



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**"CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y  
ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS  
TROYANOS"**

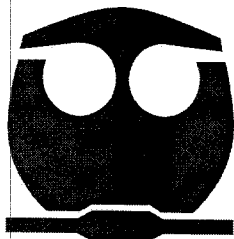
**TESIS**

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

PRESENTA:

**Q.F.B. JONATHAN GABRIEL  
RODRIGUEZ PLAZA**

**TUTOR: DR. GABRIEL DEL RIO GUERRA**



**MEXICO, D.F.**

**JULIO, 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel Del Río Guerra, en el laboratorio 102-Oriente, en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Jonathan Gabriel Rodríguez Plaza recibió una beca durante dos años por parte de CONACYT. Agradezco a la Dra. María Teresa Lara Ortíz por el apoyo técnico durante la elaboración de este trabajo. De igual manera agradezco al Dr. Alfredo Torres y a la Dra. Georgina Garza por el trabajo realizado en los estudios de cristalografía y dicroísmo circular respectivamente.

### *Dedicatorias*

*A mi papá, por ser un modelo a seguir y por sus sabios consejos, los cuales me han servido, me sirven y me servirán durante el resto de mi vida.*

*A mi mamá, por todo el cariño, el amor y la comprensión que me ha brindado en todo momento.*

*A mi hermano Lalo, por ser no solo mi hermano, sino mi mejor amigo, por escucharme y apoyarme en todo momento.*

*A mi novia Nallely, por estar a mi lado durante todo este tiempo, apoyándome y llenándome con su cariño y su amor.*

*A Gaby, la hermana de mi papá que se convirtió a la vez en mi hermana mayor, por escucharme y aconsejarme durante estos últimos años.*

*A mis abuelitos, por que sin ustedes nada de esto sería posible, gracias por todo su cariño.*

### *Agradecimientos*

*Al Dr. Gabriel Del Río Guerra, por guiarme en el camino de la ciencia, permitiéndome conocer lo maravillosa que puede ser la investigación.*

*A los miembros del jurado e integrantes de mi comité tutorial: Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Alejandro Sosa, Dr. Julio Moran, Dr. Salvador Uribe, Dr. Javier Plasencia, Dr. Roberto Coria y Dra. Irene Castaño, gracias por sus comentarios, críticas y sugerencias en la revisión de la tesis y/o en los tutorales, gracias a ellas mi trabajo fue más rico y completo y a la vez yo también mejore en muchos aspectos.*

*A la Dra. María Teresa Lara, por apoyarme en el trabajo del laboratorio, mejor maestra no podría tener.*

*Al Dr. Antonio Peña y a la Dra. Alicia González, así como a los miembros de sus laboratorios por permitirme hacer uso de sus equipos y asesorarme en su manejo.*

*Al Dr. Alfredo Torres y a la Dra. Georgina Garza, por el trabajo realizado en los estudios de cristalografía y dicroísmo circular respectivamente.*

*A mis compañeros en el laboratorio 102-Oriente: Pablo, Aurora, Raúl, Marco, Ricardo, Amanda, Sur y Roberto, gracias por su apoyo y consejos, gracias por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio.*

*A mis compañeros en el instituto: Sammy, Jenny, Vanessa, Itzel, Adriana, Fernando, Martha, Gissel, Cristian, Giovanni, Carlos y Daniela, gracias por brindarme su amistad.*

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>7</b>
1.1. DISEÑO DE FÁRMACOS.....	7
1.2. PÉPTIDOS CAZADOR-ASESINO.....	7
1.3. PÉPTIDOS TROYANOS.....	10
1.4. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	12
1.5. MUERTE CELULAR.....	14
1.5.1. Muerte apoptótica dependiente de caspasas.....	15
1.5.2. Muerte apoptótica independiente de caspasas.....	16
1.5.3. Muerte autofágica.....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIAL.....	18
3.1.1. Microorganismos.....	18
3.1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
3.1.1.2. <i>Candida glabrata</i> .....	18
3.1.1.3. <i>Pichia pastoris</i> .....	18
3.1.1.4. <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.1.2. Medios de Cultivo.....	19
3.1.2.1. Levaduras.....	19
3.1.2.1.1. Medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose).....	19
3.1.2.1.1. Medio YPLac (Yeast Extract Lactate).....	19
3.1.2.2. Bacterias.....	20
3.1.2.2.1. Medio LB (Luria-Bertoni).....	20
3.1.3. Antibióticos.....	20
3.1.3.1. Geneticona.....	20
3.1.3.2. Ampicilina.....	20
3.1.4. Péptidos.....	20
3.1.4.1. Síntesis.....	20
3.1.4.2. Secuencias y pesos moleculares de los péptidos.....	21
3.1.4.3. Preparación de las soluciones peptídicas.....	21
3.1.5. Equipos.....	22
3.2. MÉTODOS.....	22
3.2.1. Determinación de la actividad fungicida de los péptidos troyanos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATa.....	22
3.2.1.1. Precultivo de levaduras.....	22
3.2.1.1.1. Precultivo en medio YPD.....	22
3.2.1.1.2. Precultivo en medio YPLac.....	23
3.2.1.2. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MATa con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos en medio YPD.....	23
3.2.1.3. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MATa con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos en medio YPLac.....	23
3.2.1.4. UFC de <i>S. cerevisiae</i> MATa con agua, FER y PT1.....	23
3.2.1.5. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MATa <i>Δste4</i> con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.....	24
3.2.1.6. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MATa <i>Δsst2</i> con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.....	24
3.2.2. Determinación de la selectividad al receptor <i>Ste2</i> de la actividad de los péptidos.....	25

<i>troyanos</i> .....	25
3.2.2.1. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MAT <sub>alfa</sub> y MAT <sub>Aste2</sub> con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.....	25
3.2.2.2. Curvas de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> X-33 y <i>Candida glabrata</i> CGM99 con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.....	25
3.2.2.3. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> MAT <sub>a</sub> con los péptidos mutados del PT1 en placa de 100 pozos.....	25
3.2.3. <i>Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos troyanos</i> .....	26
3.2.3.1. Dilución de bacterias.....	26
3.2.3.2. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.....	26
3.2.4. <i>Determinación de las actividades de "cazador" y "asesino" en los péptidos troyanos, unificadas en un solo dominio</i> .....	26
3.2.4.1. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> DH10B en placas de 100 pozos con el FRAG1-6PT1 y FRAG1-6PT1 + FER.....	26
3.2.5. <i>Determinación de la estructura secundaria y terciaria de los péptidos troyanos</i> .....	27
3.2.5.1. Dicroísmo Circular.....	27
3.2.5.1.1. Péptidos troyanos en agua.....	27
3.2.5.1.2. Péptidos troyanos en metanol al 50%.....	27
3.2.5.1.3. Péptidos troyanos en Trifluoroetanol 1 al 50%.....	27
3.2.5.1.3. Interpretación de los datos.....	28
3.2.5.2. Cristalografía.....	28
3.2.5.2.1. Cristalización.....	28
3.2.5.2.2. Difracción de Rayos X.....	28
3.2.5.2.3. Análisis de los datos.....	29
3.2.6. <i>Análisis estadístico</i> .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE LOS PÉPTIDOS TROYANOS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> MAT <sub>A</sub> .....	30
4.2. DETERMINACIÓN DE LA SELECTIVIDAD AL RECEPTOR STE2 DE LA ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS TROYANOS.....	33
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PÉPTIDOS TROYANOS.....	36
4.4. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE "CAZADOR" Y "ASESINO" EN LOS PÉPTIDOS TROYANOS UNIFICADAS EN UN SOLO DOMINIO.....	37
4.5. DETERMINACIÓN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCARIA DE LOS PÉPTIDOS TROYANOS.....	37
4.5.1. <i>Dicroísmo Circular</i> .....	38
4.5.2. <i>Cristalografía</i> .....	40
<b>5. DISCUSION</b> .....	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>46</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>47</b>

## RESUMEN

El desarrollo de nuevos medicamentos es un área de gran interés para la industria farmacéutica y el área de la salud; sin embargo, no es una tarea sencilla, y se presentan una serie de complicaciones que se pueden resumir en el costo de descubrimiento de nuevos compuestos y los efectos secundarios asociados a la actividad de estos compuestos.

En particular, la estrategia a seguir para encontrar nuevos fármacos es el tamizaje de compuestos mediante "prueba y error", lo cuál implica una gran cantidad de recursos y tiempo. Mediante la metodología *in silico* desarrollada en nuestro laboratorio se lograron analizar 344,857,923 secuencias peptídicas, prediciendo que solo 30 de ellas serían tóxicas a mitocondrias y bacterias, siendo este un número más razonable de compuestos a probar experimentalmente en el laboratorio.

Para abordar el problema de la especificidad, como modelo de prueba se eligió a él par ligando-receptor: feromona alfa-receptor Ste2, los cuales son específicos de la levadura: *Saccharomyces cerevisiae* MATa. Mediante la adición de aminoácidos a la secuencia del péptido de la feromona alfa, esta obtuvo las propiedades fisicoquímicas características de ciertos antibacterianos; los cuales se han reportado que al ser expuestos a mitocondrias aisladas, causan su ruptura. De esta forma se generan péptidos capaces de reconocer una proteína específica en la superficie de la levadura, internalizarse en la célula y posteriormente causar muerte celular al dañar las mitocondrias de las células seleccionadas.

Por lo regular al generar un fármaco específico se llega a la inevitable necesidad de generar moléculas más grandes en las cuales poder ordenar múltiples sitios de unión, resultando en alteraciones en la inmunogenicidad de los compuestos, reducción en su permeabilidad e incremento en costos de manufactura. En nuestro diseño las funciones de reconocimiento y muerte están codificadas en un mismo dominio, reduciendo el tamaño requerido para acomodar las dos funciones en una misma molécula. Los compuestos con estas características los llamamos péptidos troyanos.

Se evaluó la actividad y la estructura de 2 nuevos compuestos antifúngicos, determinándose que los péptidos troyanos causan muerte celular a concentraciones micromolares, en *Saccharomyces cerevisiae* MATa mediante el reconocimiento del receptor Ste2, independientemente de la transducción de señal del receptor. Estos a su vez tienen efecto como agentes antibacterianos también a concentraciones micromolares. Los péptidos presentan las actividades de reconocimiento y muerte celular en un solo dominio funcional y tienen al menos dos conformaciones, una estructura no definida y una en forma de hélice alfa, dependiendo del tipo de solvente.

Este modelo nos permitirá en un futuro desarrollar compuestos con acción fungicida contra enfermedades causadas por hongos patógenos, ya que los medicamentos actuales pueden causar toxicidad debido a su baja especificidad por estos, además existen reportes que indican que los casos de resistencia a medicamentos antifúngicos están aumentando, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos medicamentos específicos para tratar a estos microorganismos.



## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Diseño de Fármacos

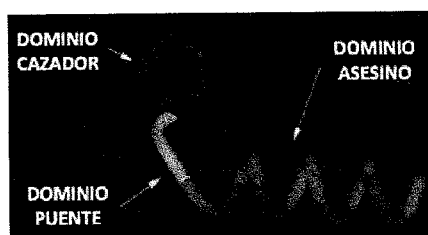
En 1908, hace poco más de un siglo, el Dr. Paul Ehrlich después de experimentar con cientos de compuestos basados en el arsénico, obtuvo un compuesto contra la sífilis: el Salvarsan, el cual no era tóxico para el paciente; a este tipo de compuestos con actividades específicas contra agentes patógenos les denominó: “balas mágicas”, postulando que: “debemos aprender a apuntar químicamente” (Ehrlich, 1910). Este postulado ha sido la meta durante mucho tiempo tanto de investigadores como de la industria farmacéutica: obtener un compuesto que haga blanco sobre una proteína específica de una célula determinada.

Sin embargo la obtención de compuestos específicos para un tipo de célula específica no es trivial. Ehrlich postuló: “usemos la síntesis química para modificar los materiales químicos iniciales en distintas formas y analicemos los productos resultantes por su capacidad para curar” (Ehrlich, 1910), pero esta no es una tarea sencilla; el mismo Ehrlich debió probar 605 compuestos antes de obtener el Salvarsan.

La estrategia de tamizaje ha sido usada desde entonces y hasta la fecha, pero además de la gran cantidad de tiempo y recursos necesarios, muchos compuestos que presentan propiedades terapéuticas, resultan muy grandes y complejos para ser sintetizados y/o modificarlos de forma económica. En resumen, no hay una manera efectiva de identificar o diseñar fármacos específicos. Recientemente se ha descrito una estrategia para obtener este tipo de fármacos por la Dra. Pasqualini y su grupo, los péptidos cazador-asesino.

### 1.2. Péptidos cazador-asesino.

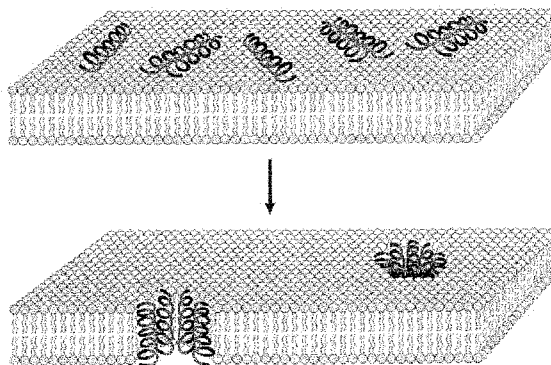
Los péptidos cazador-asesino son un grupo de péptidos quimera, los cuales se forman por una secuencia “cazador”, cuya función es de reconocimiento específico para las células eucariotas blanco y una secuencia “asesino” con las propiedades de un antibacteriano, pero que también es tóxica si se internaliza en células eucariotas, causando muerte celular por apoptosis mediante la alteración de la membrana mitocondrial; para unir a estos péptidos se utiliza una secuencia “puente” (Figura 1) (Ellerby y cols., 1999).



**Figura 1. Modelo de un péptido cazador-asesino.** Azul: dominio “cazador”, amarillo: dominio “puente”, rojo y verde: dominio “asesino”. (Ellerby y cols., 1999).

