



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PEPTIDOS IZTLI

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JONATHAN GABRIEL RODRIGUEZ PLAZA

TUTOR PRINCIPAL:

GABRIEL DEL RIO GUERRA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. ABRIL, 2014



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel del Río Guerra en el laboratorio 205-Oriente del departamento de Bioquímica en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La investigación fue realizada con apoyos económicos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 82308), por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (Proyecto IN205911) y la fundación Alexander von Humboldt de Alemania la cual financió mi viaje y hospedaje para una estancia de investigación en el grupo de investigación de la Dra. Edda Klipp en el Instituto de Biología de la Universidad Humboldt en Berlín, Alemania.

Agradezco a la Dra. María Teresa Lara Ortiz por el apoyo técnico durante la elaboración de este trabajo.

Reconozco a la Dra. Martha Calahorra Fuertes por la ayuda técnica aportada para la realización de este trabajo.

Retribuyo a la M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez por el respaldo técnico brindado durante este trabajo.

Agradezco a la Dra. Gabriele Schreiber por el apoyo técnico en los experimentos realizados durante mi estancia de investigación en Berlín.

Retribuyo a la unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en los estudios del presente trabajo.

Reconozco la ayuda brindada por la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en los estudios realizados en el presente trabajo.

DEDICATORIAS

A mí chinita Nallely, por recorrer a mi lado este camino, eres una mujer sumamente inteligente, increíblemente hermosa y con un enorme corazón lleno de bondad, con solo una sonrisa tuya iluminas mi vida y llenas mi corazón de felicidad, TE AMO.

A mi papá, por enseñarme a disfrutar todas las etapas de la vida tanto las buenas como las difíciles, a mi mamá, por su apoyo y cariño en todo momento y a los dos por enseñarme a nunca rendirme.

A mi hermano y mejor amigo Lalo, por ayudarme a distraerme y recordarme que no todo son estudios.

A Gaby, por siempre estar ahí para escucharme durante estos 7 años de estudios y por darme posada este último año.

A mis abuelitas y abuelitos, que aunque algunos ya no estén con nosotros, siempre los tengo en mi corazón.

Agradecimientos

A Gabriel, por aceptarme en su laboratorio, dándome la oportunidad de conocer y maravillarme con el increíble mundo de la ciencia.

A los miembros de mi jurado de tesis: Dr. Antonio Peña Díaz, Dra. Xóchitl Pérez Martínez, Dr. Jaime Mas Oliva, Dr. León David Islas Suárez, Dra. Clara Inés Espitia Pinzón y a los integrantes de mi comité tutorial Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. José de Jesús García Trejo, 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 Tere, gracias por apoyarme en el trabajo del laboratorio y por escuchar mis debrayes.

A la Dra. Alicia González, Dra. Xóchitl Pérez, al Dr. Antonio Peña, Dr. Salvador Uribe, Dr. Roberto Coria, Dr. José de Jesús García, Dr. Jesús Aguirre, Dr. Rogelio Hernández así como a los miembros de sus laboratorios por permitirme entrar en sus laboratorios, hacer uso de sus equipos y aprender un poco de sus líneas de investigación.

A la Dra. Georgina Garza, al Dr. Alfredo Torres y al Dr. Carlos Amero, por el trabajo realizado para la determinación de la estructura de los péptidos Iztli mediante dicroísmo circular, cristalografía y resonancia magnética nuclear respectivamente.

A la Dra. Dulce Mata, Dra. Brenda Marquina, al Dr. Jorge Barrios y al Químico Carlos Nuñez por apoyarme en los experimentos de tuberculosis.

A mis amigos y compañeros en el laboratorio antes 102, ahora 205-Oriente: Zyanya, Erika, Marina, Alba, Paula, Dulce, Chris, Raúl, Ricardo, Roberto, Luis, Erick, Mau y Jesús, gracias por las buenas pláticas y por hacer muy ameno el trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros en Fisiología y el laboratorio de Nutrición: Jenny, Dany, Vane, Arianne, Mona, Mariel, niña Tere Fer, Iliana, Lucy, Yaz, Vasti, Yadira, Gladys, Nesty, Johanna, Joey, Fer, Rafa, Mike, César, Tadeo, Vic, Adrián, Cristian, Manu, Sergio, Geovani, Alfredo, Camilo, Carlos y Jorge gracias por hacer de esta una experiencia increíble.

A mis cuates de la vida: Manolo, Emmanuel, Genaro, Chucho, Charly, Timon, Joe, Bob, Abe, Rolo, Hiram, Richard, Mau, Massa, Mono, Vic, Fer, Chups, Elvin, Pro, Puga, Tomas, Morro y el Carpa gracias por conformar una hermandad fuera de serie.

Y finalmente a los péptidos antes Troyanos, ahora Iztli gracias por permitirme comenzar a desentrañar su mecanismo de acción.

"Impossible is just a big word thrown around by small men who find it easier to live in the world they've been given than to explore the power they have to change it. Impossible is not a fact. It's an opinion. Impossible is not a declaration. It's a dare. Impossible is potential. Impossible is temporary. Impossible is nothing."

— Muhammad Ali

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCION	10
2. JUSTIFICACION	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO.....	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
6 RESULTADOS	32
7 DISCUSIÓN.....	59
8 CONCLUSIONES.....	71
9 PERSPECTIVAS	73
10 APÉNDICES	75
11 REFERENCIAS	121

RESUMEN

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en la investigación de los péptidos Iztli, los cuales son agentes fungicidas para las células *MATa* de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos péptidos se desarrollaron a partir de la feromona alfa que reconoce específicamente a células de *S. cerevisiae* mediante el receptor membranal: Ste2p; se amplió en seis aminoácidos su secuencia, imitando algunas propiedades fisicoquímicas (momento hidrofóbico, punto isoeléctrico y AGADIR) de péptidos antibacterianos conocidos (Cecropina, Magainin y Ce-Ma). Los péptidos Iztli generados mostraron actividad bactericida en *Escherichia coli* y al probarlos en *S. cerevisiae* se observó que entran en células con y sin el receptor Ste2p, pero sólo causan muerte en las que tienen Ste2p, por lo que se considera que la señalización intracelular inducida por la interacción feromona alfa-receptor Ste2p es necesaria para inducir la muerte de las células; también afectan el metabolismo energético de la célula causando inhibición de la respiración mitocondrial y reducen la fermentación, dependiendo de el o los metabolismos activos.

ABSTRACT

In this work it is present the results of the Iztli peptides's research, which are fungicides agents for *Saccharomyces cerevisiae*'s MATa cells. These peptides were developed from the alpha pheromone that specifically recognizes *S. cerevisiae*'s cells with the membranal receptor: Ste2p, this sequence was increased in six aminoacids, mimicking some physicochemical properties (hydrophobic moment, isoelectric point and AGADIR) of known bactericidal peptides (Cecropine, Magainin A and Ce-Ma). The Iztli peptides generated showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and when tested with *S. cerevisiae*'s cells, peptides's internalization was observed in cells with and without the receptor Ste2p, but only caused death in those with Ste2p, implying that the intracellular signaling induced by the interaction of the alpha pheromone with the receptor Ste2p is necessary to induce cellular death. The Iztli peptides also affect the energetic metabolism of the cell, causing inhibition of the mitochondrial respiration and reducing the fermentation, in a dependent way of the metabolic pathways actives.

ABREVIATURAS

APAP: Approach for detecting Potential Apoptotic Peptides

Frag1-6PI1: Fragmento del aminoácido 1 al 6 de la secuencia del péptido Iztli 1

GFP: Green Fluorescent Protein

MH: Momento Hidrofóbico

pI: Punto Isoeléctrico

PI: Péptidos Iztli

PI1: Péptido Iztli 1

PI1-CO-NH₂⁺: Péptido Iztli 1 con un grupo amino sustituyendo a un oxígeno de su grupo carboxilo terminal

PI1-G15A: Péptido Iztli 1 con sustitución de la Glicina 15 por Alanina

PI1-H488: Péptido Iztli 1 unido al fluoróforo HiLyte fluor 488 en el aminoácido catorce

PI1-H8A: Péptido Iztli 1 con sustitución de la Histidina 8 por Alanina

PI1-P14A: Péptido Iztli 1 con sustitución de la Prolina 14 por Alanina

PI1-Q11A: Péptido Iztli 1 con sustitución de la Glutamina 11 por Alanina

PI1-Y19A: Péptido Iztli 1 con sustitución de la Tirosina 19 por Alanina

PI2: Péptido Iztli 2

PI3: Péptido Iztli 3

PI4: Péptido Iztli 4

PtdIns3-P: Fosfatidilinositol 3-fosfato

T-PI1: Péptido Iztli 1 unido al fluoróforo TAMRA en el grupo amino terminal

T-PI1-CO- NH₂⁺: Péptido Iztli 1 con un grupo amino sustituyendo a un oxígeno de su grupo carboxilo terminal, unido al fluoróforo TAMRA en el grupo amino terminal.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

YPD: Yeast Extract-Peptone-Dextrose

YPLac: Yeast Extract-Peptone-Lactate

1. INTRODUCCION

Péptidos cazador-asesino.

Los péptidos cazador-asesino, traducción del termino “hunter-killer” acuñado por los doctores Ellerby y Pasqualini, son péptidos quiméricos diseñados para causar la muerte celular selectiva en células eucariotas. Estos péptidos están integrados por dos dominios funcionales, el dominio “cazador” que facilita el reconocimiento y la internalización del péptido completo al citosol y el dominio “asesino” con propiedades pro-apoptóticas; ambos se unen por un dominio puente formado por dos glicinas (Figura 1) (Ellerby y cols., 2008).

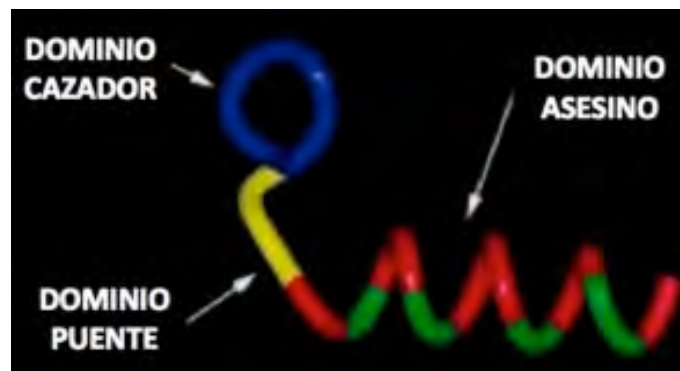


Figura 1. Modelo de un péptido cazador-asesino. En azul: dominio “cazador”, en amarillo: dominio “puente” y en rojo y verde: dominio “asesino” (Tomado y modificado de (Ellerby y cols., 1999)).

En este diseño se propone que los péptidos cazador-asesino deben su especificidad al dominio “cazador”, el cual es el ligando para un receptor específico localizado en la membrana de la célula diana. Los receptores suelen ser internalizados junto a su ligando por las células mediante endocitosis. Una vez dentro de la célula, el dominio “asesino”, el cual cuenta con algunas propiedades como la hidrofobicidad y la helicidad de ciertos antibacterianos (Cecropina B, Magainin 2 y Melitina)(Javadpour y cols., 1996), induce la muerte de las células al dañar la integridad de las membranas mitocondriales, y liberando citocromo c, el cual se une al factor activador de la apoptosis (*Apaf-1*) y a la pro-caspasa

9 formando un complejo denominado apoptosoma. Este complejo activa a la caspasa 9, la cual activa a la caspasas 3 y 7 iniciando una cascada proteolítica que afecta a proteínas clave en la célula, causando su muerte por apoptosis; por esta razón también se le llama dominio o secuencia “pro-apoptótica”. Se requiere la internalización del dominio asesino para causar muerte en la célula, ya que no es tóxico estando fuera de las células eucariotas (Figura 2) (Ellerby y cols., 1999).

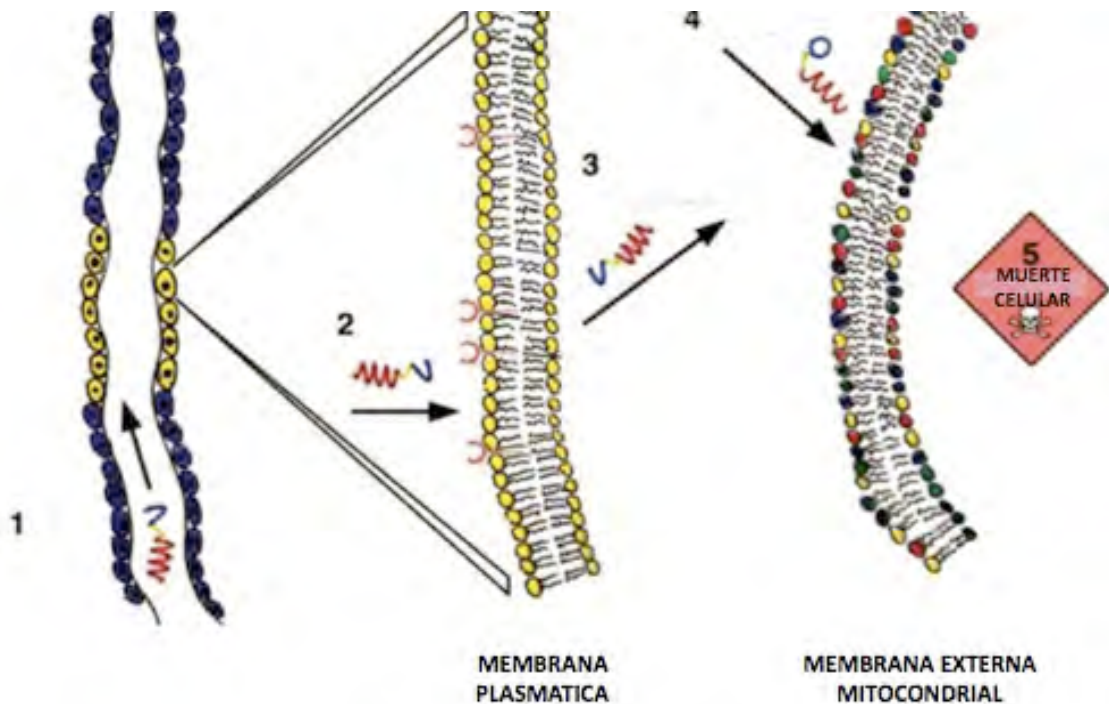


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de los péptidos cazador-asesino. 1) Los péptidos cazador-asesino permanecen en circulación sin dañar a las células que no presentan el receptor específico (células azules), (2) al encontrar células que si presentan el receptor (células amarillas), se unen a éste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

Los péptidos cazador-asesino han sido evaluados en modelos murinos, usando moléculas cazadoras para los vasos angiogénicos que proveen de oxígeno y nutrientes a las células tumorales, impidiendo o retrasando el desarrollo del cáncer. Entre los tipos de cáncer que se han tratado se encuentra el cáncer de mama, para el cual se usó como “cazador” al péptido CNGRC, reduciendo el volumen de los tumores en un 90 % (Ellerby y cols., 1999)

y en el cáncer de próstata se utilizó el péptido SMSIARL, los ratones tratados tuvieron una extensión de su periodo de vida de 6 a 8 semanas (Arap y cols., 2002). Los péptidos se evaluaron en otras patologías como la artritis, haciendo blanco a la integrina $\alpha\beta3$ de los vasos sanguíneos sinoviales, los cuales aumentan la concentración de células mononucleares causando infiltración y erosión de los cartílagos en las articulaciones, resultando en la disminución de la artritis (Gerlag y cols., 2001); también se usaron contra la proteína membranal: prohibitina, la cual es un marcador para la vasculatura del tejido adiposo blanco, logrando reducir la grasa blanca en el modelo de ratones obesos (Kolonin y cols., 2004).

Se desarrolló una variante de los péptidos cazador-asesinos, en la cual la secuencia “cazador” se encuentra dentro de la secuencia “asesina”; a las proteínas que tienen dos funciones se les denomina proteínas moonlighting.

Proteínas Moonlighting

Anteriormente se pensaba que sólo existía una función para cada proteína, pero en la actualidad se sabe que pueden tener más de una función; a estas proteínas se les denomina moonlighting. A la fecha se ha identificado como proteínas moonlighting a enzimas, receptores, canales transmembranales, chaperonas y proteínas ribosomales (Jeffery, 2003).

El cambio en la función de una proteína moonlighting puede ocurrir como consecuencia de cambios en la localización celular, el tipo de célula, el estado oligomérico o la concentración celular de un ligando, sustrato, cofactor o producto. Estos diferentes mecanismos no son mutuamente exclusivos y en muchos casos, una proteína usa una combinación de métodos para cambiar entre funciones (Figura 3) (Jeffery, 1999).

