. coli*

El medio de cultivo LB (Luria Bertani) fue utilizado para crecer las cepas de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989). Para su preparación se disolvieron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio en ~900 ml de agua desionizada; se aforo la solución a 1 L y se esteriliza por 15 min a 120° C en autoclave. Para obtener medio sólido se adicionaron 15 g/L de agar antes de aforar y esterilizar.

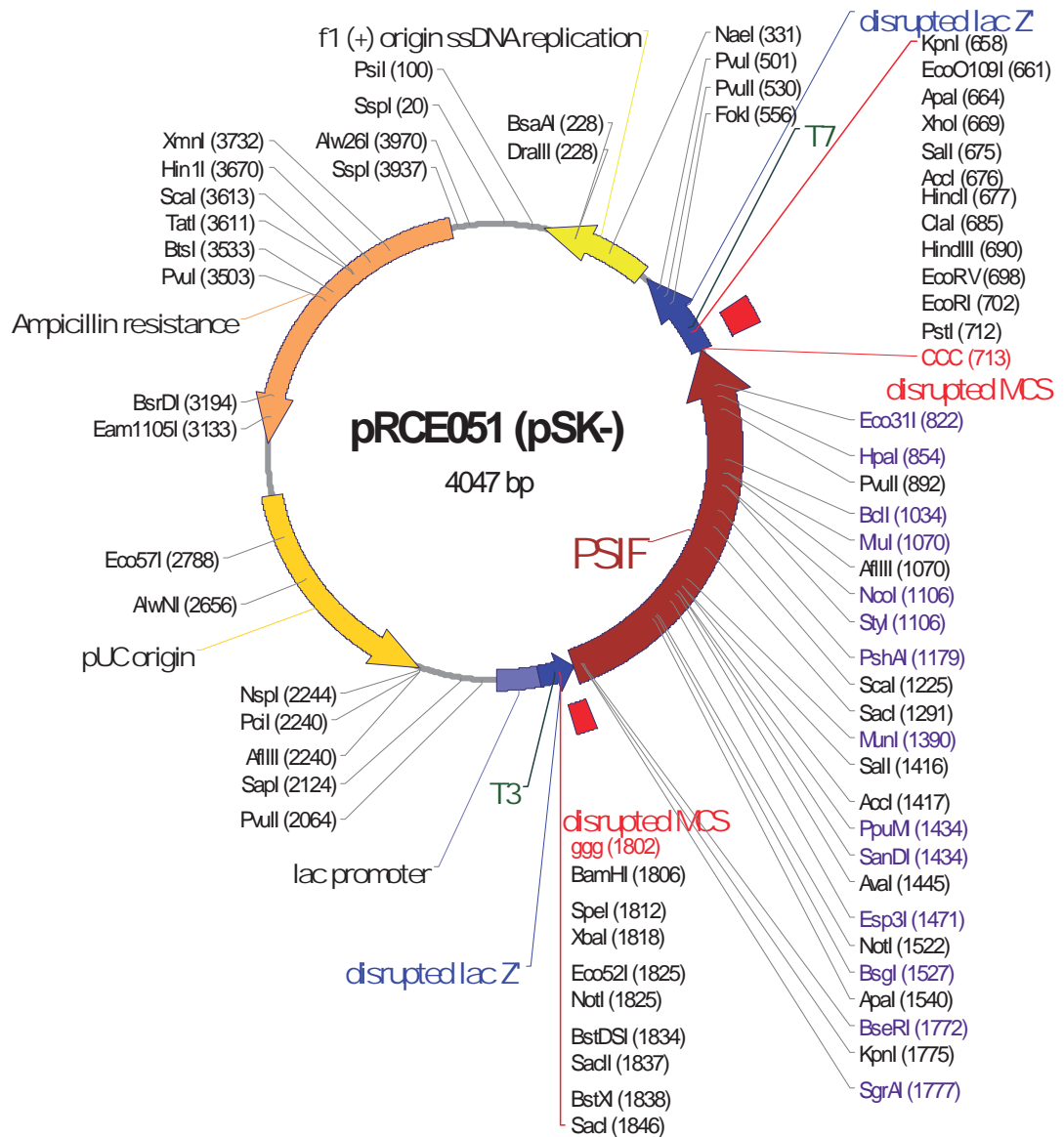


**Figura 11.** Mapa físico del vector de expresión en *E. coli* pTrcHis2A, B, C. El plásmido mostrado posee las siguientes características: promotor *trc*, permite un alto nivel de expresión; LacO, permite la unión del represor transcripcional de Lac; *rrnB*, región de antiterminación; gen 10, “enhancer” traduccional; RBS, sitio de unión al ribosoma; MCS, sitio de clonación múltiple; epítotope *myc* en el extremo C-terminal; 6XHis, región de polihistidinas; gen de resistencia a ampicilina; pBR322ori, permite la replicación del plasmado en *E. coli*; gen LacI<sup>q</sup> codifica y sobreproduce la proteína represora de Lac.

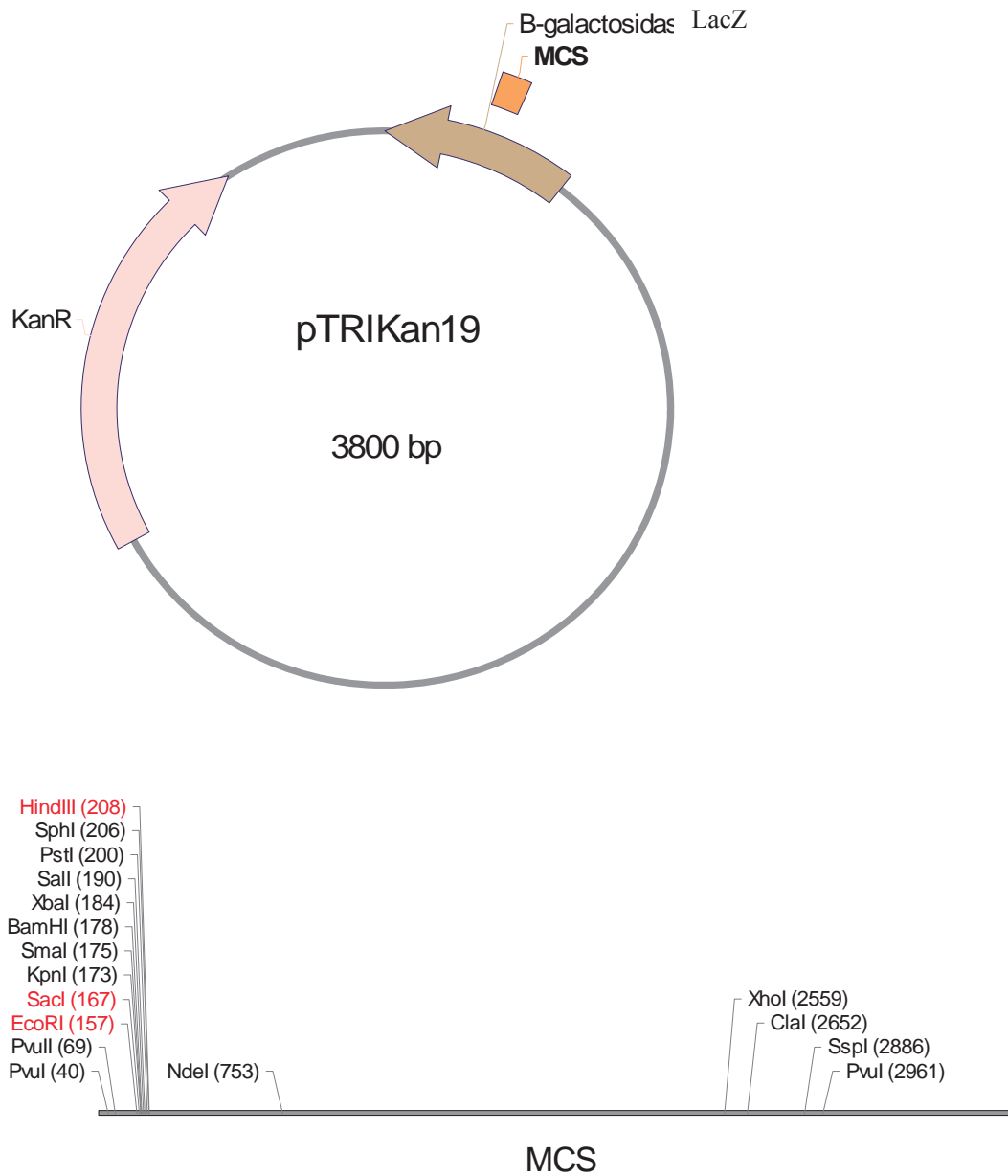


es 1102-1  
 0-1151

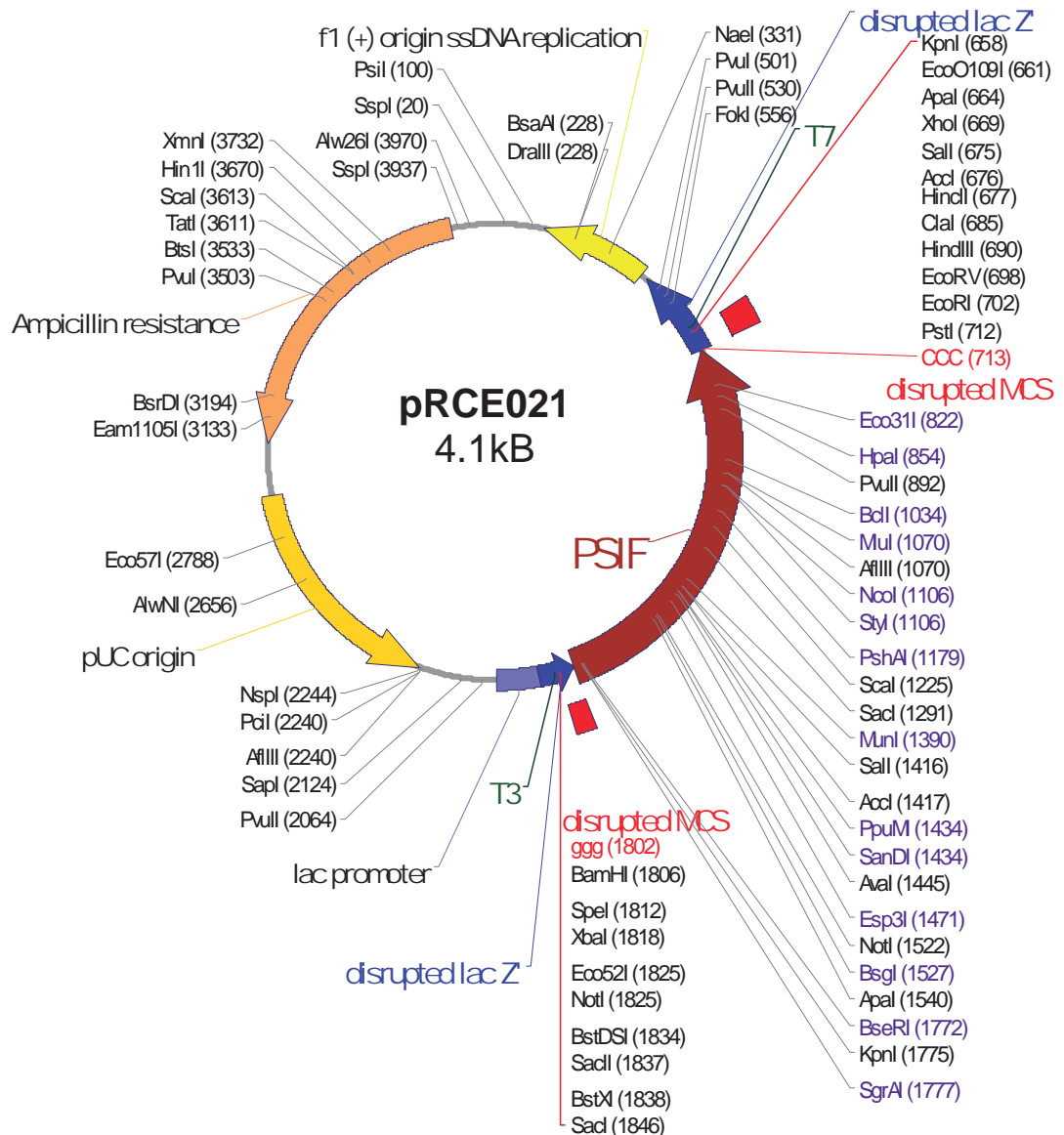
**Figura 12. Mapa físico del vector de expresión en *S. pombe* pNMT1-TOPO.** Promotor nmt *S. pombe*, permite regular la sobreexpresión del gen de interés por tiamina; Ura4 TT, permite la terminación de la transcripción; ars1, permite la alta replicación y crecimiento en *S. pombe*; promotor SV40, permite la expresión del gene LEU2; gen LEU2 de *S. cerevisiae*, permite la selección auxotrófica del plásmido en cepas de levadura Leu<sup>-</sup> nmt1, secuencia de terminación de la transcripción; Ampicillin, gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*; pUC ori, permite la replicación del plásmido en *E. coli*.



**Figura 13. Mapa físico del plásmido pRCE051.** El vector mostrado contiene lo siguiente: PSIF, gen *psif* de humano del cromosoma 2; f1(+), origen de replicación de fago filamentoso; ColE1, origen de replicación en *E. coli*; gen de LacZ; MCS, sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a ampicilina.



**Figura 14. Mapa físico del vector de clonación pTRIKan19.** El vehículo representado en la parte superior contiene las siguientes características: gen de LacZ; MCS, sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a kanamicina (KanR). En la parte inferior se esquematiza el sitio de clonación múltiple.



**Figura 15. Mapa físico del plásmido pRCE021.** El vector mostrado contiene lo siguiente: PSIF, gen de *psif* de humano del cromosoma 11; f1(+), origen de replicación de fago filamentoso; ColE1, origen de replicación en *E. coli*; gen de LacZ; MCS, sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a ampicilina.

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

Para la selección por kanamicina se empleó una concentración final de 50 µg/ml en medio sólido y de 30 µg/ml en el medio líquido, a partir de una solución stock a 30 mg/ml.

#### 5.1.2.2 MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA *S. pombe*

##### 1) Medio EMM

Este medio de cultivo fue utilizado para los experimento de expresión en *S. pombe*. De acuerdo a las instrucciones del fabricante se disolvieron 32 g de un concentrado en polvo (kit “SpECTRA™ *S. pombe* Expresión System” K180-01 Invitrogen) en 900 ml de agua destilada estéril, se afora a 1 L y se esteriliza por filtrado.

El medio sólido se obtiene disolviendo 32 g del polvo EMM en 400 ml de agua destilada estéril, se afora a 500 ml una vez disuelto y se esteriliza por filtrado. Posteriormente se adiciona un volumen de una solución estéril de agar al 4%.

El medio EMM enriquecido (EMM (T)) se obtuvo adicionando tiamina (T) a una concentración final de 10 µM a partir de una solución stock a 10 mM.

##### 2) Medio PDM (-L)

Este medio de cultivo fue utilizado para la selección de transformantes en *S. pombe*. Para elaborarlo se disuelven 6.7 g/L de base de nitrógeno para levadura, 1.6 g/L de medio sintético enriquecido sin leucina “drop-out” para levadura y 20 g/L de agar. Disuelta la mezcla se esteriliza por 15 min a 120° C en autoclave y una vez que se tibia (30-40°C) se adiciona glucosa a una concentración final de 40%.

## 5.2 METODOS

### 5.2.1 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS POR LISIS ALCALINA (MINI-prep.)

Esta técnica se utilizó para el aislamiento y purificación de plásmidos, para lo cual se sembró un inóculo de bacterias en 5 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) se incubó durante 12 hrs a 37°C en agitación a 250 rpm. De este cultivo se tomó 1.5 ml en tubos eppendorf y se centrifugó 1 min a 3 600 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de STE frío, se agitó en vortex hasta homogeneizar y se centrifugó 5 min a 3600 rpm. Nuevamente se tiró el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 300 µl de solución de resuspensión (5 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris·HCl pH 8, RNasa 40 µg/ml) a 4°C. Se agitó suavemente en vortex y se adicionaron 300 µl de una solución fresca de lisis (0.2 N de NaOH y 1% de SDS), mezclando por inversión el tubo y posteriormente se dejando reposar 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se agregaron 300 µl de solución neutralizante (60 ml de una solución de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua desionizada), dejando en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugó 15 min/14 000 rpm/4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se le adicionó 0.7 vol de isopropanol frío. Se agitó por inversión del tubo y se centrifugó 30 min a 14 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 1 ml de etanol frío al 70%, agitando por inversión. Posteriormente se centrifugó 5 min a 14 000 rpm, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se secó la pastilla al vacío a 30°C. Una vez seco se resuspendió en 50 µl de agua inyectable. Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 5.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las distintas muestras de DNA aislado en este trabajo fueron analizadas mediante su corrimiento utilizando agarosa al 1% disuelta por calor en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 6.8). Una vez tibia la solución se agregaron 5 µl de bromuro de etidio (0.05 µg/ml), se vació en una camilla del tamaño requerido y se le colocó un peine. Al concluir la polimerización del gel se retiró el peine, se pasó una cámara de electroforesis y se llenó esta con el mismo amortiguador TAE 1X.