Las membranas citoplásmicas procariontas y las mitocondriales eucariotas tienen un potencial transmembranal parecido y tienen una gran cantidad de fosfolípidos aniónicos (Ellerby y cols., 1999); esta similitud se explica por la teoría endosimbiótica (Wallin, 1927). Alternativamente, las

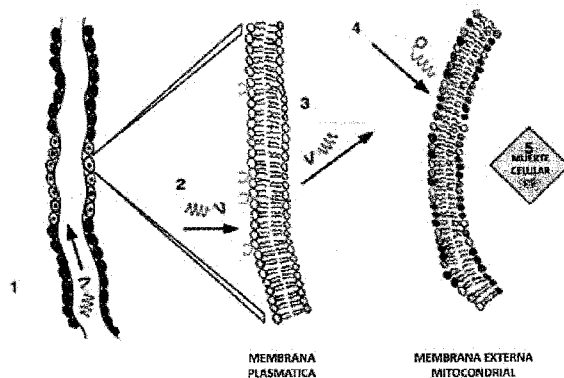
membranas plasmáticas eucariotas tienen potenciales de membrana diferentes y se forman de fosfolípidos con carga neutra (zwitteriónicos) (Ellerby y cols., 1999). Por estas razones, algunos péptidos antibacterianos tienden a romper preferencial las membranas de células procariotas y de las mitocondrias eucariotas sobre las membranas plasmáticas eucariotas (Yeaman y Yount, 2003). Algunos de los péptidos antibacterianos selectivos, se caracterizan por ser frecuentemente lineales, catiónicos, helicoidales alfa y anfipáticos; debido a estas propiedades se postula que estos péptidos son atraídos a las membranas mitocondriales/bacterianas a través de atracciones electrostáticas, quedando así la cara hidrofóbica de la hélice alfa frente a los lípidos (Plesniak y cols., 2004). Una vez en contacto con la membrana bacteriana, estos péptidos inducen la ruptura de la membrana, a través de la distorsión de la matriz lipídica y/o formando poros en la membrana causando la muerte de la bacteria (Figura 2) (Brogden, 2005).



Nature Reviews | Microbiology

**Figura 2. Modelo de "barril" para la muerte inducida por péptidos antimicrobianos.** En este modelo los péptidos unidos a la membrana se agregan e insertan en la bicapa de la membrana, de forma que las regiones hidrofóbicas se alinean con el núcleo lipídico y las regiones hidrofílicas formen la región interior del poro. Las regiones hidrofílicas del péptido se muestran en rojo, mientras que las regiones hidrofóbicas se muestran en azul. (Brogden, 2005).

En el caso de las mitocondrias, la formación de poros y/o la distorsión de la matriz lipídica de la membrana provoca la salida del citocromo C, activando la ruta de las caspasas e induciendo muerte celular por apoptosis. (Ellerby y cols., 1999). En consecuencia, los péptidos cazador-asesino no son tóxicos si se localizan en el exterior de las células eucariotas, ya que su blanco de acción es interno (la mitocondria). La capacidad que adquieren los péptidos cazador-asesino de ser tóxicos a una célula eucariote desde el exterior se debe a la secuencia "cazador" del péptido, la cual al ser reconocida media su internalización, (Figura 3) (Ellerby y cols., 2008).



**Figura 3. Mecanismo de acción de los péptidos cazador-asesino.** (1) Los péptidos cazador-asesino permanecen en circulación sin dañar a las células que no presentan el receptor específico (células azules). (2) al encontrar células que presentan el receptor (células amarillas) se unen a éste (semicírculos rojos), (3) entonces son internalizados y liberados al citosol de la célula blanco, (4) son atraídos por cargas a la mitocondria alterando su membrana, (5) llevando a la muerte celular de las células blanco. (Ellerby y cols., 2008).

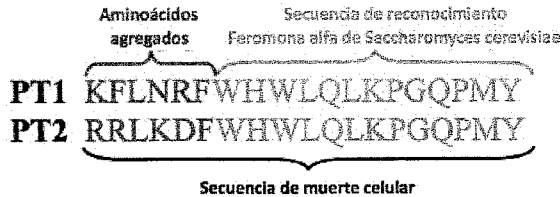
Los péptidos cazador-asesino ya han sido probados en modelos murinos contra: artritis (Gerlag y cols., 2001), tejido adiposo (Kolomin y cols., 2004), tejido angiogénico de mama (Ellerby y cols., 1999) y próstata (Arap y cols., 2002), resultando en la disminución de la artritis, la reducción de la grasa blanca y en la reducción de los tumores respectivamente; evitando el desarrollo del cáncer al matar de forma específica a las células angiogénicas que proveen de oxígeno y nutrientes a las células tumorales (Ellerby y cols., 1999).

Dada sus características, los péptidos cazador-asesino tienen un gran potencial para tratar distintos tipos de enfermedades. Sin embargo, el diseño presenta ciertas limitaciones ya que no todas las fusiones de “cazadores” con “asesinos” dan péptidos funcionales; esta limitación puede ser consecuencia de un impedimento estérico, que provoque que entre los mismos dominios bloqueen sus sitios activos impidiendo que lleven a cabo su función y/o puede deberse a efectos de cargas entre los dominios, en los cuales un dominio con cargas contrarias es atraído por las cargas opuestas del otro dominio debilitando o nulificando al bloquear el acceso a las cargas, causando una reducción o eliminando completamente la interacción del dominio de la cual depende su función (comunicación personal con M. Ellerby).

Con el fin de desarrollar fármacos célula-específicos que eviten estos problemas, se desarrolló en el laboratorio un método de diseño y detección de péptidos farmacológicos, en el cual las funciones de reconocimiento y muerte celular estuvieran un solo dominio funcional, evitando interacciones entre los dominios que anulen las funciones de el fármaco.

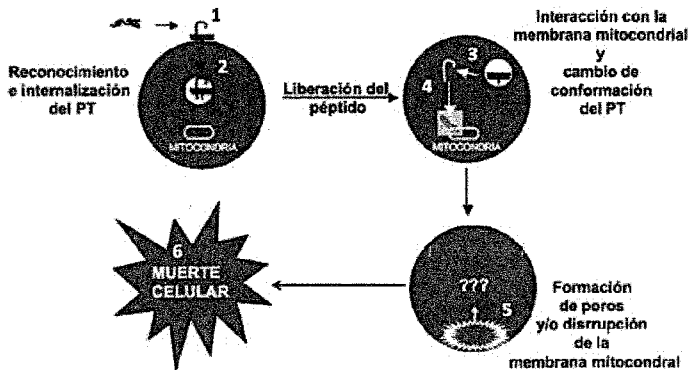
### 1.3. Péptidos troyanos

Denominamos de ésta forma a los péptidos que tienen las funciones “cazador” y “asesino” en un solo dominio funcional.



**Figura 4. Secuencias de los péptidos troyanos 1 y 2.** En rojo se presenta la secuencia de la feromona alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es la secuencia de reconocimiento celular; en verde se muestran los aminoácidos agregados a la feromona alfa en su extremo amino; en negro se indican las secuencias de aminoácidos que producen muerte celular en *S. cerevisiae* MATa.

Con el objetivo de fusionar las funciones de reconocimiento y de muerte en un mismo dominio funcional, se modificó la secuencia de un péptido “cazador” o de reconocimiento, agregándole aminoácidos para que obtenga las características fisicoquímicas de un “asesino” (Figura 4); de forma que al ser internalizado el péptido cause muerte en la célula eucariota al dañar a la mitocondria (Figura 5).



**Figura 5. Mecanismo de acción de los péptidos troyanos.** (1) El péptido troyano es reconocido de manera específica por el receptor, (2) el péptido y el receptor es internalizado al citoplasma de la célula, (3) el péptido es liberado al citoplasma, (4) el péptido es atraído por interacción de cargas a las mitocondrias de la célula, (5) el péptido se une a la membrana externa de la mitocondria, formando poros y/o rompiendo la membrana mitocondrial, (6) por último se liberan componentes mitocondriales que mandan señales de activación a alguno de los mecanismos de muerte celular.

En nuestro grupo ya se han desarrollado las herramientas de cómputo para predecir secuencias peptídicas con actividad antibacteriana y antimitocondrial, mediante el uso de un programa de computación denominado APAP (Approach for detecting Potencial Apoptotic Peptides) (del Rio y cols., 2001). APAP evalúa las siguientes propiedades fisicoquímicas características de los antibacterianos: el punto isoelectrico (PI), el cual es el pH al cual el péptido no tiene carga, el momento hidrofóbico (MH) estima la anfipaticidad del péptido y el AGADIR; este último estima la tendencia de los aminoácidos a formar una estructura secundaria de hélice alfa (Munoz y Serrano, 1995).

Se desarrolló un programa de computo, el cual generó los péptidos troyanos a partir de la secuencia de la feromona alfa; el programa agregó cada uno de los 20 aminoácidos en el extremo amino, carboxilo o en ambos, hasta agregar 6 aminoácidos, generando 344 857 923 secuencias, las cuales fueron analizadas con el programa APAP. El programa determinó que 30 péptidos presentaban las propiedades características de un péptido tóxico a bacterias y mitocondrias:  $10.8 < PI < 11.7$ ,  $0.4 < MH < 0.6$  y  $AGADIR < 10.0$  (Villalon y Del Rio, sometido a publicación).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de los 30 péptidos y se observó que se formaban 2 grupos debido a similitudes en sus residuos (Figura 6), se mandó a sintetizar un representante de cada grupo, los cuales se denominaron péptido troyano 1 y 2.



**Figura 6. Dendrograma del lineamiento de los 30 péptidos troyanos.** Se formaron dos grandes grupos en base a similitudes en las secuencias; del primer grupo (en rojo) se mando sintetizar el péptido troyano 1 con la secuencia KFLNRFWHLQLKPGQPMY, del segundo grupo(en verde) se sintetizó el péptido troyano 2 con la secuencia RRLKDFWHLQLKPGQPMY (Villalon y Del Rio, sometido a publicación).

Se determinó de manera cualitativa la actividad antimicrobiana de los péptidos troyanos 1 y 2 ante la bacteria *Escherichia coli* DH10B y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* MATA por el método de difusión en disco, observándose una disminución en el crecimiento en ambos microorganismos. Estos datos indicaban que el diseño había tenido éxito y que los péptidos causan muerte celular en las células (Villalon y Del Rio, datos en preparación).

Para probar la función biológica de los péptidos diseñados, se eligió como organismo modelo a la levadura: *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que es un organismo fácil de manejar en el laboratorio, existen muchas herramientas para su manejo y representa un modelo para el futuro desarrollo de antimicóticos.

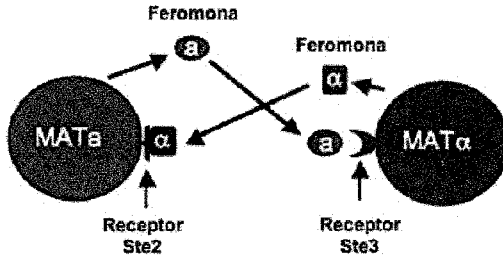
En la actualidad existen muchas enfermedades causadas por hongos, tales como las candidiasis, causadas por *Candida albicans* y *Candida glabrata* principalmente, las cuales afectan en su mayoría a pacientes inmunosuprimidos (Sanchez-Vargas y cols., 2005). Los medicamentos de uso común contra estas enfermedades por si solos causan toxicidad (daño renal y hepático) al paciente debido a su inespecificidad; además, en los últimos años estas levaduras han comenzado a desarrollar resistencia ante los agentes antimicóticos actuales como los azoles (Persidis, 1999), siendo necesario el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar estas enfermedades.

Por último *S. cerevisiae* es el modelo experimental eucariota más sencillo y de resultar eficaces los péptidos troyanos sobre éste, nos permitiría identificar el mecanismo por el cuál estos péptidos son internalizados. Este mecanismo, desconocido hasta la fecha, puede ser de gran utilidad en el estudio de los seres vivos y en facilitar la disponibilidad de fármacos en el interior de las células eucariontes.

#### 1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Conocida también como la levadura del pan y la cerveza, es una de las especies más antiguas que ha usado el hombre, teniendo reportes de elaboración de cerveza con ella en Sumeria y Babilonia en el año 6,000 A.C. No fue sino hasta la década de 1930 que se comenzó a usar como organismo experimental por ser uno de los organismos eucariotas más sencillos y fáciles de manipular en el laboratorio. Actualmente su genoma esta completamente secuenciado y se dispone de una gran cantidad de herramientas para su estudio.

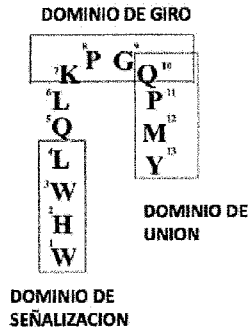
Habiendo elegido a *S. cerevisiae* como organismo modelo, el siguiente paso era encontrar la molécula de reconocimiento en la cual nos basaríamos para darle las propiedades de causar muerte celular; esta tenía que ser una molécula que solo fuera reconocida por *S. cerevisiae*. Dado que esta levadura puede reproducirse de forma sexual mediante feromonas (Figura 7) y ya que su ruta de respuesta está estudiada a detalle (Figura 9)(Bardwell, 2004) se eligió como "cazador" a la secuencia de la feromona alfa.



**Figura 7. Esquema de los dos tipos sexuales de *Saccharomyces cerevisiae*.** El sexo MAT $\alpha$  (en rojo) genera la feromona  $\alpha$ , la cual es reconocida de forma específica por el receptor Ste3 en la levadura del sexo contrario es decir MAT $\alpha$  (en azul) la cual secreta a su vez a la feromona alfa, que es reconocida por el receptor Ste2 en las células de MAT $\alpha$ .

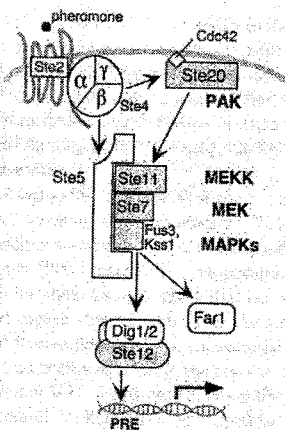
*S. cerevisiae* tiene dos sexos:  $\alpha$  y  $\alpha$ , siendo sus genotipos: MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$  respectivamente. Las células MAT $\alpha$  expresan el receptor Ste3 que reconoce a la feromona  $\alpha$  y a su vez secretan la feromona alfa, que es un péptido de trece residuos (secuencia WHWLQLKPGQPMY). Por su parte, las células MAT $\alpha$  expresan el receptor Ste2 que reconoce a la feromona alfa y secretan a la feromona  $\alpha$ , un péptido de 12 residuos (secuencia YIIKGVFWD PAC) que está covalentemente unida a un grupo lipídico (farnesil). Cuando una célula de levadura es estimulada por feromona secretada por una célula cercana del sexo opuesto, ocurren una serie de cambios fisiológicos en preparación para el apareamiento, los cuales incluyen cambios significativos en la expresión de cerca de 200 genes, arresto en la fase G1 del ciclo celular, crecimiento orientado hacia el par sexual y por último la fusión de las membranas plasmáticas de la pareja siguiendo la fusión del núcleo y poco después, la formación de una célula MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$  diploide (Naidier y Becker, 2004).