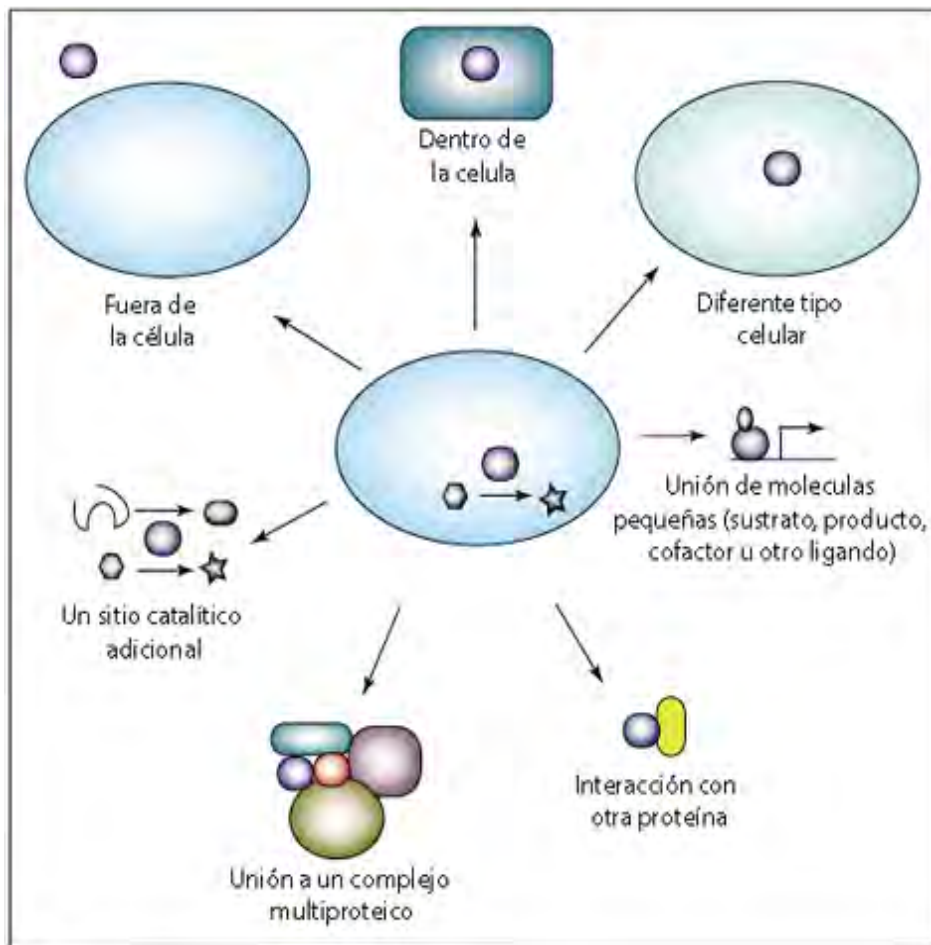


Figura 3. Ejemplos de métodos de cambio de función en las proteínas moonlighting. La esfera morada representa a una enzima y los diferentes modos por los que puede cambiar su función. (Tomado y modificado de (Jeffery, 2004)).

Normalmente las funciones se encuentran en dominios independientes dentro de la proteína, pero existen algunas con dos funciones en el mismo dominio (Rea y cols., 2009); muchas de estas proteínas se encuentran desplegadas (Tompa y cols., 2005), permitiéndoles llevar a cabo varias actividades al adoptar diferentes conformaciones, dependiendo del ambiente celular.

Péptidos Iztli

A las proteínas desarrolladas en este trabajo se les denominó: péptidos Iztli (PI), en honor al Dios azteca de los sacrificios: Iztli, que es representado como un pequeño cuchillo de obsidiana, el cual al igual que nuestros péptidos se usaba para matar de forma específica.

Se eligió como modelo de estudio a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los primeros microorganismos que ha usado el hombre para su beneficio, tanto en la elaboración de vino, cerveza y pan, así como modelo experimental, ya que es uno de los organismos eucariotas más sencillos y fáciles de manipular.

Se usó a esta levadura porque tiene dos tipos celulares con receptores y ligandos específicos (Figura 4-A), los cuales son internalizados por endocitosis: las células *MAT α* reconocen a la feromona "a" mediante el receptor transmembranal Ste3p y a su vez secretan la feromona "alfa", que es un péptido de trece residuos (WHWLQLKPGQPMY). Por su parte, las células *MAT α* identifican a la feromona alfa por el receptor Ste2p y secretan a la feromona a, un péptido de 12 residuos (YIIKGVFWD PAC) covalentemente unido a un lípido: farnesil (Feldmann, 2005); debido a este grupo químico, su síntesis es complicada y no se encuentra de manera comercial a diferencia de la feromona alfa, además también dificultaba la predicción de las propiedades del péptido que se basa solamente en los aminoácidos; por estas razones se optó por usar a la feromona alfa como secuencia base para crear a los péptidos Iztli.

Cuando la feromona alfa es reconocida por el receptor Ste2p de una célula *MAT α* de *S. cerevisiae*, la subunidad alfa (Gpa1p) con actividad de GTPasa convierte GTP a GDP causando la separación de las subunidades $\beta\gamma$, interaccionando la subunidad β (Ste4p) con las proteínas Ste5p y Ste20p, que sirven como proteínas de andamiaje y activadora

respectivamente para las cinasas MEKK (Ste11p), MEK(Ste7p), MAPKs (Kss1p y Fus3p), las cuales fosforilarán al complejo de factores transcripcionales Ste12p/Dig1p/Dig2p y a Far1p resultando en la transducción de cerca de 200 genes (Figura 4-B) los cuales preparan a la célula para la reproducción sexual, causando arresto en la fase G1 del ciclo celular, crecimiento orientado hacia el par sexual (shmoo) y por en presencia de una célula del sexo contrario la fusión de las membranas plasmáticas, siguiendo la fusión del núcleo y poco después, la generación de una célula *MATa/MAT α* diploide, que posteriormente forma una tétrada con cuatro esporas, dos de sexo a y dos de sexo alfa, que reinician el ciclo (Figura 4-A) (Naidier y Becker, 2004).

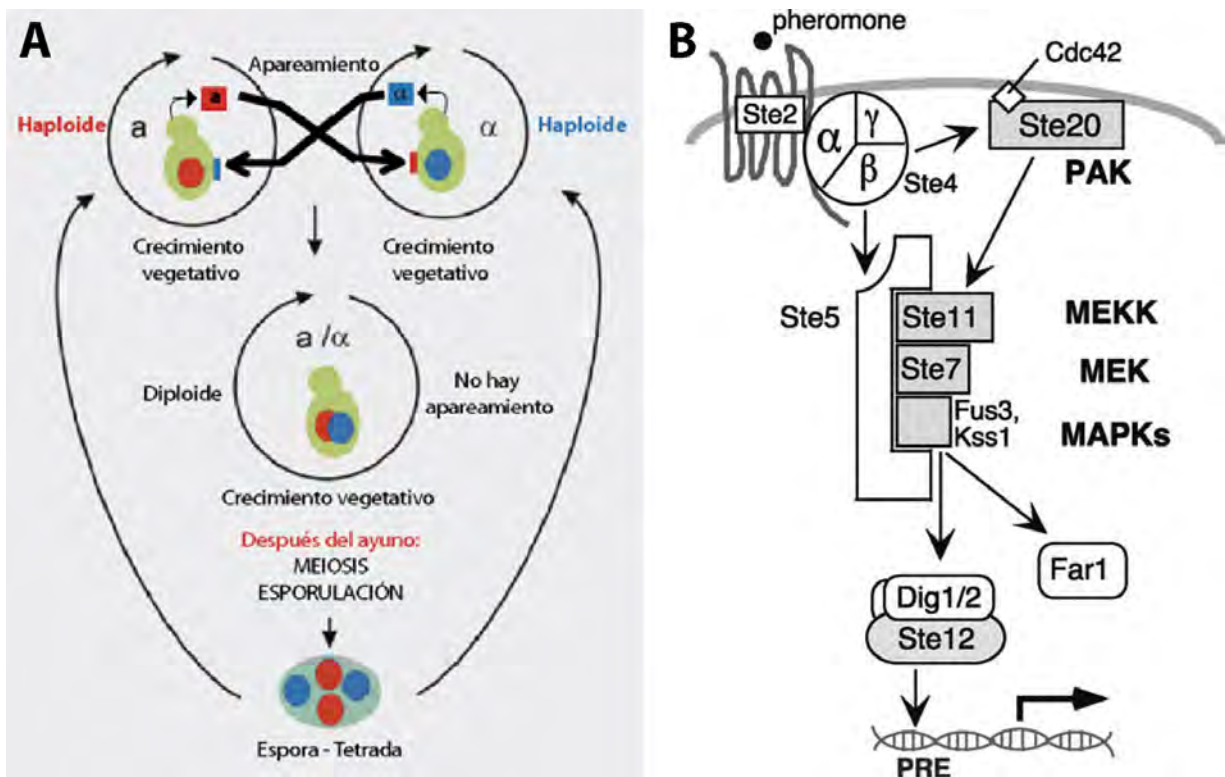


Figura 4. Esquemas de *S. cerevisiae*. A) Ciclo de vida sexual y asexual (Tomado y modificado de (Feldmann, 2005)). B) Ruta de respuesta del receptor Ste2p a la feromona alfa (Bardwell, 2004)

Diseño de los péptidos Iztli

A los trece aminoácidos de la feromona alfa se le agregaron seis aminoácidos (se excluyó a la cisteína para evitar la formación de puentes disulfuro) en los extremos amino y carboxilo terminales para igualar las propiedades fisicoquímicas de los péptidos antibacterianos (asesinos): Cecropina A, Magainin 2 y una mezcla de ambos denominada: Ce-Ma; se generaron 344 millones 857 mil 923 secuencias de péptidos en la computadora, las cuales se analizaron mediante el programa computacional: APAP (Approach for detecting Potential Apoptotic Peptides), obteniéndose 30 secuencias peptídicas cuyas propiedades fisicoquímicas: punto isoeléctrico (PI), momento hidrofóbico (MH) y el coeficiente AGADIR que mide la tendencia de los péptidos a estructurarse en hélices alfa (Munoz y Serrano, 1995), se encuentran dentro de límites característicos de péptidos asesinos: $10.8 < PI < 11.7$, $0.4 < MH < 0.6$ y $AGADIR < 10.0$ (del Rio y cols., 2001) (Figura 5). Es importante notar que a diferencia de los péptidos cazador-asesino, los péptidos Iztli integran una secuencia "cazadora" dentro de una secuencia "asesina", siendo reconocidos y causando muerte en un tipo celular específico.

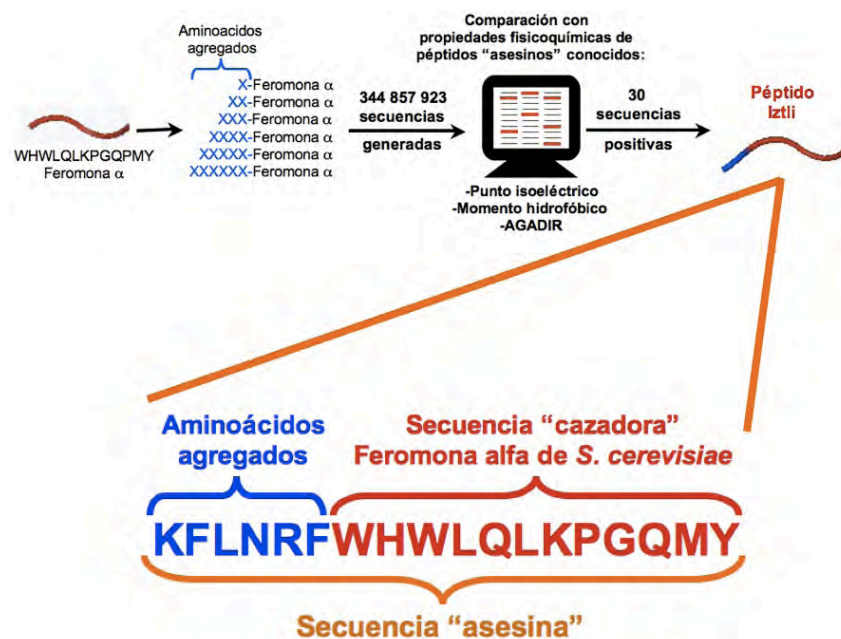


Figura 5. Esquema de la generación de los péptidos Iztli y la secuencia del péptido Iztli 1.

De las 30 secuencias que el programa APAP seleccionó, hasta la fecha se han sintetizado cuatro de ellas (Tabla 1).

NOMBRE	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	PM (g/mol)	PI 10.8<PI< 11.7,	MH 0.4<MH< 0.6	AGADI R <10.0
PI1	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY	2490	11.1	0.44	1.21
PI2	RRLKDFWHWLQLKPGQPMY	2500	11.1	0.43	1.12
PI3	KFWKRFWHWLQLKPGQPMY	2577	11.3	0.42	1.37
PI4	RKLQKFWHWLQLKPGQPMY	2486	11.3	0.42	1.22
FER	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY	1684	9.55	0.27	0.04

Tabla 1. Secuencias y propiedades fisicoquímicas de los péptidos Iztli y la feromona alfa. En rojo se muestra la secuencia de la feromona alfa y en azul los aminoácidos agregados.

El modelo planteado para el mecanismo de acción de los péptidos Iztli es el siguiente: el péptido Iztli es reconocido por el receptor Ste2p de las células *MATa* de *S. cerevisiae* mediante la secuencia de la feromona alfa; una vez reconocido, el péptido es internalizado al citoplasma junto con el receptor y dentro de la célula actúa sobre las mitocondrias, formando poros en las membranas mitocondriales, causando su hinchamiento y ruptura, afectando la generación de energía y liberando moléculas intra-mitocondriales al citoplasma, induciendo finalmente la muerte de la célula (Figura 6).

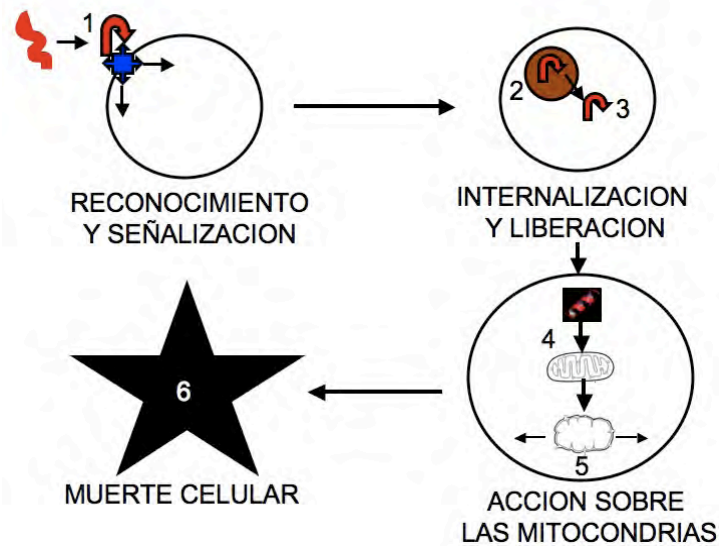


Figura 6. Modelo del mecanismo de acción de los péptidos Iztli. (1) El péptido Iztli es reconocido de manera específica por el receptor en la membrana celular, (2) el péptido y el receptor son internalizados al citoplasma de la célula, (3) el péptido es liberado al citoplasma, (4) el péptido es atraído 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, alterando la producción de energía y liberando componentes mitocondriales que mandan señales de activación a alguno de los mecanismos de muerte celular (6).

2. JUSTIFICACION

Los péptidos cazador-asesino que se han desarrollado como tratamiento contra varios tipos de cáncer, así como obesidad y artritis, forman poros en la membrana mitocondrial mediante su dominio asesino, que alteran el potencial membranal, afectando el metabolismo energético de estas células eucariotas aerobias, además permiten la entrada de iones y agua que causan el hinchamiento de la mitocondria liberando moléculas intramitocondriales como el citocromo *c*, desencadenando la muerte celular por apoptosis. Sin embargo los péptidos Iztli fueron diseñados contra *S. cerevisiae*, el cual es un microorganismo anaerobio facultativo, por lo que el daño que pudieran ocasionar los péptidos Iztli al metabolismo respiratorio, puede ser suplido por el metabolismo fermentativo; pero el daño inflingido a las mitocondrias mediante la formación de poros y la liberación del citocromo *c* debería seguir causando muerte a las células por un mecanismo tipo apoptosis. Por lo tanto es importante determinar si los péptidos Iztli son capaces de causar muerte a células que no dependen exclusivamente del metabolismo respiratorio para producir energía y si matan como lo hacen.

Durante la generación de los péptidos Iztli se modificó la feromona alfa de *S. cerevisiae*, otorgándole las propiedades de un antibacteriano, posiblemente perdiendo el reconocimiento de la feromona con el receptor Ste2p, lo cual impediría la entrada del péptido a la célula y su posterior muerte, pero ya que la alteración no afectó la secuencia de la feromona es posible que la actividad se mantenga permitiendo la entrada del péptido y que este actúe sobre la mitocondria por su actividad antibacteriana, generando una proteína moonlighting con una nueva actividad que el cazador y el asesino no tienen por separado: matar células eucariotas específicas, de ser así se abriría un nuevo campo para el desarrollo de fármacos.

3. HIPÓTESIS

Los péptidos Iztli causan muerte a las células *MATa* de *S. cerevisiae*.

4. OBJETIVO

Objetivo general:

- Determinar si los péptidos Iztli causan muerte celular en las células *MATa* de *S. cerevisiae* y no en las células *MATalfa* y comenzar a entender sus mecanismos de acción.

Objetivos particulares:

-Comprobar que los péptidos Iztli mantienen la actividad tipo feromona

-Determinar la actividad antibacteriana de los péptidos Iztli .

- Establecer si los péptidos Iztli son internalizados en las células *MATa* de *S. cerevisiae* mediante el receptor *Ste2p*.