A las muestras a correr se le agregó colorante de carga 6X (1 µl/5 µl de muestra) el cual contiene: 1.5 g de ficoll, 0.25 g de azul de bromofenol y 0.25 g de xilencianol a 10µl de agua desionizada estéril. Una vez colocada la muestra con colorante en el contenedor formado por el peine

se realizó el corrimiento a 90 voltios y finalmente se examinó colocando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

Para las muestras de DNA que posteriormente serían purificadas del gel se realizó un gel de agarosa al 0.8% y se utilizó una corriente de 70 voltios. Posteriormente el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio al 0.01% por 1 min.

### 5.2.3 RECUPERACIÓN Y LAVADO DE DNA A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Para la purificación específica de las regiones amplificadas del gen *psif* por PCR se realizó una electroforesis en agarosa del total de la reacción obtenida y posteriormente se empleó el kit de Promega “Wizard sv Gel and PCR Clean up System” (A9280) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit también fue utilizado en la purificación de *psif-Hm* extraído del vector pRCE103 y pRCE105, así como en el lavado de DNA desfosforilado o doblemente digerido.

La concentración final de DNA se determinó electroforéticamente corriendo 2  $\mu$ l del total en un gel de agarosa.

### 5.2.4 DESFOSFORILACIÓN Y LIGACIÓN

Los plásmidos de pTrcHis lavados por columna fueron desfosforilados para la eficiente ligación de los genes de *psif-Hm*. Para esto, se realizó la siguiente mezcla: 5  $\mu$ l agua libre de nucleasas estéril, 4  $\mu$ l buffer 10X, 1  $\mu$ g de DNA (30  $\mu$ l), 1  $\mu$ l de enzima SAP (Promega M8201). Se incubó esta reacción a 37°C por 15 min y para inactivar la enzima se colocó en baño María a 65°C por 15 min.

La ligación de cualquiera de los genes de *psif-Hm* a los vectores pTrcHis se logró manteniendo una proporción 2:1 (inserto:vehículo 200 ng). Mientras que la ligación del cDNA de *psif-Hm crm11 3'M* en el vector pTRIKan 19 se realizó en una proporción 5:1 (inserto: vehículo 200ng). Las reacciones se incubaron a 21°C durante 12 h utilizando ligasa T4 (Promega, M1801).

## 5.2.5 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

### 5.2.5.1. CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. coli*

Las células electrocompetentes de *E. coli* de las cepas JM101, JM109, XLblue, DH5 $\alpha$  y TOP10, que permitieran la transformación por electroporación se obtuvieron mediante el siguiente protocolo:

Se sembró un inóculo de la cepa en medio LB sólido y se incubó a 37°C durante 12 hrs. De este cultivo se tomó una asada en 250 ml de medio LB líquido dando las mismas condiciones de incubación. Posteriormente, el cultivo obtenido se vació en 1L de medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 600 nm. Obtenida la densidad, el cultivo fue vaciado en 4 botellas de 250 ml y se centrifugó 15 min/ 4000 rpm / 4°C. El sobrenadante obtenido fue desechado y la pastilla se resuspendió en agua desionizada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente 15 min/ 4000 rpm / 4°C, y la pastilla de sólo dos botellas se resuspendió con agua desionizada estéril y fría pasándolo, posteriormente, a las dos botellas restantes. Se repitió el ciclo de centrifugación y la pastilla obtenida se resuspendió en 3 ml de glicerol al 10%. De la mezcla se tomaron alícuotas de 80  $\mu$ l en tubos eppendorf y se guardaron a -80°C (modificado de Sambrook *et al.*, 1989).

Todo el experimento se realizó bajo condiciones estériles y manteniendo las células a 4°C.

### 5.2.5.2 CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *S. pombe*

Para obtener células electrocompetentes de la cepa de *S pombe* TCP1 de acuerdo al manual del sistema empleado “SpECTRA™ *S. pombe* Expresión System” (K180-01 Invitrogen), como primer paso se sembró un inóculo en 10 ml de medio EMM (T) y fue incubado a 33°C por 18 h. De este preinóculo se tomó una alícuota para su resiembra en 50 ml de medio EMM (T), hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.4, posteriormente se dejó crecer de 2 a 4 h bajo las condiciones descritas. Transcurrida la incubación, se cosecharon las células a 1500 Xg/ 5 min/ 4°C y se lavaron con 25 ml de agua desionizada, estéril y fría. Consecutivamente, se centrifugó a 1500Xg/ 5min/ 4°C y el sedimento obtenido se lavó con 25 ml de sorbitol 1 M frío. Se repitió el lavado antes descrito y nuevamente se centrifugó a 1500 Xg/ 5 min/ 4°C. Una vez limpio el sedimento celular, se determinó su volumen y se agregaron 2 veces el volumen obtenido de sorbitol 1M frío. De la mezcla se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf y se guardaron a -80°C.

Todo el experimento se realizó bajo condiciones estériles y manteniendo las células a 4°C.

## 5.2.6 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

### 5.2.6.1 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* POR ELECTROPORACIÓN

Para las transformaciones realizadas en *E. coli* con los vectores pRCE104, pRCE105, pRCE107 y pRCE108 se empleó en siguiente protocolo: se adicionaron 2 µl de la ligación/plásmido a 80 µl de células electrocompetentes y se dejó incubar 2 min en hielo en una celda para electroporación; posteriormente, se aplicó un voltaje de 2000 voltios e inmediatamente se adicionó 1 ml de LB; las muestra obtenida se incubó 1 h a 37°C en agitación suave; de este cultivo se tomaron alícuotas de 25 µl, 50 µl y 150 µl que se perlearon en cajas petri con medio selectivo y se incubaron a 37°C por 14 h.

### 5.2.6.2 TRANSFORMACIÓN DE *S. pombe* POR ELECTROPORACIÓN

Esta técnica se empleó para introducción del plásmido pRCE103 en la cepa de *S. pombe* TCPI. Para ésto, en una celda de electroporación previamente enfriada se colocaron 100 µl de células de levadura electrocompetentes y a éstas se les adicionó 1 µg del plásmido y se dejó incubar en hielo por 7.5 min. Transcurrido este tiempo se electroporó a 2500 voltios e inmediatamente se adicionó 1 ml de sorbitol 1 M pasando la mezcla a un tubo (1.5 ml) frío. Se tomaron alícuotas de 75 µl que se perlearon en cajas petri con medio selectivo PDM (-L) y, finalmente, se incubó 14 hrs a 33°C.

## 5.2.7 DIGESTIONES ENZIMÁTICAS

### 5.2.7.1 DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS

Para digerir el plásmido pTRIKan 19 se realizó la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 2 µg de DNA, 2 µl de enzima *SmaI*. Posteriormente se incubó 12 hrs a 30°C.

La digestión de pTrcHis2C con *EcoRI* se obtuvo de la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 1.5 µg de DNA, 2 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 8 hrs a 37°C.

La doble digestión del plásmido pTrcHis2B, se realizó en primer lugar con la enzima *HindIII* mediante la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 50 µl, 5 µl de buffer 10X, 1.5 µg de DNA, 4 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37°C. Posterior al lavado por columna de la primera reacción de ligación, se prosiguió con su segunda digestión con *SacI* mediante la siguiente mezcla: agua desionizada estéril a un volumen final de 50 µl, 5 µl de buffer 10X, ~1.5 µg de DNA, 1 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37°C.

Todas las digestiones se analizaron electroforéticamente corriendo 1 µl/muestra en un gel de agarosa al 1%.

#### 5.2.7.2 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones enzimáticas para los análisis de restricción en todos los casos se realizaron mezclando: agua desionizada estéril a un volumen final de 20 µl, 2 µl de buffer 10X, 2 µl de BSA 10X, 1 µg de DNA, 1 µl de enzima (*Sall*, *SacI*, *KpnI*, *BamHI*).

#### 5.2.7.3 LIBERACIÓN DE FRAGMENTOS

El gen *psif-Hm* fue liberado del vector pRCE103 realizando la siguiente reacción de digestión con la enzima *EcoRI*: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 1.5 µg de DNA, 2 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37°C y posteriormente se corrió en gel de agarosa al 1% para su lavado.

La liberación de *psif-Hm crm113'M* del plásmido pRCE105, se obtuvo mediante dos digestiones por separado. En la primera digestión, tres muestras por separado fueron sometidas a la acción de la enzima *HindIII* para lo cual se realizó la siguiente mezcla: agua desionizada estéril a un volumen final de 50 µl, 5 µl de buffer 10X, 1.5 µg de DNA/muestra, 4 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37°C y la completa digestión se determinó electroforéticamente corriendo 1 µl/muestra en un gel de agarosa al 1%. Posterior al lavado por columna, las tres muestras se colectaron en un solo tubo y se continuó con su segunda digestión con la enzima *SacI*. Para esta reacción se realizó la siguiente mezcla: agua desionizada estéril a un volumen final de 100 µl, 10 µl de buffer 10X, 6 µg de DNA, 1 µl de enzima. Se incubó la reacción a 37°C y se tomaron 25 µl a los 5 min, 10 min, 15 min y 40 min para obtener digestiones parciales. Posteriormente se inactivo cada muestra a 65°C durante 20 min. Los resultados se analizaron electroforéticamente corriendo el total de las muestras extraídas en un gel de agarosa al 1%.

#### 5.2.8 AISLAMIENTO DE RNA CON TRIZOL

Se extrajo RNA total de células humanas embrionarias 293H, a fin de obtener en experimentos posteriores el cDNA de la copia del gen *psif-Hm* ubicada en el cromosoma 11(*psifHm-crm11*). Para lograr esto, se siguió el protocolo anexo:

Se precipitaron  $2-3 \times 10^6$  células por centrifugación a  $100 \times g/10$  min. El sedimento celular se lisó por pipeteo con  $500 \mu\text{l}$  de trizol y fue incubado 5 min a temperatura ambiente ( $T^\circ\text{A}$ ). Posteriormente, se agregaron  $200 \mu\text{l}$  de coloforno, se agitó, y se incubó 3 min a  $T^\circ\text{A}$ . Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue centrifugada a  $12\,000 \times g/15$  min/ $4^\circ\text{C}$ , obteniendo así dos fases líquidas. Se tomó la primera fase y se mezcló suavemente con  $500 \mu\text{l}$  de isopropanol incubando 10 min a  $T^\circ\text{A}$ . Nuevamente se dio centrifugación a  $7\,500 \times g/5$  min/ $4^\circ\text{C}$  y se prosiguió con el lavado de la pastilla obtenida con 1 ml de EtOH 75%. Para precipitar se repitió la centrifugación a  $7\,500 \times g/5$  min/ $4^\circ\text{C}$  y se dio un secado parcial del RNA en campana de flujo laminar. Finalmente, se resuspendió en  $20 \mu\text{l}$  de agua libre de RNasas, se incubó a  $65^\circ\text{C}/10$  min y transcurrida la incubación se agregaron  $0.5 \mu\text{l}$  de inhibidor de RNasas ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ ). La muestra se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para medir la concentración de la muestra se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%.

### 5.2.9 RT-PCR

El cDNA de *psif-Hm* ubicado en el cromosoma 11, se obtuvo mediante una reacción de transcripción reversa, a partir del RNA obtenido de células humanas 293H. Como primer paso, se mezclaron  $0.5 \mu\text{g}$  de RNA total,  $40 \text{ pmol}$  de oligo AE3'M, agua desionizada estéril a  $12 \mu\text{l}$  y se incubó 5 min a  $65^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, se colocó el tubo en hielo y se adicionaron los siguientes componentes  $4 \mu\text{l}$  de buffer de reacción 5X,  $2 \mu\text{l}$  DTT  $0.1 \text{ M}$ ,  $1 \mu\text{l}$  de inhibidor de RNasas ( $40 \text{ U}/\mu\text{l}$ ); se incubó 2 min a  $42^\circ\text{C}$  y posteriormente se agregó  $1 \mu\text{l}$  ( $200\text{U}$ ) de la enzima SuperScript<sup>™</sup>II<sup>aa</sup> (Invitrogen, 18064-014), incubando 50 min a  $42^\circ\text{C}$ . Para detener la reacción se incubó 15 min a  $70^\circ\text{C}$ .

Para la amplificación del cDNA obtenido se emplearon los oligos: AE 5'C, obtenido a partir de la secuencia genómica reportada y AE3'M, descrito anteriormente (ver 5.2.1). La reacción de amplificación se obtuvo mezclando los siguientes componentes:  $21 \mu\text{l}$  de agua desionizada estéril,  $5 \mu\text{l}$  de buffer de reacción (10X),  $1.5 \mu\text{l}$  dNTP's ( $10 \text{ mM}$ ),  $1.5 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $50\text{mM}$ ),  $10 \mu\text{l}$  Enhancer 10X,  $4 \mu\text{l}$  oligo AE5'C ( $10 \text{ pmol}$ ),  $4 \mu\text{l}$  oligo AE3'M ( $10 \text{ pmol}$ ),  $3 \mu\text{l}$  cDNA,  $0.5 \mu\text{l}$  polimerasa Pfx platinum (Promega). La mezcla anterior se sometió a un proceso de amplificación de 40 ciclos a  $94^\circ\text{C}/30''$ ,  $50^\circ\text{C}/40''$ ,  $72^\circ\text{C}/1' 10''$ , con un ciclo previo de  $94^\circ\text{C}/2'$  y uno posterior de  $72^\circ\text{C}/10'$ . Para comprobar la amplificación de la muestra se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%.

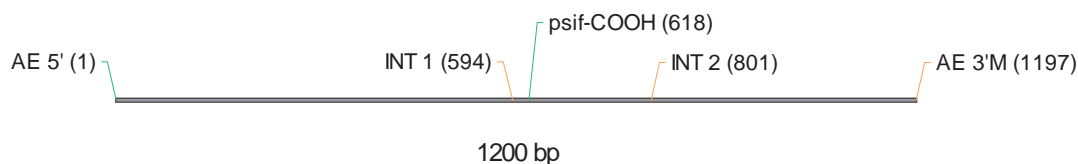
## 5.2.10 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación del gen *psifHm-crm2* se diseñaron los oligos AE 5' y AE3'M (Tabla 1), los cuales se localizan doce bases previas al codón de inicio y antes al codón de terminación, respectivamente (Fig. 13). La reacción de amplificación se obtuvo mezclando los siguientes componentes: 34 µl de agua desionizada estéril, 5 µl de buffer de reacción (10X), 1.5 µl dNTP's (10 mM), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl oligo OAE5' (10 pmol), 2 µl oligo OAE3'M (10 pmol), 2 µl de DNA (5ng/µl), 2 µl de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 µl. La mezcla anterior se sometió a un proceso de amplificación de 35 ciclos a 94°C/30'', 55°C/45'', 72°C/1' 10'', con un ciclo previo de 94°C/5' y uno posterior de 72°C/5'. Para comprobar la amplificación de la muestra se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa.

La comprobación de la inserción del plásmido pRCE103 en levadura se corroboró por amplificación del gene *psif-Hm* utilizando los oligos AE3'M y "NMT *pombe* foward priming site", este último integrado en el kit de Invitrogen "SpECTRA™ *S. pombe* Expression System" (K180-01). Para la amplificación, se picó una colonia de ~1 mm de diámetro y se pasó a un tubo de 1.5 ml con 50 µl de agua desionizada estéril, se agitó en vortex y se mantuvo a 100°C 5 min. Posteriormente, fue centrifugada a 12 000 Xg/ 1 min. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo limpio de 0.5 ml; de esta muestra se tomaron 5 µl para la reacción de amplificación. Dicha reacción se obtuvo mezclando, además: 13 µl de agua desionizada estéril, 2.5 µl de buffer de reacción (10X), 0.75 µl dNTP's (10 mM), 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), oligo NMT 1 µl, oligo AE3'M 1 µl, Taq polimerasa 1 µl. La amplificación se realizó utilizando el programa previamente descrito.

**Tabla 1. Oligonucleotidos**

OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA (5'-3')
AE5'	attctcgacaagATGgccacaccggcg
AE3'M	ctcaatgaaaaactgtaaacctg
<i>psif</i> INT2	ctgcaagtcaactgagagtcc
<i>psif</i> COOH 5'	gtgatgttcacgcctctgaca
NMT <i>pombe</i> foward priming site	tttcaatctcattctcactttctga
pTrcHis 5' forward	agaggatatattaatgaatcg



**Figura 16. Diagrama de localización de los oligonucleótidos en la secuencia de *psif-Hm*.** Se indica el nombre del oligo y entre paréntesis la base de inicio de la secuencia en dirección 5'-3'.

## 5.2.11 EXPRESIÓN PROTÉICA

### 5.2.11.1 EXPRESIÓN PROTEICA EN *E. coli* (piloto)

La expresión de la proteína *psif-Hm* de cualquiera de las dos copias del gen se realizó con el kit “pTrcHis2A, B, C” (V365-20, Invitrogen) utilizando el siguiente protocolo:

Se creció un cultivo de 2 ml de la cepa que lleva el gen *psif* en medio LB+ampicilina a 37°C en agitación durante toda la noche. De este cultivo se tomaron 600 µl para resiembra en 30 ml de LB+ampicilina y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.6. Alcanzada la densidad se tomó una alícuota de 1.5 ml (corresponde al tiempo cero), se centrifugó 30 seg a 14,000 rpm y se almacenó a -20°C. Posteriormente, al cultivo restante se le adicionó inductor IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C en agitación. A partir de este momento se colectaron muestras de 1.5 ml a diferentes tiempos, las cuales se centrifugaró 30 seg a 14 000 rpm y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

### 5.2.11.2 EXPRESIÓN PROTEICA EN *S. pombe*

La expresión de la proteína *psif-Hm* se realizó con el kit “SpECTRA™ *S. pombe* Expression System” (K180-01, Invitrogen) para lo cual se empleó el siguiente protocolo:

Se inoculó una colonia de pRCE103 en 25 ml de medio EMM(T) y se dejó crecer toda la noche a 33°C en agitación. El cultivo obtenido se precipitó por centrifugación 5 min/ 1500Xg/ TA y se lavó dos veces resuspendiendo con 25 ml de sorbitol 1 M y centrifugando en las condiciones descritas. El precipitado una vez limpio, se resuspendió en 25 ml de medio inductor EMM sin tiamina y se tomaron 250 µl para inocular 50 ml de medio EMM. Posteriormente se incubó 18 h a 30°C en agitación y transcurrido el tiempo se colectaron las células centrifugando 5 min/ 1500Xg/ 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de TE 1X+NaCl 100 mM y nuevamente se centrifugó 2 min/ 14 000 rpm/ 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Para las muestras control sin inducir, del preinóculo lavado se tomaron 250 µl para su resiembra en medio EMM enriquecido con 10 µM de tiamina EMM(T); el resto del protocolo permaneció igual.