Mediante mutaciones sitio-dirigidas en la feromona alfa, se han determinado 3 dominios (Fig 8): uno de señalización del aminoácido 1 al 4, un dominio de giro del aminoácido 7 al 10 y uno de reconocimiento comprendiendo del aminoácido 10 al 13 (Abel y cols., 1998).



**Figura 8. Representación esquemática de los dominios de la feromona alfa.** El dominio de señalización comprende del aminoácido 1 al 4, el dominio de giro abarca los aminoácidos 7 al 10 y el dominio de unión se forma de los aminoácidos 10 al 13 (Abel y cols., 1998).

En esta conformación de gancho, la feromona alfa interactúa con el receptor Ste2, activando la ruta de señalización de arresto del ciclo celular (Figura 9). El extremo carboxilo interactúa con las hélices transmembranales II y VII del receptor, dando la función de unión, mientras que el extremo amino interactúa con un bolsillo de la proteína Ste2, estimulando a la proteína G, la cual se compone de tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  está acoplada al receptor Ste2, que es estimulada para intercambiar GDP por GTP. Este intercambio es regulado por la proteína Ste20, la cual acorta el tiempo de unión de la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP y acelera la reasociación con  $G\beta\gamma$ , regulando así la respuesta celular a la feromona alfa. También la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP libera al hetero-dímero  $G\beta\gamma$ . Por su parte, la subunidad  $\gamma$  une al complejo  $G\beta\gamma$  a la membrana, mientras que la subunidad  $\beta$  transmite una señal a 3 diferentes complejos efectores, los cuales eventualmente activan a la proteína MEK cinasa, la cual constituye el primer paso en la cascada de las MAP cinasas, que causan la detención del ciclo celular, así como la preparación para la cruce mediante la fusión con su sexo complementario (Lee y cols., 2001).



**Figura 9. Esquema de la ruta de respuesta de la feromona alfa.** La feromona alfa se une al receptor Ste2 acoplado a una proteína G heterotrimérica, compuesta por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; la subunidad  $\alpha$  en respuesta a la unión de la feromona alfa libera a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , la subunidad  $\beta$  transmite una señal a Ste20 y a Ste5, los cuales activan a las proteínas MEK cinasa, iniciando una cascada de MAP cinasas, las cuales mandan señales al núcleo para detener el ciclo celular, así como para preparar a la célula para la cruce mediante la fusión con su sexo complementario (Lee y cols., 2001).

Tener una secuencia de reconocimiento muy bien estudiada como es la feromona alfa, nos da herramientas muy valiosas para el estudio de los péptidos derivados de ella como se describirá más adelante en este trabajo.

### 1.5. Muerte Celular

La muerte es parte normal del ciclo de desarrollo y maduración de las células (Kanduc y cols., 2002). Los mecanismos que causan muerte celular han sido estudiados con diversos fines, incluyendo preguntas básicas sobre el desarrollo o bien para la generación de fármacos que produzcan muerte para el control de enfermedades.



La muerte celular se divide en dos tipos: la muerte celular programada, en la cual la célula juega un papel activo en su regulación y la necrosis donde que es una forma de muerte más caótica, la cual resulta por factores en el exterior de la célula (Castro-Obregon y cols., 2004). La muerte celular programada observada en levadura se puede clasificar en tres tipos principales: apoptótica dependiente de caspasas, apoptótica independiente de caspasas y autofágica

### 1.5.1. Muerte apoptótica dependiente de caspasas.

La apoptosis hasta hace algunos años era un proceso que se creía ausente en levaduras. Sin embargo, esta idea se ha descartado por la observación de fenotipos característicos de apoptosis en levadura (Madeo y cols., 1997), incluyendo ruptura de DNA, condensación de la cromatina, externalización de la fosfatidilcolina y liberación del citocromo c de la mitocondria (Ludovico y cols., 2002). Además, se caracterizaron las especies reactivas de oxígeno como reguladores centrales de la apoptosis y se descubrieron las proteínas: YCA1 (Madeo y cols., 2002) y la serin proteasa HtrA2/Omi (Fahrenkrog y cols., 2004), ortólogos de reguladores de la apoptosis en células de mamífero.

La apoptosis se puede inducir por una gran cantidad de factores (figura 10), los cuales se pueden dividir en externos e internos. Los factores externos pueden ser drogas o sustancias químicas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido acético, la aspirina, el azúcar, la sal, la feromona alfa o incluso el calor. Los factores internos pueden ser las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), el citocromo C, BAX, las metacaspasas y las serin proteasas. Los estímulos externos e internos se comunican con los reguladores centrales de la apoptosis que son las especies reactivas de oxígeno, las cuales interactúan con la metacaspasa Yca1, la cual manda la señal para la liberación del citocromo c, el cual activará al resto de la ruta de las metacaspasas iniciando así la apoptosis (Madeo y cols., 2004).

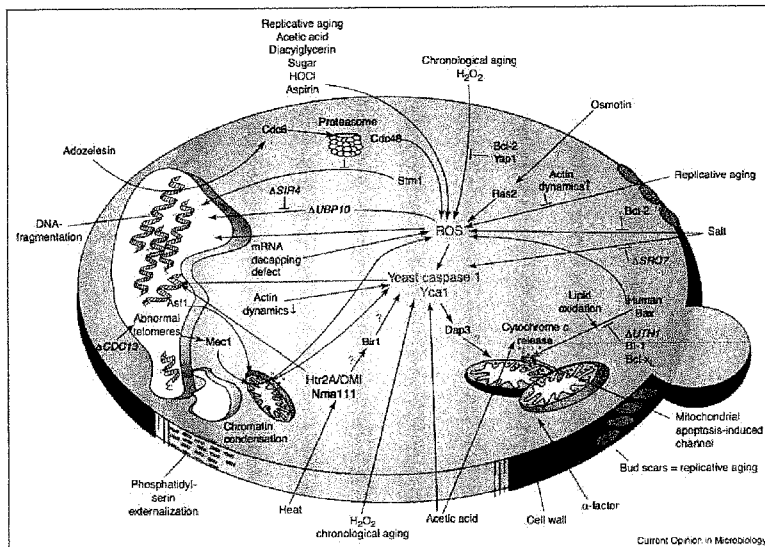
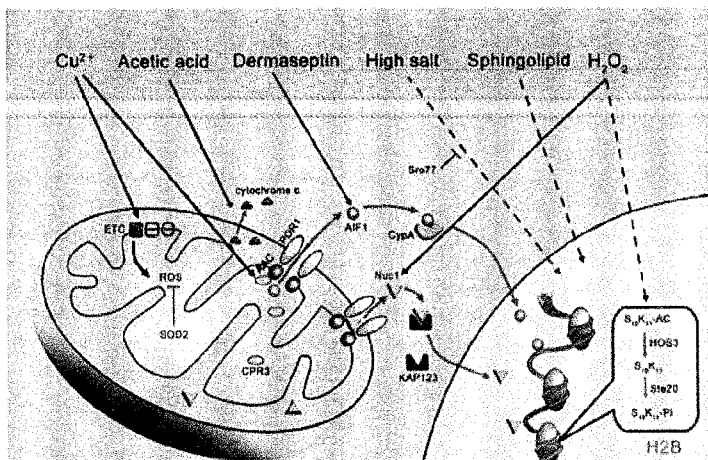


Figura 10. Apoptosis en levadura. Se muestran los principales componentes de la apoptosis en levaduras y su interdependencia. (Madeo y cols., 2004).

### 1.5.2. Muerte apoptótica independiente de caspasas.

En años recientes, se ha visto que la activación de las caspasas no es un proceso determinante para causar muerte por apoptosis, la cuál puede ser activada por otros mecanismos. Se han reportado como agentes causales externos: altas temperaturas, ácido acético, cloruro de sodio, estrés por cobre, esfingolípidos, la familia de péptidos antimicrobianos de las dermaseptinas y el  $H_2O_2$ . Mientras que como factores internos se han reportado a; el factor inductor de la apoptosis (AIF por sus siglas en inglés), la endonucleasa G y el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (figura 11) (Liang y cols., 2008).



**Figura 11. Apoptosis independiente de caspasas en levaduras.** Se muestran varios estímulos extra e intracelulares que inducen apoptosis independiente de caspasas. (Liang y cols., 2008)

### 1.5.3. Muerte autofágica.

La autofagia es un proceso indispensable para la homeostasis celular, mediante el cual se da el reciclaje de organelos y componentes celulares, sin embargo también es uno de los mecanismos de muerte celular programada (Eisenberg y cols., 2007). La muerte autofágica, se caracteriza por la presencia de autofagosomas o autolisosomas en la célula, en los cuales se pierde la regulación de la autofagia desencadenando en la muerte de la célula (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

En *S. cerevisiae* la muerte celular autofágica, está regulada por la proteína Uth1, la cual regula la respuesta al estrés oxidativo, así como por Aup1, la cual es una fosfatasa mitocondrial, este proceso de muerte se relaciona con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, la apertura de este poro incrementa la permeabilidad de la mitocondria, la cual reduce las concentraciones de ATP y  $Ca^{2+}$  e hinchamiento mitocondrial (Scherz-Shouval y Elazar, 2007).

En el presente trabajo se describe la caracterización de los primeros péptidos diseñados para inducir la muerte específicamente en *S. cerevisiae* MATa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

- Estudiar los eventos moleculares fundamentales de la acción de los péptidos Troyanos en *Saccharomyces cerevisiae* MATa.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la actividad fungicida de los péptidos troyanos en *Saccharomyces cerevisiae* MATa.
- Determinar la sensibilidad al receptor Ste2 de la actividad de los péptidos troyanos.
- Determinar la actividad antibacteriana de los péptidos troyanos.
- Determinar si los péptidos troyanos presentan las actividades de “cazador” y “asesino” en un solo dominio funcional.
- Determinar la estructura secundaria y terciaria de los péptidos troyanos.

o

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. Material.

##### 3.1.1. Microorganismos.

###### 3.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Fuente
W303-1A	MATa, <i>ade1</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i>	Dr. Roberto Coria Ortega Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México
W303-5A	MATa, <i>ade1</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , $\Delta$ <i>ste4::URA3</i>	Dr. Roberto Coria Ortega Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México
W303-29-6	MATa, <i>ade1</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , $\Delta$ <i>ssi2::URA3</i>	Dr. Roberto Coria Ortega Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

Cepa	Genotipo	Fuente
BY4741	MAT <i>a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks
YFL026W	MAT <i>a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, Δste2::KanMX</i>	Open Biosystems YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks
BY4742	MAT <i>alfa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems YKO MATalpha Strain Collection-Glycerol Stocks

###### 3.1.1.2. *Candida glabrata*

Cepa	Genotipo	Fuente
CGM99	<i>Ura3D::Tn903(G418<sup>R</sup>), Trp 1D</i>	Domergue R. et al. Nicotinic acid limitation regulates silencing of <i>Candida</i> adhesins during UTI. Science. (2005) May 6;308(5723). Pp:866-70.

###### 3.1.1.3. *Pichia pastoris*

Cepa	Genotipo	Fuente
X33	Wild type	Invitrogen

### 3.1.1.4. *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Fuente
DH10B	$\Delta(mrr-hsd\ RMS-mcrBC)\ mcrA\ recA1$	Sambrook J. and Russell D. W. Molecular Cloning. A laboratory manual. 3rd edition, CSHL PRESS U.S.A. (2001). Pp. A3.7.

### 3.1.2. Medios de Cultivo.

#### 3.1.2.1. Levaduras

##### 3.1.2.1.1. Medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose).

Se preparó medio de cultivo líquido y sólido (cajas de cultivo), con los siguientes componentes:

Compuestos	Líquido (100 mL)	Sólido (100 mL)
Extracto de levadura	1.0 g	1.0 g
Peptona	2.0 g	2.0 g
Glucosa	2.0 g	2.0 g
Agar	-----	1.4 g

El medio de cultivo fué esterilizado a 120° C por 20 minutos.

##### 3.1.2.1.1. Medio YPLac (Yeast Extract Lactate)

Se preparó medio de cultivo líquido y sólido (cajas de cultivo), con los siguientes componentes:

Compuestos	Líquido (100 mL)	Sólido (100 mL)
Extracto de levadura	1.0 g	1.0 g
Peptona	1.0 g	2.0 g
Ac. láctico	2.0 mL	2.0 g
Sulfato de amonio	0.12 g	0.12 g
Fosfato potásico	0.1 g	0.1 g
Agar	-----	1.4 g

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.5 con solución de NaOH (2M) y posteriormente esterilizado a 120° C por 20 minutos.

### 3.1.2.2. Bacterias.

#### 3.1.2.2.1. Medio LB (Luria-Bertoni).

Se preparó medio de cultivo líquido y sólido(cajas de cultivo), con los siguientes componentes:

Composición	Líquido (100 mL)	Sólido (100 mL)
Bacto triptona	1.0 g	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g	0.5 g
NaCl	0.5 g	0.5 g
Agar	-----	1.4 g

El medio de cultivo fué esterilizado a 120° C por 20 minutos.

### 3.1.3. Antibióticos.

#### 3.1.3.1. Geneticina

Se prepararon stocks de 10 mg/mL, los cuales se prepararon disolviendo 10 mg de Geneticina en 1 mL de agua estéril en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los stocks se mantuvieron a -20° C hasta el momento de usarse.

#### 3.1.3.2. Ampicilina.

Se prepararon stocks de 50 mg/mL, los cuales se prepararon disolviendo 50 mg de Ampicilina en 1 mL de agua estéril en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los stocks se mantuvieron a -20° C hasta el momento de usarse.