-Determinar si los péptidos Iztli causan muerte por apoptosis tipo levadura en células *MATa* de *S. cerevisiae*.

-Establecer si los péptidos Iztli afectan a las mitocondrias de *S. cerevisiae*

-Determinar si los péptidos Iztli causan muerte a células *MATa* de *S. cerevisiae* con el metabolismo respiratorio y/o el fermentativo activo(s).

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Organismos modelo

Hongos levaduriformes

Saccharomyces cerevisiae	Cepa	Genotipo	Fuente
	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems, Yeast Parental Strain
	BY4741 mutantes nulas	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, gen nulo:: KANMX4</i> Genes nulos: <i>atg11, ayt1, bre2, cms1, cox17, cyc3, dep1, dnm1, drs2, elm1, erv46, frt2, fun14, gat3, isa2, mht1, ntg1, nup60, oye2, pep4, por1, psr2, saw1, seo1, sir4, snc1, snf7, spo7, spo75, ste20, ste4, swc3, swd1, syn8, ubr2, uip3, uth1</i>	Open Biosystems, YKO MATa Strain Collection
	YOR212W	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, ste4Δ:: KANMX4</i>	Invitrogen, Yeast-GFP Clone Collection from UCSF
	BY4741 ρ^0	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Generada para este trabajo a partir de la cepa BY4741
	BY4742	<i>MATalfa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems, Yeast Parental Strain
	BY4743	4741/4742	Open Biosystems, Yeast Parental Strain
	W303-5 ^a	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, can1-100, ste4Δ::URA3</i>	Donada por el Dr. Roberto Coria Ortega, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Generada por la Dra. Kurjan, J., Columbia University, NY, Estados Unidos.

<i>Candida glabrata</i>	CGM99	<i>ura3Δ::tn903(G418^R), trp1Δ</i>	Donada por la Dra. Irene Castaño, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Generada originalmente por (Domergue y cols., 2005)
--------------------------------	-------	--	---

Tabla 2. Hongos levaduriformes

Hongos filamentosos

	Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Aspergillus nidulans</i>	CLK43	<i>Silvestre</i>	Proveída por el Dr. Jesús Aguirre Linares, Generada por (Kawasaki y cols., 2002)

Tabla 3. Hongos filamentosos

	Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	Δ (mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Invitrogen, MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells

Tabla 4. Bacterias

Medios de Cultivo para levaduras

YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose).

Se preparó medio líquido y sólido (agar 1.5%), bajo las siguientes especificaciones: extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2%. El medio de cultivo fue esterilizado a 120° C por 20 minutos.

YPLac (Yeast Extract Lactate)

Se preparó medio líquido y sólido (agar 1.5%), bajo las siguientes especificaciones: extracto de levadura 1%, peptona 2%, ácido láctico 2%, sulfato de amonio 0.12% y fosfato monobásico de potasio 0.1%. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.5 con una solución de hidróxido de sodio y posteriormente esterilizado a 120° C por 20 minutos.

Medio Mínimo (MM)

Se preparó medio líquido bajo las siguientes especificaciones: base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos 0.67%, glucosa 2%, mezcla de aminoácidos 0.79% y fosfato monobásico de potasio 0.1%. El pH del medio se ajustó a 5.5 con hidróxido de sodio y posteriormente se esterilizó a 120° C por 20 minutos. En caso de no requerir algún aminoácido debido a una auxotrofia de la cepa a usar, se usaron las mezclas comerciales: Complete supplement mixture (CSM) de FORMEDIUM.

Antibióticos.

Geneticina

Se prepararon stocks disolviendo 10 mg de Geneticina en 1 mL de agua estéril. Los stocks se mantuvieron a -20° C hasta el momento de usarse. La concentración final usada fue 200 µg/mL.

Péptidos

Los péptidos Iztli 1, 2, 3, 4 (PI1, PI2, PI3, PI4), 1 y 2 cíclico, 1 y 2 con momento hidrofóbico alterado, los 6 aminoácidos del N-terminal del PI1 añadidos a la feromona alfa (Frag1-6PI1), el PI1 marcado con el marcador fluorescente verde Hilytefluor 488 (PI1-H488), fueron sintetizados por la compañía AnaSpec (USA), por el método de síntesis de péptidos en fase sólida, bajo los requerimientos de extremos amino y carboxilos

terminales: libres; la pureza de los péptidos fue mayor al 95%, determinada mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) analítica. El péptido Iztli 1 con el extremo carboxilo cubierto con un grupo amino (PI1-CO-NH₂⁺), así como sus variantes, y del PI1 marcados con la molécula roja fluorescente TAMRA (T-PI1-CO-NH₂⁺ y T-PI1 respectivamente) fueron sintetizados por el grupo del Dr. Rudolf Volkmer en el hospital Charite en Berlín, Alemania.

La Feromona alfa (FER) se obtuvo de la compañía Sigma-Aldrich.

Nombre	Secuencia	Peso molecular (g/mol)
PI1	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY	2490
PI2	RRLKDFWHWLQLKPGQPMY	2500
PI3	KFWKRFWHWLQLKPGQPMY	2577
PI4	RKLQKFWHWLQLKPGQPMY	2486
PI1-H8A	KFLNRFWAWLQLKPGQPMY	2424
PI1-Q11A	KFLNRFWHWLALKPGQPMY	2433
PI1-P14A	KFLNRFWHWLQLKAGQPMY	2464
PI1-G15A	KFLNRFWHWLQLKPAQPMY	2504
PI1-Y19A	KFLNRFWHWLQLKPGQPMA	2398
Frag1-6PI1	KFLNRF	824
PI1-H488	KFLNRFWHWLQLK(Hilytefluor 488 maleimido propionyl-GGG)-PGQPMY	3335.4
PI1-CO-NH ₂ ⁺	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY-CO-NH ₂ ⁺	2490
T-PI1-CO-NH ₂ ⁺	TAMRA-KFLNRFWHWLQLKPGQPMY-CO-NH ₂ ⁺	2903
T-PI1	TAMRA-KFLNRFWHWLQLKPGQPMY	2903
FER	WHWLQLKPGQPMY	1684

Tabla 6. Abreviaturas, secuencias de aminoácidos y pesos moleculares de los péptidos Iztli y la feromona alfa.

Preparación de las soluciones peptídicas.

De todos los péptidos se pesó 1 mg y se disolvieron en agua estéril (1 mL). Posteriormente fueron cuantificados espectrofotométricamente en un equipo Nanodrop a 280 nm. Las concentraciones de los péptidos P11-H488, T-P11 y T-P11-CO-NH₂⁺ se basaron en el peso seco, debido a que la molécula fluorescente complica la cuantificación por espectrofotometría. A partir de estas soluciones madre se realizaron diluciones para los diferentes experimentos realizados.

Equipos

Equipo	Marca	Accesorios
Espectro UV-VIS RS	LaboMed, Inc. (Estados Unidos)	Celdas de poliestireno de 1 cm de paso de luz
YSI modelo 5300 Oxímetro	Yellow Springs Instrument Co. (Estados Unidos)	Voltímetro MUL-600 Electrodo de Clark Agitador magnético Placa de agitación
Espectrofotómetro de doble rayo DW2 Aminco	Olis, Inc. (Estados Unidos)	Celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz Agitadores magnéticos
Nanodrop	Thermo Scientific (Estados Unidos)	Nanodrop software

Synergy Mx	BioTek (Estados Unidos)	Gen 5 Software Placas de ensayos, 96 pozos de media área con tapa para baja evaporación, fondo plano, tratadas para cultivo de tejidos, estériles, poliestireno, 3697, Costar.
Bead-Beater cell homogenizer	Biospec Products (Estados Unidos)	Perlas de vidrio, Sigma (G8772-100G 425-600 µm) Cámara pequeña, Biospec Products.
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Estados Unidos)	Termoblock para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL

Tabla 7. Equipos

Métodos.

- Levaduras

Cultivo.

Se inoculó una colonia de la cepa de la levadura a utilizar (Tabla 2) en 5 mL de medio dependiendo del experimento, YPD para curvas de crecimiento, YPLac para las curvas de crecimiento y respiración celular y mitocondrial y MM para experimentos de microscopía de fluorescencia. El cultivo se incubó a 30° C con agitación constante a 200 rpm por 24 horas.

Preparación de las muestras.

Los cultivos incubados por 24 horas se diluyeron con medio nuevo, a una D.O. de 0.12 o 0.4, dependiendo si serían utilizados para experimentos de curvas de crecimiento o de microscopia confocal.

Curvas de crecimiento.

Se colocaron en placas estériles de 96 pozos de media área, 37.5 μL de la dilución de células a 0.12 de D.O., con agua estéril, feromona alfa (controles) y los péptidos Iztli a una concentración final de 10 μM , llevando a un volumen final de 150 μL con el medio respectivo. Una vez preparada la placa, esta se incubó a 30° C en el equipo Synergy MX con una agitación rápida y constante, tomando lecturas de la D.O. a 600 nm cada hora durante 24 horas; el equipo se manipuló mediante el programa Gen5. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Las muestras fueron preparadas usando el mismo procedimiento usado para las curvas de crecimiento; pero en lugar de medir la D.O., se tomaron muestras del cultivo de 5 μL a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas, diluyéndolas 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^4 y 10^4 veces respectivamente y 5 μL fueron sembrados en placas de YPD que se incubaron a 30° C. Después de 36 horas el número de colonias para cada muestra fueron contadas.

Microscopia de fluorescencia.

Se colocaron en tubos Eppendorf estériles los cultivos celulares diluidos a 0.4 D.O.; el volumen varió con respecto al número de muestras que se tomarían en cada experimento; se agregó agua estéril y feromona alfa como controles, y los péptidos Iztli a una concentración final de 20 μM . Los tubos se colocaron en un equipo Thermomixer a 30° C con agitación constante a 300 rpm. A los tiempos determinados para cada experimento se tomaron muestras de 50 μL y se centrifugaron a 5000 rpm por 3 minutos, removiendo el sobrenadante y resuspendiendo en medio nuevo; se centrifugó dos veces más, resuspendiendo la tercera ocasión en 10 μL de medio. Se tomaron 5 μL de la muestra y se colocaron en un portaobjetos; en seguida se agregaron 5 μL de agar de bajo punto de

fusión a 37° C y se mezcló con la muestra, la cual se cubrió con un portaobjetos y se observó al microscopio.

Respiración celular de levaduras

Se agregaron 50 μ L de un cultivo de *S. cerevisiae* MATa o MAT α incubado en YPLac por 24 horas y 50 μ L de YPLac en la cámara de 300 μ L con camisa de agua a 30° C conectado a un Oxímetro YSI modelo 5300 equipado con un electrodo de Clark. A los dos minutos se agregó agua estéril y feromona alfa como controles, y los PI a una concentración final de 68 μ M. Las lecturas se continuaron hasta los diez minutos.

Aislamiento de mitocondrias.

Se incubó un precultivo de *S. cerevisiae* MATa en 100 mL de YPD a 30° C por 24 h a 250 rpm; posteriormente el precultivo se pasó a un litro de YPLac a 30° C por 24 h a 250 rpm para mejorar la oxigenación de las células. Las células se colectaron y lavaron dos veces mediante centrifugación y fueron suspendidas en medio frío de aislamiento (5 mM MES, 0.6 M manitol, 0.1% albúmina sérica bovina; el pH fue ajustado a 6.8 con trietanolamina). Las células se rompieron usando un homogenizador con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro prelavadas en buffer de aislamiento frío, en una cámara pequeña rodeada de hielo, dando tres pulsos de 20 segundos, separados por intervalos de 40 segundos. Después de la homogenización las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial como se describe en la literatura (Pena y cols., 1977). El botón final de mitocondrias se resuspendió en 500 μ L de medio de aislamiento frío sin albúmina, la concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret (Gornall y cols., 1949). En los experimentos se utilizó 0.5 mg/mL de proteína.

Respiración mitocondrial

El consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas expuestas a los péptidos Iztli se midió usando un oxímetro YSI modelo 5300 equipado con un electrodo de Clark en una cámara de 1.0 mL con camisa de agua a 30° C. Estos experimentos permitieron determinar la respiración de la mitocondria en su estado acoplado (estado III). El oxímetro estaba conectado a un voltímetro, el cual tenía una interfaz con una computadora para el registro de los datos.

Se agregaron mitocondrias (0.5 mg proteína/mL) a la mezcla de reacción que contenía 0.6 M manitol, 5 mM MES pH 6.8 (ajustado con trietanolamina), 20 mM cloruro de potasio, 0.5 mM cloruro de magnesio, 4 mM de fosfato, ADP (150 μ M) el sustrato fue etanol (5 μ L/mL). Las soluciones madre usadas fueron 2.0 M cloruro de potasio, 1.0 y 1 M Pi-Tris, pH 6.8. Se utilizó 5 mM de CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) para probar el acoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial. El consumo de oxígeno fue grabado en la ausencia de péptidos por 30 segundos para determinar el grado de la respiración basal en mitocondrias intactas. Después de eso se añadieron los péptidos Iztli a una concentración final de 58 μ M.

Medición de etanol

Un cultivo de células se centrifugó y se determinó el peso húmedo de las células, se preparó una solución 1g:1mL, en tubos Eppendorf; se agregaron 0.005 mL de células, 0.17 mL de agua 0.02 mL de MES, 0.005 mL de glucosa, agua, feromona alfa 40 μ M (controles) y PI1 40 μ M. Después de una incubación de 10 minutos a 30° C, cada tubo fue centrifugado a 5000 rpm por 3 minutos, obteniendo el sobrenadante. Para medir el etanol se prepararon tubos con 40 μ L de sobrenadante, con 100 μ L de Bicina-TEA 0.2 M

(llevada a pH 9.0 con trietanolamina) y 100 μL de NAD^+ (20 mg/mL), todo en un volumen final de 2 mL con agua. Se preparó un control con 10 μL de alcohol. A cada tubo se agregó 15 μL de aldehído deshidrogenasa (ALDH) 10 mg/mL, se tomó una lectura de absorbancia inicial a 340 nm a los dos minutos de agregada la enzima y después se agregaron 15 μL de alcohol deshidrogenasa (ADH) 30 mg/mL, después de 30 minutos se tomó otra lectura. La cantidad de μmoles de alcohol se obtiene al multiplicar la diferencia de la D.O. y dividirlo por la D.O. del estándar de etanol.

- Bacterias

Cultivo.

Se inoculó una colonia de *E. coli DH10B* (Tabla 2) en 5 mL de medio LB. El cultivo se incubó a 37° C con agitación constante a 200 rpm por 12 horas.

Preparación de las muestras.

Los cultivos incubados por 12 horas se diluyeron con medio nuevo, a una D.O. de 0.12

Curvas de crecimiento

Se colocaron en placas estériles de 96 pozos de media área, 37.5 μL de la dilución de células a 0.12 de D.O., con agua estéril, feromona alfa y Frag1-6PI1 (controles) y los péptidos Iztli a una concentración final de 10 μM , llevando a un volumen final de 150 μL con el medio respectivo. Una vez preparada la placa, esta se incubó a 37° C en el equipo Synergy MX con una agitación rápida y constante, tomando lecturas de la D.O. a 600 nm cada hora durante 24 horas; el equipo se manipuló mediante el programa Gen5. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

UFC

Las muestras fueron preparadas usando el mismo procedimiento usado para las curvas de crecimiento de bacterias; pero en lugar de medir la D.O., se tomaron muestras del cultivo de 5 μL a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas, diluyendolas 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^5 y 10^6 veces respectivamente y 5 μL fueron sembrados en placas de YPD que se incubaron a 30° C. Después de 36 horas el número de colonias para cada muestra fueron contadas.

6 RESULTADOS

Determinación de la actividad antibacteriana de los péptidos Iztli

Para el desarrollo de los péptidos Iztli se agregaron seis aminoácidos en el extremo amino terminal de la feromona alfa modificando algunas de sus propiedades fisicoquímicas (momento hidrofóbico, punto isoelectrico y coeficiente AGADIR) de forma que coincidieran con las de ciertos péptidos antibacterianos (Magainin 2, Cecropina A y Ce-Ma), las propiedades fisicoquímicas se determinaron mediante el programa APAP (del Rio y cols., 2001). Para evaluar la nueva actividad antibacteriana de los péptidos Iztli, se pusieron en presencia de células de la bacteria *E. coli*, incubando la mezcla en medio rico a 37° C por 24 horas, se midió su densidad óptica (D.O.) para hacer curvas de crecimiento.

Al analizar las curvas de crecimiento de *E. coli* (Figura 7-A) observamos que en presencia del péptido Iztli 1 (■) no hubo crecimiento con respecto al cultivo control (□), las células tratadas con feromona alfa (△) y el fragmento de los seis primeros aminoácidos del P11 (◇) crecieron al igual que el cultivo control; esto muestra que los diecinueve aminoácidos del péptido Iztli 1 tiene un efecto antibacteriano contra *E. coli*, cosa que no ocurre con los trece aminoácidos de la feromona alfa o los seis aminoácidos que se le agregaron al P11. En el caso de la feromona alfa el resultado coincide con las predicciones negativas realizadas por el programa APAP para sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 1), no existe predicción para el fragmento de seis aminoácidos del P11 debido a que el programa analiza un mínimo de ocho.