## 5.2.12 LISADO CELULAR

### 5.2.12.1 LISADO CELULAR DE *E. coli*

Para lisar las muestras de inducción en *E. coli* la pastilla celular de cada muestra se resuspendió en buffer de lisis (PBS pH 7.4, Tris-HCl 25 mM pH 8, Triton X100 1%, lizozima 0.2 mg/ml, DTT 10 mM, glicerol 10%), se agitó en vortex hasta homogeneizar y se dejó incubar en hielo 30 min. Posteriormente, se lisó dando cinco ciclos de 10 segundos de sonicación al máximo alternados con 10 segundos de reposo en hielo. Consecutivamente cada lisado se centrifugó 15 min/ 14 000/ 4°C y el sobrenadante obtenido se colectó en un tubo limpio. La muestra así obtenida se almacenó a -20°C hasta su análisis.

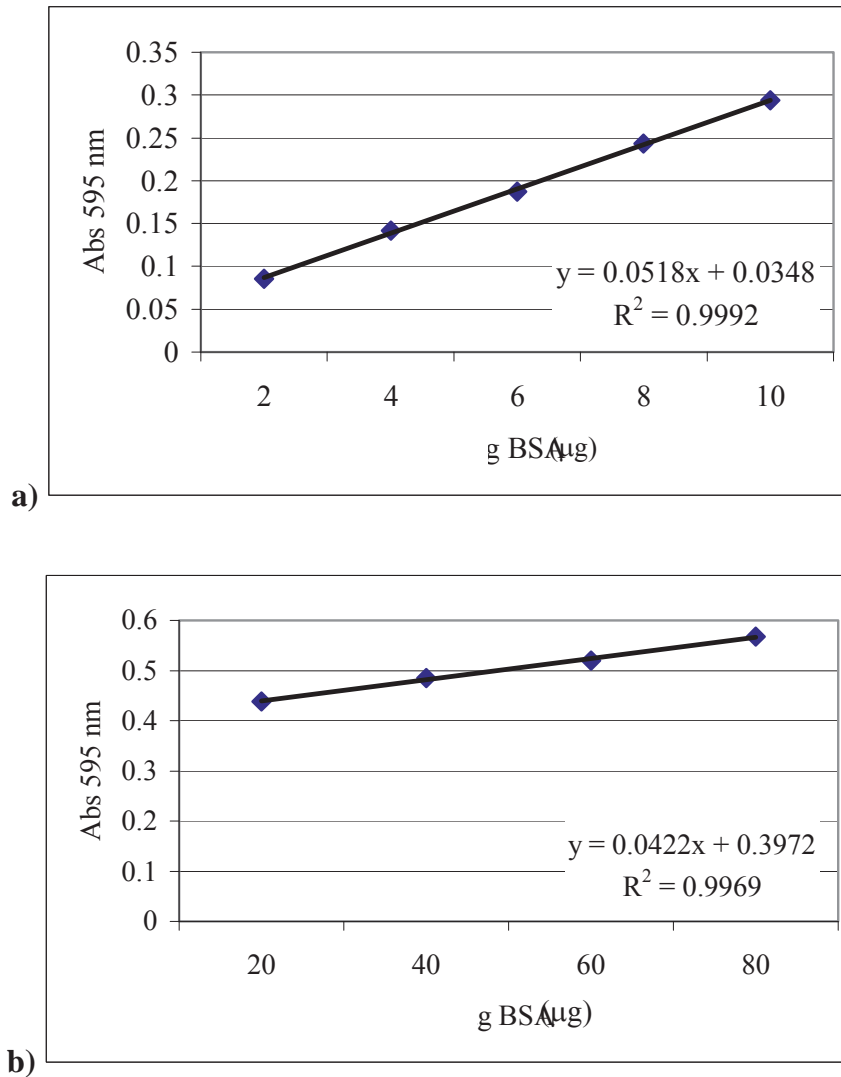
### 5.2.12.2 LISADO CELULAR DE *S. pombe*

Los cultivos obtenidos de los ensayos de inducción en levadura *S. pombe* (TCP1) se procesaron mediante el siguiente protocolo: se centrifugó a 1500 Xg/ 5 min/ 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de TE IX y se volvió a centrifugar 2 min a la velocidad máxima; se decantó y resuspendió en un volumen igual de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 0.1% SDS, 1% DMSO, 1 mg/ml lizozima), se adicionó PMSF (1 mM) y se incubó 30 min en hielo; posteriormente, se agregaron de 2 a 4 perlas de vidrio por gramo de suspensión celular y se agitó 9 veces en vortex 1 min, alternando 2 min de reposo en hielo; el lisado se transfirió a un tubo limpio y se removieron los restos celulares por centrifugación 15 min a la velocidad máxima (14 000 rpm); finalmente, se colectó el sobrenadante en un tubo estéril y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

## 5.2.13 ENSAYO DE BRADFORD

Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva estándar de albúmina sérica de bovino (Bio Labs). De un stock 100X del suero se tomaron 100 µl y se disolvieron en 900 µl de buffer de lisis (ver lisado celular); de esta mezcla se tomaron 2, 4, 6, 8, y 10 µl, para la primera curva, y 20, 40, 60, 80 µl para la segunda. Estas muestras se llevaron por separado a un volumen de 100 µl con NaCl 0.5 M y se les adicionaron 900 µl de solución de Bradford (5 ml Etanol, 10 mg azul de Coomassie G-250, 10 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, aforar a 100 ml). Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 2 min y se midió la absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro.

La concentración proteica de los extractos celulares se determinó de la siguiente manera: se tomaron 10  $\mu\text{l}$ , se llevaron a 100  $\mu\text{l}$  con NaCl 0.5 M y a 1 ml con solución de Bradford, midiendo la absorbencia, de igual manera, a una longitud de onda de 595 nm.



**Figura 17. Curva estándar de concentración de albumina sérica de bovino (BSA).** Las graficas muestran la absorbencia obtenida para 2, 4, 6, 8, y 10  $\mu\text{g}$  en a) y 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}$  en b) de BSA siguiendo el método de Bradford descrito en el texto.

#### 5.2.14 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (*SDS-PAGE*) (Sambrook, *et al.*, 1989)

El corrimiento electroforético de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10 o 12%. Para el gel de resolución se mezclaron los siguientes componentes en un volumen final de 5 ml: 1.9 ml de agua desionizada estéril, 1.7 ml de acrilamida-bis 30% (Bio-Rad 161-0154), 1.3 ml de Tris 1.5 M (pH 8), 0.05 ml de SDS 10%, 0.05 ml de persulfato de amonio 10% y 0.002 ml de TEMED.

El gel concentrador al 5% se obtuvo de la siguiente mezcla: 0.68 ml de agua desionizada estéril, 0.17 ml de acrilamida-bis 30% (Bio-Rad 161-0154), 0.13 ml de Tris 1 M (pH 6.8), 0.01 ml de SDS 10%, 0.01 ml de persulfato de amonio y 0.0044 ml de TEMED.

Las muestras a analizar se prepararon adicionándoles 10 µl de buffer de carga 1X SDS (Tris-Cl (pH 8) 50 mM, Dithiothreitol (DTT) 100mM, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) y poniéndolas a 100°C por 3 min para desnaturalizar las proteínas.

El corrimiento electroforético se realizó a 80 V para el gel concentrador y 100 V en el gel de separación, utilizando como amortiguador Tris-Glicina 1X (stock 5X: 15.1 g, Tris-base, 94 g Glicina en 900 ml de agua desionizada estéril, y 50 ml de SDS 10%).

#### 5.2.15 TINCIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE

Para teñir el gel de poliacrilamida-SDS se disuelven 0.25 g de azul de Coomassie R-250 en 90 ml de agua:metanol (1:1) y 10 ml de ácido acético glacial. Se sumerge el gel en esta solución y se deja en agitador recíprocante por 2 h como mínimo. Posteriormente se retira la solución y se agrega una solución metanol:ácido acético (paso 1) para desteñir el gel, misma que debe cambiarse 3 o 4 veces en un periodo de 2 a 4 h en agitación constante.

### 5.2.16 ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (*WESTERN BLOT*)

La expresión y concentración de PSIF-*Hm* en *S. pombe* fue corroborada mediante este tipo de ensayo, para lo cual se utilizó el siguiente protocolo (:

Luego del corrimiento electroforético en SDS-PAGE, la membrana de PVDF y el gel fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por 15 min. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a la membrana durante hora y media a 15 V (400 mA) y a 18 V (400 mA) por 30 min al final, en cámara de transferencia semi-seca. Transcurrido el tiempo de transferencia, se dejó secar la membrana y posteriormente se bloqueó con solución bloqueadora al 5% (TBST: Tris-base 20 mM, NaCl 100 mM, 0.1% Tween 20; 5% leche descremada) durante 1 h en agitación constante. Después del bloqueo, se dieron tres lavados la membrana con TBST durante 5 min (c/u) en agitación suave. Se decantó el TBST y se añadió el anticuerpo conjugado a HRP (Anti-His(C-Term)-HRP antibody, Invitrogen R931-25) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo; se incubó 1 h en agitación suave y constante. Se prosiguió con el lavado de la membrana por tres periodos de 5 min con TBST. Finalmente, se dejó en TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 100 mM; pH 7.5) hasta proseguir con la detección.

La inmunodetección de peroxidasa de rábano se realizó utilizando el sustrato “Inmun-Star HRP substrate” de Biorad (170-5040), siguiendo las instrucciones del mismo.

Para la inmunodetección por fosfatasa alcalina se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón contra histidinas (Chemicon Internacional Inc, MAB3114) como anticuerpo primario en una dilución 1:5000 y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Rockland, 610-4520) en una dilución de 1:1000. El protocolo utilizado es igual al descrito anteriormente, con la diferencia que después del último lavado de la membrana se volvió a incubar con el segundo anticuerpo y transcurrido el tiempo se dieron los lavados correspondientes. La detección se realizó utilizando como sustrato NTB/BCIP (Roche, 1 681 451), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ensayos de inmunodetección con anticuerpos de planta se realizaron bajo las condiciones anteriormente descritas, utilizando en un primer ensayo, como anticuerpo primario, uno monoclonal de ratón anti-p32/eIF3 de trigo y como secundario un anti-IgG de ratón fusionado a peroxidasa de rábano. En un segundo ensayo se empleó anti-eIF3, que es un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce todas las subunidades del eIF3 de trigo y como secundario anti-IgG de conejo fusionado también a peroxidasa de rábano.

### 5.2.17 ENSAYO DE FOSFORILACIÓN *in vitro* PARA *PSIF-Hm crm11*

Para realizar el ensayo de fosforilación se obtuvo en primer lugar el capRNAm de *psif-hm crm11* insertado en el vector pRCE021 bajo el promotor T7. A partir de este se obtuvo la proteína en un sistema de traducción en extracto crudo de reticulocitos y finalmente con este extracto se realizó el ensayo de fosforilación.

#### 5.17.1 TRANSCRIPCIÓN *in vitro* DE *PSIF-Hm crm11*

Para realizar transcripción se empleó el sistema “mMessage mMachine, High Yield Capped RNA, Transcription Kit” (1340, Ambion). Para la reacción estándar de transcripción se mezclaron los siguientes componentes: agua desionizada estéril a 25  $\mu$ l, 5  $\mu$ l NTP/Cap 2X, 1  $\mu$ l Amortiguador de reacción 10X, 500 ng pRCE021 (*psif-hm crm11*), 1  $\mu$ l mezcla de enzimas. Posteriormente, incubo la reacción 90 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionó 1  $\mu$ l de DNasa y se incubó 15 min a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 90  $\mu$ l de agua desionizada estéril y 10  $\mu$ l de acetato de amonio. Al volumen obtenido se añadió uno igual de fenol:cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó 4 min a 14 000 rpm. Se tomó la primera fase, se adicionó un volumen igual de cloroformo isoamílico, se agitó por vortex y se centrifugó 3 min a 14 000 rpm. Nuevamente se tomó la primer fase y a esta se agregó un volumen de isopropanol; se agito por vortex 10 seg y se centrifugó 20 min/14 000 rpm/ 4°C. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 70% y centrifugando 5 min a 14 000 rpm. El capRNAm así obtenido, se dejó secar parcialmente en campana y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La cuantificación se realizó en espectrómetro a una absorbancia de 260 nm.

#### 5.17.2 TRADUCCIÓN *in vitro* DE *PSIF-Hm crm11*

Para sintetizar la proteína de *PSIF-Hm crm11*, se empleó el sistema “TNT Coupled Reticulocyte Lysate System” (L4610, Invitrogen). La reacción estándar se obtuvo mezclando: agua libre de nucleasas a 25  $\mu$ l, 12.5  $\mu$ l extracto de reticulocitos, 2  $\mu$ l buffer de reacción, 0.5  $\mu$ l mezcla de aminoácidos sin metionina, 0.5  $\mu$ l mezcla de aminoácidos sin leucina, 0.5  $\mu$ l inhibidor de ribonucleasa (40 u/ $\mu$ l), 500 ng capRNAm. Posteriormente, la reacción se incubó 90 min a 30°C. La reacción se detuvo adicionando el buffer de fosforilación.

#### 5.17.3 FOSFORILACIÓN *in vitro* DE *PSIF-Hm crm11*

A cada reacción de traducción se adicionaron 25  $\mu$ l de buffer de fosforilación (10 mM HEPES, 50 mM NaCl<sub>2</sub>, 12.5 mM DTT, 100  $\mu$ M ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) y 2.5  $\mu$ l de ATP ( $\gamma$ <sup>32</sup>P, 370 MBq/ml, 10

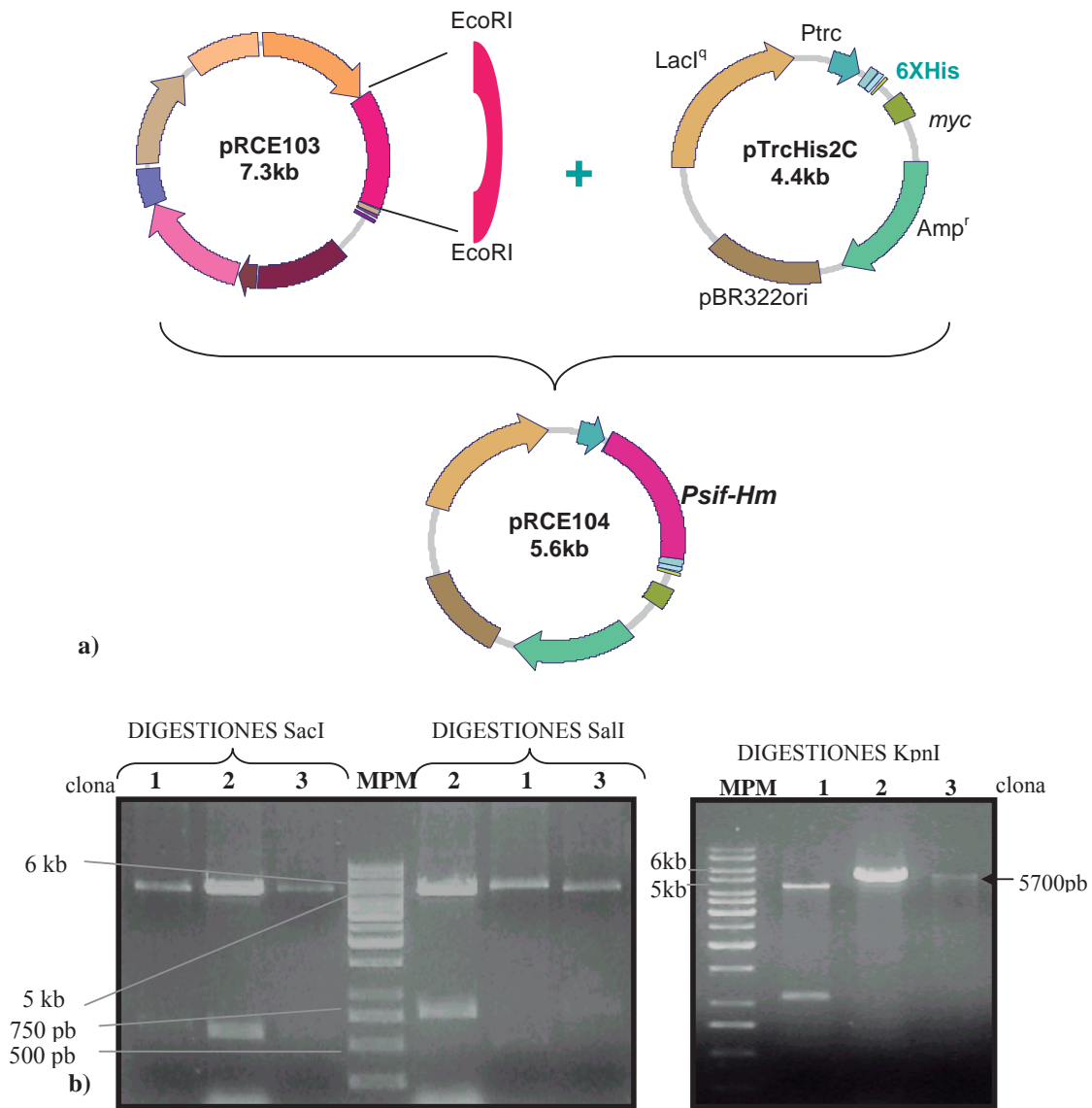
MCi/ml) diluido 1:20. Del complejo MPF (20 U/ $\mu$ l) se tomó 1  $\mu$ l y se diluyó en 4  $\mu$ l de agua desionizada estéril; de esta dilución se tomó 1  $\mu$ l para cada reacción de fosforilación. Finalmente, la olomoucina se adicionó a una concentración final de 500  $\mu$ M partiendo de una solución a 10 mM. Las reacciones obtenidas, se incubaron 30 min a 30°C. La reacción se detuvo adicionando Buffer de corrida 1X SDS-PAGE.

## CAPITULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 SUBCLONACIÓN DE *psif-Hm* EN EL VECTOR pTrcHis2C

Ante nuestro primer objetivo que consistió en la clonación de *psif-Humano (Homo sapiens, Hm)* en un vector adecuado para la purificación de la proteína *PSIF*, como primer paso se realizó la subclonación del gen en el vector de expresión de la serie pTrcHis2 (Fig 11). Este vector posee tres alternativas diferentes que varían únicamente en el número de bases dentro de la región de múltiple clonación, a fin de seleccionar aquella que ante la inserción de fragmentos de DNA no sufra modificaciones en el marco de lectura inicial y final, tanto del vector como de la secuencia clonada. De acuerdo a este principio, la variante “C” de este plásmido permite la adecuada clonación del gen *psif*. Una vez introducido el gen en el vector pTrcHis2C, la secuencia quedará alineado bajo el promotor *P<sub>trc</sub>* inducible hacia el extremo 5', lo cual permite manipular en pasos ulteriores la inducción de la expresión del gen. De igual manera, hacia el extremo 3' estará fusionado una cola de seis histidinas que permitirá la purificación de la proteína expresada, por cromatografía de afinidad.

Para realizar la clonación de *psif-Hm*, se liberó del plásmido pRCE103 la región codificante del gen con la enzima de restricción *EcoRI*, ya que dicha región se encuentra flanqueada por secuencias de reconocimiento para esta enzima (Fig. 18a). De igual manera, el plásmido pTrcHis2C fue digerido con *EcoRI*. Posteriormente, a este plásmido se ligó el gen de *psif-Hm* y por electroporación la construcción se introdujo en la cepa de *E. coli* TOP10, obteniendo así numerosas colonias. De las colonias transformantes obtenidas se resembraron veinte para el aislamiento de DNA plasmídico y posterior al corrimiento electroforético en gel de agarosa, se seleccionaron cuatro plásmidos para su análisis por restricción con tres endonucleasas: *SacI*, *Sall* y *KpnI*, lo cual permitirá comprobar la correcta inserción del gen con respecto al promotor. Con la enzima *SacI* se esperaban dos fragmentos: uno de ~550 pb y otro de ~5.2 kb; mientras que para las enzimas *Sall* y *KpnI* se buscaban fragmentos de ~768 pb y ~5kb, y ~5.7 kb, respectivamente. De las cuatro clonas analizadas, tres correspondieron con lo esperado, es decir, el gen se encontró en sentido 5'-3', mientras que en la clona 1 se encuentra en sentido opuesto (Fig. 18b). Las construcciones en sentido se denominaron pRCE104.



**Figura 18. Subclonación de *psif-Hm* en el vector pTrcHis2C.** a) El diagrama muestra la estrategia de clonación para la obtención del plásmido pRCE104: la región codificante de *psif-Hm* se extrajo del plásmido pRCE103 con la enzima *EcoRI*. El fragmento obtenido se insertó en el vector pTrcHis2C, digerido con la misma endonucleasa, resultando así la construcción pRCE104. b) Las fotografías muestran la electroforesis en gel de agarosa de las digestiones de pRCE104 con las enzimas indicadas. Se indican los fragmentos de tamaño esperados. MPM marcador de peso molecular.

## 5.2 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pRCE104

La secuenciación de la clona pRCE104 se realizó para confirmar la correcta inserción del gen *psif-Hm* en el plásmido pTrcHis2C en referencia al marco de lectura inicial y final. Para ello, se utilizó el oligo *pTrcHis* (*forward priming site*) ubicado río arriba de la inserción, para el extremo 5', y un oligo

interno ubicado hacia el extremo 3' del gen. Tal como se observa en la figura 19, la región codificante de *psif-Hm* se encuentra fusionada en fase a ambos extremos del vector. Aun cuando se presentan dos sustituciones, sólo en una de ellas se produce un cambio en el aminoácido, modificando valina por alanina, sin embargo, este cambio puede no presentar ningún efecto negativo en la proteína ya que se encuentra dentro de una región caracterizada como rica en ambos aminoácidos. De esta manera se prosiguió con la utilización de la clona pRCE104.

CCG AGC TCG	AGA TCT GCA	GCT GGT ACC	ATA TGG GAA	TTC GCC CTT
Pro Ser Ser	Arg Ser Ala	Ala Gly Thr	Ile Trp Glu	Phe Ala Leu
ATT CTC GAC	AAG <b>ATG</b> GCC	ACA CCG GCG	GTA CCA <b>GCA</b>	AGT GCT CCT
Ile Leu Asp	Lys <b>Met</b> Ala	Thr Pro Ala	Val Pro <b>V-A</b>	Ser Ala Pro
CCG GCC ACG	<b>CCG</b> ACC CCA	GTC CCG GCG	GCG GTC CCA	GCC TCT GCC
Pro Ala Thr	Pro Thr Pro	Val Pro Ala	Ala Val Pro	Ala Ser Ala
CCA GCC TCA	GTT CCA GCG	CCA ACG CCA	GCA CCG GCT	GCG GCT CCG
Pro Ala Ser	Val Pro Ala	Pro Thr Pro	Ala Pro Ala	Ala Ala Pro
GTT CCC GCT	GCG GCT CCA	GCC TCA TCC	.....	.....
Val Pro Ala	Ala Ala Pro	Ala Ser Ser	.....	.....
CTC ACA TAG	TCA CAG ATT	GCC CTC AAT	GAA AAA CTT	GTA AAC CTG,
Leu Thr Gln	Ser Gln Ile	Ala Leu Asn	Glu Lys Leu	Val Asn Leu
AAG GGC GAA	<b>TTC</b> GAA GCT	<b>TAC</b> GTA GAA	<b>CAA</b> AAA CTC	<b>ATC</b> TCA GAA
Lys Gly Glu	<b>Phe</b> Glu Ala	<b>Ser</b> Val Glu	<b>Gln</b> Lys Leu	<b>Ile</b> Ser Glu
GAG GAT CTG	<b>AAT</b> AGC GCC	<b>GTC</b> GAC CAT	<b>CAT</b> CAT CAT	
Glu Asp Leu	<b>Asn</b> Ser Ala	<b>Val</b> Asp His	<b>His</b> His His	

**Figura 19. Análisis de secuencia del plásmido pRCE104.** Secuencia obtenida del plásmido pRCE104. En negro se muestra la secuencia del gen *psif-Hm*; en azul los nucleótidos correspondientes al vector.

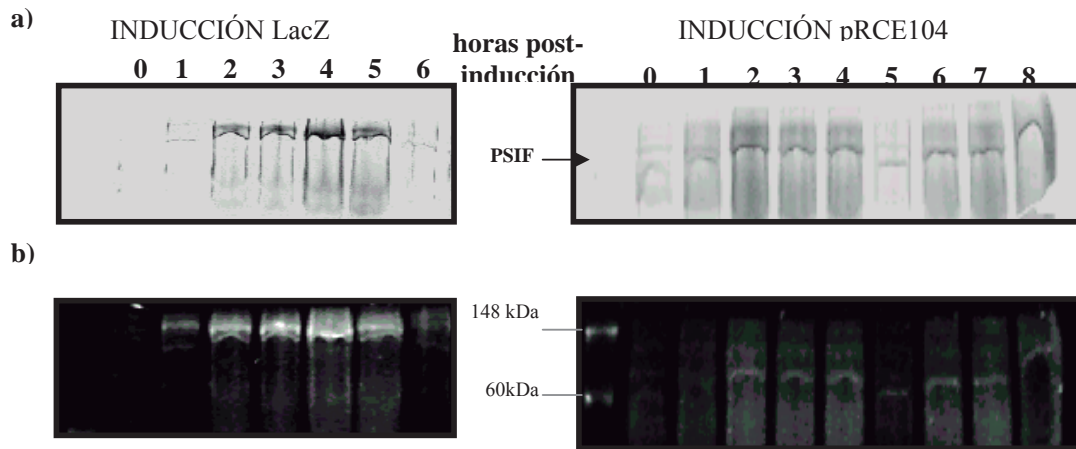
### 5.3 EXPRESIÓN Y DETECCIÓN DE PSIF-HUMANO EN EXTRACTOS DE *E. coli*

Al comprobar la adecuada construcción en *E. coli* del plásmido pRCE104, que lleva el gen de *psif-Hm*, se procedió con su sobreexpresión lo cual permitirá aumentar la concentración de la proteína en los cultivos celulares, para su posterior purificación. La inducción de la expresión se logró adicionando 1 mM de IPTG durante la fase exponencial de crecimiento. Para determinar el tiempo de inducción máxima, se colectaron muestras a diferentes tiempos post-inducción y posteriormente se lisaron bajo las condiciones descritas. Del sobrenadante obtenido, se corrió una alícuota en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y el gel obtenido se tiñó con azul de Coomassie. De este experimento se esperaba una banda diferencial y creciente con respecto al tiempo de ~50 kDa (47 kDa

de PSIF-*Hm* y 2.5 kDa de la región 6XHis y el epítipo *myc*). Como puede verse en la figura 20a, aunque sí se obtuvo una banda diferencial, ésta no corresponde con el tamaño deseado y no se observa un aumento en la expresión de la proteína a través del tiempo que indique su sobreexpresión. Esto puede comprobarse al analizar el control positivo, que corresponde a la expresión de la proteína LACZ-His (pTrcHisLacZ, 120 kDa), donde se logró observar una banda diferencial con un máximo de expresión a las cuatro horas post-inducción (Fig 20a, panel izquierdo).

A fin de comprobar la expresión de *PSIF-Hm* en las muestras obtenidas, se realizó nuevamente un SDS-PAGE y el gel obtenido se sometió a un sistema de detección fluorescente que reconoce proteínas fusionadas a la cola de seis histidinas. Los resultados de este experimento comprueban que la banda diferencial observada corresponde a la proteína recombinante de *PSIF-Hm(His6X)*, pero no hay una inducción de su expresión, tal como ocurre en el control de LacZ (Fig. 20b). La diferencia en tamaño observada tanto en la proteína *PSIF* como en el control, con respecto a lo esperado, probablemente se deba a que no hubo una separación adecuada del residuo celular después del lisado de la muestra, por lo tanto la muestra corrida puede llevar otras proteínas o restos celulares que retarden su corrimiento.

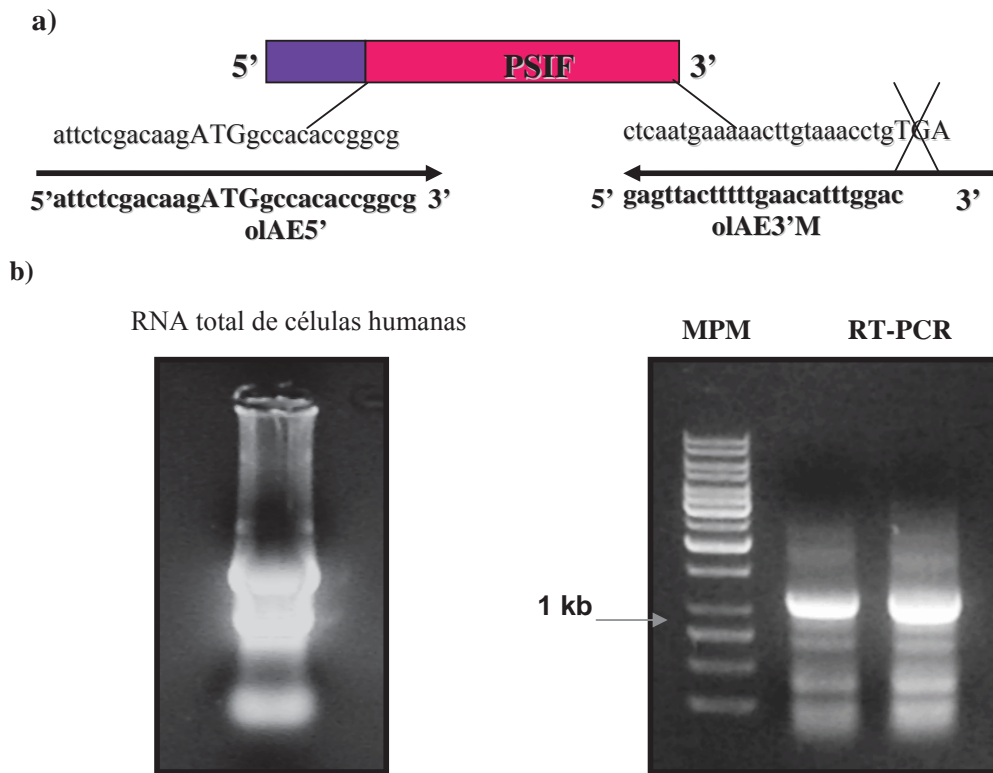
A la par de este trabajo, se han realizado otros estudios sobre el gen *psif-Hm*, y otros autores han reportado recientemente en el banco genómico una segunda copia del gen ubicada en el cromosoma 11 (Shi *et al.*, 2003). Hasta este momento en este trabajo se había empleado la copia de *psif-Hm* localizada en el cromosoma 2, pero a partir de datos obtenidos en el laboratorio de Biología Molecular sobre su regulación transcripcional, así como características propias del gen, indican que aparentemente esta copia no es activa en condiciones normales de división celular o presenta una expresión tejida específica. A partir de estos datos, así como la imposibilidad de sobreexpresar la proteína partiendo del gen *psif-Hm* cromosoma 2, se prosiguió con la obtención de la copia del gen ubicada en el cromosoma 11 (*psif-Hm crm11*).



**Figura 20. Inducción de la expresión de *PSIF-Hm* en *E. coli*.** a) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie para determinar el tiempo de máxima inducción. En la izquierda se muestra el control positivo que corresponde a la fusión del gen *LacZ* en el vector pTrcHis. En la derecha se encuentra el experimento problema y se indica la proteína detectada como probable *PSIF-Hm*. b) Detección fluorescente mediante el sistema “In Vision” para proteínas fusionadas a seis histidinas. A la izquierda el equivalente del control positivo *LacZ*. A la derecha, el análisis de las muestras de *PSIF-Hm*.