### 3.1.4. Péptidos

#### 3.1.4.1. Síntesis.

Los péptidos troyanos 1, 2 (PT1 y PT2), el Fragmento de los primeros 6 aminoácidos del PT1 (Frag1-6PT1), los péptidos troyanos 1 Mutantes 8, 11, 14, 15,19 (PT1M8, PT1M11, PT1M14, PT1M15, PT1M19) los cuales presentan sustituciones del aminoácido indicado por una Alanina, y el Péptido Troyano 2 Mutante 18 selenometionina (PT2M18SEM), se mandaron sintetizar a la compañía AnaSpec (USA), por el método de síntesis de péptidos en fase sólida, bajo los siguientes requerimientos:

N-Terminal: Amino libre.

C-Terminal: Acido carboxilo libre.

Pureza: >95%, ésta la determinó ANASPEC mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) analítica.

### 3.1.4.2. Secuencias y pesos moleculares de los péptidos.

Nombre	Secuencia	Peso molecular
PT1	KFLNRFHWLQLKPGQPMY	2490 g/mol
PT2	RRLKDFHWLQLKPGQPMY	2500 g/mol
Frag1-6PT1	KFLNRF	824 g/mol
PT1M8	KFLNREFAWLQLKPGQPMY	2424 g/mol
PT1M11	KFLNRFHWLALKPGQPMY	2433 g/mol
PT1M14	KFLNRFHWLQLKAGQPMY	2464 g/mol
PT1M15	KFLNRFHWLQLKPAQPMY	2504 g/mol
PT1M19	KFLNRFHWLQLKPGQPMA	2398 g/mol
PT1M18SEM	RRLKDFHWLQLKPGQP(SEM)Y	2547 g/mol

La Feromona Alfa (FER) por su parte fue comprada a Sigma-Aldrich, reportando las siguientes características:

Nombre	Secuencia	Peso molecular	Pureza
FER	HWLQLKPGQPMY	1684 g/mol	96 %

### 3.1.4.3. Preparación de las soluciones peptídicas.

Los PT1 y 2, el Frag1-6PT1, la FER y los PT1M8, 11, 14, 15, 19 y PT2M18SEM, fueron pesados y disueltos en agua estéril para dar las siguientes concentraciones, a partir de estas soluciones madre se realizaron diluciones para los diferentes experimentos realizados.

Péptido	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{M}$
PT1	2000	803
PT2	2000	800
Frag1-6PT1	2000	2427
FER	2000	1187
PT1M8	2000	825
PT1M11	2000	822
PT1M14	2000	811
PT1M15	2000	798
PT1M19	2000	834
PT2M18SEM	2000	785

### 3.1.5. Equipos.

Equipo	Marca	Accesorios
Spectro UV-VIS RS	LaboMed, Inc. (U.S.A.)	Celdas de poliestireno de 1 cm de paso de luz
Microplate Reader OY Growth Curves	Bioscreen C (Finlandia)	Microplacas de 100 pozos Software EZExperiment versión 1.26
Espectropolarimetro JASCO J-715	Jasco Inc. (U.S.A.)	PTC 348WI marca Peltier, para control de temperatura. Celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz

### 3.2. Métodos.

#### 3.2.1. Determinación de la actividad fungicida de los péptidos troyanos en *Saccharomyces cerevisiae* MATa

Con el fin de determinar si los péptidos troyanos diseñados mostraban efecto fungicida en *Saccharomyces cerevisiae* MATa, se realizaron los siguientes experimentos:

##### *Curvas de Crecimiento.*

Al medir la densidad óptica (D.O.) de cultivos de un microorganismo bajo diferentes condiciones a una determinada longitud de onda (600 nm para bacterias y levaduras), durante un periodo de tiempo dado, se puede hacer un comparativo y evaluar si existen cambios con respecto a los controles. En este caso se evaluará la acción de los péptidos troyanos sobre el crecimiento de bacterias y levaduras, usando como controles agua y la feromona alfa.

##### *Unidades Formadoras de Colonias (UFC)*

Mediante esta técnica se determina el número mínimo de células separables sobre un medio de agar sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible formada por decenas de millones de células descendientes. Para obtener las UFC se toma una muestra de un cultivo y se realizan diluciones para encontrar la dilución en la cual las colonias se puedan contabilizar sin problema (<100 colonias); las UFC se reportan en UFC/mL.

#### 3.2.1.1. Precultivo de levaduras.

##### 3.2.1.1.1. Precultivo en medio YPD.

Se inoculó una colonia de la cepa de la levadura a utilizar (Tabla 2), en 5 mL de medio YPD, el cual se incubó a 30° C por 24 horas, el cultivo se diluyó con medio YPD para ajustarlos a una densidad óptica (D.O.) de 0.12 en el espectrofotómetro: Spectro UV-VIS RS.



#### 3.2.1.1.2. Precultivo en medio YPLac.

Se inoculó una colonia de la cepa de la levadura a utilizar (Tabla 2), en 5 mL de medio YPLac, el cual se incubó a 30° C por 48 horas, el cultivo se diluyó con medio YPLac para ajustarlos a una densidad óptica (D.O.) de 0.12 en el espectrofotómetro: Spectro UV-VIS RS.

#### 3.2.1.2. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* MATa con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos en medio YPD.

Se preparó una suspensión de células de la levadura *S. cerevisiae* BY4741 como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50 µL de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido Troyano 1 y péptido Troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 4, 12 y 20 µM, llevando a 200µL con medio YPD.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

#### 3.2.1.3. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* MATa con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos en medio YPLac.

Se preparó una suspensión de células de la levadura *S. cerevisiae* W303-1A como se indica en 3.2.1.1.2.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50 µL de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido Troyano 1 y péptido Troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 4, 12 y 20 µM, llevando a 200µL con medio YPLac.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

#### 3.2.1.4. UFC de *S. cerevisiae* MATa con agua, FER y PT1.

Se preparó una suspensión de células de la levadura *S. cerevisiae* W303-1A como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50 µL de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa y péptido Troyano 1 de las soluciones stock para tener una concentración de 20 µM, llevando a 200µL con medio YPD.

Una vez colocados los reactivos, la placa se colocó en una cámara húmeda la cual se mantiene en una incubadora con agitación a 120 rpm a 30° C; se tomaron muestras de 5 µL de cada uno de los

pozos a las 0, 6, 12, 18 y 24 hrs. y se colocó cada muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL para realizar las siguientes diluciones con medio YPD:

Tiempo (h)	Dilución		
	Control	FER	PT1
0	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$
6	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-2}, 10^{-3}$
12	$10^{-4}$	$10^{-2}$	$10^{-2}, 10^{-4}$
18	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}, 10^{-4}$
24	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}, 10^{-4}$

Una vez obtenida la dilución requerida, se tomó una muestra de 5  $\mu$ L la cual se vertió sobre una caja de medio YPD y siendo distribuida uniformemente con perlas de vidrio; las cajas se incubaron a 30° C por 36 hrs. y se contaron las UFC de cada caja. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

### 3.2.1.5. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* MATA $\Delta$ ste4 con agua, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.

Se preparó una suspensión de células de la levadura *S. cerevisiae* W303-1A  $\Delta$ ste4 como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50  $\mu$ L de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido Troyano 1 y péptido Troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 4, 12 y 20  $\mu$ M, llevando a 200 $\mu$ L con medio YPD.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

### 3.2.1.6. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* MATA $\Delta$ Sst2 con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.

Se preparó una dilución de la levadura *S. cerevisiae* W303-1A  $\Delta$ Sst2 como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50  $\mu$ L de levadura, más los volúmenes necesarios de agua estéril(control), feromona alfa, péptido Troyano 1 y péptido Troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 4, 12 y 20  $\mu$ M, llevando a 200 $\mu$ L con medio YPD para cada una de las cepas.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

3.2.2. Determinación de la selectividad al receptor Ste2 de la actividad de los péptidos troyanos.

3.2.2.1. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$   $\Delta$ ste2 con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.

Se prepararon suspensiones de células de las levaduras *S. cerevisiae* BY4742 y BY4741  $\Delta$ ste2 como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50  $\mu$ L de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido troyano 1 y péptido troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 4, 12 y 20  $\mu$ M, llevando a 200 $\mu$ L con medio YPD para cada una de las cepas.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

3.2.2.2. Curvas de crecimiento de *Pichia pastoris* X-33 y *Candida glabrata* CGM99 con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.

Se prepararon suspensiones de células de las levaduras *Pichia pastoris* X-33 y *Candida glabrata* CGM99 como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50  $\mu$ L de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril y filtrada (control), feromona alfa, péptido troyano 1 y péptido troyano 2 de las soluciones stock para tener concentraciones de 2, 4, 8 y 20  $\mu$ M, llevando a 200 $\mu$ L con medio YPD para cada una de las cepas.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

3.2.2.3. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* MAT $\alpha$  con los péptidos mutados del PT1 en placa de 100 pozos.

Se preparó una suspensión de células de la levadura *S. cerevisiae* W303-1A como se indica en 3.2.1.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50  $\mu$ L de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido troyano 1, PT1M8, PT1M11, PT1M14, PT1M15, PT1M19 de las soluciones stock para tener concentraciones de 0.4, 2, 4 y 20  $\mu$ M, llevando a 200  $\mu$ L con medio YPD para cada una de las cepas.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment;

incubando a 30° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

### 3.2.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos troyanos.

Se realizaron los siguientes métodos para determinar si los péptidos troyanos tienen actividad antibacteriana:

#### 3.2.3.1. Dilución de bacterias.

Se inoculó una colonia de la cepa de la bacteria a utilizar (Tabla 1), en 5 mL de medio LB, usando para *E. coli DH10B* ampicilina como antibiótico a una concentración de 100 µg/mL, los cuales al día siguiente se diluyeron con medio LB con ampicilina a 100 µg/mL, para ajustarlos a una densidad óptica (D.O.) de 0.04 en el espectrofotómetro: Spectro UV-VIS RS.

#### 3.2.3.2. Curva de crecimiento de *E. coli* con control, FER, PT1 y PT2 en placa de 100 pozos.

Se preparó una suspensión de células de *E. coli DH10B*, como se indica en 3.2.3.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50 µL de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril (control), feromona alfa, péptido troyano 1 de las soluciones stock para tener concentraciones de 10, 20 y 24 µM, llevando a 200µL con medio LB<sub>AMP 100µg/mL</sub> para cada una de las cepas.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment; incubando a 37° C con agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

### 3.2.4. Determinación de las actividades de “cazador” y “asesino” en los péptidos troyanos, unificadas en un solo dominio.

#### 3.2.4.1. Curva de crecimiento de *E. coli DH10B* en placas de 100 pozos con el FRAG1-6PT1 y FRAG1-6PT1 + FER.

Se preparó una suspensión de células de la bacteria *E. coli DH10B* como se indica en 4.2.1.1.

Se colocaron en placas estériles de 100 pozos, 50 µL de células, más los volúmenes necesarios de agua estéril y filtrada (control), FRAG1-6PT1 a 110 µM y una mezcla equimolar de FRAG1-6PT1 + FER para una concentración combinada de 66 µM, llevando a 200µL con medio LB<sub>AMP 100µg/mL</sub>.

Una vez colocados los reactivos, se colocó la placa en el equipo Microplate Reader OY Growth Curves para medir la D.O. a 600 nm de los cultivos, haciendo uso del programa EZExperiment;

incubando a 37° C con una agitación alta constante y lecturas de la D.O. cada hora durante 24 horas. Nota: Se realizaron 4 mediciones por experimento.

### 3.2.5. Determinación de la estructura secundaria y terciaria de los péptidos troyanos.

#### 3.2.5.1. Dicroísmo Circular.

La espectroscopia de Dicroísmo Circular/(DC) es una forma de espectroscopia de absorción de luz que mide la diferencia en absorbancia de luz polarizada circularmente a la izquierda o la derecha de una sustancia. Si se analiza el espectro de DC entre las longitudes de onda del UV lejano (180 y 260 nm) se pueden analizar los diferentes tipos de estructura secundaria de una proteína, como son las hélices alfa, hojas beta y estructuras aleatorias. Las hélices alfa muestran un fuerte y característico espectro de DC lo que facilita su identificación. En el caso de los espectros de las hojas beta, el espectro es débil y depende de el largo y el giro de las hojas beta respectivas, siendo menos confiable su predicción; lo mismo aplica para los giros beta (Craighton, 1997). El desarrollo y análisis de los datos obtenidos de esta metodología se realizó en colaboración con la Dra. Georgina Garza Ramos (Facultad de Medicina/UNAM).

##### 3.2.5.1.1. Péptidos troyanos en agua.

Se pesó 1 mg de los péptidos troyanos 1 y 2 y fueron solubilizados en 1 mL de agua estéril, diluyéndose a una concentración de 0.3 mg/mL.

De las soluciones de 0.3 mg/mL se tomó 1 mL de cada una y se colocó dentro de una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, leyendo el espectro entre las longitudes de onda de 200 y 250 nm para cada péptido.

##### 3.2.5.1.2. Péptidos troyanos en metanol al 50%

Se pesó 1 mg de los péptidos troyanos 1 y 2 y fueron solubilizados en 1 mL de una solución 50% metanol, diluyéndose a una concentración de 0.3 mg/mL.

De las soluciones de 0.3 mg/mL se tomó 1 mL de cada una y se colocó dentro de una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, leyendo el espectro entre las longitudes de onda de 200 y 250 nm para cada péptido.

##### 3.2.5.1.3. Péptidos troyanos en Trifluoroetanol 1 al 50%

Se pesó 1 mg de los péptidos troyanos 1 y 2 y fueron solubilizados en 1 mL de una solución 50% TFE, diluyéndose a una concentración de 0.3 mg/mL.

De las soluciones de 0.3 mg/mL se tomó 1 mL de cada una y se colocó dentro de una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, leyendo el espectro entre las longitudes de onda de 200 y 250 nm para cada péptido.

### 3.2.5.1.3. Interpretación de los datos.

Se realizó análisis de convolución de los espectros obtenidos con los programas: CDSSTR, CONTII, SELCON 3 y CDNN, con el fin de determinar la estructura secundaria de los péptidos.