Un antibacteriano puede ser bacteriostático si sólo detiene la replicación o bactericida si causa su muerte, para realizar esta diferenciación se tomaron muestras de los cultivos

para determinar su viabilidad mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 7-B y C) observando que el conteo de las muestras tomadas a las 6, 12, 18 y 24 horas mostraron valores por debajo a los valores iniciales (tiempo 0) de cinco mil células por lo que se puede concluir que los péptidos Iztli son bactericidas; en el caso de ser bacteriostáticos, los conteos de UFC se habrían mantenido constantes en el rango de los valores del tiempo 0 y no se reducirían.

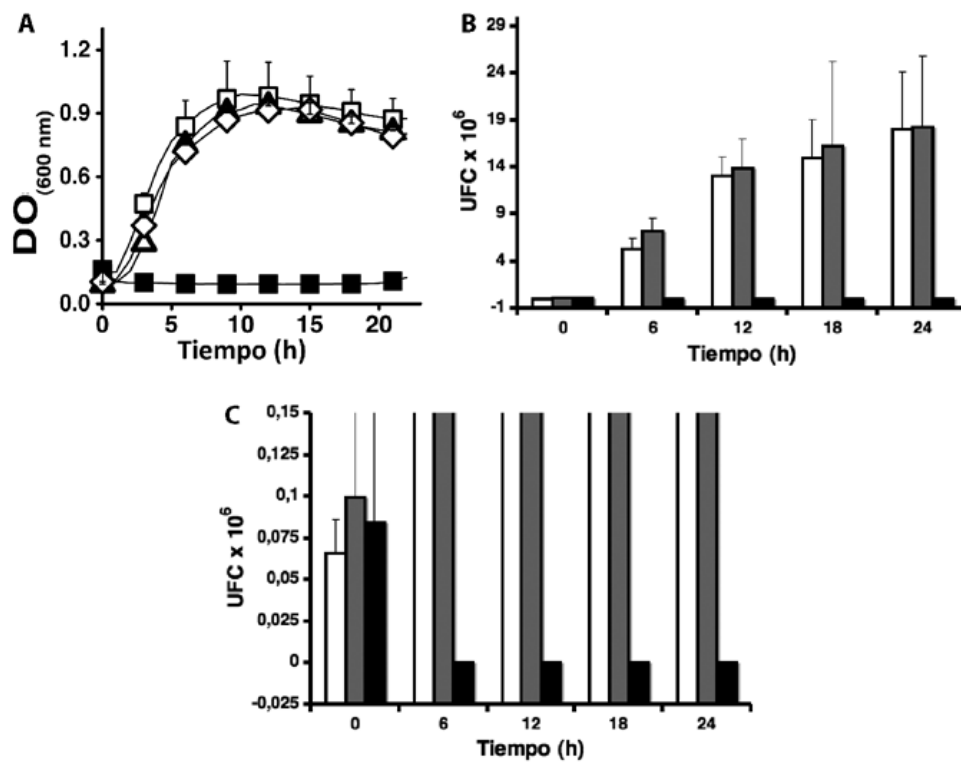


Figura 7. Actividad antibacteriana de los péptidos Iztli en *E. coli* DH10B. A) Curvas de crecimiento en presencia de agua destilada □, Feromona alfa △ (20 µM), Frag1-6PI1 ◇ (119 µM) y PI1 ■ (20 µM). B) UFC en presencia de agua destilada (barras blancas) (control), Feromona alfa (barras grises) (20 µM) y PI1 (barras negras) (20 µM). C) Acercamiento a valores menores a 15 mil UFC. La Feromona alfa y el Frag1-6PI1 no tienen efecto sobre el crecimiento de los cultivos con respecto al control, mientras que el PI1 inhibe el crecimiento celular completamente. Mediante UFC se observa que el efecto de los PI es el de un bactericida y no de un bacteriostático. Solo se muestran los datos del PI1, pero los PI2,3 y 4 muestran actividades similares.

Determinación de la actividad antifungal de los péptidos Iztli.

Una vez se determinó que los péptidos Iztli son antibacterianos, nos interesaba conocer si de acuerdo a su diseño también podían matar a células *MATa* de *S. cerevisiae* que presentan el receptor Ste2p que reconoce a la secuencia de la feromona alfa. Para evaluar la actividad antifungal de los péptidos Iztli, se pusieron en presencia de células *MATa* del hongo levaduriforme *S. cerevisiae*, incubando la mezcla en medio rico a 30° C por 24 horas, se midió su densidad óptica (D.O.) para hacer curvas de crecimiento.

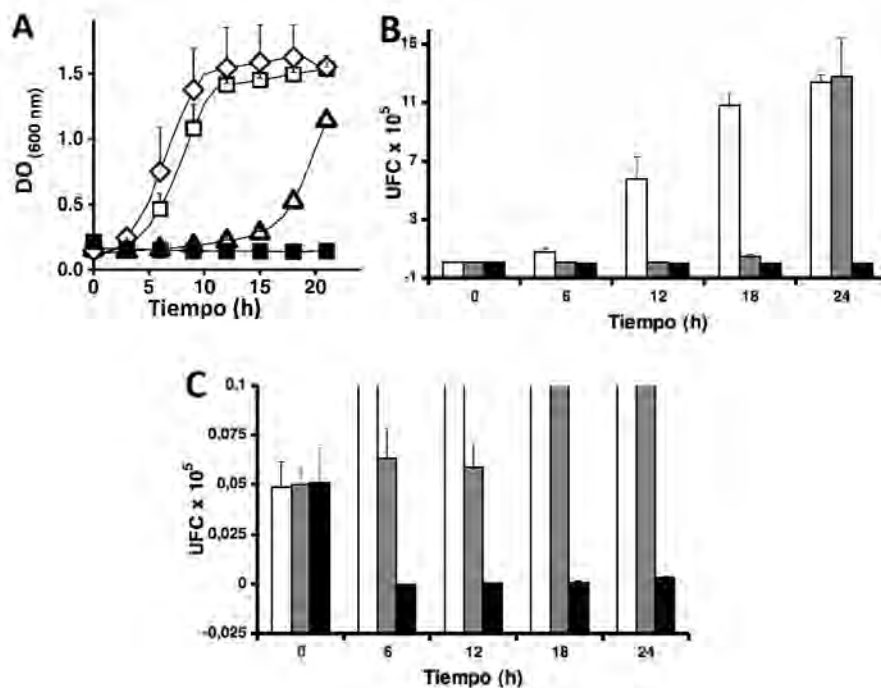


Figura 8. Actividad antifungal de los péptidos Iztli en *S. cerevisiae*. A) Curvas de crecimiento de células *MATa* en presencia de agua destilada □ (control), feromona alfa △ (10 µM), Frag1-6PI1 ◇ (60 µM) y PI1 ■ (10 µM). B) UFC de células *MATa* en presencia de agua destilada (barras blancas) (control), feromona alfa (barras grises) (10 µM) y PI1 (barras negras) (10 µM). C) Acercamiento a valores menores a 10 mil UFC. La feromona alfa arresta el crecimiento de las células mientras que el Frag1-6PI1 no tiene efecto, el PI1 inhibe el crecimiento celular completamente. Mediante las UFC se observa que el efecto de los PI es el de un fungicida y no de un fungistático. Solo se muestran los datos del PI1, pero los PI2,3 y 4 muestran actividades similares.

Se observa (Figura 8) que al tratar a las células *MATa* con el fragmento de seis aminoácidos del PI1 (◇) el crecimiento del cultivo fue similar al del control, en el caso de la feromona alfa se sabe que esta arresta el crecimiento de las células con el receptor

Ste2p, los experimentos que normalmente se realizan para probar el arresto son de inhibición del crecimiento por halo en cajas de agar (Abel y cols., 1998) , sin embargo al realizar los experimentos con la feromona alfa (Δ) en medio liquido no se puede medir el halo, pero se observa que a la misma concentración molar ($10 \mu\text{M}$) que el PI1, la feromona alfa lo que hace es retrasar el crecimiento del cultivo por aproximadamente cinco horas para después reiniciar su crecimiento, a diferencia del PI1 (■) que a una concentración de $10 \mu\text{M}$ inhibe completamente el crecimiento de los cultivos. Sin embargo al igual que en el caso de la actividad antibacteriana, este experimento no permite determinar si la inhibición del crecimiento se debe a que los péptidos son fungistáticos o fungicidas, pero al realizar UFC (Figura 8B y C) se puede establecer el tipo de antifungal que son, el conteo inicial (tiempo 0) de células fue cercano a las cinco mil células, pero en tiempo posteriores (6, 12, 18 y 24 horas) redujeron su numero a valores cercanos a cero, a diferencia de la feromona alfa la cual mantuvo su número constante durante 12 horas, por lo que se concluyó que los péptidos Iztli son fungicidas. Cabe señalar que aunque en las curvas de crecimiento se estableció que el arresto por la feromona dura aproximadamente cinco horas, el aumento en la densidad óptica se da hasta las 15 horas, coincidiendo con el conteo de UFC.

Determinación de la actividad tipo feromona de los péptidos Iztli en *S. cerevisiae*

Conociendo que los péptidos Iztli tienen actividad antifungal en las células *MATa* de *S. cerevisiae*, el siguiente paso fue establecer si la secuencia de la feromona alfa que se encuentra dentro de los péptidos mantenía sus actividades de reconocimiento y señalización celular mediante la interacción con el receptor Ste2p (Bardwell, 2004). Durante el desarrollo de los péptidos Iztli se agregaron aminoácidos a la feromona alfa en su extremo amino terminal lo cual podría haber modificado su pegado al receptor

afectando su actividad, pero considerando que su secuencia como tal se mantiene también era posible que no hubiera cambios; esto se determinó mediante estudios de microscopia en los cuales se observó si después de exponer a las células *MATa* de *S. cerevisiae* a la feromona alfa se daba la formación de una proyección en la célula denominada “shmoo” que tiene como funciones orientar a la célula hacia donde se detectó a la feromona, localizando a la célula de sexo contrario y ayudar en la fusión sexual. Durante la formación del shmoo se concentra en su punta la proteína Fus1p la cual se encarga de la fusión de las células de sexo contrario, al marcar esta proteína con la molécula verde fluorescente: GFP, es posible determinar la acción de la feromona alfa sobre las células *MATa* al observar la localización de Fus1-GFP en la punta del shmoo .

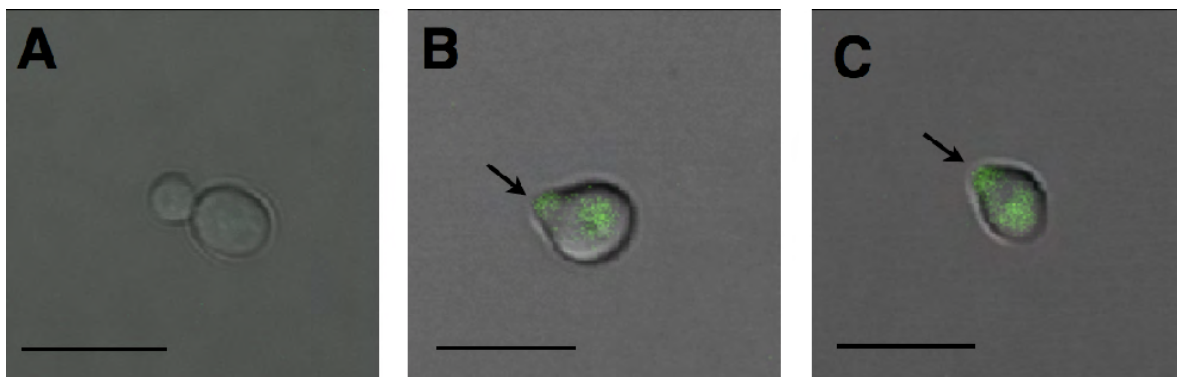


Figura 9. Los péptidos Iztli mantienen la actividad tipo feromona. Imágenes compuestas de microscopia de campo claro y de fluorescencia, células de *S. cerevisiae MATa* Fus1p-GFP en presencia de A) agua destilada, B) Feromona alfa (10 μ M), C) PI1 (10 μ M). En presencia del PI1 se observa la formación de una proyección (shmoo) en la célula y la concentración en el ápice del shmoo de Fus1p-GFP (flecha negra), así como ocurre en presencia de la feromona alfa. Línea de escala 5 μ M.

Las células de *S. cerevisiae* en condiciones normales tienen una forma redondeada (Figura 9-A), pero en presencia de la feromona alfa forman en la membrana celular una proyección denominada “shmoo”, la cual en su punta congrega a Fus1p-GFP (Figura 9-B), en presencia del PI1 también se formó el shmoo y se acumuló la proteína verde fluorescente en su punta (Figura 9-C), demostrando de forma directa que los péptidos Iztli

mantienen la inducción de las rutas de señalización de la feromona y de manera indirecta que los péptidos Iztli se unen al receptor Ste2p mediante la secuencia de la feromona alfa.

Para probar la interacción de la feromona alfa con el receptor Ste2p se sintetizaron cinco análogos del PI1 con sustituciones por alanina en distintas regiones de la secuencia de la feromona basándonos en el trabajo del grupo de Becker que realizó un análisis estructura-función de la feromona alfa mediante un escaneo de todos sus aminoácidos realizando sustituciones con alanina, mediante los cambios en la unión al receptor determinados por variaciones en el tamaño del halo, de esta manera estableció tres dominios funcionales en la feromona alfa: uno de unión (10-13), uno de giro (7-10) y uno más de señalización (1-4) (Abel y cols., 1998). Abel y Becker originalmente realizaron el experimento determinando la cantidad de feromona necesaria para causar un halo de inhibición de 15 mm en placas de agar cultivadas con *S. cerevisiae*, sin embargo en nuestro caso no se puede realizar de esa manera ya que los péptidos Iztli no difunden en agar, en nuestro laboratorio se realizaron algunos ensayos (datos sin publicar trabajo de taller de Amanda Villalón) y se requería de concentraciones muy altas (2 mg/mL) para ver un ligero halo de inhibición, en sustitución se probaron los péptidos en células MATa de *S. cerevisiae* en medio líquido rico incubando la mezcla en medio rico a 30° C por 24 horas, se midió su densidad óptica (D.O.) para hacer curvas de crecimiento, esperando encontrar variaciones similares en la inhibición del crecimiento que ellos reportaron.

Se analizaron las curvas de crecimiento (Figura 10) y tomando al PI1 (■) como el 100 % se obtuvieron valores de porcentajes para el resto de los análogos para poder realizar una comparación con los valores de actividad biológica reportados por Abel y Becker, los cuales también fueron transformados a porcentaje tomando el valor del experimento con la feromona alfa normal como el 100 %.

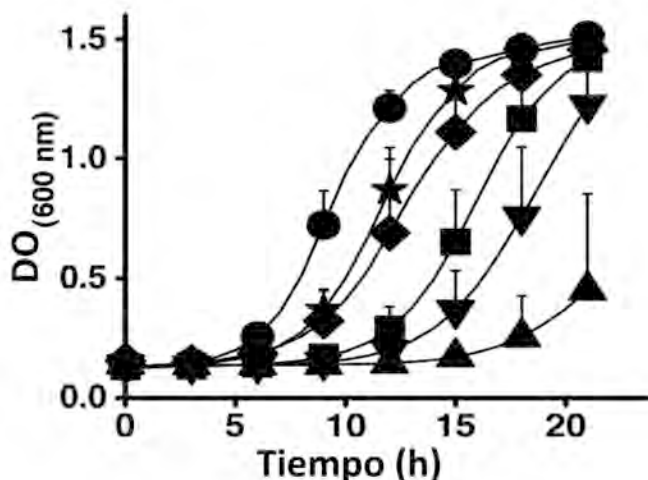


Figura 10. Actividad antifungal de péptidos con sustituciones de alanina en la secuencia de reconocimiento. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* MATa en presencia de PI1H8A ● (2 μ M), PI1G11A ▲ (2 μ M), PI1P14A ▼ (2 μ M), PI1G15A ◆ (2 μ M) y PI1Y19A ★ (2 μ M), como control se uso el PI1 ■ (2 μ M) se incubo por 24 h a 30° C. Los péptidos mostraron variaciones en la actividad antifungal con respecto al PI1.

Feromona alfa con sustituciones	Resultados por difusión en disco (Abel y cols., 1998)	Péptidos Iztli con sustituciones de alanina	Resultados en medio líquido del presente trabajo
FER-H2A	+ 180%	PI1-H8A	+ 44%
FER-Q5A	- 30%	PI1-Q11A	- 59%
FER-P8A	- 24%	PI1-P14A	- 12%
FER-G9A	+ 268%	PI1-G15A	+ 22%
FER-Y13A	+ 202%	PI1-Y19A	+ 28%

Tabla 8. Comparación de cambios ocurridos por las sustituciones en la Feromona alfa y el péptido Iztli 1.

Los experimentos realizados con los análogos de alanina en la secuencia de la feromona del PI1 reproducen de una manera cualitativa los cambios de actividad reportados por Abel en las posiciones equivalentes de la feromona alfa (Tabla 8), en el caso de las sustituciones en las posiciones 8,15 y 19 de los péptidos Iztli, estos aumentan su actividad así como sus equivalentes en las posiciones 2, 9 y 13 de la feromona alfa, mientras que las posiciones 11 y 14 disminuyen su actividad coincidiendo con la reducción de los

lugares 5 y 8 de la feromona. Al comparar los resultados hay dos puntos importantes a considerar: primero las metodologías usadas son diferentes, mientras que Abel usó medio sólido y medición de halos, nosotros usamos medio líquido y la medición de la variación de las curvas de crecimiento y segundo en el estudio de Abel se usó una cepa supersensible a la feromona alfa. Considerando estos factores son comprensibles las variaciones en los porcentajes presentados entre ambos métodos, sin embargo las tendencias se mantienen y permiten decir que si hay interacción entre los péptidos Iztli y el receptor Ste2p y que esta es similar a la de la feromona alfa a pesar de los aminoácidos que se le agregaron.