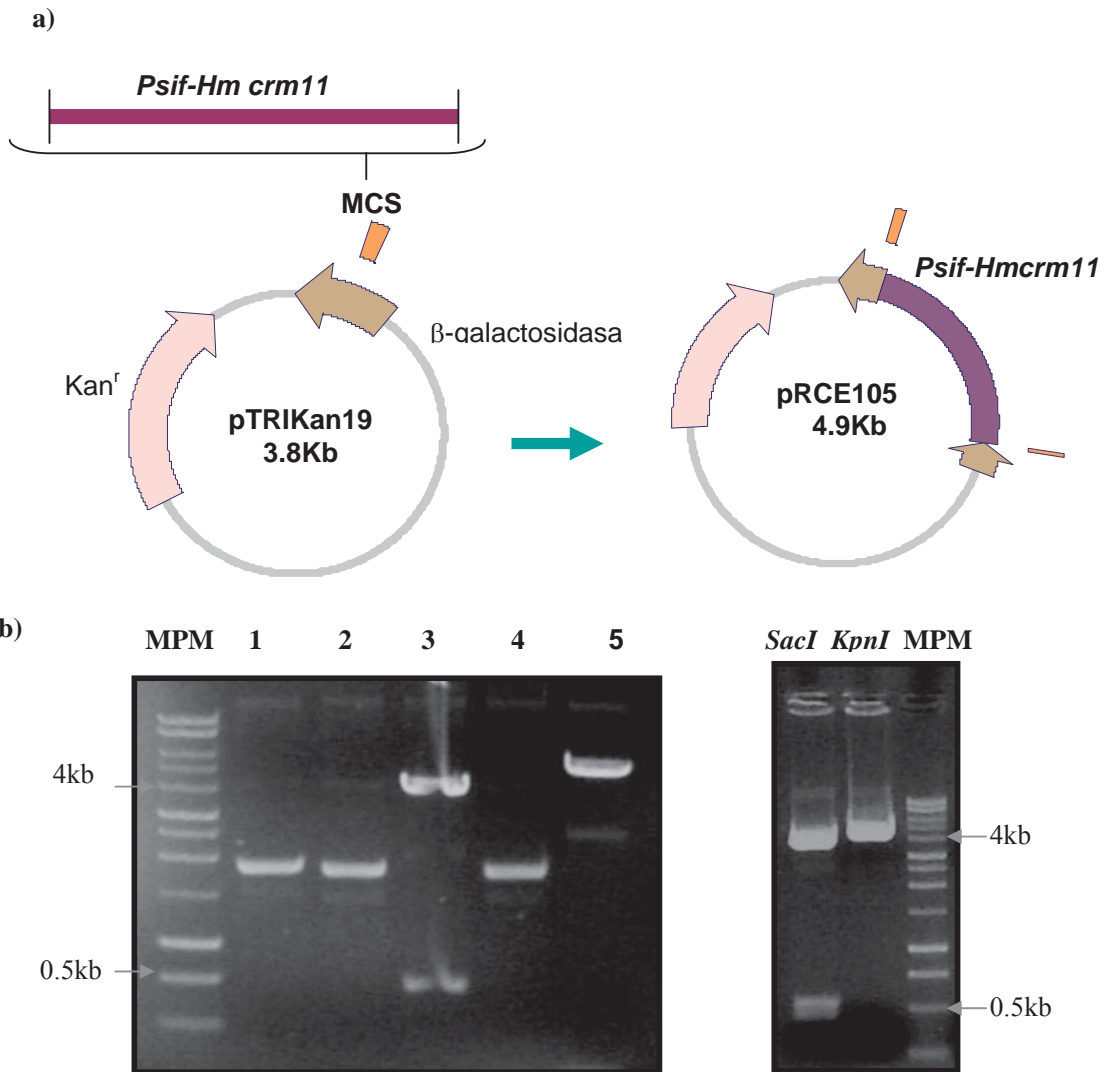
#### 5.4 OBTENCIÓN Y CLONACIÓN DE LA COPIA DEL GEN *psif-Hm crm11*

Para obtener la copia del gen *psif-Hm* localizada en el cromosoma 11 (*psif-Hm crm11*), en primer lugar se aisló el RNA total de células humanas embrionarias (línea celular 293H), y a partir de éste, se efectuó una reacción de transcriptasa reversa que dio lugar al cDNA del gen de interés. Posteriormente, se realizó una amplificación mediante PCR logrando así el cDNAs de *psif-Hm crm11*. Para la transcripción inversa, se utilizó un oligonucleótido previo al codón de término de la traducción en el extremo 3' (Fig. 21a), lo cual permitirá la posterior fusión traduccional a la cola de histidinas. La ulterior amplificación se consiguió empleando un oligo doce bases precedentes al codón de inicio de la traducción, hacia el extremo 5' (Fig. 21a) y el oligo antes mencionado para el extremo 3', obteniendo así un fragmento de ~1.1 kb (Fig. 21b).



**Figura 21. Obtención de la copia del gen *psif-Hm* ubicada en el cromosoma 11.** a) Diagrama de amplificación de *psif-Hm crm11* y los oligos empleados. b) Las fotografías muestran corrimientos electroforéticos en gel de agarosa. A la izquierda, del RNA total extraído por trizol. A la derecha, del cDNAs obtenido por amplificación correspondiente a *psif-Hm crm11* (~1.1 kb). MPM, marcador de peso molecular.

Una vez obtenido el gen de *psif-Hm crm11*, se prosiguió con su clonación en el vector pTRIKan19, a fin de aumentar los sitios de restricción en los extremos 3' y 5' del gen (Fig. 22a). Debido a que la secuencia amplificada del gen posee extremos romos, el plásmido a utilizar fue digerido, previamente a la ligación, con la endonucleasa *SmaI* que produce este mismo tipo de corte. Posterior a la ligación, se transformó la cepa de *E. coli* XLblue con la posible clona resultante obteniendo así numerosas colonias. De las colonias transformantes positivas se sembraron diez para el aislamiento de DNA plasmídico y después del corrimiento electroforético en gel de agarosa, se seleccionaron cinco plásmidos para su análisis por restricción con la endonucleasa *SalI*, lo cual permitirá comprobar la inserción del gen. De esta digestión se esperaban fragmentos de ~700 pb y otro de ~4.2 kb y tal como se aprecia en la figura 22b, una de las construcciones analizadas corresponde con lo esperado. Para comprobar dicho resultado, esta clona fue digerida además con las enzimas *SacI* y *KpnI*, esperando fragmentos de ~500 pb y ~4.4 kb para la primer endonucleasa y de ~4.9 kb para *KpnI* (Fig. 22b). Una vez confirmado el experimento, la clona positiva se denominó pRCE105.



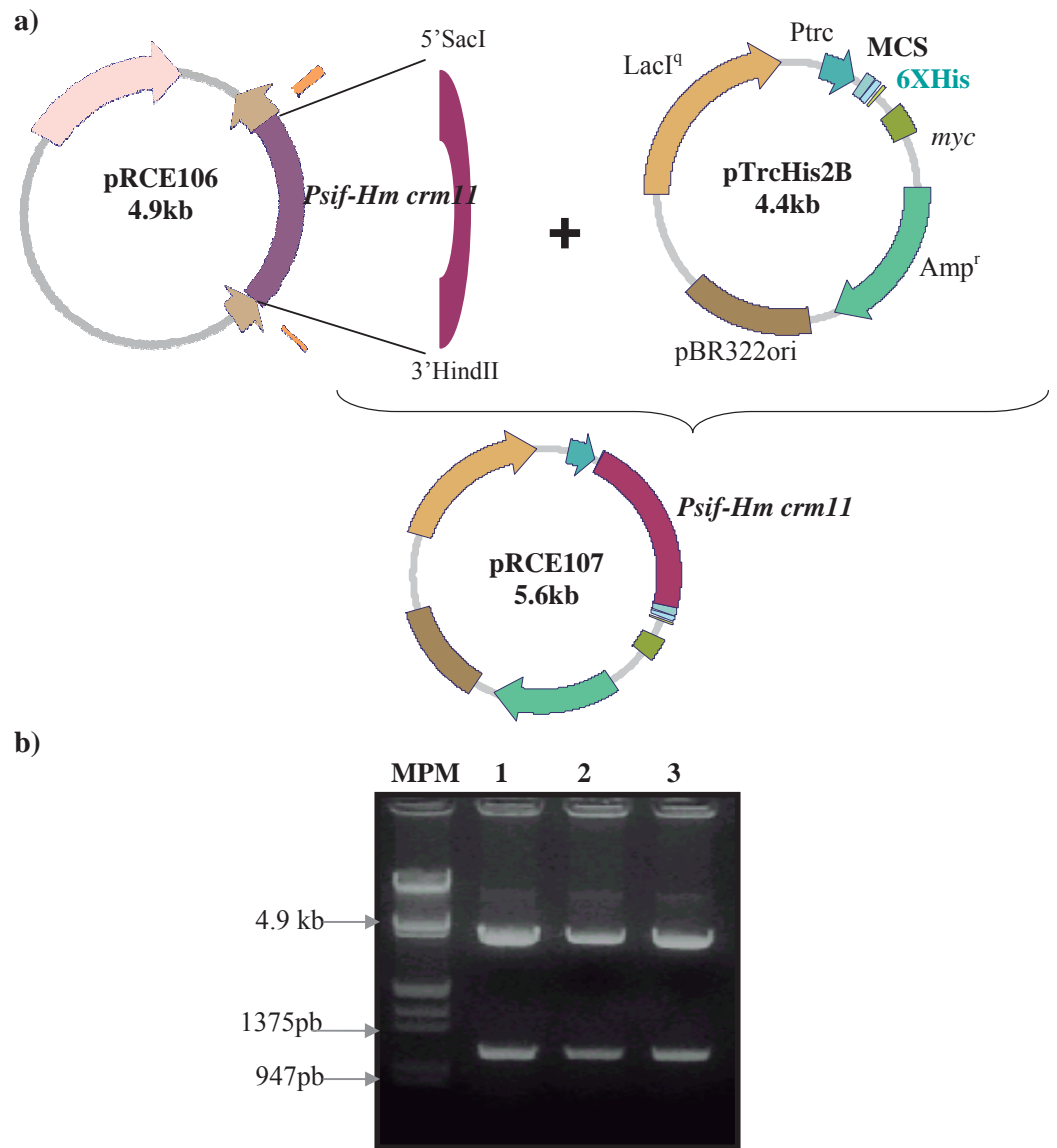
**Figura 22. Clonación de *psif-Hm crm11* en el vector pTRIKan19.** a) Estrategia de clonación: el gen *psif-Hm crm11* elaborado por RT-PCR se ligó al vector pTRIKan19 en el sitio *SmaI* dentro de la región de múltiple clonación (MCS), obteniendo así el plásmido pRCE105. b) Las fotografías muestran corrimientos electroforéticos en gel de agarosa. A la izquierda se encuentran las muestras analizadas por restricción con la enzima *SalI*. A la derecha, se muestra la digestión de la clona positiva digerida con *SacI* y *KpnI*. MPM, marcador de peso molecular.

## 5.5 SUBCLONACIÓN DE *psif-Hm crm11* EN EL VECTOR pTrcHis2B

Una vez clonada la copia de *psif-Hm crm11*, se prosiguió con la subclonación del gen en el vector de expresión en *E. coli* pTrcHis2, utilizando en este caso la variante “B”. Para lograr ésto, la región codificante del gen se extrajo del vector pRCE105 mediante su digestión con las enzimas *SacI* y *HindIII*. De igual manera, el vector pTrcHis2B se digirió con las mismas enzimas en la región de clonación múltiple. Posteriormente, a este plásmido se ligó el gen de *psi-fHm crm11* y por electroporación la construcción se introdujo en la cepa de *E. coli* TOP10 obteniendo numerosas colonias. De las colonias transformantes obtenidas, se sembraron diez para el aislamiento de DNA plasmídico y posterior al corrimiento electroforético en gel de agarosa, se seleccionaron tres para su análisis por restricción con la endonucleasas *BamHI*, esto permitió comprobar la correcta inserción del gen con respecto al promotor. De este análisis se esperaban dos fragmentos: uno de ~4.4 kb y otro de ~1.2 kb y como se aprecia en la figura 23, las tres clonas analizadas correspondieron con lo esperado, es decir el gen se localizaron en dirección 5'-3' con respecto a su promotor. Las construcciones se denominaron pRCE107.

## 5.6 EXPRESIÓN Y DETECCIÓN DE *PSIF-Hm crm11* EN EXTRACTOS DE *E. coli*

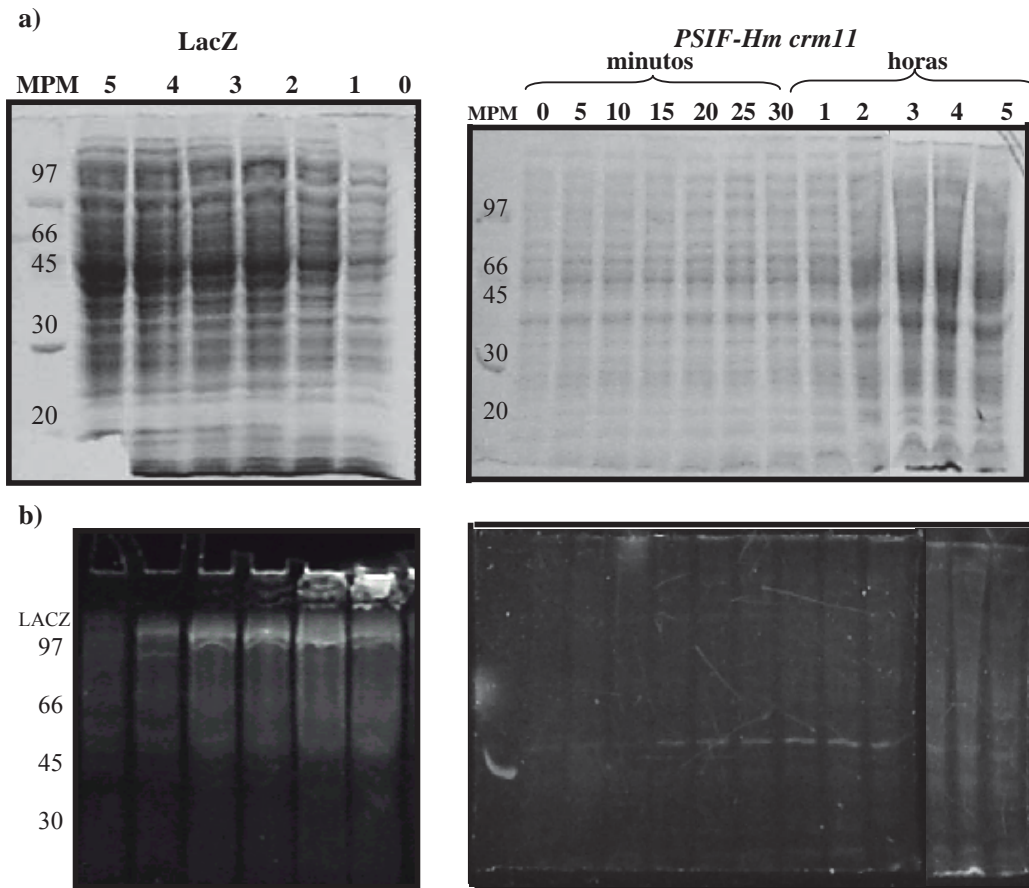
Para inducir la expresión en *E. coli* del plásmido pRCE107, que lleva el gen de *psi-fHm crm11*, se adicionó a los cultivos celulares 1 mM de IPTG durante la fase exponencial de crecimiento. Para determinar el tiempo de inducción máxima, se colectaron muestras a diferentes tiempos post-inducción, y posteriormente se lisaron bajo las condiciones descritas. Del sobrenadante obtenido se corrió una alícuota en un gel de poliacrilamida al 10%, y se tiñó con azul de Coomassie. Se esperaba una banda creciente con respecto al tiempo de ~50 kDa (47 kDa de PSIF-*Hm* y 2.5 kDa de la región 6XHis y el epítipo *myc*). El procedimiento antes descrito se realizó también para el control positivo, que corresponde a la inducción de LacZ-His (pTrcHisLacZ, 120 kDa). Como se aprecia en el panel izquierdo en la figura 24, en el control positivo no sobresale una banda a la altura esperada mediante su tinción por Coomassie, sin embargo, al realizar la detección fluorescente específica se observó la proteína recombinante de LacZ del tamaño esperado y con un máximo de inducción entre las tres y las cuatro horas post-inducción. Por el contrario, en las muestras problema no hubo una banda sobresaliente de ~50 kDa que indique una inducción o sobreexpresión, ya sea mediante su tinción por Coomassie o por detección fluorescente (Fig 24, derecha).



**Figura 23. Subclonación de *psif-Hm crm11* en el vector pTrcHis2B.** a) Diagrama de clonación: la región codificante de *psif-Hm crm11* se extrajo del plásmido pRCE105 con las enzimas *SacI* y *HindIII*. El fragmento obtenido se insertó en el vector pTrcHis2B, digerido con las mismas endonucleasas, resultando en la construcción pRCE107. b) La fotografía muestra la electroforesis en gel de agarosa de las digestiones de pRCE107 con las enzimas indicadas. MPM, marcador de peso molecular.

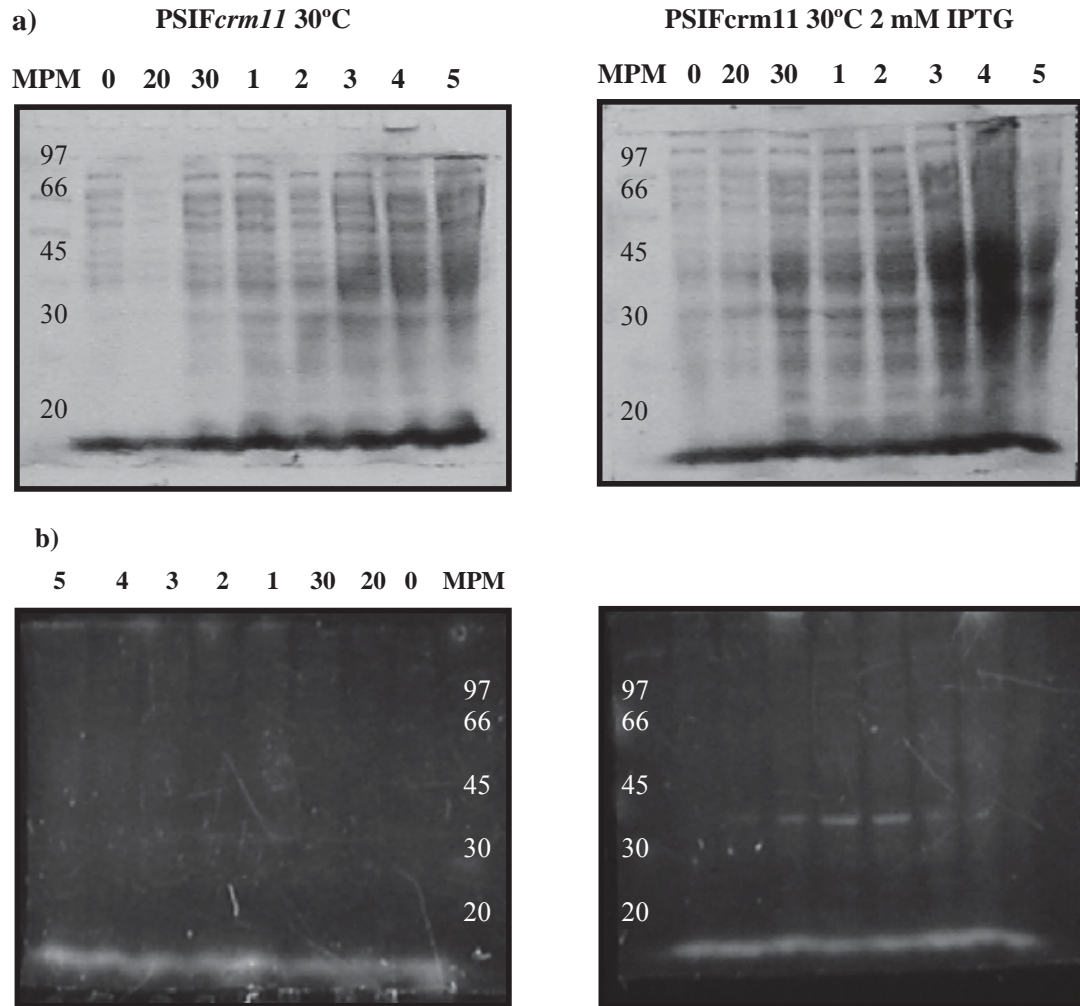
Para eliminar la posibilidad de no inducción, se realizaron los ensayos de expresión de la clona pRCE107 duplicando la concentración de IPTG (2 mM). Siguiendo los protocolos de detección antes descritos, se encontró que ya sea mediante la tinción por Coomassie o por fluorescencia específica, no fue posible detectar ninguna proteína del tamaño indicado, que corresponda a *PSIF-Hm crm11* (Fig. 25 a y b, derecha). Cabe mencionar que se observó una banda de ~32 kDa con un patrón claro de inducción, pero esta banda fue también detectada en el control positivo lo cual indica que es un probable subproducto del sistema y no de la inducción de la expresión de *psif-Hm crm11*.