### 3.2.5.2. Cristalografía

En las formas cristalinas los átomos se hallan estructurados en redes caracterizadas por la repetición tridimensional de sus componentes. A la repetición de la estructura se le denomina célula o celda cristalina. Este ordenamiento es aprovechado en la interpretación de patrones de difracción de rayos X para obtener las estructuras de macromoléculas orgánicas como son las proteínas. Obteniendo cristales de las proteínas, estas son difractadas por rayos X, los cuales tienen una longitud de onda de alrededor de 0.1 nm (el diámetro de un átomo de hidrógeno). Si se dirige un haz estrecho y paralelo de rayos X a una muestra de proteína pura, la mayoría los atravesará, pero algunos serán dispersados por los átomos de la proteína, obteniéndose patrones de difracción de rayos X, los cuales son interpretados mediante el uso de computadoras las cuales ajustan los datos a posibles estructuras.

Al analizar el patrón de difracción se obtienen contornos de densidades electrónicas, las cuales se traducen en estructuras tridimensionales haciendo uso de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Mientras mayor resolución tengan los datos cristalográficos iniciales, más fiables serán los resultados del modelo atómico: a 0.5 nm se puede obtener un mapa de baja resolución y a 0.15 nm se puede obtener la localización de todos los átomos de la proteína, con excepción de los de hidrógeno.

#### 3.2.5.2.1. Cristalización.

En esta parte del proyecto se realizó una colaboración con el Dr. Alfredo Torres Larios (Instituto de Fisiología Celular/UNAM) siendo él responsable de obtener los cristales y las estructuras de los péptidos troyanos. Los péptidos troyanos 1 y 2 fueron solubilizados en agua a una concentración de 32 mg/mL. Se realizó un General Screen HT de la compañía Hampton Research, obteniéndose resultados en el tubo F3 a concentraciones combinadas de: sulfato de amonio 0.5 M, citrato de sodio 100 mM a pH 5.6 y sulfato de litio 1 M, cristalizando solamente a la temperatura de 30° C. Los cristales se ultra-congelaron a -173° C con una solución 2M de sulfato de litio.

El péptido troyano mutante PT2M18SEM fue solubilizado en agua y cristalizado bajo las mismas condiciones que los péptidos troyanos 1 y 2.

#### 3.2.5.2.2. Difracción de Rayos X.

Los cristales de tipo espacial trigonal, de los PT1, PT2 y PT2M18SEM fueron difractados en el Sincrotrón APS (Advanced Photon Source) de Chicago por el Dr Alfredo Torres Larios.

#### 3.2.5.2.3. Análisis de los datos.

Se realizó la estrategia del reemplazo molecular, haciendo uso de un modelo helicoidal para los PT1 y PT2, mientras que para el PT2M18SEM, se tomo como referencia el átomo de selenio del aminoácido seleno-metionina en la posición 18 para realizar el reemplazo.

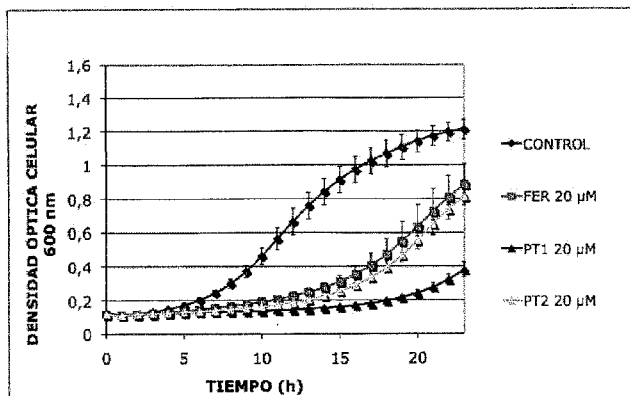
#### 3.2.6. Análisis estadístico

Todos los datos de las curvas de crecimiento se realizaron por duplicado, realizando una repetición del experimento, obteniendo 4 juegos de datos de cada experimento. A los datos se les obtuvo el promedio y la desviación estándar mediante el software: hoja de calculo Excel 2004 de Microsoft para Mac. Los datos graficados presentan barras de error con valores +/- una desviación estándar sobre el promedio de los resultados.

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. Determinación de la actividad fungicida de los péptidos troyanos en *Saccharomyces cerevisiae* MATa.

Para determinar la actividad antifúngica de los péptidos troyanos PT1 y PT2, se probaron estos a una concentración de 20  $\mu$ M contra la cepa MATa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, en medio respiratorio (YPLac)

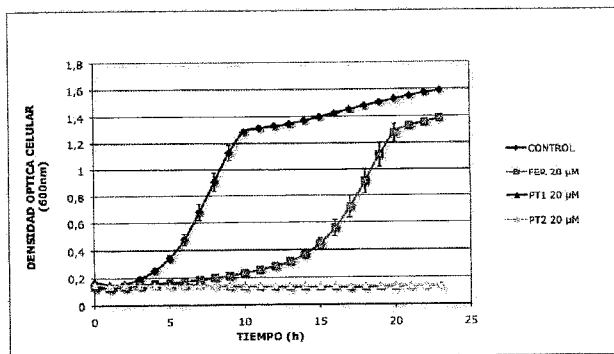


**Figura 12. Efecto antifúngico de los péptidos troyanos en *S. cerevisiae* MATa en medio respiratorio.** Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741 con agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20  $\mu$ M (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20  $\mu$ M (PT1-negro) y péptido troyano 2 a 20  $\mu$ M (PT2-naranja) en YPLac por 23 hrs.

La feromona alfa al ser reconocida por el receptor Ste2 de *S. cerevisiae* MATa activa una cascada de MAP cinasas que detienen el crecimiento de la levadura por algunas horas, preparándola para unirse con su contraparte sexual, si esto no ocurre, la levadura comienza a crecer. En la figura 12 al agregar la feromona alfa, se observó un retraso en el crecimiento de la levadura de 8 horas con respecto al control de agua, mientras que el péptido troyano 1 a una concentración de 20  $\mu$ M, con respecto al control y a la feromona alfa, detuvo el crecimiento por 16 hrs; en el caso del péptido troyano 2, a partir de la hora 11 se reinició el crecimiento, observándose que el péptido troyano 1 es más potente que el péptido troyano 2.

Los péptidos troyanos están diseñados para que una vez internalizados ataquen a la mitocondria, causando poros en ella, afectando a la respiración celular y posteriormente causando la muerte de la célula, sin embargo *S. cerevisiae*, también tiene un metabolismo fermentativo, el cuál le podría permitir vivir. Por esta razón, se probaron los péptidos troyanos contra *S. cerevisiae* en un medio fermentativo: YPD, el cuál le permitiría sobrevivir al daño en la mitocondria.

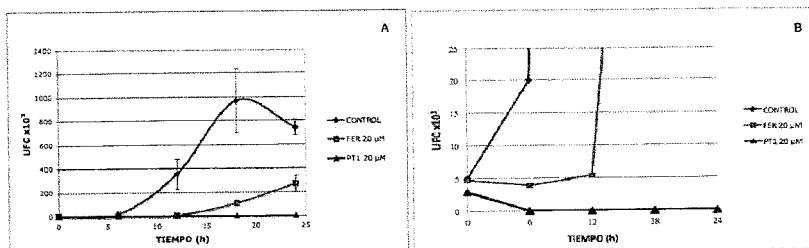




**Figura 13. Efecto antifúngico de los péptidos troyanos en *S. cerevisiae* MATA en medio fermentativo.**  
 Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741 con agua (CONTROL-azul), feromona alfa (FER-rojo), péptido troyano 1 (PT1-negro) y péptido troyano 2 (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs. A) 20 µM.

Como se puede apreciar en la figura 13, el que la levadura tenga la opción de fermentar para seguir viviendo no afecta la actividad de los péptidos troyanos, ya que estos siguen reduciendo el crecimiento celular, por lo que se puede pensar que no solo afectan la respiración celular, sino que también activan una señal para iniciar un proceso de muerte celular. Estos resultados muestran que los péptidos troyanos 1 y 2 tienen actividad antifúngica en *S. cerevisiae* MATA.

Debido a la adición de 6 aminoácidos en el extremo amino terminal para convertir a la feromona alfa en un péptido troyano, el efecto de la falta de crecimiento de los péptidos troyanos podría ser resultado de haber mejorado su estabilidad ante las enzimas de degradación o bien podría haber aumentado su afinidad por el receptor Ste2, por lo que su efecto duraría más y requeriría una menor concentración, en vez de deberse a la muerte de las células. Para descartar esta posibilidad, se realizó un estudio de viabilidad mediante Unidades Formadoras de Colonias (UFC).



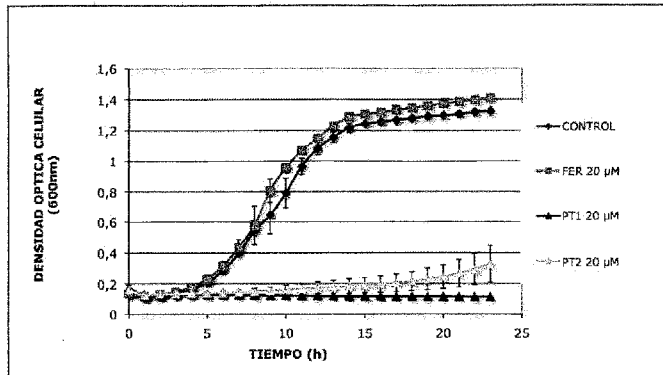
**Figura 14. Efecto fungicida de los péptidos troyanos en *Saccharomyces cerevisiae* MATA en YPD.**  
 Unidades Formadoras de Colonias ( $\times 10^3$ ) de *S. cerevisiae* W303-1A contra agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20 µM (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20 µM (PT1-negro) en YPD por 24 hrs.

- A) Gráfico completo mostrando en el eje Y de 0 a  $1400 \times 10^3$  UFC.  
 B) Subgráfico mostrando en el eje Y de 0 a  $25 \times 10^3$  UFC.

Se observa en la figura 14-A el mismo patrón observado en la curva de crecimiento de la figura 13, viéndose una disminución en el crecimiento de las células tratadas con el péptido troyano 1, lo mismo ocurre durante 12 horas con la feromona alfa; sin embargo el subgráfico de la figura 14-B, revela que mientras las células tratadas con levadura se mantienen viables, solo se detiene su

replicación, las células tratadas con el péptido reducen su viabilidad a 0, indicando que están muriendo, esto demuestra que los péptidos desarrollados se tratan de agentes fungicidas.

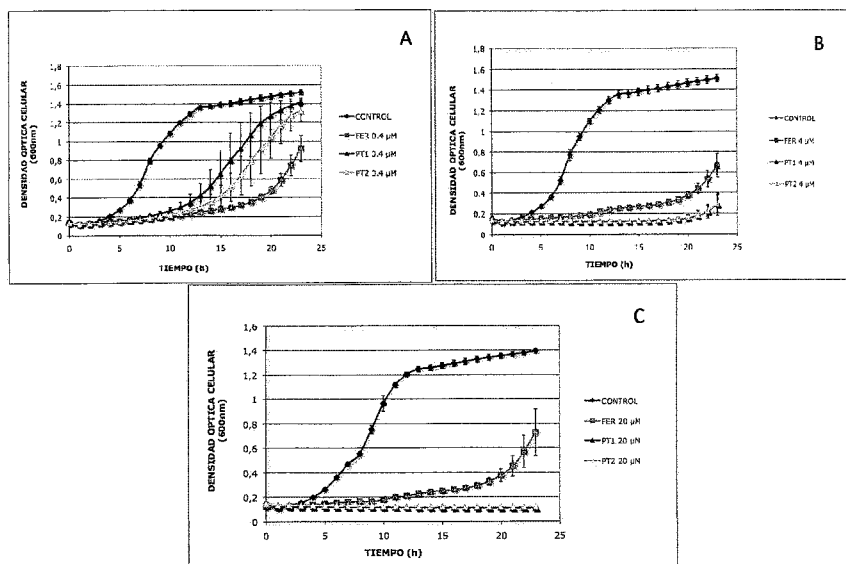
Sin embargo este efecto fungicida podía no deberse al diseño de los péptidos, sino a una acción de la feromona alfa, la cual se ha reportado que a altas concentraciones (59  $\mu\text{M}$ ) puede causar muerte celular programada en *S. cerevisiae*. Este proceso está mediado por el reconocimiento del receptor Ste2 y la activación de la cascada de las MAP cinasas, la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de citocromo C (Severin y Hyman, 2002). Con el fin de descartar esta posibilidad, se probaron los péptidos troyanos en una cepa de *S. cerevisiae* MATa que carece del gen Ste4, el cual codifica para la proteína  $\beta$  del heterotrimerio de la proteína G (ver figura 9); esta proteína es la encargada de iniciar los complejos que activan a las MAP cinasas; así en esta cepa carente de Ste4 no se detiene el crecimiento celular en presencia de la feromona alfa.



**Figura 15.** El mecanismo de muerte celular en *S. cerevisiae* MATa inducido por los péptidos troyanos es independiente de la transducción de señal mediada por Ste2. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1A  $\Delta\text{Ste4}$  con agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20  $\mu\text{M}$  (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20  $\mu\text{M}$  (PT1-negro) y péptido troyano 2 a 20  $\mu\text{M}$  (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs.

La cepa *S. cerevisiae* W303-1A  $\Delta\text{Ste4}$  al no presentar la subunidad  $\beta$  de la proteína G que da inicio a la cascada de señalización que puede desencadenar en la detención del crecimiento o en la muerte celular por la secuencia de la feromona alfa, no presenta ninguna de estas respuestas, sin embargo los péptidos troyanos continúan causando muerte a las células de *S. cerevisiae* MATa (figura 15), por lo tanto los péptidos troyanos actúan mediante un mecanismo independiente de los causados por la feromona alfa.

Con el fin de corroborar este dato, los péptidos se probaron contra la cepa W303-1A  $\Delta\text{Sst2}$ ; ya que el gen Sst2 codifica para una proteína que acorta el tiempo de unión de la subunidad  $\alpha$  al GTP, acelerando la reasociación con G $\beta\gamma$  y atenuando la respuesta celular a la feromona. Al eliminar el gen Sst2, la levadura es más sensible a la feromona alfa. Si los péptidos causan su efecto debido a la secuencia de la feromona alfa, entonces estos verán aumentada su actividad también a menores concentraciones en la cepa W303-1A  $\Delta\text{Sst2}$ .