Determinación de la especificidad sexual de los péptidos Iztli en *S. cerevisiae*

Sabíamos que los péptidos Iztli causan muerte a las células *MATa* de *S. cerevisiae* debido al reconocimiento del receptor Ste2p, por lo que células sin esta proteína no deberían morir como las células *MATalfa* las cuales tienen el receptor Ste3p o las *MATa Ste2Δ* que no cuentan con el gen del receptor Ste2p. Se probaron los péptidos Iztli en ambos tipos celulares en medios líquidos ricos incubando la mezcla en medio rico a 30° C por 24 horas, se midió su densidad óptica (D.O.) para hacer curvas de crecimiento.

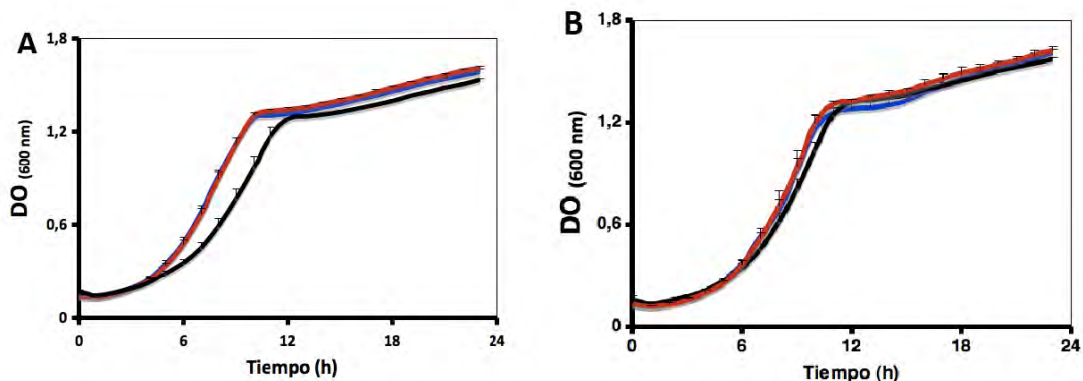


Figura 11. Especificidad de los péptidos Iztli por el receptor Ste2p. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* A) *MATa ste2Δ*. B) *MATalfa*, ambas en presencia de agua (línea azul), feromona alfa (línea roja) (10 μ M) y PI1 (línea azul) (10 μ M) en YPD por 24 hrs. La feromona alfa no induce arresto al no existir el Ste2p en ninguna de las células, en el caso del PI1 no hay reconocimiento y no se produce la muerte de las células. Solo se muestran los datos del PI1, pero los PI2,3 y 4 muestran actividades similares.

Se sabe que la feromona alfa (línea roja) no causa arresto en células sin el receptor Ste2p, por lo que se usó como control negativo y justamente no se observó ningún cambio en el crecimiento con respecto a las curvas control tratadas con agua (Figura 11); como se esperaba el PI1 (línea negra) no afectó el crecimiento de las células *MATa Ste2Δ* y *MATalfa*, los cultivos crecen de manera similar a las curvas control. Los péptidos Iztli no afectan a células de *S. cerevisiae* sin el receptor Ste2p.

Determinación de la internalización celular de los péptidos Iztli

Una vez determinado que los péptidos Iztli matan a las células *MATa* de *S. cerevisiae* de manera dependiente a la presencia del receptor Ste2p y que existe interacción entre estos, hacia falta establecer si los péptidos Iztli son internalizados por endocitosis mediada por el receptor Ste2p, como se ha reportado para la feromona alfa (Schandel y Jenness, 1994). Para observar la internalización mediante microscopia de fluorescencia se sintetizó una variante del PI1 al cual se le agregó la molécula fluorescente roja: TAMRA (T-PI1).

Antes de probar la internalización del péptido marcado se probó que mantuviera su actividad como antifúngico contra las células *MATa* de *S. cerevisiae* y no sobre las *MATalfa* en cultivos líquidos ricos incubando la mezcla en medio rico a 30° C por 24 horas, se midió su densidad óptica (D.O.) para hacer curvas de crecimiento.

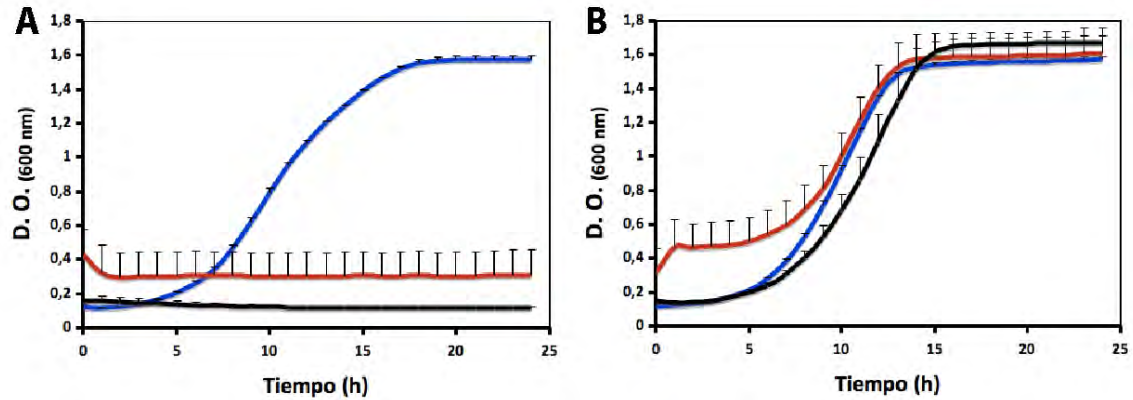


Figura 12. Efecto antifungal de T-PI1 sobre células de *S. cerevisiae*. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* A) *MATa* Control (línea azul), PI1 (línea negra) (10 μ M) y T-PI1 (línea roja) (63 μ M). B) *MATalfa* Control (línea azul), PI1 (línea negra) (10 μ M) y T-PI1 (línea roja) 40 μ M en YPD a 30° C por 24 h. El T-PI1 mantiene su actividad antifungal ya que mata a las células *MATa* a concentraciones seis veces mayores al PI1 normal, mientras que en células *MATalfa* no causa ningún daño a las células al igual que el PI1.

En la figura 12-A, se observa que el T-PI1 requiere una concentración seis veces mayor (63 μ M) para causar muerte en las células *MATa* con respecto a la requerida por el PI1 sin marcar (10 μ M); el aumento puede deberse a la molécula de TAMRA que probablemente altera la estructura y las propiedades fisicoquímicas del péptido y/o su interacción con el receptor y/o con el blanco intracelular. Como se aprecia en la figura 12-B el T-PI1 no inhibe el crecimiento del cultivo de células *MATalfa* al igual que el péptido sin marcar. Debido a la molécula de TAMRA las lecturas de la D.O. se ven alteradas en un incremento de los valores, como se puede apreciar en ambas imágenes de la Figura 12, Esto nos indica que el T-PI1 mantiene su actividad fungicida en las células *MATa* mientras que no afecta a las *MATalfa* de *S. cerevisiae*.

Comprobada la actividad del T-PI1, mediante microscopía de fluorescencia se determinó si el péptido marcado entraba a las células *MATa* de *S. cerevisiae* pero no entraba a las *MATalfa* de acuerdo a lo planteado en el modelo de acción de los péptidos.

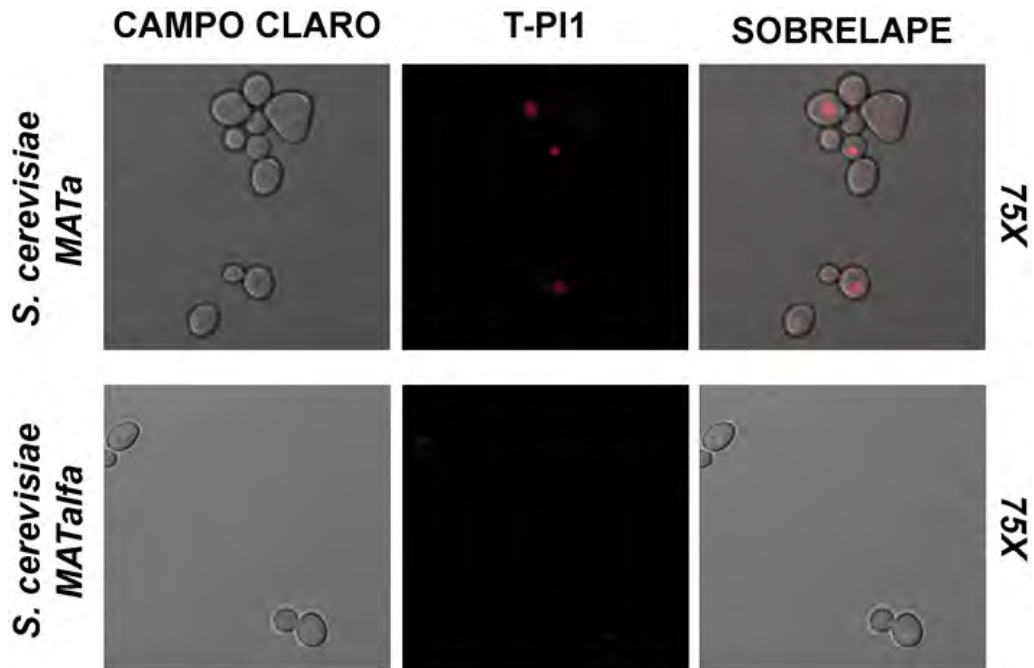


Figura 13. Internalización del T-PI en células de ambos sexos de *S. cerevisiae*. Imágenes de microscopía confocal de células de *S. cerevisiae* *MATa* y *MATalfa* en presencia de T-PI1 (40 μ M) a 1 h de incubación a 30° C. El T-PI1 entra en ambos tipos celulares de *S. cerevisiae*, con y sin el receptor Ste2p.

Las imágenes de la figura 13 muestran que el péptido marcado entra a las células *MATa*, las cuales cuentan con el receptor Ste2p y permiten el reconocimiento con la secuencia de la feromona alfa lo cual conduciría a la internalización por la endocitosis mediada por el receptor, pero el T-PI1 también entra a las células *MATalfa*, las cuales no expresan el receptor Ste2p por lo que no debería ocurrir internalización del péptido. Estos resultados muestran que el T-PI1 entra a ambos tipos de células de *S. cerevisiae* sin importar la presencia del receptor Ste2p.

Debido a la aparente inespecificidad de los péptidos Iztli se probó su internalización contra otro hongo levaduriforme (*Candida glabrata*), en el que anteriormente se probaron los péptidos Iztli y en el que no se observó efecto alguno sobre su crecimiento (Rodríguez Plaza, tesis de maestría, 2009); también se evaluó contra un hongo filamentoso

(*Aspergillus nidulans*); no se han realizado pruebas de toxicidad de los péptidos sobre *A. nidulans*.

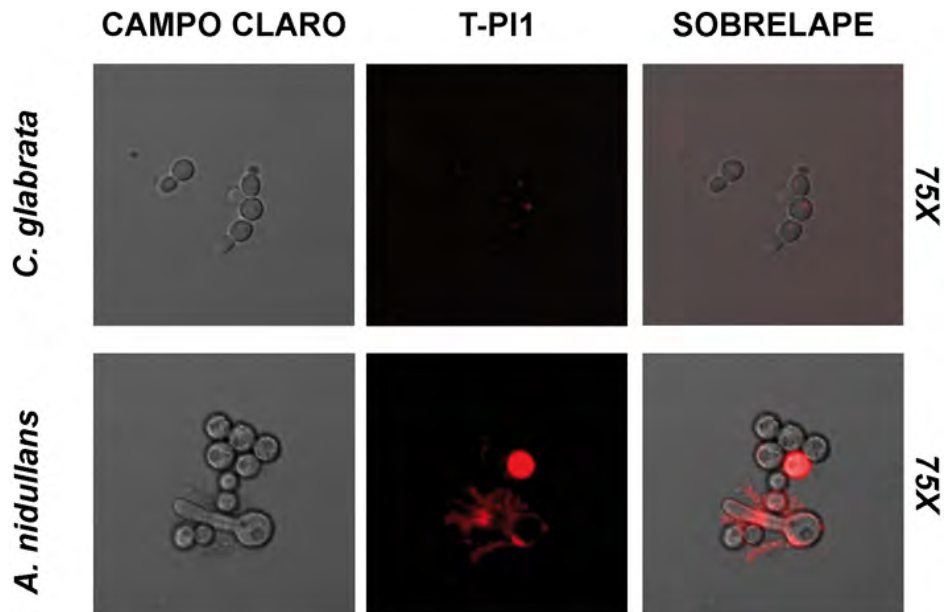


Figura 14. Internalización del T-PI en otro hongo levaduriforme y un filamentoso. Imágenes de microscopía confocal de células de *C. glabrata* (paneles superiores) y *A. nidulans* (paneles inferiores) en presencia del T-PI1 (40 μ M) a 1 h de incubación a 30 $^{\circ}$ C. El T-PI1 entra tanto a *C. glabrata* como a *A. nidulans*

Como se observa en las imágenes de la figura 14 el T-PI1 también entra en células de *C. glabrata* y de *A. nidulans*; estos datos junto con los de las células *MATalfa* muestran que la internalización del péptido no es exclusiva de las células *MATa* de *S. cerevisiae* como se creía inicialmente; sin embargo se ha reportado la internalización de la molécula de TAMRA sola en fibroblastos humanos (CRL-2076) (Cunningham y cols., 2010), por lo que existe la posibilidad de que la molécula de TAMRA internalice al péptido por su cuenta de manera independiente al receptor o que la internalización que se observa ocurra debido a una ruptura del enlace entre la molécula de TAMRA y el péptido, dejando solo al fluoróforo para entrar por su cuenta.

Para descartar esta posibilidad se marcó al PI1 con la molécula verde fluorescente: Hilytefluor-488, el cual no es internalizado por sí solo a las células (comunicación personal con ANASPEC). El diseño del PI1 unido a Hilytefluor-488 (PI1-H488) se basó en el reporte hecho por el grupo del Dr. David Drubin sobre las dinámicas de endocitosis de una feromona alfa marcada fluorescentemente (Toshima y cols., 2006). Antes de observar la entrada del péptido marcado a las células, se comprobó que mantuviera su efecto antifungal en las células *MATa*, desafortunadamente no se probó en células *MATalfa*, debido a una limitante en la cantidad de péptido disponible.

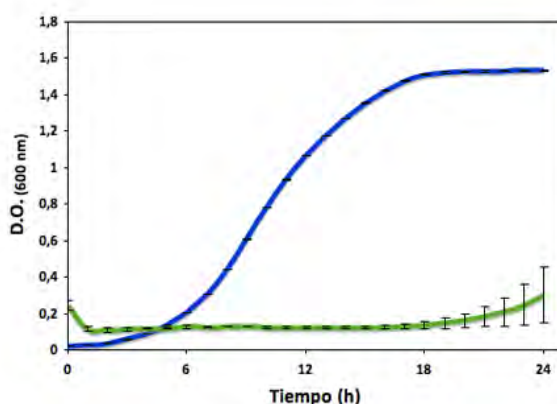


Figura 15. Actividad antifúngica del PI1-H488. Curvas de crecimiento de células de *S. cerevisiae* *MATa* en presencia de: agua destilada (línea azul) y PI1-H488 27 μM (línea verde) en YPD a 30° C por 24 hrs. El péptido marcado causa muerte celular a concentraciones casi tres veces mayores al PI1 original.

PI1-H488 mostró actividad antifúngica contra las células *MATa* a una concentración aproximadamente tres veces mayor a la del péptido sin marcar (Figura 15) (debe tomarse en cuenta que los péptidos marcados con fluoróforos no se cuantificaron mediante Nanodrop, ya que la molécula fluorescente altera las lecturas, por lo que la concentración reportada se basa en la cantidad del péptido en peso seco). Considerando este dato se probó si el péptido marcado entraba en las células *MATa*.

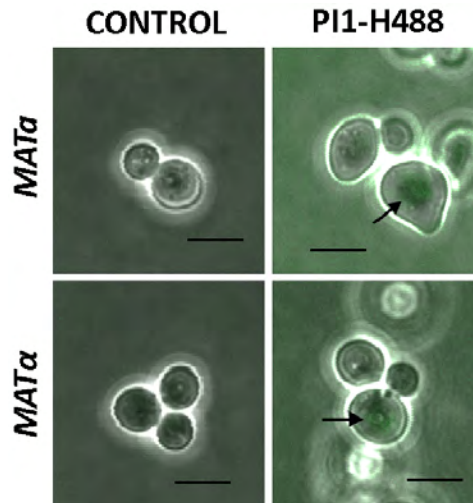


Figura 16. Internalización del PI1-H488 en células de levadura. Imágenes de microscopía confocal de células de *S. cerevisiae* *MATα* y *MATαfa* en presencia de agua (control) y PI1-H488 (90 μ M) a 1 h de incubación a 30° C. Barra de escala 5 μ m. Las flechas negra indican la localización del péptido marcado dentro de las células.