Finalmente, para eliminar por completo la posibilidad de degradación de la proteína en los cultivos de *E. coli*, se realizaron nuevamente dos ensayos de inducción reduciendo la temperatura de incubación a 30°C. Se colectaron muestras a tiempos reducidos y a uno de los cultivos se adicionó, además, una concentración de 2 mM de IPTG. Mediante los experimentos de detección de tinción por Coomassie y fluorescencia específica, no fue posible detectar ninguna proteína del tamaño esperado en ninguna de las dos condiciones de inducción (Fig. 26 a y b). Se detectó nuevamente la proteína de ~32 kDa, pero como se mencionó anteriormente, esta corresponde a un probable subproducto del sistema. Estos datos indican que probablemente existe una modificación de origen en la región codificante del gen *psif-Hm crm11* obtenido mediante RT-PCR, de manera tal que el marco de lectura de la fusión traduccional se encuentra desfasado y por esta razón no es detectable ninguna proteína, aun a tiempos cortos de expresión o con el doble de inductor. De esta forma, se requiere realizar la secuenciación completa del cDNA de *psif-Hm crm11* obtenido mediante RT-PCR, lo cual nos permitiría comprobar dicha suposición. Sin embargo, a partir de los datos obtenidos para la inducción de la expresión de *psif-Hm crm2*, donde no fue posible obtener un pico de máxima expresión, y debido a deficiencias en el sistema de expresión empleado, se decidió cambiar a un sistema de expresión eucariótico.



**Figura 24. Inducción de la expresión de *PSIF-Hm crm11* en *E. coli* 1.** a) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie para determinar el tiempo de máxima inducción. En la izquierda se muestra el control positivo que corresponde a la fusión del gen LacZ en el vector pTrcHis2, las horas post-inducción se encuadran en sentido invertido, de mayor a menor. En la derecha se encuentra el experimento para la clona pRCE107 que lleva *PSIF-Hm crm11*. b) Detección fluorescente mediante el sistema “In Vision” para proteínas fusionadas a seis histidinas. Los gels corresponden al duplicado del que se muestra en la parte superior.

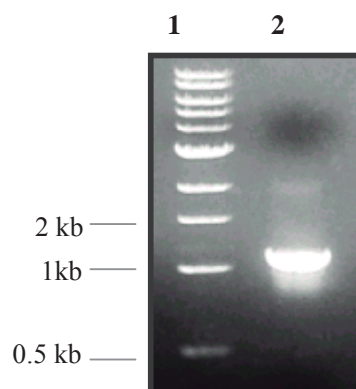




**Figura 26. Inducción de la expresión de *PSIF-Hm crm11* en *E. coli* 3.** a) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie para determinar el tiempo de máxima inducción. En la izquierda se muestra las muestras a 30°C. En la derecha el experimento realizado a 30°C con 2 mM IPTG. b) Detección fluorescente mediante el sistema “In Vision” para proteínas fusionadas a seis histidinas. Los geles corresponden al duplicado del mostrado en la parte superior.

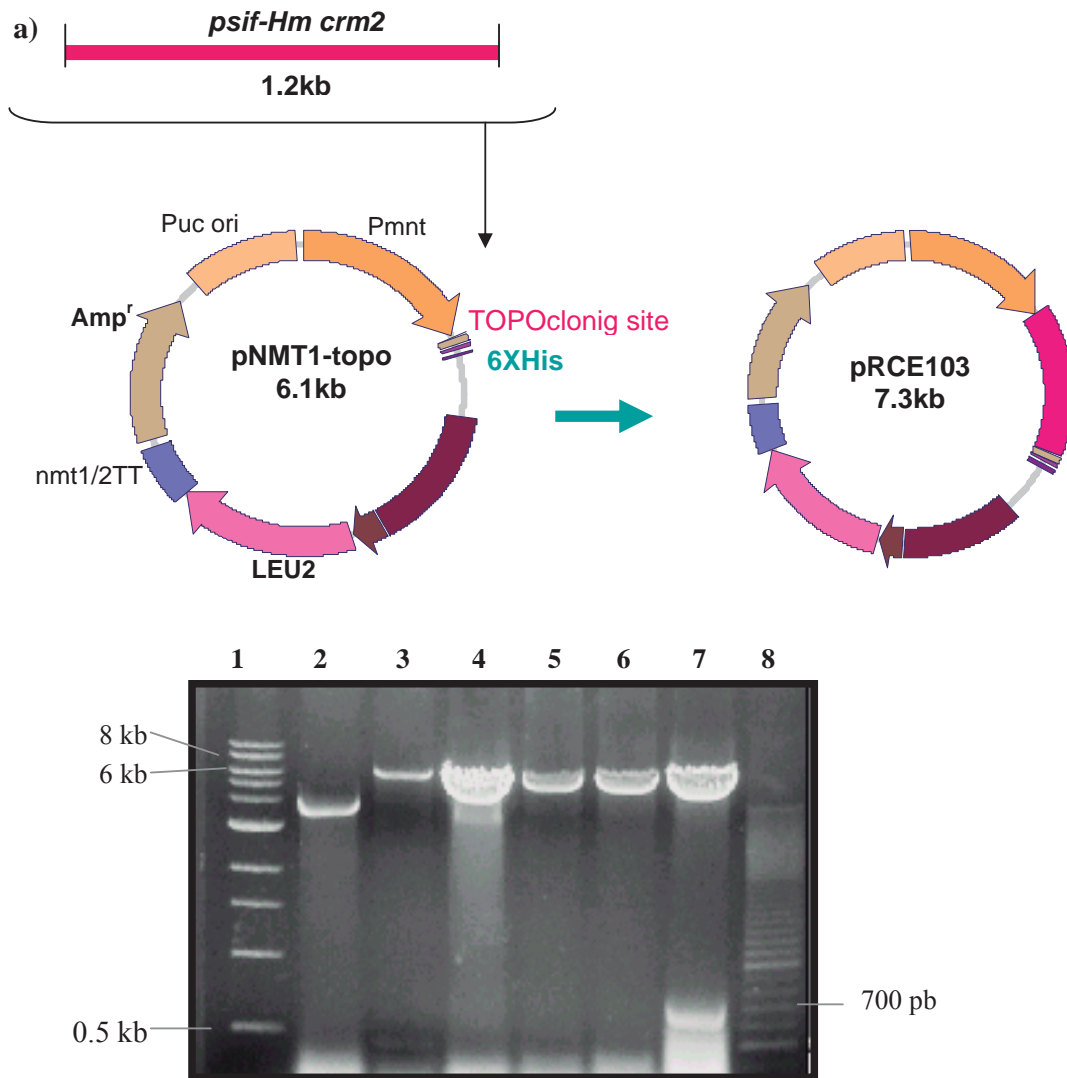
## 5.7 SUBCLONACIÓN DE *psif-Hm crm2* EN EL VECTOR pNMT1-TOPO

Ante la imposibilidad de sobreexpresar *PSIF-Hm* en un sistema procariótico, se prosiguió con la implementación de un sistema de expresión eucariótico, que permita la producción de la proteína para su posterior purificación. Para lograr esto, se llevó a cabo la amplificación de la región codificante del gen *psif-Hm crm2* a fin de eliminar el codón de término de la traducción, lo que permitirá su posterior fusión a una cola de seis histidinas, misma que facilita la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad. Para llevar a cabo la amplificación por PCR, se utilizaron los oligos descritos con anterioridad: AE5' (tabla 1 y Fig. 15) y AE3'M, el cual carece de codón de término de la traducción. De dicha amplificación se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.1 kb que correspondieron con lo esperado (Fig. 27)



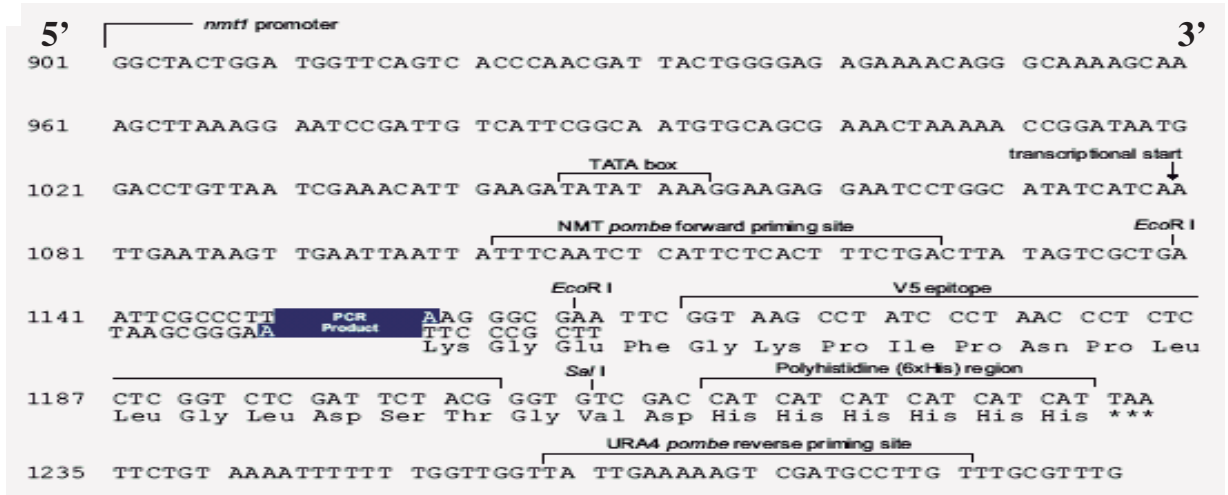
**Figura 27. Amplificación de *psif-Hm crm2*.** La fotografía corresponde a la electroforesis en gel de agarosa: en el carril 1 se ubica el marcador de peso molecular; el carril 2 corresponde a la amplificación de *psif-Hm crm2*.

Posteriormente, la región codificante del gen *psif-Hm crm2* obtenida por amplificación, se insertó en el vector de alta expresión pNMT1-topo (Fig. 12) para productos de PCR, bajo el promotor inducible *Pnmt* y fusionada a la cola de seis histidinas (Fig. 28a). Por electroporación esta construcción se introdujo en la cepa de *E. coli* JM101 obteniendo numerosas colonias, de las cuales se analizaron seis mediante el aislamiento de DNA plasmídico y realizando un análisis de restricción con la endonucleasa *Sal I*. La enzima *Sal I* nos permite comprobar la correcta inserción del gen con respecto al promotor al presentar dos sitios de reconocimiento: uno en la región codificante del gen y un segundo en el vector, previo a la cola de histidinas. De esta manera, del análisis de restricción se esperaba un fragmento de ~700 pb y otro de ~6400 pb. De las seis colonias analizadas solamente una correspondió con lo esperado, es decir, se encuentra en sentido 5'-3' con respecto al promotor, el resto se encuentran en sentido opuesto (Fig. 28b). Dicha construcción se denominó pRCE103.



**Figura 28. Subclonación de *psif-Hm crm2* en el vector pNMT1-TOPO.** a) La figura esquematiza la inserción del gen *psif-Hm crm2* amplificado, en el vector pNMT1-TOPO (Fig. 12), mismo que fue denominado pRCE103. b) La fotografía corresponde a la electroforesis en gel de agarosa de las digestiones enzimáticas de DNA plasmídico con *Sall* de seis colonias obtenidas. Los carriles 1 y 8 contiene los marcadores de peso molecular; del carril 2 al 7 se encuentran las muestras analizadas donde únicamente la 7 corresponde a los fragmentos esperados de ~700 pb y ~6400 pb, que indican la inserción en sentido 5'-3' del gen.

a)



b)

5'			ATA	GTC GCT GAA	TTC GCC CTT	3'
			Ile	Val Ala Glu	Phe Ala Leu	
				KpnI		
ATT CTC GAC	AAG ATG GCC	ACA CCG GCG	GTA CCA GAA	AGT GCT CCT		
Ile Leu Asp	Lys Met Ala	Thr Pro Ala	Val Pro Val	Ser Ala Pro		
CCG GCC ACG	CCG ACC CCA	GTC CCG GCG	GCG GTC CCA	GCC TCT GCC		
Pro Ala Thr	Pro Thr Pro	Val Pro Ala	Ala Val Pro	Ala Ser Ala		
CCA GCC TCA	GTT CCA GCG	CCA ACG CCA	GCA CCG GCT	GCG GCT CCG		
Pro Ala Ser	Val Pro Ala	Pro Thr Pro	Ala Pro Ala	Ala Ala Pro		
GTT CCC GCT	GCG GCT CCA	GCC TCA TCC	.....	.....		
Val Pro Ala	Ala Ala Pro	Ala Ser Ser	.....	.....		
.....	.....	.....	.....	.....		
AAC AGC AAC	ATC AAT GAC	CTT TTG ATG	GTG ACC TAC	CTG GCC AAC		
Asn Ser Asn	Ile Asn Asp	Leu Leu Met	Val Thr Tyr	Leu Ala Asn		
CTC ACA TAG	TCA CAG ATT	GCC CTC AAT	GAA AAA CTT	GTA AAC CTG		
Leu Thr Gln	Ser Gln Ile	Ala Leu Asn	Glu Lys Leu	Val Asn Leu		
	EcoRI					
AAG GGC GAA	TTC GGT AAG	CCT ATC CCT	AAC CCT CTC	CTC GGT CTC		
Lys Gly Glu	Phe Gly Lys	Pro Ile Pro	Asn Pro Leu	Leu Gly Leu		
	SalI	región	6x His			
GAT TCTACG	GGT GTC GAC	CAT CAT CAT	CAT CAT CAT			
Asp Ser Thr	Gly Val Asp	His His His	His His His			

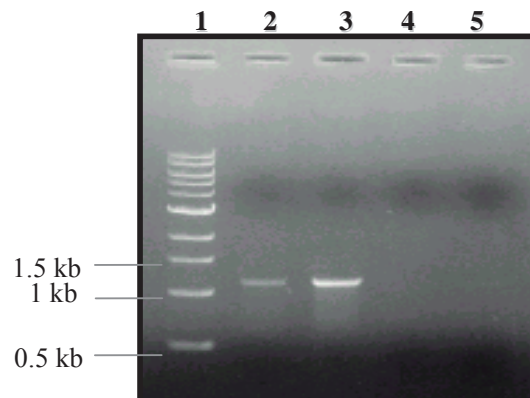
**Figura 29. Analisis de secuencia del plásmido pRCE103.** a) La secuencia corresponde al vector pMNT1-TOPO, indicando el sitio en que fue fusionada la región codificante de *psif-humano* (PCR product). b) Secuencia obtenida del plásmido pRCE103. En negro se muestra la secuencia del gen *psif-Hm crm2*; en azul los nucleótidos correspondientes al vector. Se indican, además, los sitios de restricción para endonucleasas.

## 5.8 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pRCE103

Una vez obtenida la clona pRCE103, se realizó su secuenciación para determinar la correcta inserción del gen *psif-Hm crm2* en el plásmido pNMT1-TOPO en referencia al marco de lectura inicial y terminal. Para ello, se emplearon los oligos NMT *pombe foward* y URA4 *pombe reverse* localizados en el vector y rodeando el gen insertado (Fig. 29a). Tal como se observa en la figura 29, la región codificante de *psif-Hm crm2* se encuentra fusionada en fase a ambos extremos del vector pNMT1-TOPO. De esta manera se prosiguió con la utilización de la clona pRCE103 en los siguientes experimentos.