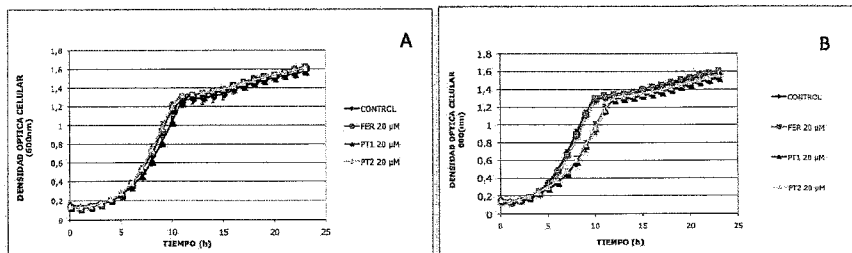
**Figura 16. Los péptidos troyanos son hipersensibles en una cepa de *S. cerevisiae* MAT $\alpha$  hipersensible a la feromona alfa.** Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1A  $\Delta$ Sst2 con agua (CONTROL-azul), feromona alfa (FER-rojo), péptido troyano 1 (PT1-negro) y péptido troyano 2 (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs. A) (0.4  $\mu$ M), B) (4  $\mu$ M), C) (20  $\mu$ M).

Los experimentos en la figura 16-A confirman que la feromona detiene el crecimiento a menores concentraciones (0.4  $\mu$ M) que cuando la proteína Sst2 esta presente <20 $\mu$ M (ver Fig. 13). En el caso de los péptidos troyanos también requieren de una menor concentración para causar el efecto fungicida, lo cual sugiere que el mecanismo de muerte si involucra la unión de Ste2 con la proteína G trimérica. Es importante destacar que las diferencias en crecimiento entre los péptidos troyanos y la feromona se reducen en este fondo genético, lo cual sugiere que la mayor parte de las células estarían arrestadas. Esta observación requiere una validación analizando unidades formadoras de colonias.

Además, algo que destaca en estas graficas, es el efecto de saturación de la feromona alfa: a 4  $\mu$ M (figura 16-B) y 20  $\mu$ M (figura 16-C) no hay diferencia en la magnitud del arresto causado por la feromona alfa ni los péptidos troyanos 1 y 2. Esto indica que los péptidos troyanos activan el arresto celular, pero en una fracción también actúan en este fondo genético de una manera independiente al arresto sobre las levaduras causando su muerte, tal y como se había demostrado en la figura 15.

#### 4.2. Determinación de la selectividad al receptor Ste2 de la actividad de los péptidos troyanos

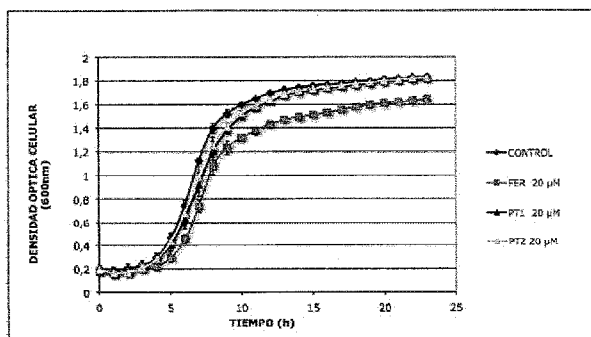
Con la finalidad de probar que la acción fungicida de los péptidos troyanos es mediada por el receptor Ste2, se probaron los péptidos en una cepa MAT $\alpha$  de *S. cerevisiae* la cual no expresa el receptor Ste2 y en una cepa MAT $\alpha$   $\Delta$ Ste2, la cual tiene el gen del receptor Ste2 deletado.



**Figura 17. El receptor Ste2 media la selectividad de los péptidos troyanos.** Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* A)BY4742 (*MATα*) y B)BY4741  $\Delta$ *ste2* (*MATA*) con agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20  $\mu$ M (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20  $\mu$ M (PT1-negro) y péptido troyano 2 a 20  $\mu$ M (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs.

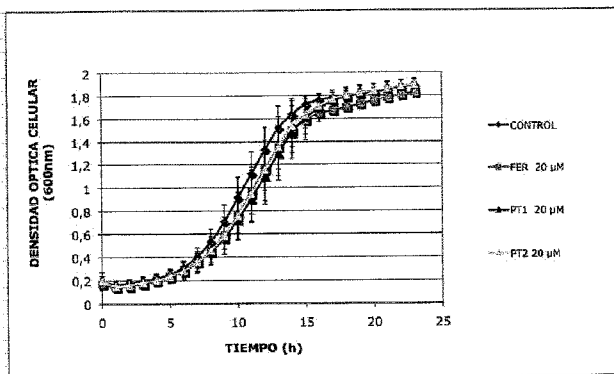
En la figura 17-A se observa que la cepa de *S. cerevisiae* BY4742 (*MATα*) la cual no expresa el receptor Ste2 específico para la feromona alfa, no es afectada por la feromona alfa y tampoco por los péptidos troyanos; de igual manera en la figura 17-B se puede ver que la cepa de *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ *ste2* (*MATA*) a la cual se le eliminó el gen que codifica para el receptor Ste2 tampoco es afectada por la feromona alfa y los péptidos troyanos, lo cual indica que la actividad fungicida de los péptidos depende de la expresión del receptor Ste2.

Para corroborar que los péptidos troyanos actúan específicamente sobre *S. cerevisiae* *MATA*, se probaron en dos levaduras diferentes: *Candida glabrata* y *Pichia pastoris*.



**Figura 18. Los péptidos troyanos no tienen efecto antifúngico en *C. glabrata*.** Curva de crecimiento de *C. glabrata* con agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20  $\mu$ M (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20  $\mu$ M (PT1-negro) y péptido troyano 2 a 20  $\mu$ M (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs.

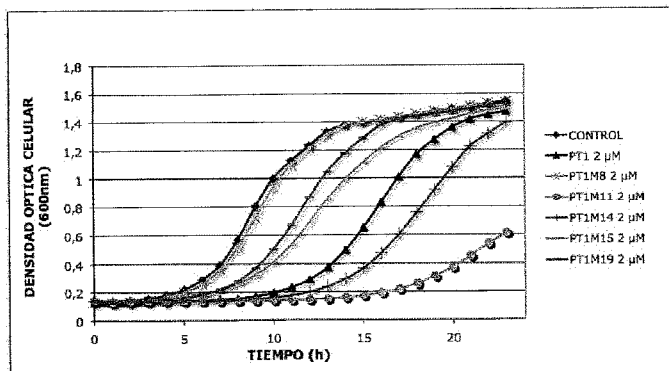
Ninguno de los dos péptidos troyanos o la feromona alfa causó variaciones en el crecimiento con respecto al control. Se ha reportado que *C. glabrata* expresa el receptor CgSte2 (Muller y cols., 2008), el cual es homólogo al Ste2 de *S. cerevisiae*, aunque no responde a la feromona alfa como se muestra en la figura 18.



**Figura 19. Los péptidos troyanos no tienen efecto antifúngico en *P. pastoris*.** Curva de crecimiento de *P. pastoris* con agua (CONTROL-azul), feromona alfa a 20  $\mu$ M (FER-rojo), péptido troyano 1 a 20  $\mu$ M (PT1-negro) y péptido troyano 2 a 20  $\mu$ M (PT2-naranja) en YPD por 23 hrs.

En *P. pastoris* no se han reportado genes homólogos a los involucrados en la reproducción sexual de *S. cerevisiae*. Acorde con esta noción, el crecimiento de *P. pastoris* no es afectado por la feromona alfa ni a los péptidos troyanos (véase figura 19). Estos resultados confirman el carácter de especificidad que tienen los péptidos troyanos para con *S. cerevisiae* MATa.

Con la finalidad de determinar si el modo de reconocimiento de los péptidos troyanos al receptor Ste2 es igual al de la feromona alfa, se sintetizaron 5 mutaciones en el péptido troyano 1 en la región de la feromona alfa. Estas mutaciones se han reportado que aumentan o disminuyen la actividad de la feromona alfa (Abel y cols., 1998). Se mandaron sintetizar 5 péptidos mutantes del péptido troyano 1 con sustituciones de alaninas en las posiciones 8, 11, 14, 15 y 19.



**Figura 20. Análisis del modo de reconocimiento de la secuencia de la feromona alfa en el PT1 al receptor Ste2.** Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1A (MATa) con agua (CONTROL-azul), péptido troyano 1 a 2  $\mu$ M (PT1-negro), PT1M8 a 2  $\mu$ M(rojo), PT1M11 a 2  $\mu$ M(verde), PT1M14 a 2  $\mu$ M(naranja), PT1M15 a 2  $\mu$ M(rosa) y PT1M19 a 2  $\mu$ M(morado) en YPD por 23 hrs.

Basándome en los resultados reportados por Abel, hago una comparativa con los resultados de este trabajo:

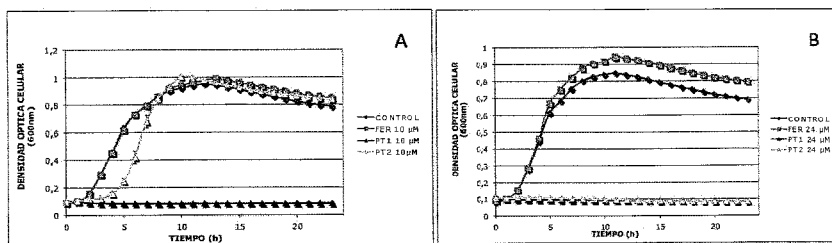
Péptido	Sustitución	Resultados (Abel y cols., 1998) Difusión en disco	Resultados de este trabajo Curva de crecimiento en medio líquido
PT1M8	His <sup>3</sup> Ala	+ 180%	+ 44%
PT1M11	Gln <sup>5</sup> Ala	- 30%	- 39%
PT1M14	Pro <sup>8</sup> Ala	- 24%	- 12%
PT1M15	Gly <sup>9</sup> Ala	+ 268%	+ 22%
PT1M19	Tyr <sup>13</sup> Ala	+ 202%	+ 28%

Los porcentajes presentados representan la cantidad de feromona o péptido extra o sobrante que es necesaria para causar un halo de inhibición de 15 mm como el causado por la feromona alfa nativa en el caso de los resultados de Abel y en el caso de los resultados de este trabajo, es la variación del efecto entre las graficas de los péptidos mutantes y el péptido troyano 1. Estas diferencias son importantes de considerar al comparar los resultados reportados.

Observamos que las mutaciones por alanina en el péptido troyano I reproducen los cambios de actividad reportados en las posiciones equivalentes de la feromona alfa. Cabe mencionar que se usaron cepas distintas en el estudio reportado por Abel (cepa supersensible a la feromona alfa), así como formas de medición diferentes como se mencionó arriba. Estos resultados indican que la interacción del péptido troyano con el receptor Ste2 es similar al de la feromona alfa.

#### 4.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos troyanos.

Los péptidos troyanos fueron determinados en base a propiedades fisicoquímicas propias de los péptidos antibacterianos lineales catiónicos alfa helicoidales. Para verificar la actividad antibacteriana de los péptidos troyanos, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias en la bacteria: *Escherichia coli* DH10B.



**Figura 21. Efecto antibacteriano de los péptidos troyanos sobre bacterias** Curva de crecimiento de *E. coli* DH10B con agua (CONTROL-azul), feromona alfa (FER-rojo), péptido troyano 1 (PT1-negro) y péptido troyano 2 (PT2-naranja) en LB<sub>AMP 100µg/mL</sub> por 23 hrs. A) 10µM, B) 24 µM.

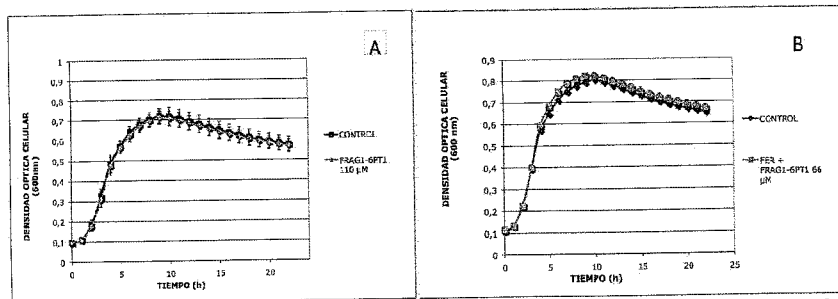
Los resultados muestran que la feromona alfa (la cual sus propiedades fisicoquímicas no la identifican como un antibacteriano; datos no mostrados) no afecta el crecimiento de la bacteria; mientras que el péptido troyano 1 si tiene actividad antibacteriana (figura 21-A) desde una concentración de 10 µM ya que impide el crecimiento de la bacteria por 24 horas, mientras que el péptido troyano 2 solo impide el crecimiento por un par de horas. Al aumentar la concentración a

24  $\mu\text{M}$ , el péptido troyano 2 aumenta su actividad impidiendo el crecimiento por 24 horas igualando el efecto del péptido troyano 1 (figura 21-B).

Se han reportado experimentos en los cuales se colocan péptidos antibacterianos en presencia de mitocondrias, dando como resultado el hinchamiento y posterior ruptura de las mitocondrias, esto se atribuye al pasado común entre bacterias y mitocondrias. De acuerdo a la teoría endosimbiótica la membrana mitocondrial tiene ciertas semejanzas con la membrana bacteriana lo cual permite que los péptidos diseñados con el fin de alterar ciertas membranas bacterianas también afecten a la mitocondrial. Nuestros resultados sugieren que los péptidos troyanos podrían tener actividad sobre mitocondrias.

#### 4.4. Determinación de las actividades de "cazador" y "asesino" en los péptidos troyanos unificadas en un solo dominio.

Con la finalidad de comprobar que la función antibacteriana se encuentra sobrelapada con la función de reconocimiento en un solo dominio funcional y no solo en los 6 aminoácidos agregados, se mandaron sintetizar los primeros 6 aminoácidos agregados del péptido troyano 1 y este fragmento se probó contra la bacteria *E. coli*.



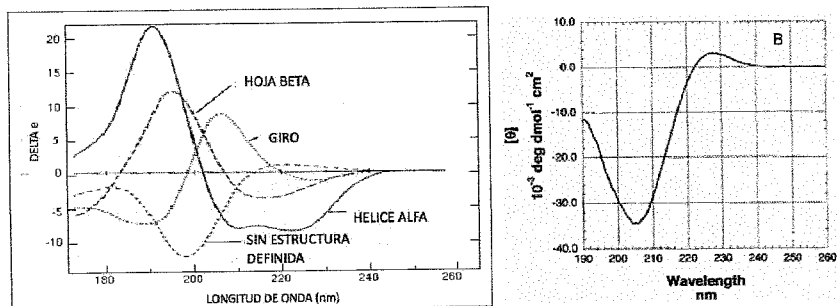
**Figura 22. Determinación del sobrelapamiento de la actividad "cazador" y "asesino" en un solo dominio.** Curva de crecimiento de *E. coli* DH10B con agua (CONTROL-azul). A) FRAG1-6PT1 60  $\mu\text{M}$ (verde). B) FER + FRAG1-6PT1 22  $\mu\text{M}$ (morado).