En la figura 16 se observa al péptido marcado verde tanto dentro de las células *MATα* como de las *MATαfa* (flechas negras), lo cual confirma los datos obtenidos con T-PI1: los péptidos Iztli si entran a las células de *S. cerevisiae* sin importar la presencia del receptor Ste2p.

Actividad de los péptidos Iztli sobre mitocondrias.

El diseño de los péptidos Iztli implica que una vez dentro de las células de *S. cerevisiae* estos causan muerte debido al daño que causan a las mitocondrias por sus propiedades antibacterianas, recordemos que las mitocondrias se originaron a partir de ciertas bacterias, por lo cual son sensibles a algunos antibacterianos (Ellerby y cols., 1999).

Determinación del hinchamiento mitocondrial producido por los péptidos Iztli.

Demostrado que los péptidos Iztli son antibacterianos, el siguiente paso fue probar si afectan a la mitocondria, para esto se determinó el hinchamiento mitocondrial. Se aislaron mitocondrias de *S. cerevisiae* y se pusieron en un medio isotónico, se realizó un registro

continuo de la absorbancia a 600 nm, posteriormente se agregaron los péptidos Iztli y se observó si se alteraban las lecturas, en el caso de que los péptidos formaran poros en las membranas de la mitocondria, permitiendo la entrada de agua e iones, lo cual hincharía a la mitocondria modificando la cantidad de luz que absorbe y reduciendo las lecturas de la D.O.

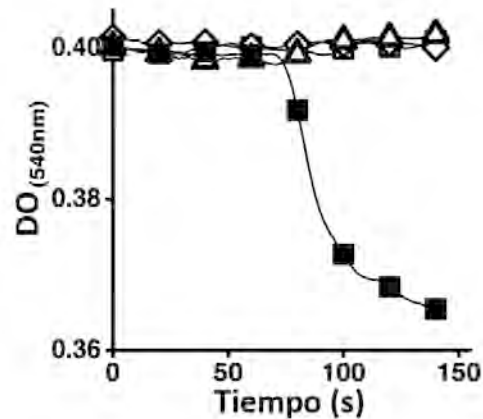


Figura 17. Los péptidos Iztli causan hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*. Lectura de D.O. (600 nm) de mitocondrias en presencia de agua destilada □, FER △ (160 μ M), Frag1-6PI1 ◇ (100 μ M) y PI1 ■ (117 μ M). Los péptidos Iztli causan hinchamiento mitocondrial contrario a la FER y el Frag1-6PI1. Solo se muestran los datos del PI1, pero los PI2,3 y 4 muestran actividades similares.

En presencia de los péptidos Iztli la D.O. de la suspensión de mitocondrias disminuyó, lo cual indica su hinchamiento debido a la entrada de agua posiblemente debido a la formación de poros en las membranas mitocondriales (Figura 17), esto se debe a sus propiedades antibacterianas y a la similitud de las membranas bacterianas y mitocondriales.

Determinación de la actividad de los péptidos Iztli sobre la respiración mitocondrial.

Los péptidos Iztli tienen actividad antibacteriana y pueden hinchar a mitocondrias aisladas, estos dos hechos sugieren que pueden causar daño a las mitocondrias y en consecuencia afectar sus actividades, tales como la respiración. Para probar esta

hipótesis se determinó la respiración de mitocondrias aisladas en presencia de los péptidos Iztli.

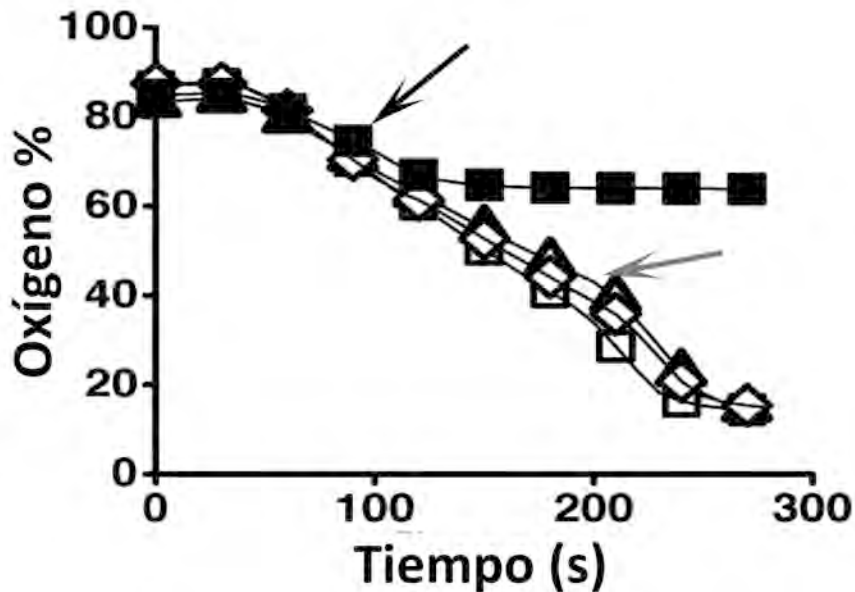


Figura 18. Inhibición de la respiración por los péptidos Iztli en mitocondrias aisladas.

Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* MATa en presencia de los siguientes controles: agua destilada □, Feromona alfa Δ (19 μ M), Frag1-6PI1 \diamond (100 μ M) y PI1 ■ (11 μ M) agregados a los 80 s del inicio del trazo (flecha negra), como un control de la respiración se agregó CCCP (1 μ M) a los 180 s (flecha gris). El PI1 detuvo el consumo de oxígeno a los pocos segundos de haber sido agregado a la solución con respecto al control, mientras que la feromona alfa y el Frag1-6PI1 no afectaron la respiración. Los péptidos Iztli 2, 3 y 4 mostraron efectos similares al PI1.

En la figura 18 podemos ver que al agregar el PI1 (■) a las mitocondrias aisladas el consumo de oxígeno se detuvo a los pocos segundos, cosa que no ocurrió con la feromona alfa (Δ) (19 μ M) o el fragmento de 6 aminoácidos (\diamond) (100 μ M) incluso a concentraciones superiores a las usadas para el PI1 (11 μ M); al agregar el agente desacoplante CCCP a los controles la respiración se aceleró confirmando el estado acoplado de la cadena respiratoria, pero en el caso del PI1 no se aceleró la respiración por lo que la cadena está desacoplada.

Los datos reunidos hasta el momento indican que los péptidos Iztli entran a ambos tipos celulares de *S. cerevisiae* de manera independiente al receptor Ste2p y causan hinchamiento e inhibición de la respiración en mitocondrias aisladas, por lo que es probable que si se tratan con los péptidos Iztli ambos sexos de la levadura, estos deben ver afectada su respiración

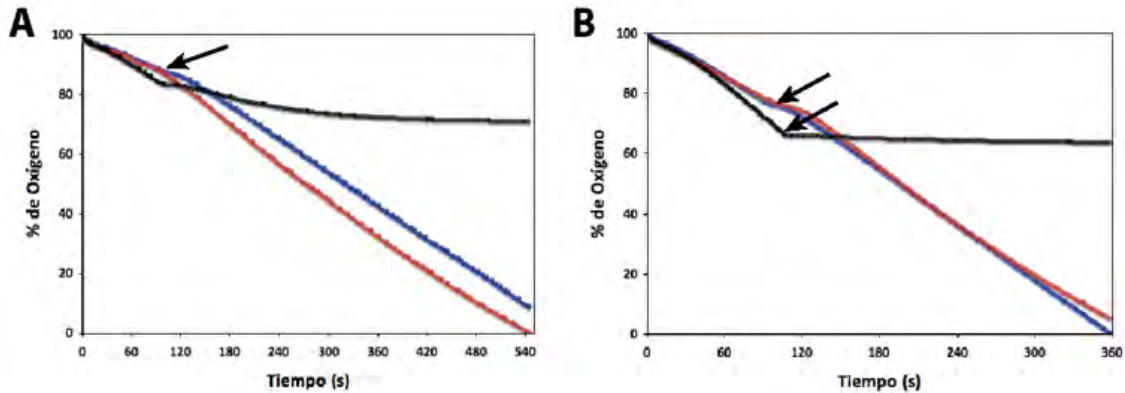


Figura 19. Inhibición de la respiración en células de *S. cerevisiae*. Consumo de oxígeno de células: A) *MATa* y B) *MATalfa* se trataron con agua destilada (línea azul) y feromona alfa (767 μ M) (línea roja) como controles y PI3 (68 μ M) (línea negra) a los 120 segundos (flechas negras) del inicio de la toma de lecturas. El PI3 inhibe la respiración de las células *MATa* y *MATalfa*, mientras que la FER no tiene ningún tipo de efecto sobre la respiración.

En la figura 19 podemos ver que al tratar a las células con el PI3 (línea negra) se inhibió la respiración en ambos tipos celulares, mientras que la feromona alfa (línea roja) la cual arresta el crecimiento de las células lo cual podría afectar de alguna manera la respiración no causó ningún cambio en el consumo del oxígeno. Los péptidos Iztli usados para los ensayos de respiración celular no tienen a los fluoróforos, con lo cual se descarta que la inhibición de la respiración ocurriera por las moléculas fluorescentes. Estos datos coinciden con lo observado en los experimentos de internalización con los péptidos marcados, por lo que los péptidos Iztli deben entrar a los dos tipos celulares por un mecanismo alterno común, de manera independiente al receptor Ste2p.

Determinación de genes involucrados en el mecanismo de acción de los Péptidos

Iztli

Se probaron los péptidos Iztli en cepas con mutantes nulas de diversos genes para determinar si la ausencia de alguno de ellos protegía de la acción de los péptidos y por lo tanto estaba relacionado con su mecanismo de acción.

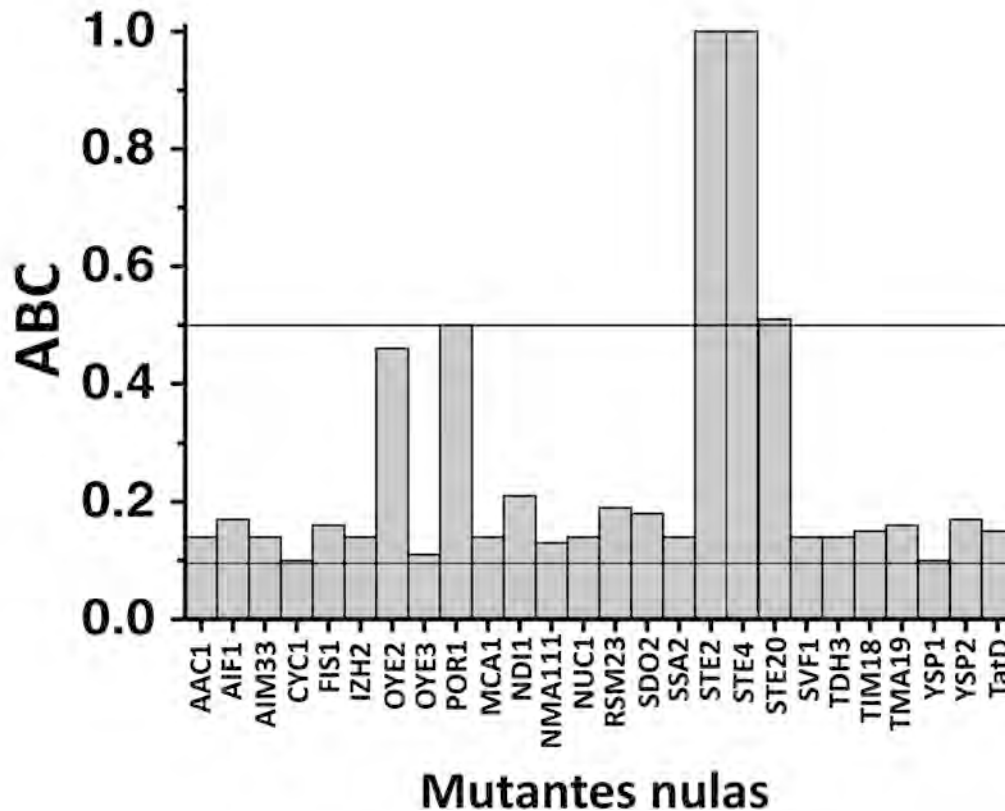


Figura 20. Escaneo de mutantes nulas resistentes a los péptidos Iztli. El área bajo la curva (ABC) para cada cepa de las mutantes nulas de *S. cerevisiae* probada contra el PI1 (10 μ M) fue calculada y graficada. El ABC control (0.09) es el valor del PI1 (10 μ M) contra *S. cerevisiae* MATa. Se tomo como punto de corte 0.5, para determinar si las mutantes nulas presentan resistencia al PI1.

Las curvas de crecimiento que se obtuvieron se convirtieron en áreas bajo la curva (ABC).

Los resultados de este escaneo (Figura 20) mostraron que genes involucrados en procesos apoptóticos como el factor inductor de la apoptosis (AIF1), el citocromo c (CYC1) y la metacaspasa 1 (MCA1) no están involucrados en el mecanismo de muerte producido por los péptidos Iztli ya que sus mutantes nulas no confieren resistencia a los

péptidos, mientras que los genes que codifican para proteínas relacionadas a la ruta de señalización de la feromona alfa (*ste2*, *ste4* y *ste20*) al no estar presentes protegen del efecto del péptido; estos resultados indican que la muerte que producen los péptidos Iztli no tiene que ver con apoptosis, pero si tiene que ver la cascada de señalización inducida por la feromona alfa.

Esta cascada de señalización (Figura 4) inicia con la unión de la feromona alfa con el receptor Ste2p el cual a través de Ste4p en la proteína G, una proteína de andamiaje y Ste20p activan a un grupo de MAPquinasas que forman una cascada de señalizaciones que prepararan a la célula para el apareamiento sexual. En caso de existir alteraciones en la feromona que afecten su interacción con el receptor. la señalización se verá afectada reflejándose en el arresto celular como lo reportó (Abel y cols., 1998) o en nuestro caso en la actividad antifungal de los péptidos Iztli como ya lo probamos con los análogos de alanina (Figura 11, Tabla 8)

Como una alternativa al análisis ya realizado se evaluó un péptido variante del PI1, al cual se le colocó un grupo amino en lugar de un oxígeno del grupo carboxilo terminal (PI1-CO-NH₂), normalmente esta modificación lo que hace es estabilizar el péptido pero en nuestro caso lo que hizo cuando lo probamos en las células *MATa* fue reducir su actividad.

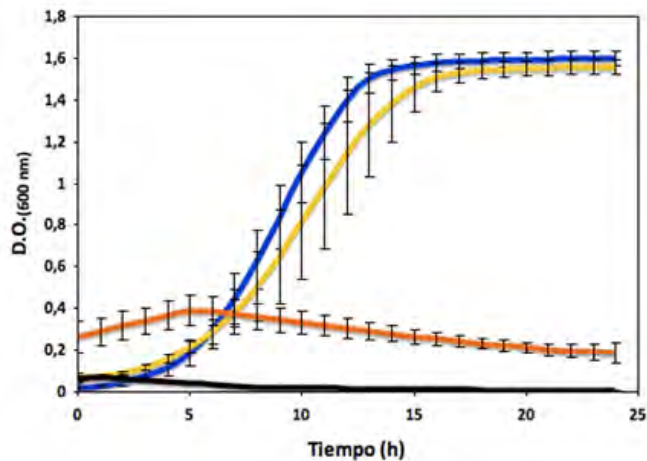


Figura 21. Actividad antifúngica del PI1-CO-NH₂⁺. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* MATa en presencia de agua destilada (línea azul), PI1 (10 µM) (línea negra), PI1CO-NH₂⁺ 10 µM (línea dorada) y 40 µM (línea naranja). El PI1CO-NH₂⁺ muestra actividad a concentraciones cuatro veces mayores con respecto al PI1.

Este nuevo péptido Iztli resultó ser activo a una concentración cuatro veces mayor que el PI1 (Figura 21). La reducción de la actividad puede ser explicada por estudios previos que han reportado que el extremo carboxilo de la feromona alfa es importante para la unión al receptor y por lo tanto necesaria para la señalización (Naider y Becker, 2004), requiriéndose mayores concentraciones del péptido para causar el arresto celular. Por esos antecedente suponemos que la actividad de feromona del péptido puede estar alterada, lo cual explicaría el aumento de péptido necesario para causar muerte celular; sin embargo, las gráficas de crecimiento no proporcionan datos para confirmar este hecho. Para ello se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia en los cuales se agregó el péptido PI1-CO-NH₂⁺ a una cepa MATa Fus1p-GFP de *S. cerevisiae* para buscar la formación del shmoo y la acumulación de la proteína Fus1p-GFP en la punta del shmoo como indicadores de la activación de la ruta de señalización que lleva al arresto celular.