## 5.9 TRANSFORMACIÓN DE *PSIF-Hm crm2* EN *S. pombe*

Al comprobar la adecuada construcción de la clona pRCE103, se procedió con la transformación por electroporación de *S. pombe* (TCP1), cepa hospedera que permitiera la sobre expresión de la proteína. De las colonias transformadas obtenidas, se tomaron cuatro para su análisis. Para corroborar la inserción del plásmido se realizó un PCR a partir de las colonias seleccionadas utilizando un oligonucleótido ubicado en el vector río arriba de la inserción del gen (NMT *pombe foward*, tabla 1) y un segundo oligo del extremo 3' del gen (olAE3'M). De la amplificación, dos de las colonias analizadas resultaron positivas al arrojar un fragmento de ~1.2 kb lo que confirma su transformación en levadura (Fig. 30).



**Figura 30. Amplificación de *psif-Hm crm2* transformado en *S. pombe*.** La figura muestra la electroforesis en gel de agarosa correspondiente a la amplificación de cuatro colonias de *S. pombe* transformadas con el plásmido pRCE103. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular. Los carriles 2-5 contienen las muestras amplificadas.

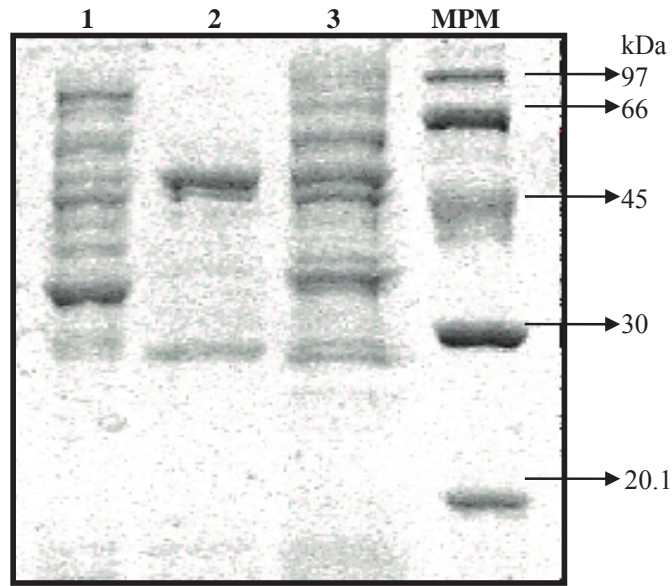
## 5.10 EXPRESIÓN Y DETECCIÓN DE *PSIF-Hm crm2* EN EXTRACTOS CRUDOS DE *S. pombe*

Para aumentar la concentración de proteína en los cultivos celulares, lo cual permita la posterior purificación, se prosiguió con la inducción de la expresión. La sobreexpresión del plásmido pRCE103, que lleva el gen de *psif-Hm*, en *S. pombe* se logró por eliminación de tiamina del medio de cultivo. Los niveles de expresión máxima se logran a las 16 horas post-inducción, por lo cual las células se colectaron a las 18 horas y se lisaron bajo las condiciones descritas. Del sobrenadante obtenido, se cargaron 20 µg de proteína total en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, mismo que se tiñó con azul de Coomassie. Se esperaba una banda diferencial de ~51 kDa (47 kDa de *PSIF-Hm* y 3.6 kDa de la región 6XHis y el epítipo V5) con respecto a los controles, que corresponden a la no inducción (control negativo) y a la inducción de la cepa que lleva el vector pNMT1-CAT (control positivo, 32 kDa). Tal como se observa en la figura 31, el patrón de bandeo es muy similar entre los controles del experimento, pero no ocurre así con la muestra problema donde se obtiene una reducción notoria en la concentración de proteínas, debida probablemente a la inducción de la expresión de *psif*, que como se sabe inhibe el proceso de síntesis proteica (Farias 2002; Llanderal 2003). Aun a pesar de la reducción obtenida, sobresale una banda a la altura esperada de ~51 kDa, pero esta también está presente en las reacciones control. Ante esto, se continuó con la inmunodetección de la proteína, lo cual permitirá comprobar que dicha proteína corresponde a *PSIF-Hm crm2 (His6X)*.

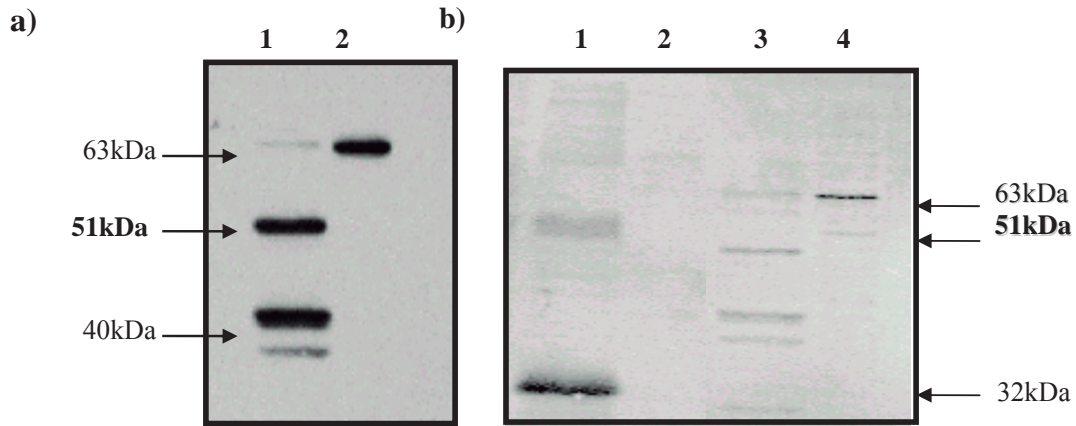
Para la inmunodetección específica, se realizó un SDS-PAGE al 12% con 20 µg de proteína total y el gel obtenido se transfirió a una membrana de PVDF. Para el reconocimiento de la proteína se utilizó el anticuerpo anti-His(C-Term) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), el cual reconoce la cola de seis histidinas (*His6X*) fusionadas a la proteína *PSIF-Hm crm2*. Así, la membrana obtenida fue sometida a un tratamiento de detección por quimioluminiscencia, que dió como resultado cuatro bandas en la reacción problema y una en el control sin inducir (Fig. 32a). Dentro de las bandas obtenidas en la muestra inducida, se encontró una a la peso esperado (~51 kDa), que no está presente en la muestra control y podría corresponder a la proteína de *PSIF-Hm crm2*. Sin embargo, debido a la inespecificidad obtenida, no se puede asegurar que sea realmente la proteína *PSIF-Hm crm2* o alguna otra del mismo tamaño que al igual que las proteínas de ~38, ~40 y ~63 kDa esté dando señal. Cabe resaltar, además, que no hubo una diferencia notoria en intensidad de las bandas que refleje una sobreexpresión de la proteína.

Con el objetivo de cerciorarnos de que la proteína PSIF estuviera sobreexpresada en los cultivos de *S. pombe* y determinar si la inespecificidad estaba dada por el anticuerpo, se repitió el ensayo tipo *Western blot* pero utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón que reconoce la cola de histidinas y un anticuerpo secundario antiIgG-ratón conjugado a fosfatasa alcalina. Al realizar la

detección por colorimetría se obtuvo el mismo patrón de bandeo para ambas muestras (Fig. 32b) que el observado en el ensayo anterior. Esto nos indicó que las proteínas detectadas superiores o inferiores a la banda de 51 kDa, podrían corresponder a modificaciones postraduccionales sobre la proteína *PSIF-Hm*, o bien que la sobreexpresión de *PSIF-Hm* induce la expresión de otras proteínas no detectables en los controles negativo y positivo.

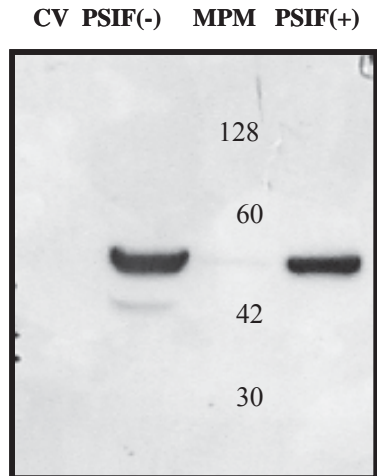


**Figura 31. Expresión de PSIF-*Hm crm2* en extractos de *S. pombe*.** La fotografía muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carril 1: control positivo, proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT) fusionada en el vector pNMT1-TOPO. Carril 2: inducción de pRCE103 (pNMT1-*psif/Hm*). Carril 3: control negativo, corresponde a la no inducción de pRCE103. MPM, marcador de peso molecular.



**Figura 32. Inmunodetección de *PSIF-Hm crm2* en extractos de *S. pombe*** 1. a) Detección quimioluminiscente de la proteína *PSIF-Hm crm2* con el anticuerpo anti-His (C-Term)-HRP. El carril 1 corresponde a la muestra inducida de pRCE103 y el carril 2 al control negativo de esta misma muestra. b) Detección colorimétrica de *PSIF-Hm crm2* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-His6x y un anticuerpo secundario anti-IgG-PA de ratón. Carril 1: control positivo (pNMT1-CAT); Carril 2: inducción del vector pNMT1; Carril 3: inducción de pRCE103; Carril 4: control negativo, pRCE103 sin inducir; los pesos moleculares indicados corresponden a las bandas obtenidas en el carril 3.

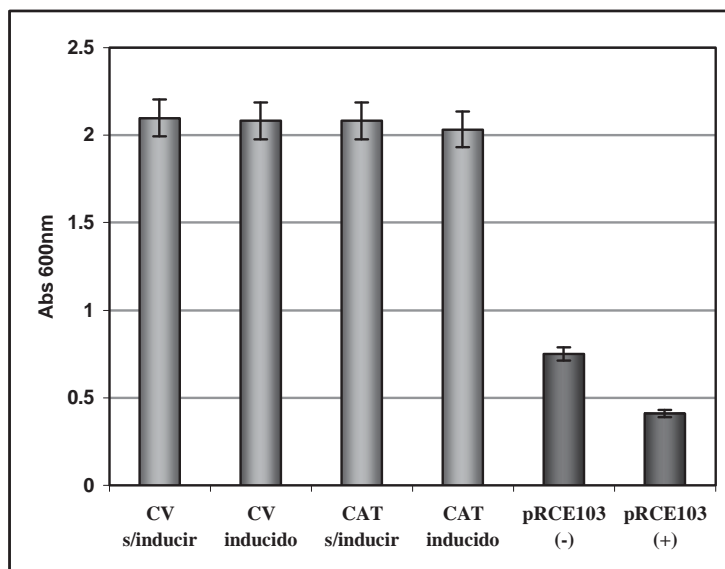
De manera paralela, se realizaron dos ensayos de *Western blot* con los mismos lisados de levadura, pero utilizando dos anticuerpos diferentes: un anticuerpo monoclonal que reconoce la subunidad p34 del factor de inicio de la traducción eIF3 de trigo y otro policlonal para todas las subunidades del eIF3, también de trigo. Ambos se utilizaron con el propósito de obtener una probable reacción cruzada entre la p34-eIF3 de trigo y su equivalente en humano p47-eIF3 o PSIF, la cual permitiera comprobar la sobreexpresión de la proteína en los cultivos de *S. pombe*. Con el anticuerpo monoclonal específico para p34 no se obtuvo detección alguna, lo que indica que aunque p34 y PSIF son homólogos no se obtiene una reacción antígeno-anticuerpo, debido probablemente a que la secuencia utilizada para la generación del anticuerpo puede ser una región no conservada entre proteínas, o bien por ser un segmento de la proteína, que en el caso de PSIF, no esté del todo expuesto. Por otra parte, del ensayo con el anticuerpo policlonal para las subunidades de eIF3-trigo, se obtuvo una banda de ~51 kDa en la muestra problema (Fig. 33). Esta misma banda fue también detectada en el lisado sin inducir y sin ninguna diferencia en cuanto expresión de la proteína con la muestra inducida (Fig. 33), lo cual indica que la expresión basal fue muy alta, o bien que ante la función inhibitoria de *PSIF-Hm crm2* sobre el sistema, la proteína no puede ser expresada más allá de la expresión basal, sin obtener un efecto negativo sobre los cultivos celulares como se mostrará a continuación.



**Figura 33. Inmunodetección de *PSIF-Hm crm2* en extractos de *S. pombe 2*.** Detección quimioluminiscente de la proteína *PSIF-Hm crm2* utilizando como anticuerpo primario anti-eIF3 policlonal de trigo, que reconoce todas las subunidades que conforman al factor y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa de rábano. CV, cultivo que lleva únicamente el vector; PSIF (-), pRCE103 que lleva *psif-Hm crm2*, no inducido; PSIF (+), pRCE103 inducido.

Cabe mencionar que, durante el procedimiento de expresión de la proteína, fue notorio el descenso en el crecimiento celular de la levadura al contener y sobreexpresar la proteína de *PSIF-Hm*. Para validar dicha observación, se tomó la absorbencia de los controles y la muestra problema inducidas y sin inducir a las 18 horas (tiempo de colecta por máxima inducción). Los resultados obtenidos para las distintas muestras se grafican en la figura 34 y, como puede observarse, mientras que el crecimiento entre las células que llevan el vector y aquellas que contienen el control positivo (CAT), ya sea inducidas o sin inducir, fue relativamente similar, no ocurre así en las que contienen *psif-Hm* (pRCE103), donde fue notoria la fuerte inhibición sobre el crecimiento celular. Esto comprueba el resultado obtenido anteriormente, donde se observó que la expresión de *PSIF-Hm crm2* entre la muestra inducida y sin inducir es relativamente similar.

La totalidad de estos resultados nos permiten deducir que al inducir la sobreexpresión de la proteína PSIF en un sistema eucariótico se obtiene un efecto negativo sobre la síntesis total de proteínas, lo cual corrobora su función como inhibidor de dicho proceso. La reducción en el crecimiento celular de la levadura es congruente con la expresión específica del gen sobre la regulación del ciclo celular.



**Figura 34. Crecimiento celular de la clona pRCE103.** Las barras moradas corresponden a la absorbancia de los cultivos que llevan únicamente el vector (CV). Las barras rosas muestran la absorbancia para los cultivos que contienen el plásmido pNMT1-CAT (control positivo). Como pRCE103, se indican los cultivos que contienen *psif-Hm* inducido (+) y sin inducir (-).

Se sabe que la sobreexpresión o eliminación de la función de *psif* en cultivos vegetales dispara programas de muerte celular (Llanderal, 2003). Probablemente en los cultivos de levadura ocurra lo mismo y no es detectada una inhibición total del crecimiento celular porque se está empleando un sistema heterólogo. Es decir, *S. pombe* puede no contener todos los elementos necesarios para la completa función de *PSIF-Hm*, un ejemplo de ello son las subunidades que conforman al eIF3; mientras que dicho factor en humanos está integrado por al menos diez subunidades, en *S. pombe* únicamente contiene cinco subunidades (Buró *et al.*, 2000). De esta manera, el efecto de la sobreexpresión de *PSIF-Hm* puede no ser contundente en la inhibición del crecimiento de levadura.

A pesar del efecto inhibitor de *PSIF-Hm* sobre el crecimiento de la levadura, cabe destacar que se obtienen niveles de expresión de la proteína suficientes para llevar a cabo su purificación. Dichos experimentos no son incluidos en este trabajo.

#### 5.11 FOSFORILACIÓN *in vitro* DE *PSIF-Hm crm11*

Uno de los objetivos de sobreexpresar a la proteína *PSIF-Hm* en algún cultivo celular residía en purificar, a partir de estos, a la proteína mediante cromatografía de afinidad. Una vez obtenida la fracción pura de la proteína *PSIF-Hm* se proseguirá con la inmunización de conejos para la obtención

del anticuerpo anti-*PSIF-Hm* que finalmente permitirá realizar un ensayo de fosforilación *in vivo* en células de mamífero. Sin embargo, debido a que los dos primeros experimentos aún se encuentran en proceso, se diseñó un ensayo de fosforilación *in vitro*, que de igual manera permitió determinar si la proteína *PSIF-Hm* sufre fosforilación.

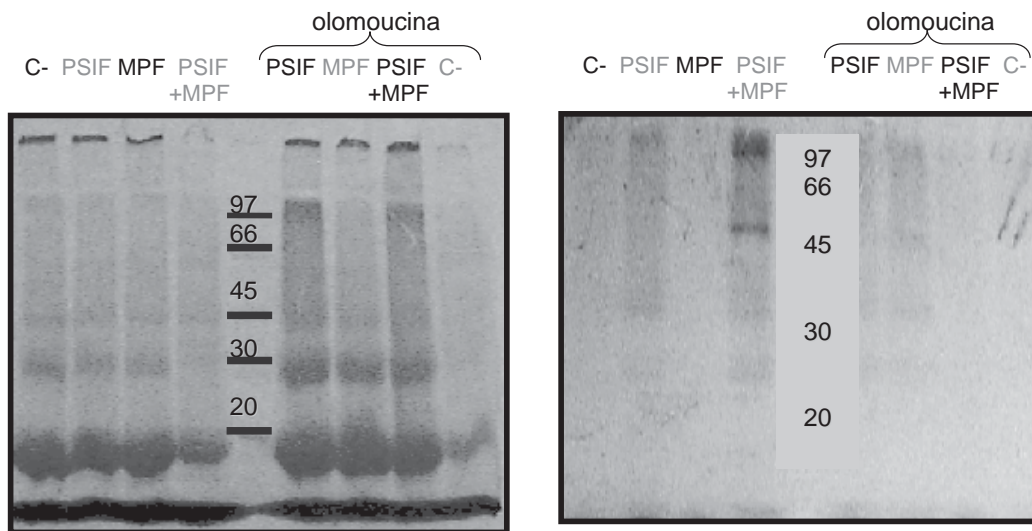
Mediante el análisis de la secuencia de la proteína *PSIF* bajo el programa ELM (Eukariotic Linear Motif) (Fig. 10) se obtuvieron varios sitios probables de fosforilación por distintas proteínas cinasas, entre las que se encuentra una cinasa dependiente de ciclina o CDK. De igual manera, se localizó una secuencia consenso de unión a ciclina, que como se sabe, es esencial para la fosforilación de la proteína blanco por una CDK. De manera notoria, el sitio probable de fosforilación por CDK, coincide con una secuencia consenso para la interacción proteína-proteína, cuyo requisito de interacción es que dicha secuencia sea fosforilada. Estos datos nos permiten sugerir que la proteína *PSIF* podría ser fosforilada por un complejo CDK/ciclina, promoviendo de esta manera su interacción con otras proteínas.