Al analizar la gráfica 22-A es evidente que el fragmento del péptido troyano 1 no causa efecto por si solo sobre la bacteria a diferencia del péptido completo(figura 231B). Debido a una posible interacción del fragmento con la secuencia de la feromona alfa, se probó una mezcla equimolar de ambas, observándose que esta no causa ningún efecto sobre la bacteria(ver figura 24-B). Por estos datos puedo concluir que la propiedad antibacteriana del péptido reside en la secuencia total de aminoácidos y no en los 6 primeros aminoácidos, sobrelapandose las actividades en un solo dominio funcional.

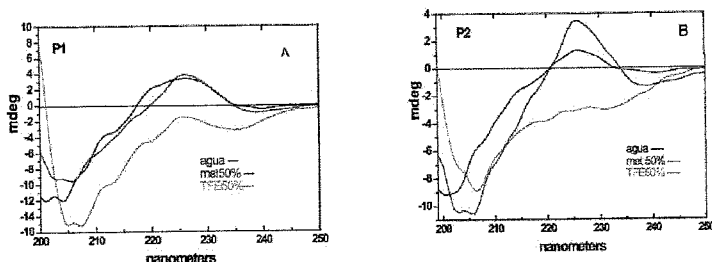
#### 4.5. Determinación la estructura secundaria y terciaria de los péptidos troyanos.

Dentro del estudio de las características de los péptidos troyanos, se están realizando estudios para determinar su estructura secundaria y terciaria, entre ellos estudios de Dicroísmo Circular y Cristalografía, aquí presento los resultados obtenidos.

#### 4.5.1. Dicroísmo Circular.



**Figura 23. Gráficos típicos que se obtienen de las estructuras secundarias que puede presentar una proteína. A) Hélice alfa, hoja beta, giros y estructuras no definidas. B) Hélice de poliprolinas (Rucker y cols., 2003).**



**Figura 24. Estructuras secundarias por dicroísmo circular de los péptidos troyanos. A) PT1 agua(negro) estructura no definida, metanol 50%(azul) posible hélice tipo poliprolinas y TFE 50%(rojo) posible hélice alfa. B) PT2 agua(negro) estructura no definida, metanol 50%(azul) posible hélice tipo poliprolinas y TFE 50%(rojo) posible hélice alfa.**

En la figura 24 A y B se muestran los resultados obtenidos de los péptidos troyanos 1 y 2 respectivamente, al disolverlos en diferentes solventes, en la dilución en agua se observa un espectro similar a una estructura no definida (ver Fig. 23-A), mientras que en metanol al 50%, al se observa la estructura de una hélice de poliprolinas (ver Fig. 23-B) con un pico positivo cercano a 229 y un fuerte pico negativo en 209; mientras que para el TFE, el cual ayuda a la formación de alfa hélices, se observan picos a 208 nm típicos de hélices alfa, siendo este mucho más claro en el péptido troyano 1 que en el 2, sin embargo no forma el pico característico de 220 nm (ver figura 23-A).

Por lo tanto los péptidos troyanos tienen distintas conformaciones dependiendo del medio que los rodea: en medio acuoso no presentan una estructura definida, pero tienden a formar estructuras helicoidales, mientras que en medios hidrofóbicos adoptan la conformación de hélices alfa, esto coincide con las estructuras reportadas por Saskiawan para la feromona alfa (Fig 25) (Saskiawan y cols., 2002): en su momento se les consideró random coils, sin embargo éstas presentaban un pico en 208nm aproximadamente y uno en 220 nm, coincidiendo con hélices alfa.



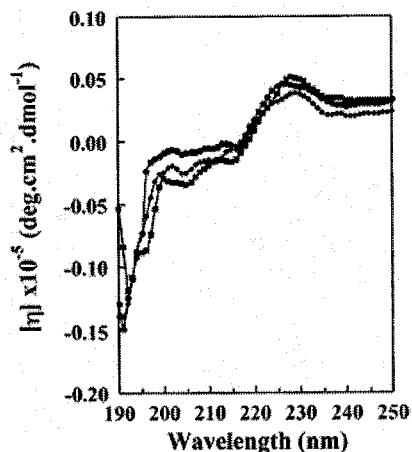


Figura 25. Dicroísmo Circular de la feromona alfa. En metanol 50% (●) hélice alfa (Saskiawan y cols., 2002)

De igual forma Higashijima determinó que la feromona alfa no tiene una estructura secundaria definida en solución acuosa como se observa en la figura 26-A, en presencia de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina-fosfatidilserina el espectro cambia sin dar un patrón típico de una estructura regular, sin embargo al estar en contacto con micelas de lisofosfatidilcolina el espectro muestra un patrón parecido al de una hélice de poliprolinas (Higashijima, 1983). Lo cual es coherente con las observaciones hechas por RMN que indican que en presencia de membranas de fosfolípidos con carga negativa, el amino terminal toma conformación de hélice alfa (figura 28-B) (Higashijima y cols., 1984), mientras que el resto se mantiene en una conformación no definida.

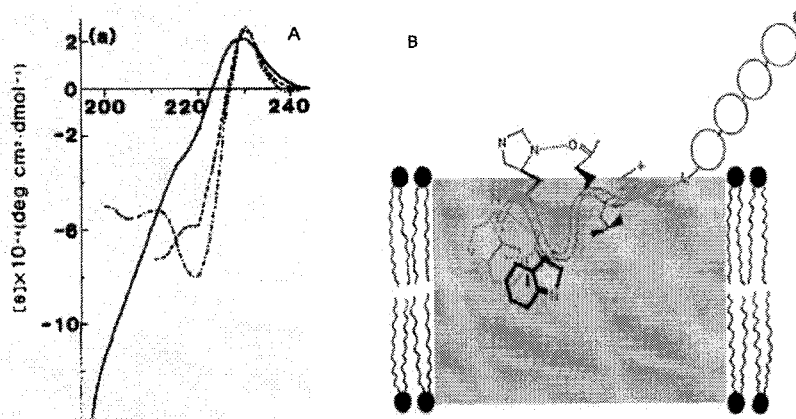


Figura 26. Estructura secundaria de la feromona alfa. A) Espectro de Dicroísmo Circular para la alfa-feromona en solución acuosa (—), en SUVs (---) y en presencia de fosfatidilcolina(· · ·) (Higashijima,

1983). B) Conformación y localización de la feromona alfa en una membrana de fosfatidil colina.(Wakamatsu y cols., 1987).

Dado que en el diseño se planteó que los péptidos tendrían estructura de hélice alfa en medios lipídicos, se espera que al disolverlo en SUCVS o fosfatidil colina, adquirirán una conformación helicoidal debido a su anfifilicidad, mostrando un espectro típico en la gráfica de dicroísmo circular.

#### 4.5.2. Cristalografía.

Para determinar tanto la estructura secundaria como la terciaria de los péptidos troyanos se recurrió a la cristalografía. Para este fin el Dr. Alfredo Torres Larios obtuvo cristales de los péptidos troyanos. A continuación muestro el primer juego de cristales obtenido.

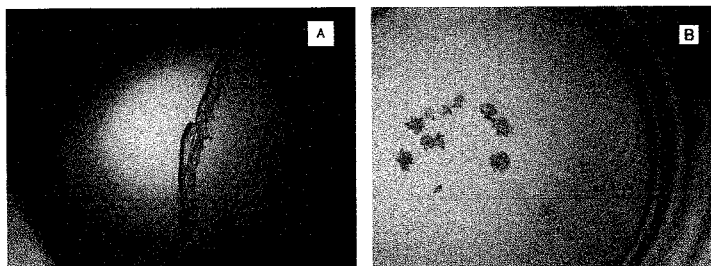


Figura 27. Cristales de los péptidos troyanos. A) PT1. B) PT2.

Estos cristales fueron difractados, pero los cristales del péptido troyano 1 se fundieron bajo los rayos X. No fue así el caso de los cristales del péptido troyano 2. Con este juego de datos se realizó la estrategia del reemplazo molecular, haciendo uso de un modelo helicoidal, sin embargo esta estrategia requiere un mayor grado de resolución, ya que de otra forma el reemplazo no es muy claro y las estructuras no ajustan.

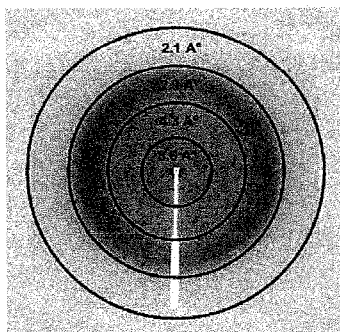
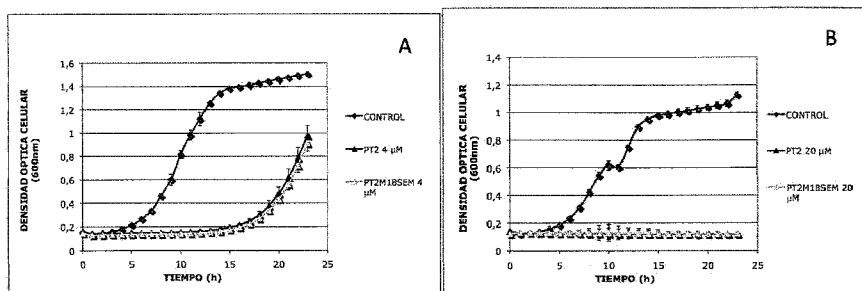


Figura 28. Patrón de difracción del péptido troyano PT2.

Aprovechando la metionina ubicada a dos posiciones del extremo carboxilo del péptido troyano 2, esta se sustituyo por una molécula de seleno-metionina, generando el péptido PT2M18SEM. Gracias al selenio que tiene anexo, este se puede usar como un marcador de densidad electrónica

dentro del patrón de difracción, lo cual permitirá realizar un mejor reemplazo helicoidal, permitiendo obtener la estructura secundaria de los péptidos troyanos.

Antes de comenzar con la cristalización del PTM18SEM, se realizaron curvas de crecimiento en *S. cerevisiae* agregando este péptido con la finalidad de comparar la actividad de este péptido con PT2, obteniendo los siguientes resultados.



**Figura 29. Comparación de efecto antifúngico entre los péptidos troyanos: PT2 y PT2M18SEM.** Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* W303-1A (MATa) contra agua (CONTROL-azul), péptido troyano2 (PT2-negro) y PT2M18SEM (naranja) A) 4 µM. B) 20 µM.

Como se puede observar en las figuras 29 A y B, tanto el efecto de muerte celular de *S. cerevisiae* MATa como la magnitud del efecto a la misma concentración se mantiene en el PT2M18SEM con respecto al péptido troyano 2 del cual se originó, lo cual es indicativo que el selenio no modifica las propiedades del péptido. Una vez con estos datos se comenzó el proceso de cristalización del péptido, obteniéndose los cristales que muestro en la figura 30.



**Figura 30. Cristales del péptido troyano PT2M18SEM.**

Estos cristales fueron difractados, obteniéndose una resolución de 3.2 Å. Con el patrón de difracción obtenido se realizó una búsqueda de los átomos de Selenio, para realizar el reemplazo de la estructura del péptido. Para la resolución de la estructura se hizo uso del programa Shelx y con el programa XDS se procesaron los datos para refinar el modelo. El Profesor George M. Sheldrick de la Universidad de Göttingen en Alemania apoyó al Dr. Alfredo Torres Larios en la resolución del cristal, llegando a una resolución de 3.5 Å, obteniendo una estructura helicoidal lineal (ver figura 31) lo cual concuerda con el diseño de los péptidos y los resultados de Dicroísmo Circular.



**Figura 31. Estructura del péptido troyano PT2M18SEM.**  
El péptido mutante del péptido troyano 2 presenta estructura de hélice alfa.

## 5. DISCUSION

El desarrollo de nuevos medicamentos es un área de gran interés para la industria farmacéutica y el área de la salud; sin embargo, no es una tarea sencilla, y se presentan una serie de complicaciones que se pueden resumir en el costo de descubrimiento de nuevos compuestos y los efectos secundarios asociados a la actividad de estos compuestos.

En particular, la estrategia a seguir para encontrar nuevos fármacos es el tamizaje de compuestos mediante "prueba y error", lo cuál implica una gran cantidad de recursos y tiempo. Mediante la metodología *in silico* desarrollada en nuestro laboratorio se lograron analizar 344,857,923 secuencias peptídicas, prediciendo que solo 30 de ellas serían tóxicas a mitocondrias y bacterias, siendo este un número más razonable de compuestos a probar experimentalmente en el laboratorio.

Otro de los principales problemas es la especificidad celular de los medicamentos, ya que estos en ocasiones no solo actúan sobre las células que causan la enfermedad o sobre las células enfermas, sino que también tienen efecto sobre células sanas, dando lugar a efectos secundarios indeseables. El diseño *in silico* desarrollado en nuestro grupo de trabajo nos ha permitido identificar péptidos que presentan actividad farmacológica específica para cierto tipo de células, lo cual evita en gran medida posibles efectos secundarios sobre otros tipos de células.

Los péptidos antifúngicos desarrollados en nuestro grupo, péptidos troyanos, actúan causando muerte sobre un tipo específico de levadura: *Saccharomyces cerevisiae* *MATa*. Nuestros péptidos troyanos están basados en la secuencia de la feromona alfa, la cual es reconocida de forma específica por el receptor Ste2 (Bardwell, 2004) y esto determina la especificidad por las células reconocidas por nuestros péptidos. De hecho, la ausencia del receptor Ste2 evita la acción de los péptidos troyanos en la levadura.

Existen reportes que muestran que la feromona alfa puede causar muerte celular a un 30% de las células de *S. cerevisiae* *MATa* a altas concentraciones (59  $\mu$ M) (Severin y Hyman, 2002). Este proceso se da mediante la activación de una cascada de señalización iniciada por las subunidades de la proteína G acoplada al receptor Ste2, lo cuál podría sugerir que la muerte causada por los péptidos troyanos en realidad la produce la secuencia de la feromona alfa. Sin embargo, al probar los péptidos con una cepa la cual tiene la vía de señalización interrumpida en la subunidad  $\beta$  de la proteína G, se sigue observando el mismo efecto de muerte celular. Esto indica que el efecto de muerte de los péptidos troyanos es independiente de la señal de transducción de la feromona alfa.