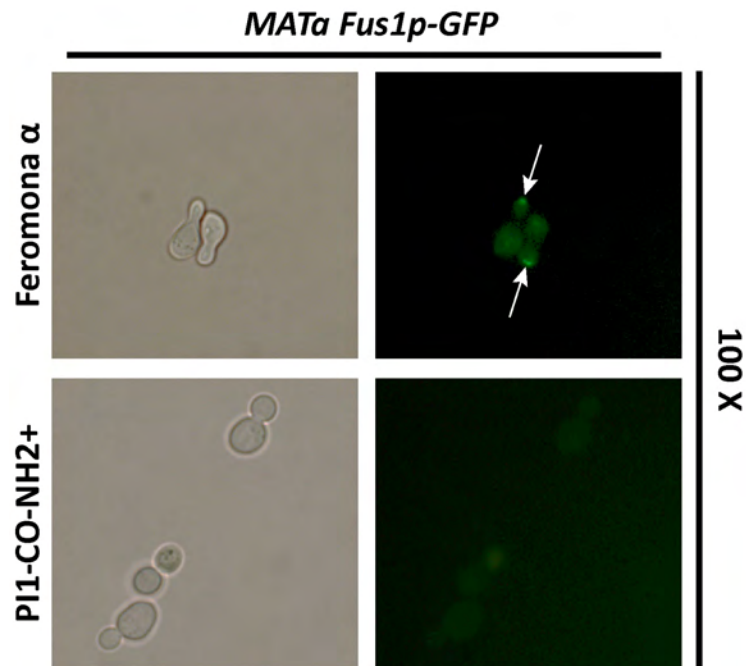


Figura 22. Inactividad tipo feromona del PI1-CO-NH₂⁺ en células de levadura. Microscopía de campo claro y fluorescencia de *S. cerevisiae* *MATa* Fus1p-GFP en presencia de feromona alfa 10 μ M y PI1-CO-NH₂⁺ 40 μ M a las 6 h de incubación a 30° C. La FER induce formación de shmoo y concentración de Fus1p-GFP en su punta (flechas blancas), el PI1-CO-NH₂⁺ no causa cambios en la morfologías de las células ni concentración de la proteína fluorescente.

El PI1-CO-NH₂⁺ no indujo la formación de shmoo ni la acumulación de Fus1p-GFP (Figura 22) a pesar de que se usó una concentración cuatro veces mayor al control (feromona alfa, 10 μ M), indicando que el péptido no activa la cascada de señalización de las MAPquinas. Se sintetizó a PI1-CO-NH₂ unido a la molécula TAMRA en su extremo amino terminal para determinar si la reducción de su actividad se debe a que no entra en las células.

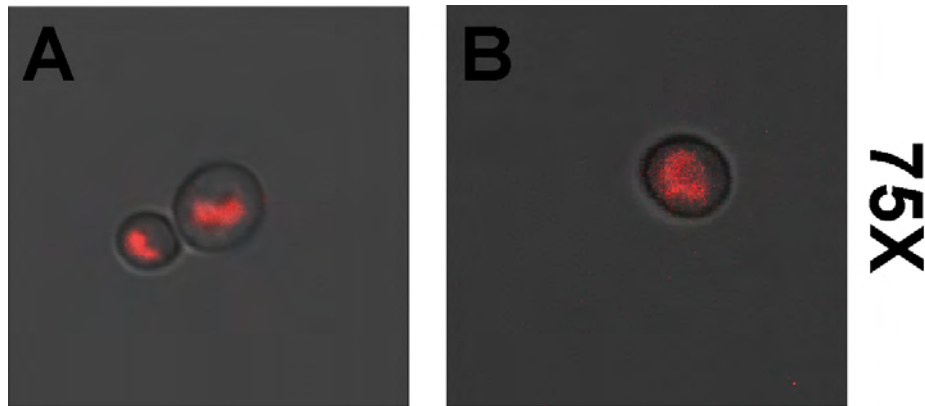


Figura 23. Internalización de T- PI1-CO-NH₂⁺ en células de *S. cerevisiae*. Imágenes de microscopía confocal de células: A) *MATa* y B) *MATalfa* después de una hora de incubación a 30° C con 100 µg/mL de T- PI1-CO-NH₂⁺.

El péptido marcado con TAMRA entra tanto en las células *MATa* como en las *MATalfa* (Figura 23), confirmando que el péptido T- PI1-CO-NH₂⁺ falla en la señalización. Tomando en cuenta este hecho, se probó compensar la falta de actividad tipo feromona de PI1-CO-NH₂⁺ agregando cantidades equimolares de la feromona alfa a un cultivo de células *MATa*.

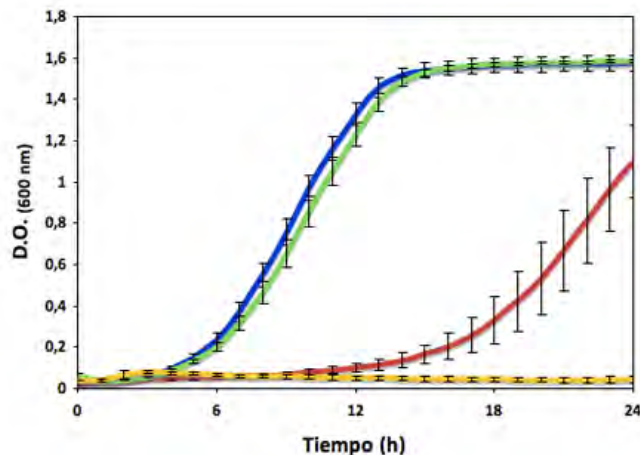


Figura 24. Restauración de la actividad del PI1-CO-NH₂⁺. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* *MATa* con agua destilada (línea azul), feromona alfa (5 µM) (línea roja), PI1-CO-NH₂⁺ (5 µM) (línea verde) y mezcla feromona alfa (5 µM) y PI1-CO-NH₂⁺ (5 µM) (línea amarilla) por 24 h de incubación a 30° C. La feromona alfa y el PI1-CO-NH₂⁺ por separado no causan el efecto que ocurre al mezclar, restaurando la actividad de muerte celular.

Al agregar la feromona alfa y el PI1-CO-NH₂⁺ a las células *MATa* se produce muerte, cosa que no ocurre con la feromona o el péptido modificado por sí solos (Figura 24). Este resultado indica que la feromona alfa complementa el efecto perdido por la modificación

del péptido, restaurándose el efecto de muerte celular, e incluso parece ser que se potencia el efecto del PI1-CO-NH₂⁺, ya que induce muerte en las células MATa a una concentración conjunta de 10 μM (5 μM de feromona alfa y 5 μM de PI1-CO-NH₂⁺), mientras que el PI1 requiere de 10 μM. Estos experimentos apoyan la teoría que los péptidos Iztli mediante la secuencia de la feromona alfa activan la señalización del receptor Ste2p, ayudando a inducir muerte en las células MATa de *S. cerevisiae*.

Determinación de la actividad de los péptidos Iztli sobre los tipos de metabolismo de *S. cerevisiae*

Los péptidos “cazador-asesino” originales matan a las células angiogénicas mediante el daño a la mitocondria, la liberación de citocromo c y la inducción de apoptosis. Sin embargo para nuestro caso ya se demostró que la ausencia de algunos genes claves para la apoptosis de *S. cerevisiae* no protegen de la acción de los péptidos Iztli (Figura 21), por lo que la muerte debe estar ocurriendo mediante otro mecanismo de acción.

Los péptidos Iztli inhiben la respiración de *S. cerevisiae*, reduciendo la producción de energía en la célula, esto podría explicar la inducción de la muerte por los péptidos si las células solamente respiraran, sin embargo en presencia de glucosa también fermentan ya que son anaerobios facultativos.

Los experimentos realizados hasta el momento se han llevado a cabo en medio con glucosa (YPD), por lo que aunque los péptidos Iztli inhiben la respiración, las células también fermentan, indicando que causan la muerte de las células por otro mecanismo. Considerando este punto se probaron los péptidos Iztli en un medio con lactato (YPLac)

en el cual solo pueden respirar las células para observar si sólo la inhibición de la respiración puede causar la muerte de las células.

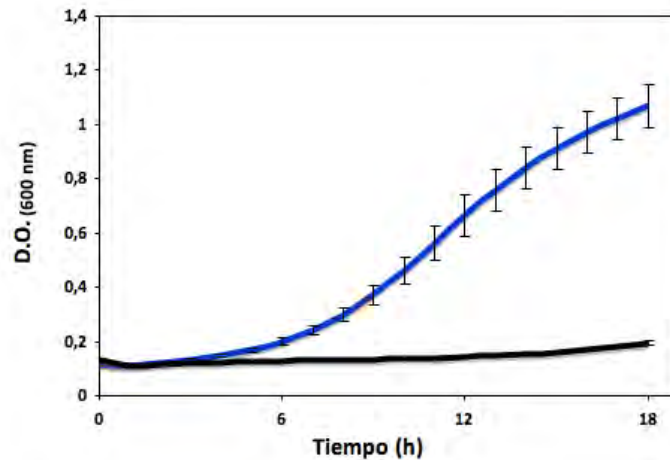


Figura 25. Actividad antifungal de los péptidos Iztli en un medio respiratorio. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae MATa* con: agua (línea azul), PI1 10 µM (línea negra) incubado en YPLac durante 18 h a 30° C. El PI1 causa muerte celular en un medio exclusivamente respiratorio.

En un medio en el cual las células sólo pueden respirar, los péptidos Iztli causan muerte celular (Figura 25). Si el mecanismo de acción involucrara solamente al metabolismo fermentativo entonces los péptidos no deberían haber tenido actividad sobre las células en YPLac, esto quiere decir que muy probablemente que la acción ejercida por los péptidos no afecta un tipo de metabolismo en específico.

Para determinar la acción de los péptidos sobre células que solo fermentan se obtuvo una cepa de *S. cerevisiae MATa* $\rho 0$, derivada de una cepa silvestre sometida a mutaciones sucesivas con bromuro de etidio, con el fin de eliminar su ADN mitocondrial; este procedimiento elimina muchas proteínas de la cadena respiratoria que se encuentran codificadas en el ADN mitocondrial, por lo que estas células serán incapaces de respirar y solo obtendrán energía mediante la fermentación.

Se comprobó que el metabolismo respiratorio de la cepa $\rho 0$ se encontrara inactivo, incubándose en un medio de cultivo sólido con sustrato respiratorio (lactato), en el cual no hubo crecimiento y en un sustrato fermentable (glucosa) en el cual creció de manera normal (Figura 26).

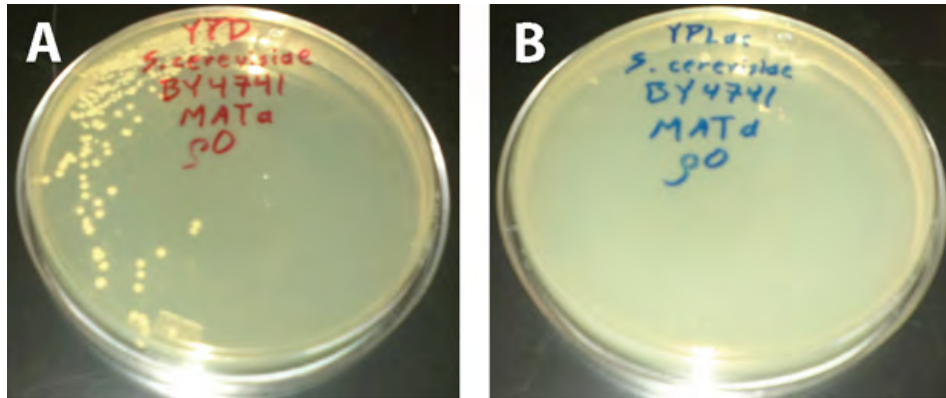


Figura 26. Caracterización metabólica de la cepa $\rho 0$. Crecimiento de cultivos de *S. cerevisiae* BY4741 cepa $\rho 0$ en medio sólido en A) glucosa y B) lactato.

Dentro de las pruebas realizadas para la caracterización de la cepa $\rho 0$, también se determinó el consumo de oxígeno de la cepa, verificando que no respira, a diferencia de la cepa silvestre (Figura 27-A). Una vez establecido que la cepa $\rho 0$ sólo fermenta, se probó el PI1 contra esta.

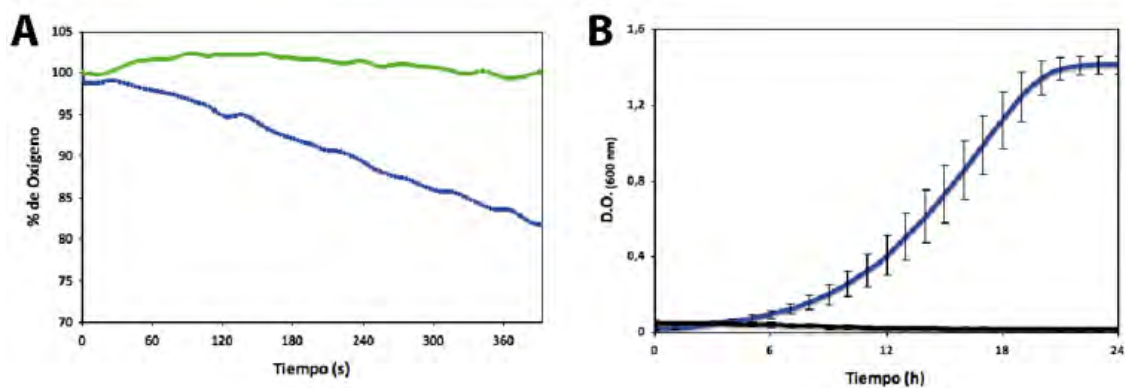


Figura 27. Metabolismo respiratorio y efecto antifungal de los péptidos Iztli sobre células de levadura $\rho 0$. A) Oximetría de *S. cerevisiae* BY4741 en YPLac, cepa silvestre (línea azul), cepa $\rho 0$ (línea verde). B) Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741 $\rho 0$ con agua (línea azul), PI1 (10 μ M) (línea negra), en YPD incubado por 24 h a 30° C. La cepa $\rho 0$ no respira a diferencia de la cepa silvestre. El PI1 mata a las células $\rho 0$ que solo fermentan.

El PI1 causa muerte a las células $\rho 0$ (Figura 27-B), por lo que si solo esta activa la fermentación los péptidos Iztli también causan muerte celular, en concordancia con los datos obtenidos al probar los péptidos en células con el metabolismo respiratorio y respiratorio/fermentativo,

Determinación de la fermentación de *S. cerevisiae* en presencia de los péptidos Iztli.

Puesto que los péptidos matan a las células de *S. cerevisiae* MATa con el metabolismo fermentativo activo, se probó si los péptidos Iztli afectan su fermentación midiendo la tasa fermentativa (producción de etanol).

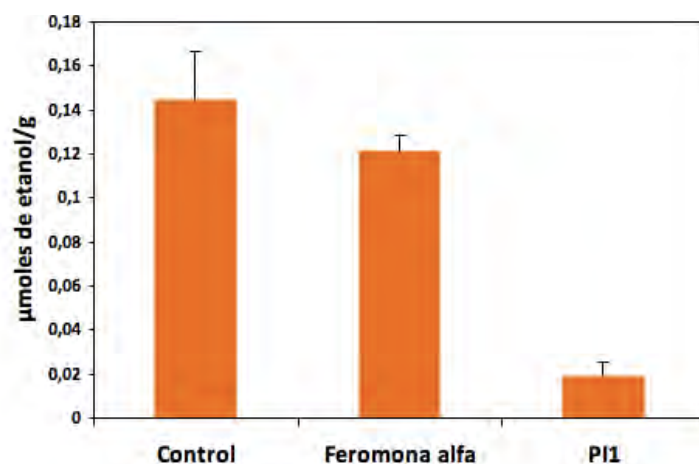


Figura 28. Reducción de la fermentación por el PI1. Se presentan los μ moles de etanol producidos por gramo de células de *S. cerevisiae* MATa en presencia de agua destilada (control), feromona alfa 27 μ M y PI1 27 μ M incubados por 10 minutos. El PI1 reduce la generación de etanol, mientras que con la feromona no se observa una diferencia significativa.

Los niveles de etanol en presencia del PI1 se reducen en un 87% con respecto a las células no tratadas, mientras que con la feromona alfa la variación no es significativa (Figura 28) . La significación de las diferencias se confirmó estadísticamente por la prueba de la T de Student. Estos resultados en conjunto muestran que los péptidos Iztli causan muerte celular sin importar si el metabolismo fermentativo o respiratorio se encuentran activos o incluso si los dos están en funcionamiento. también se observó que los péptidos inhiben la respiración y reducen la fermentación de las células afectando afectando la

producción de energía, pero no sabemos si estos cambios metabólicos son los que producen la muerte de la célula o antes si ocurre otro evento que causa estas bajas en el metabolismo bioenergético de la levadura.

7 DISCUSIÓN

Los péptidos Iztli tienen la función “asesino”, la cual fue incorporada mediante la adición de seis aminoácidos a la secuencia de la feromona alfa de *S. cerevisiae*. Esta actividad antibacteriana se determinó en cultivos de *E. coli DH10B* (Figura 7), con resultados positivos a una concentración de 20 μM , causando muerte al 99% de las bacterias de el cultivo durante 24 horas. Estos resultados indican es posible diseñar nuevos antibacterianos basándonos solamente en tres propiedades fisicoquímicas (punto isoeléctrico, momento hidrofóbico y Agadir) de los péptidos antibacterianos: Cecropina A, Magainin 2 y Ce-Ma.