En los estudios que llevaron a determinar el efecto de *PSIF* sobre la síntesis de proteínas *in vivo* de la proteína *PSIF* (Fig. 8), fue notorio que aunque la expresión del gen se induce desde etapas tempranas del ciclo celular (fase S), éste no ejerce su actividad hasta la transición G2/M. De esta manera, existe la posibilidad de que la proteína requiera algún factor accesorio de activación, que no está presente en la fase S y que alcanza su pico de actividad máxima en la fase G2 tardía, como ocurre con el MPF o CDK1/ciclina B. De ser así, se esperaría que la proteína *PSIF* fuera fosforilada por el complejo CDK1/ciclina B, en el sitio identificado mediante su análisis bio-informático, y que esta fosforilación permitiera la interacción con el factor eIF3, logrando de esta manera la inhibición sobre la síntesis de proteínas.

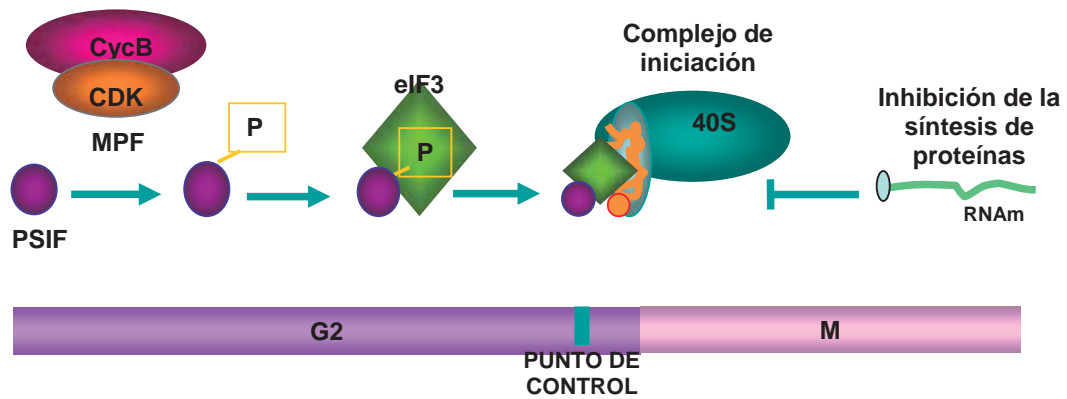
Para determinar si la proteína *PSIF-Hm crm11* es fosforilada de manera específica por el complejo CDK1/CycB, se diseñó el ensayo de fosforilación *in vitro* que se describirá a continuación: como primer paso, se llevó a cabo la transcripción *in vitro* del gen *psif-Hm crm11*; posteriormente, se realizó la síntesis protéica en extracto de reticulocitos a partir del transcrito obtenido. Una vez sintetizada la proteína de *PSIF-Hm crm11* en el extracto, se adicionó el complejo CDK1/CycB y ATP ( $\gamma$  P<sup>32</sup>), para la fosforilación. Para comprobar la fosforilación específica por el complejo CDK1/CycB, se repitió la reacción antes descrita, pero agregando olomoucina, la cual funciona como inhibidor competitivo específico del complejo. Las reacciones obtenidas se corrieron en un SDS-PAGE al 12% y posterior al secado del gel, se realizó una autorradiografía para el análisis de los datos por opacidad (Fig. 35). Analizando los datos obtenidos, se encontró que al adicionar el complejo CDK1/ciclina B (MPF) se obtuvo una banda a la altura esperada de entre 47 y 50 kDa equivalente a la proteína *PSIF-Hm crm11* fosforilada. Al agregar olomoucina, dicha fosforilación no tuvo lugar, lo que indica que la

fosforilación detectada sobre la proteína, es realizada de manera específica por el complejo. Estos resultados nos permiten concluir no solamente que la proteína *PSIF-Hm crm11* es fosforilada, sino que ésta fosforilación es realizada por el complejo CDK1/ciclina B, el cual es el regulador maestro en organismos eucariontes de la transición G2/M.

Cabe destacar que fue obtenida una segunda banda superior a los 97 kDa, que también desapareció ante el tratamiento con olomoucina. Esta banda podría corresponder a otra proteína que sufre fosforilación por el complejo CDK/ciclina B únicamente ante la presencia y fosforilación de *PSIF-Hm*. Otra posibilidad es que la fosforilación de *PSIF-Hm* por el MPF promueva su interacción con otras proteínas, esto, basado en la coincidencia del sitio de fosforilación por CDK con la secuencia de interacción proteína-proteína obtenida en el análisis bio-informático. Esta última hipótesis permite apuntar hacia su interacción con el factor eIF3 y la inhibición sobre la síntesis de proteínas previa a la entrada en mitosis (Fig. 36).



**Figura 36. Fosforilación *in vitro* de *PSIF-HM crm11*.** Las fotografías en la izquierda corresponden al SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en que se corrieron las muestras indicadas para el ensayo de fosforilación. A partir de este gel, se obtuvo la autorradiografía mostrada a la derecha. Los carriles centrales marcados con números equivalen al marcador de peso molecular en kDa. C-, control negativo; PSIF, reacción de fosforilación que contiene solo el sustrato o *PSIF-Hm crm11*; MPF, reacción de fosforilación que sólo lleva la enzima o MPF; PSIF+MPF, reacción de fosforilación que contiene tanto la enzima como el sustrato.



**Figura 37. Modelo hipotético sobre la función de *PSIF-Hm*.** Una vez sintetizada la proteína *PSIF* durante la fase G2 tardía, esta es fosforilada y por tanto activada por el complejo MPF. Dicha fosforilación permite su interacción con el factor eIF3 y de esta manera inhibe la síntesis de proteínas en el punto de control previo a mitosis, al impedir la interacción del complejo de iniciación (40S, complejo ternario-GTP, RNAt, eIF2-) con el RNAm durante el inicio de traducción.

## CONCLUSIÓN

- La proteína *PSIF-Hm crm11* es fosforilada *in vitro* por el complejo CDK/CycB (MPF).

#### IV. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews M.J., McInnes C., Kontopidis G., Innes L., Cowan A., Plater A. and Fischer PM. 2004. Design, synthesis, biological activity and structural analysis of cyclic peptide inhibitors targeting the substrate recruitment site of cyclin-dependent kinase complexes. *Org Biomol. Chem.* 2; 2735-2741.
- Asano K., Vornlocher H-P., Fitcher-Cook J.N., Merrick C.W., Hinnebush G.A. and Hershey W.B.J. 1997. Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *J. Biol. Chem.* 272; 27042-27052.
- Asano K., Kinzy T.G., Merrick W.C. and Hershey J.W. 1997. Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *J. Biol. Chem.* 272; 1101-1109.
- Balasubramanian K.M., McCollum D. and Surana U. 2000. Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J. Cell Sci.* 113; 1503-1513.
- Baumeister W., Walz J., Zuhl F and Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92; 367-380.
- Berlin A., Paoletti A., and Chang F. 2003. Mid2 stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J. Cell Biol.* 160; 1083-1092.
- Bird R.C., and Deinnocentes P. 2004. Characterization of the CDP-like/CTAS-1 binding site in the okadaic acid response element (OARE) of the human CDK1(p34cdc2) promoter. *Anticancer Res.* 24; 1469-1480.
- Bonneau A.M. and Sorenberg N. 1987. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J. Biol. Chem.* 262; 11134-11139.
- Daga R.R. and Jimenez J. 1999. Translational control of the Cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J. Cell Sci.* 112; 3137-3146
- De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T.S., Krols L., Terras F., Landrieu I., Van Der Schueren E., Maes S., Nauts S. and Inzé D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinases inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13; 1653-1667.
- den Boer B.G. and Murray J.A. 2000. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* 10; 245-250.

- do Carmo-Avides and Glover D.M. 1999. Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing center. *Science* 283; 1733-1735.
- Donaldson M.M., Taveres M.A., Hagan M.I., Nigg A.E. and Glover M.D. 2001. The mitotic roles of Polo-like kinase. *J. Cell Sci.* 114; 2357-2358.
- Ewen E.M. 2000. Where the cell cycle and histones meet. *Genes Dev.* 14; 2265-2270.
- Fan H. and Penman S. 1970. Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *J. Mol. Biol.* 50; 655-670.
- Farias E. A. 2002. Estudios *in vitro* acerca de la función molecular de la proteína PSIF. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Fournier N., Cerutti. B., Beltraminelli N., Salimova E. and Simanis V. 2001. Bypass of the requirement for cdc16pGAP function in *Schizosaccharomyces pombe* by mutation of the septation initiation network genes. *Arch. Microbiol.* 175; 62-69.
- Fry A.M., Mayor T., Meraldi P., Stierhof Y.D., Tanaka K., and Nigg E.A. 1998. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J. Cell Biol.* 141; 1563-1574.
- Giet R. and Prigent C. 1999. Aurora/lpl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* 112; 3591-3601.
- Giet R. and Glover D. 2001. *Drosophila* Aurora A kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152; 669-681.
- Glover D.M., Ohkura H., and Tavares A. 1996. Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage?. *J Cell Biol.* 135; 1681-1684.
- Golan A., Yudkovsky Y. and Hershko A. 2002. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.* 277; 552-557.
- Gould K.L. and Simanis V. 1997. The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev.* 11; 2939-2951.

- Haghghat A., Mader S., Pause A. and Sorenberg N. 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14; 5701-5709.
- Harbour J.W. and Dean D.C. 2000. The RB/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14: 2393-2409.
- Hernández S.P. 2005. Análisis estructural del gen y la proteína PSIF en Eucariontes Superiores. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Julio de 2005.
- Higareda A.E., Farias A., Llanderal J., Méndez A., Pardo M. A.,(2003), A cell cycle and protein syntesis-related factor required for G2/M transition; *Miami Nature Biotechnology Short Reports.* 14; 111.
- Hofmann K. and Bucher P. 1998. The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *TIBS.* 23; 204-205.
- Horak E.C., Luscombe M.N., Quian J., Bertone P., Piccirillo S., Gerstein M. and Snyder M. 2002. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 16: 3017-3033.
- Hoyt A.M. 2001. A new view of the spindle checkpoint. *J. Cell Biol.* 154; 909-911.
- Hsu J.Y., Sun Z.W., Li X., Reuben M., Tatchell K., Bishop D.K., Grushcow J.M., Brame C.J., Caldwell J.A., Hunt D.F., Lin R., Smith M.M., and Allis C.D. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 4; 279-291.
- Ito M. 2000. Factor controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* 43; 677-690.
- John P.C., Mews M. and Moore R. 2001. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in the cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma* 216; 119-142.
- Kaldis P. 1999. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 55; 284-296.
- Kandli M., Feige E., Chen A., Kilfin G., and Motro B. 2000. Isolation and characterization of two evolutionarily conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA. *Genomics* 68; 187-196.

- Kitazono A.A., Fitz G. N.J. and Kron J.S. 2001. Encyclopedia of Life Sciences: Cell cycle: regulation by cyclins. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. (www/els.net). 1-8.
- Kong M., Barnes A.E., Ollendorff V. and Donoghue D. 2000. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. EMBO J. 19; 1378-1388.
- Kramer E.R., Scheuringer N., Podtelejnikov A.V., Mann M., and Peters J.M. 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH. Mol. Biol. Cell. 5; 1555-1569.
- Krapp A., Kano E., and Simanis V. 2003. Mitotic hiperphosphorilation of the fission yeast SIN scaffold protein cdc11p is regulated by protein kinase cdc7p. Curr. Biol. 13; 168-172.
- Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. USA. 990pp.
- Lodish H, Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J. 2002. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana S.A. 4ª Edición. Madrid España. 1084pp.
- Llanderal M.J. 2003. Estudios *in vitro* de la función de la proteína PSIF en la división celular de *Nicotiana tabacum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Mader S. and Sorenberg N. 1995. Cap binding complexes and cellular growth control. Biochimie 77; 40-44.
- Marcotrigiano J., Gingras A.C., Sorenberg N., and Burley S.K. 1999. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. Mol. Cell 6; 707-716.
- Marks J. and Hyams J.S. 1985. Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. J. Cell Biol. 39; 27-32.
- Millar E.M. and Cross R.F. 2000. Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle?. J. Cell Sci. 114; 1811-1820.
- Mitra J. and Enders G.H. 2004. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. Oncogene 22; 3361-3367
- Mitra J., Dai C.Y., Somasundaram K., El-Deiry W.S., Satyamoorthy K., Herlyn M., and Enders G.H.. 1999. Induction of p21(WAF1/CIP1) and inhibition of Cdk2 mediated by the tumor suppressor p16(INK4a). Mol. Cell Biol. 19; 3916-3928.
- Morgan D.O. 1996. The dynamics of ccylin dependent kinase structure. Curr. Opin. Cell Biol. 8; 767-772.
- Morgan D.O. 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. Nat. Cell Biol. 1; E47-E53.

- Moroy T. and Geisen C. 2004. Cyclin E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 4; 1424-1439.
- Mulvihill D.P. and Hyams J.S. 2002. Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci.* 115; 3575-3586.
- Nelson D.M., Ye X., Hall C., Santos H., Ma T., Kao G.D., Yen T.J., Harper J.W., and Adams P.D.. 2002. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 2; 7459-7472.
- Nigg A. E. 1995. Cyclin-dependent protein kinases, key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17; 471-480.
- Nigg A.E. 1998. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10; 776-783.
- Nigg A. E. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2; 21-32.
- Novák B., Sible C.J. and Tyson J.J. 2002. Encyclopedia of life sciences: Check points in the cell cycle. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. ([www/els.net](http://www/els.net)). 1-8.
- Pause A., Belsham G.J., Gingras A.C., Donzé O., Lin T.A., Lawrence J.C. Jr and Sorenberg N. 1994. Insulin dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371; 762-767.
- Peter M., Le Peuch C., Labbe J.C., Meyer A.N., Donoghue D.J., and Doree M. 2002. Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep.* 6: 551-556.
- Peters J-M. 1999. Subunits and substrates of the Anaphase-Promoting Complex. *Exp. Cell Res.* 248: 339-349.
- Queralt E. and Igual J.C. 2004. Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitotic Cycle. *Genetics.* 168; 129-140.
- Rao M.S., Hirsch F., Wu B.C., Spohn W.H., Busch H. 1977. Comparative studies on the '5'-cap' and in vitro translational activity of cytoplasmic and nuclear poly A(+) RNA1. *Mol. Cell Biochem.* 15; 3-13.

- Rosseau D., Gingras A.C., Pause A. and Sorensberg N. 1996. The eIF4G-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13; 2415-20.
- Rossi V. and Varotto S. 2002. Insights into the G1/S transition in plants. *Planta*. 215; 345-356.
- Sagata N. 2002. Molecular biology. Untangling checkpoints. *Science* 298; 1905-1907.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawin K.E. and Mitchinson T.J. 1995. Mutation in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92; 4289-4293.
- Shaul O. Mironov V., Burssens S., Van Montagu M. and Inzé D. 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93; 4868-4872.
- Sherr J. C. and Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 15; 1501-1512.
- Shi, J., Feng, Y., Goulet, A.C., Vaillancourt, R.R., Sachs, N.A., Hershey, J.W. and Nelson, M.A. 2003. The p34cdc2-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278; 5062-5071.
- Simanis V. 2003. The mitotic exit and septation networks. *J. Cell Sci.* 116; 4261-4262.
- Simanis V. 2003. Events at the end of mitosis in budding and fission yeast. *J. Cell Sci.* 116; 4263-4275.
- [Stals H, and Inze D](#). 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6; 359-364.
- Stein S.G., van Wijnen J.A., Stein L.J., Lian B.J. and Owen A.T. 2002. *Encyclopedia of Life Sciences: Cell Cycle*. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. (www/els.net). 1-9.
- Suda M., Yamada S., Toda T., Miyakawa T. and Hirata D. 2000. Regulation of Wee1 kinase in response to protein synthesis inhibition. *FEBS lett.* 486; 305-309.
- Takizawa G.C. and Morgan D.O. 2000. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin B1-Cdk1 and Cdc25. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12; 658-665.
- Tarnowka M. and Baglioni C. (1979). Regulation of protein synthesis in mitotic HeLa cells. *J. Cell Physiol.* 99; 359-367.

- Uhlmann F., Wernic D., Poupart M.A., Koonin E.V. and Nasmyth K. 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103; 375-386.
- Uversax A. J., Woodbury L.E., Quang N.P., Paraz M., Blethrow D.J., Shah K., Shokat M.K. and Morgan O.D. 2003. Targets of the cyclin dependent kinase Cdk1. *Nature* 425; 859-864.
- Wolfe B. A. and Gould K.L. 2004. Inactivating Cdc25, mitotic style. *Cell Cycle* 5; 601-603.
- Zacharie W. 1999. Progression into and out of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11; 708-716.