La feromona alfa fue transformada en péptido troyano al agregarle seis aminoácidos, ya que con estos adquirió las propiedades fisicoquímicas para ser tóxico a bacterias y a las células de levadura al estar dentro y reconocer sus mitocondrias. Este proceso de internalización celular se basa en que la feromona alfa de forma natural es internalizada por endocitosis a la célula, junto con el receptor (Toshima y cols., 2006).

Los datos de éste trabajo muestran que los péptidos troyanos causan muerte en las células de *S. cerevisiae* *MATa* a concentraciones micromolares (20 $\mu$ M). El mecanismo mediante el cual se causa la muerte de la levadura por los péptidos troyanos aun es desconocido, sin embargo ya que los péptidos están diseñados para afectar a la mitocondria, esto nos hace pensar en vías de muerte que involucran a la mitocondria como son: la apoptosis dependiente de caspasas (Mazzoni y Falcone, 2008), apoptosis independiente de caspasas (Liang y cols., 2008) o la muerte autofágica (Tsujimoto y Shimizu, 2005).

Los valores de punto isoeléctrico y momento hidrofóbico usados para el diseño de los péptidos troyanos coinciden con péptidos que presentan actividad antibacteriana selectiva (Wieprecht y cols., 1997) (Dathe y cols., 2001), por lo cual se esperaba que los péptidos troyanos presentaran actividad antibacteriana. De hecho, al probarlos ante la bacteria *Escherichia coli* estos presentaron actividad antibacteriana a concentraciones micromolares (24  $\mu$ M). Dadas las similitudes filogenéticas, estructurales y funcionales de las membranas de las bacterias y las mitocondrias (Yeaman y Yount, 2003) y el hecho que los péptidos troyanos actúan sobre bacterias, es factible hipotetizar que el blanco intracelular de estos es la mitocondria.

Dentro de las propiedades fisicoquímicas evaluadas para los péptidos, se encuentra el parámetro AGADIR, el cuál indica la tendencia a formar hélices alfa, las cuales ya se han reportado como conformaciones estructurales de algunos péptidos antibacterianos (Brogden, 2005) (Zasloff, 1987). Mediante estudios de dicroísmo circular y cristalografía se determinó que los péptidos presentan una conformación de hélice alfa, lo cuál apoya el mecanismo de daño a la mitocondria mediante la unión de los péptidos helicoidales anfifílicos a la membrana mitocondrial, induciendo la formación de poros y posiblemente rompiendo la membrana mitocondrial desencadenando la muerte celular de *Saccharomyces cerevisiae* MATa

¿Cómo llega el péptido a la mitocondria? La respuesta a esta pregunta aun la desconocemos; en particular, en el caso de la feromona alfa al ser endocitada es degradada por enzimas lisosomales (Roth y cols., 1998), lo cuál sugiere que los péptidos troyanos de alguna manera se liberan de la vesícula fagocítica por un mecanismo desconocido, y una vez libre en el citoplasma pensamos que al igual que en el caso de algunos péptidos antibacterianos (Plesniak y cols., 2004), los péptidos troyanos son atraídos debido a su carga positiva a las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial, donde los residuos hidrofóbicos permitirían la interacción con la membrana mitocondrial, uniéndose a esta mediante una interacción hidrofóbica con los fosfolípidos de la membrana, quedando los residuos hidrofílicos expuestos al citoplasma celular. Creemos que esta acción puede generar poros en la membrana mitocondrial o su ruptura, posiblemente causando la salida de componentes mitocondriales que pueden servir como señales de muerte celular como lo es el citocromo c en la apoptosis.

Es importante mencionar que la función de reconocimiento y muerte celular están sobrelapadas en un solo dominio: nuestros resultados muestran que se requiere de los 19 aminoácidos que componen a los péptidos troyanos para que estos tengan actividad; ni la feromona alfa o los 6 aminoácidos agregados por si solos causaron muerte celular, demostrando que se pueden fusionar dos funciones en un solo dominio funcional.

Al probar que los péptidos desarrollados son antifúngicos de manera específica para el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* MATa, da lugar al futuro desarrollo de péptidos antifúngicos específicos para levaduras patógenas de interés en el área clínica, como pueden ser *Candida albicans* o *Candida glabrata*, las cuales generan infecciones en pacientes inmunosuprimidos (Sanchez-Vargas y cols., 2005). Además, estos patógenos en últimas fechas han presentando resistencia a los fármacos usados para su tratamiento (Persidis, 1999), por lo cuál es importante el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados expuestos en el presente trabajo, se llegó a las siguientes conclusiones:

Los péptidos troyanos causan muerte celular en *Saccharomyces cerevisiae* MATa a concentraciones micromolares.

El efecto de muerte causado por los péptidos troyanos, es independiente de la señal de transducción mediada por el receptor Ste2. Sin embargo, la interacción con la proteína G tiene un papel en la muerte inducida por estos péptidos.

Los péptidos troyanos muestran actividad fungicida específica, y ésta depende de la expresión del receptor Ste2.

Los péptidos troyanos son antibacterianos en *Escherichia coli* a concentraciones micromolares.

Los péptidos troyanos presentan las actividades “cazador” y “asesino” en un solo dominio.

Los péptidos troyanos presentan dos tipos de conformaciones: una estructura no regular y una hélice alfa lineal, dependiendo de las propiedades del solvente.

## 7. PERSPECTIVAS

Una vez analizados los datos obtenidos en este trabajo, quedan una serie de incógnitas, las cuales deberán ser contestadas en estudios posteriores. A continuación las menciono:

Determinar si los péptidos troyanos causan daño a mitocondrias. Esto se puede llevar a cabo por varios métodos:

-Expresión intracelular de los péptidos troyanos en *Saccharomyces cerevisiae*, mediante un vector inducible.

-Exposición de mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* a los péptidos troyanos.

-Determinación de la capacidad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae* ante los péptidos troyanos.

Determinar el proceso de internalización y el mecanismo de acción mediante el cual inducen muerte celular los péptidos troyanos.

- Se ha realizado una búsqueda de los genes involucrados en los procesos de endocitosis y muerte celular. Se probarán los péptidos troyanos sobre cepas con deleciones en estos genes con el fin de observar sobrevivencia celular y de esta forma determinar si los genes forman parte del mecanismo de acción de los péptidos troyanos.

Obtener imágenes de microscopía electrónica de levaduras, sus mitocondrias y las bacterias tratadas con los péptidos troyanos y analizar su morfología.

Usar los péptidos troyanos con otras especies de bacterias, para evaluar su rango de acción antibacteriano.

Sintetizar y probar algunas de las secuencias que no fueron predichas como péptidos troyanos, así como los 28 péptidos restantes que si fueron predichos, con el fin de evaluar correctamente el método de evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos.



## 8. REFERENCIAS.

- Abel, M. G., Y. L. Zhang, H. F. Lu, F. Naider y J. M. Becker (1998). "Structure-function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone using alanine-scanned analogs." J Pept Res **52**(2): 95-106.
- Arap, W., W. Haedicke, M. Bernasconi, R. Kain, D. Rajotte, S. Krajewski, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini y E. Ruoslahti (2002). "Targeting the prostate for destruction through a vascular address." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1527-31.
- Bardwell, L. (2004). "A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway." Peptides **25**(9): 1465-76.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-50.
- Castro-Obregon, S., R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. K. Zhang, R. A. Swanson y D. E. Bredesen (2004). "Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77." J Biol Chem **279**(17): 17543-53.
- Craighton, T. E. (1997). "Protein Structure. A practical Approach." IRL Press Oxford University Press Inc NY USA: 287-297.
- Dathe, M., H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann y M. Bienert (2001). "Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge." FEBS Lett **501**(2-3): 146-50.
- del Rio, G., S. Castro-Obregon, R. Rao, H. M. Ellerby y D. E. Bredesen (2001). "APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide." FEBS Lett **494**(3): 213-9.
- Ehrlich, P. (1910). "Die Behandlung der Syphilis mit dem Ehrlichschen Präparat 606." Deutsche medizinische Wochenschrift: 1893-1896.
- Eisenberg, T., S. Buttner, G. Kroemer y F. Madeo (2007). "The mitochondrial pathway in yeast apoptosis." Apoptosis **12**(5): 1011-23.
- Ellerby, H. M., W. Arap, L. M. Ellerby, R. Kain, R. Andrusiak, G. D. Rio, S. Krajewski, C. R. Lombardo, R. Rao, E. Ruoslahti, D. E. Bredesen y R. Pasqualini (1999). "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides." Nat Med **5**(9): 1032-8.
- Ellerby, H. M., D. E. Bredesen, S. Fujimura y V. John (2008). "Hunter-killer peptide (HKP) for targeted therapy." J Med Chem **51**(19): 5887-92.

- Fahrenkrog, B., U. Sauder y U. Aebi (2004). "The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis." J Cell Sci **117**(Pt 1): 115-26.
- Gerlag, D. M., E. Borges, P. P. Tak, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini, E. Ruoslahti y G. S. Firestein (2001). "Suppression of murine collagen-induced arthritis by targeted apoptosis of synovial neovasculature." Arthritis Res **3**(6): 357-61.
- Higashijima, T. (1983). "Physiological activities of peptides are correlated with the conformations of membrane-bound molecules alpha mating factor from *Saccharomyces cerevisiae* and analog peptides." FEBS **159**(1,2): 229-232.
- Higashijima, T., Y. Masui, N. Chino, S. Sakakibara, H. Kita y T. Miyazawa (1984). "Nuclear-magnetic-resonance studies on the conformations of tridecapeptide alpha-mating factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and analog peptides in aqueous solution. Conformation-activity relationship." Eur J Biochem **140**(1): 163-71.
- Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci y E. Farber (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)." Int J Oncol **21**(1): 165-70.
- Kolonin, M. G., P. K. Saha, L. Chan, R. Pasqualini y W. Arap (2004). "Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue." Nat Med **10**(6): 625-32.
- Lee, B. K., S. Khare, F. Naider y J. M. Becker (2001). "Identification of residues of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein-coupled receptor contributing to alpha-factor pheromone binding." J Biol Chem **276**(41): 37950-61.
- Liang, Q., W. Li y B. Zhou (2008). "Caspase-independent apoptosis in yeast." Biochim Biophys Acta.
- Ludovico, P., F. Rodrigues, A. Almeida, M. T. Silva, A. Barrientos y M. Corte-Real (2002). "Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **13**(8): 2598-606.
- Madeo, F., E. Frohlich y K. U. Frohlich (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." J Cell Biol **139**(3): 729-34.
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S. J. Sigrist, S. Wesselborg y K. U. Frohlich (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." Mol Cell **9**(4): 911-7.
- Madeo, F., E. Herker, S. Wissing, H. Jungwirth, T. Eisenberg y K. U. Frohlich (2004). "Apoptosis in yeast." Curr Opin Microbiol **7**(6): 655-60.

- Mazzoni, C. y C. Falcone (2008). "Caspase-dependent apoptosis in yeast." Biochim Biophys Acta **1783**(7): 1320-7.
- Muller, H., C. Hennequin, J. Gallaud, B. Dujon y C. Fairhead (2008). "The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types." Eukaryot Cell **7**(5): 848-58.
- Munoz, V. y L. Serrano (1995). "Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides." J Mol Biol **245**(3): 275-96.
- Naider, F. y J. M. Becker (2004). "The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors." Peptides **25**(9): 1441-63.
- Persidis, A. (1999). "Antibacterial and antifungal drug discovery." Nat Biotechnol **17**(11): 1141-2.
- Plesniak, L. A., J. I. Parducho, A. Ziebart, B. H. Geierstanger, J. A. Whiles, G. Melacini y P. A. Jennings (2004). "Orientation and helical conformation of a tissue-specific hunter-killer peptide in micelles." Protein Sci **13**(8): 1988-96.
- Roth, A. F., D. M. Sullivan y N. G. Davis (1998). "A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor." J Cell Biol **142**(4): 949-61.
- Rucker, A. L., C. T. Pager, M. N. Campbell, J. E. Qualls y T. P. Creamer (2003). "Host-guest scale of left-handed polyproline II helix formation." Proteins **53**(1): 68-75.
- Sanchez-Vargas, L. O., N. G. Ortiz-Lopez, M. Villar, M. D. Moragues, J. M. Aguirre, M. Cashat-Cruz, J. L. Lopez-Ribot, L. A. Gaitan-Cepeda y G. Quindos (2005). "Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico." J Clin Microbiol **43**(8): 4159-62.
- Saskiawan, I., M. Mizuno, T. Inazu, K. Haneda, S. Harashima, H. Kumagai y K. Yamamoto (2002). "Chemo-enzymatic synthesis of the glycosylated alpha-mating factor of *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its biological activity." Arch Biochem Biophys **406**(1): 127-34.
- Scherz-Shouval, R. y Z. Elazar (2007). "ROS, mitochondria and the regulation of autophagy." Trends Cell Biol **17**(9): 422-7.
- Severin, F. F. y A. A. Hyman (2002). "Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*." Curr Biol **12**(7): R233-5.
- Toshima, J. Y., J. Toshima, M. Kaksonen, A. C. Martin, D. S. King y D. G. Drubin (2006). "Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding

yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5793-8.

- Tsujimoto, Y. y S. Shimizu (2005). "Another way to die: autophagic programmed cell death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1528-34.
- Wakamatsu, K., A. Okada, T. Miyazawa, Y. Masui, S. Sakakibara y T. Higashijima (1987). "Conformations of yeast alpha-mating factor and analog peptides as bound to phospholipid bilayer. Correlation of membrane-bound conformation with physiological activity." Eur J Biochem **163**(2): 331-8.
- Wallin, I. E. (1927). "Symbioticism and the Origin of Species." Bailliere, Tindall & Cox, London.
- Wierprecht, T., M. Dathe, M. Beyermann, E. Krause, W. L. Maloy, D. L. MacDonald y M. Bienert (1997). "Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes." Biochemistry **36**(20): 6124-32.
- Yeaman, M. R. y N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zasloff, M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5449-53.