Previamente se ha reportado que los péptidos Iztli causan hinchamiento en las mitocondrias de células cancerígenas debido a su secuencia asesina (Ellerby y cols., 1999), los péptidos Iztli tienen las propiedades de un péptido asesino y causan hinchamiento en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* (Figura 17), mientras que la feromona alfa y el fragmento de 6 aminoácidos no afectaron a la mitocondria, ya que sus propiedades fisicoquímicas no son las de un péptido asesino (del Rio y cols., 2001, Rodríguez Plaza y cols., 2012). Tanto la muerte de las bacterias como el hinchamiento de las mitocondrias puede deberse a la formación de poros en sus membranas; al medir los potenciales eléctricos de membranas artificiales en presencia de los péptidos Iztli, se observan cambios de potencial que indican la formación de poros (Figura 7 del apéndice 2).

S. cerevisiae no cuenta con una muerte apoptótica canónica (Ligr y cols., 1998), principalmente debido a la falta de un homólogo de la proteína pro-apoptótica de mamíferos Bax, cuya función es interaccionar con las mitocondrias e inducir la apertura

del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC por sus siglas en inglés), mediante el cual se libera el citocromo *c*, el cual activa a las caspasas y se lleva a cabo la apoptosis, a pesar de esto en los últimos años se han descubierto homólogos de diversos genes de mamíferos involucrados en la apoptosis y se han observado marcadores de apoptosis al tratar a las células con diversos compuestos que causan muerte celular (e.g. ácido acético, aspirina, peróxido de hidrógeno) por lo que se le denomina “apoptosis tipo levadura” (Balzan y cols., 2004, Madeo y cols., 1997, Madeo y cols., 1999). Sin embargo ya que no presentaron resistencia a la acción de los péptidos algunas de las mutantes nulas de genes necesarios para este tipo de apoptosis (Figura 20, genes: *CYC1*, *MCA1*, *AIF1*) (Greenhalf y cols., 1996, Ligr y cols., 1998), sabemos que la muerte inducida por los péptidos Iztli no ocurre por apoptosis.

Dentro de los genes cuyas mutantes nulas se analizaron y se reportaron como resistentes a la acción de los péptidos (Figura 20) se encuentra *POR1* también conocido como VDAC, que junto con el acarreador de adenín nucleótidos y la ciclofilina D es una de las proteínas que conforman un canal mitocondrial no selectivo de *S. cerevisiae* (*scMUC* por sus siglas en inglés) (Manon y cols., 1998). Este poro al abrirse causa el incremento en el transporte inespecífico de iones y metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial, despolarizando al organelo y pudiendo llegar a ocasionar la muerte de la célula (Uribe-Carvajal y cols., 2011). Considerando las actividades que realizan los péptidos Iztli sobre las mitocondrias (hinchamiento e inhibición de la respiración) es interesante que una proteína de la membrana externa mitocondrial proteja de la acción de los péptidos. Es posible que los péptidos Iztli interaccionen con el canal mediante Por1p induciendo su apertura y liberando moléculas que pueden llegar a inducir la muerte de la célula mediante un mecanismo desconocido; por esta razón será importante estudiar la actividad de los péptidos con mitocondrias aisladas de la cepa sin Por1p.

La feromona alfa de manera convencional al unirse al receptor Ste2p, da inicio a una cascada de señalizaciones que prepararan a la célula para la reproducción sexual (Figura 4-B) (Bardwell, 2005). Existen dos formas para identificar morfológicamente la activación de esta cascada, una es la polarización de la célula, resultando en la generación de un “shmoo” que se genera en dirección hacia donde la célula percibió la feromona (Arkowitz, 2009, Merlini y cols., 2013) y la segunda es la acumulación de Fus1p en la punta del shmoo. Ésto se puede observar mediante el marcaje de Fus1p con GFP (Bagnat y Simons, 2002). En efecto, al tratar las células *MATa* con los péptidos Iztli, se observó la formación del shmoo y la concentración de Fus1p-GFP en su punta, tal y como se observó en el control con la feromona alfa (Figura 9), indicando que los péptidos Iztli tienen la actividad tipo feromona.

Los péptidos Iztli causan muerte en las células *MATa* de *S. cerevisiae*, que tienen el receptor Ste2p (Figura 11). Pero los péptidos no matan a las células *MATa ste2Δ* y *MATalfa*, en las que el receptor Ste2p está ausente de la membrana celular, en la primera por no existir el gen y en la segunda por no ser expresado, comprobando que se requiere el receptor Ste2p para que los péptidos Iztli causen muerte celular.

Los péptidos Iztli tienen dos funciones: la cazadora, es decir la tipo feromona (formación de shmoo y localización de Fus1-GFP) y la asesina como antibacteriano, juntas en un solo dominio funcional generaron una nueva actividad: la de antifungal para las células *MATa* de *S. cerevisiae*.

Debido a la dependencia de los péptidos Iztli hacia el receptor Ste2p y su actividad tipo feromona, se considera que la interacción entre: secuencia-feromona y el receptor se mantiene, esto se comprobó mediante la sustitución por alanina de los trece aminoácidos

de la feromona alfa de acuerdo a reportes previos (Abel y cols., 1998). Nuestros resultados (Figura 10 y Tabla 8) mostraron las mismas variaciones antagonistas y sinérgicas reportadas por Abel, por lo que pesar de los seis aminoácidos agregados a los péptidos Iztli, estos mantienen la unión tipo feromona con el receptor Ste2p.

Se probó la internalización de los péptidos Iztli en las células *MATa*, con una variante del PI1 unido al fluoróforo TAMRA en su extremo amino terminal. Este péptido tiene actividad de antifungal a concentraciones seis veces mayores que el PI1 y es inocuo contra las células *MATalfa* (Figura 12). Por estudios de microscopia confocal, se observó que el péptido entra no solo al sexo *MATa*, sino también al *MATalfa* (Figura 13), incluso se vio dentro de células de otros géneros de levaduras como *C. glabrata* (no se observó toxicidad) (Rodríguez Plaza, 2009)), en hongos filamentosos como *A. nidulans* (no se han realizado estudios de toxicidad) (Figura 14) y por resultados de nuestro grupo de investigación (González y cols. en proceso de publicación) se ha observado que los péptidos Iztli también entran en células humanas HEK 293 (Human Embryonic Kidney).

En el caso de *C. glabrata* se sabe que existe un gene homólogo a *STE2* de *S. cerevisiae*, al cual se le denominó *CgSTE2* el cual se expresa en la levadura; sin embargo, desde que se describió por primera vez en 1917 y hasta la fecha no existen reportes de la reproducción sexual de *C. glabrata* (Anderson, 1917, Wong y cols., 2003). Se ha observado que en ambos tipos sexuales de *C. glabrata* se expresan los homólogos tanto de *STE2* como de *STE3*; sin embargo, al exponer a las células de *C. glabrata* a sus propias feromonas a o alfa o incluso a las feromonas de *S. cerevisiae*, no se observó arresto celular, pero al tratar a ambos tipos de células sexuales de *S. cerevisiae* con las feromonas a y alfa de *C. glabrata* sí se observó arresto celular (Muller y cols., 2008), una posible explicación para este comportamiento es que las feromonas si se pegan al

receptor *C. glabrata*, pero la cascada de señalización no se encuentra activa. Con respecto a *A. nidulans* se ha determinado la existencia de homólogos para los receptores Ste2 (*PreB*), Ste3 (*PreA*) y para la feromona alfa de *S. cerevisiae* (*ppgA*), pero no para la feromona α (Dyer y cols., 2003). En el caso de las células HEK 293, no hay homólogos de STE2 reportados, y estas células no se reproducen de manera sexual.

El hecho de que existan homólogos en *C. glabrata* y *A. nidulans* podría hacer pensar que la internalización de los péptidos Iztli es mediada por éstos; sin embargo, debe considerarse que también entra en las células *MAT α* y *HEK 293*, la primera no cuenta con el receptor Ste2p y en la segunda no se han encontrado homólogos, siendo lo más lógico pensar que en realidad el péptido marcado está entrando a todos estos tipos celulares de manera independiente al receptor Ste2p, contraponiéndose a lo predicho por el modelo.

El hecho que el péptido Iztli marcado entre en varios tipos celulares pudiera ocurrir debido a que la molécula fluorescente (TAMRA) se separara del péptido debido a una hidrólisis, penetrando por sí sola a las células, como ya se ha reportado con anterioridad en células de humano (Cunningham y cols., 2010), pero considerando que el péptido unido a Hilytefluor-488, el cual sólo entra a las células si esta unido a otra molécula que se lo permita, también entra a las células *MAT α* y *MAT α* (Figura 16), indica que los péptidos en realidad sí entran a las células. Además, los estudios de respiración celular que se efectuaron, indican que los péptidos Iztli inhiben la respiración tanto en las células *MAT α* como en las *MAT α* de *S. cerevisiae* (Figura 18). Estos experimentos son complementarios y enriquecen la idea de que los péptidos Iztli entran a las células sin necesidad del receptor Ste2p.

La internalización de los péptidos Iztli planteada en el modelo se basa en la endocitosis del receptor y de su ligando la feromona alfa que ocurre de manera natural (Toshima y cols., 2006). Sin embargo, se puede reconocer que el modelo no contemplaba cómo el péptido podría llegar a la mitocondria después de su internalización; en la endocitosis mediada por el receptor Ste2p, tanto la feromona como el receptor son llevadas a la vacuola de la levadura para ser degradados (Singer y Riezman, 1990). Una posibilidad para escapar a la degradación es que sus propiedades anfífilas les permitieran escapar de los endosomas, pero ya que la internalización es independiente del receptor Ste2p, sabemos que los péptidos Iztli no requieren de una liberación del endosoma.

En nuestro grupo de investigación desarrollaron dos modelos cinéticos de la internalización de los péptidos, uno considera que existe endocitosis mediada por el receptor y el segundo no considera la endocitosis (Figura 3 del apéndice 2). Para los datos del escape del péptido de los endosomas y el número de estas moléculas necesarias para causar muerte se hizo un estimado ajustando el número de células muertas tomando en cuenta los experimentos de UFC realizados. El ajuste entre los datos observados y los calculados mostró que un modelo que supone una endocitosis mediada por el receptor no reproduce los datos observados en las UFC, en contraste un modelo que no considera la endocitosis, sino la unión al receptor Ste2p, reproduce los datos de muerte de las UFC significativamente (Figura 3B del apéndice 2). Apoyando estos resultados en nuestro grupo de investigación se probaron los péptidos Iztli sobre mutantes nulas de *S. cerevisiae MATa* involucradas todas ellas en la endocitosis, ninguna de ellas presentó resistencia (Figura 2 del apéndice 2), confirmando lo visto en los modelos generados, por lo que los péptidos Iztli entran a las células de *S. cerevisiae MATa* de manera independiente a la internalización mediada por el receptor Ste2p.

Se ha reportado que algunos péptidos helicoidales anfipáticos penetran diferentes membranas celulares en base a su momento hidrofóbico (Milletti, 2012). El mecanismo por el cual penetran la membrana este tipo de péptidos se piensa que es mediante translocación directa la cual requiere la interacción de los péptidos con los lípidos de membrana mediante la interacción de carga positiva del péptido y la negativa de los fosfolípidos de la membrana, formando micelas invertidas (para péptidos pequeños) o carpetas, poros toroidales o poros en forma de barril (para péptidos grandes), finalizando en la entrada del péptidos a la célula. (Trabulo y cols., 2013)

Esto nos hace reconsiderar el modelo del mecanismo de acción planteado, si los péptidos entran en diversos tipos de células, ¿entonces por qué solo causan muerte en las células con el receptor Ste2p? Lo que diferencia a las células *MATa* de las *MATalfa* además de la producción de la feromona α , es la presencia en la membrana celular de los receptores Ste2p o Ste3p respectivamente (Herskowitz, 1988). En ambos sexos se da la misma señalización que conlleva a la célula a prepararse para la fusión sexual, ocurriendo cambios morfológicos como el shmoo o el arresto celular (Bagnat y Simons, 2002). Debido a que el principal cambio entre las células es la presencia del receptor Ste2p, suponemos que alguno de los procesos activados por el receptor es la clave para causar la muerte celular.

La señalización que induce la feromona mediante el receptor se transmite por una proteína G heterotrimérica (Figura 4-B), constituida por tres subunidades: alfa (Gpa1p), beta (Ste4p) y gamma (Ste18p). Al unirse la feromona con el receptor, el GDP unido a la subunidad alfa cambia a GTP, interrumpiéndose la interacción de alfa y gamma, liberándose las subunidades beta y gamma (Slessareva y cols., 2006). Este complejo permite a la subunidad beta unirse a la proteína Ste5p que a su vez activa a las

MAPcinastas que inducen la transcripción de cerca de 200 genes (Bardwell, 2005). Al ser Ste4p la siguiente proteína involucrada en la señalización después de Ste2p, se probaron los péptidos en células *MATa* con Ste4p eliminada (Figura 20), observándose que los péptidos no causan muerte celular, indicando que la cascada de señalización iniciada en Ste4p por la feromona alfa a través del receptor Ste2p es necesaria para inducir la muerte en las células. Este dato concuerda con lo reportado por Muller en los experimentos de las feromonas de *S. cerevisiae* y las células de *C. glabrata* en los cuales no observó arresto celular y lo previamente reportado en mi tesis de maestría (Rodríguez Plaza, 2009) en la que observé que los péptidos Iztli no afectan a *C. glabrata*. Esta levadura tiene un receptor homólogo a Ste2p pero ni su propia feromona alfa ni la de *S. cerevisiae* inducen ningún tipo de respuesta, ya sea arresto celular o formación de shmoo. Así, la hipótesis del malfuncionamiento de la cascada de señalización es congruente con estos datos, aunque sigue sin determinarse si hay interacción de las feromonas con los péptidos Iztli y el receptor en *C. glabrata*.

Pero no solo Ste4p se activa cuando la feromona interacciona con el receptor, también Gpa1 se une a Vps15p y Vps34p causando un incremento del segundo mensajero fosfatidilinositol 3 fosfato (PtdIns 3-P) y la Gpa1p promueve la translocación de Bem1p a los endosomas. La mutante nula de Vps34 disminuye la eficacia y la potencia de la feromona (Slessareva y cols., 2006), Bem1p interviene en la polarización y morfogénesis celular, posiblemente este involucrada en la formación del shmoo y por eso al no translocarse disminuye la eficacia de la feromona. Es interesante que después de tanto tiempo de estudiar a la ruta de señalización de la feromona, aun hay cosas que no conocemos acerca de ella y que aun tienen que ser investigadas.

Sumado a estos resultados, se desarrolló un PI1 modificado en el extremo carboxilo terminal, el cual está reportado dentro del dominio de unión de la feromona alfa con Ste2p (Naider y Becker, 2004), afectando la actividad tipo feromona del péptido (PI1-CO-NH₂⁺). Este péptido mostró una actividad antifungal mucho menor al PI1 normal, requiriendo concentraciones cuatro veces mayores a las normales (Figura 21); sin embargo al añadir la feromona alfa y el PI-CO-NH₂⁺ en concentraciones equimolares (5 μM), observamos un fenotipo de muerte celular (Figura 24). Estos datos confirman que los péptidos Iztli requieren activar al receptor Ste2p para inducir la muerte de las células *MATa*. Considerando los resultados de internalización (el PI-CO-NH₂⁺ marcado con TAMRA que también es internalizado por las células *MATa*, Figura 23), el mecanismo de acción involucra al menos dos eventos: la internalización del péptido y la activación de la ruta de las MAPquinasas.

Dado que al parecer se requiere la activación de la o las cascadas de señalización de Ste2p para que los péptidos Iztli causen muerte y que una de las respuestas más importantes es la inducción del arresto celular, en nuestro grupo de investigación se indujo el arresto de células *MATalfa* mediante estrés salino (Hohmann, 2002, Logothetis y cols., 2007) y se agregaron los péptidos Iztli, causando muerte en células que antes no eran afectadas por estos péptidos, indicando que lo que se requiere de la señalización es el arresto celular, el cual está mediado por Ste4p (González y cols. en proceso de publicación).

El siguiente paso fue determinar la acción de los péptidos sobre el blanco intracelular establecido en nuestro modelo: las mitocondrias.

Con base en las características de los péptidos “asesinos”, establecimos que los péptidos Iztli al entrar a la célula actuarían sobre la membrana mitocondrial, causando que las mitocondrias se hinchen y se alteren sus funciones, como la respiración, provocando la muerte tipo apoptosis por liberación del citocromo *c* o por la falta de energía causada al dañar el metabolismo respiratorio.

Durante las pruebas de las propiedades antibacterianas de los péptidos Iztli comprobamos que ocurre hinchamiento mitocondrial (Figura 17) y por las mutantes nulas sabemos que el citocromo *c*, así como el factor inductor de la apoptosis y la metacaspasa-1 no son necesarios para que los péptidos Iztli causen muerte y al ser algunas de las principales proteínas involucradas en la apoptosis de *S. cerevisiae*, la muerte debe estar ocurriendo por otro mecanismo.

Sabemos que los péptidos inhiben la respiración tanto de células *MATa* como *MATalfa* (Figura 19), así como de mitocondrias aisladas (Figura 18), sin embargo al ser este microorganismo un anaerobio facultativo y en presencia de una fuente de carbono adecuada (e.g. glucosa) no depende del metabolismo respiratorio para vivir, puede obtener su energía mediante la fermentación. La mayoría de los resultados presentados fueron hechos con glucosa, por lo que al parecer los péptidos también afectan a las células que fermentan.

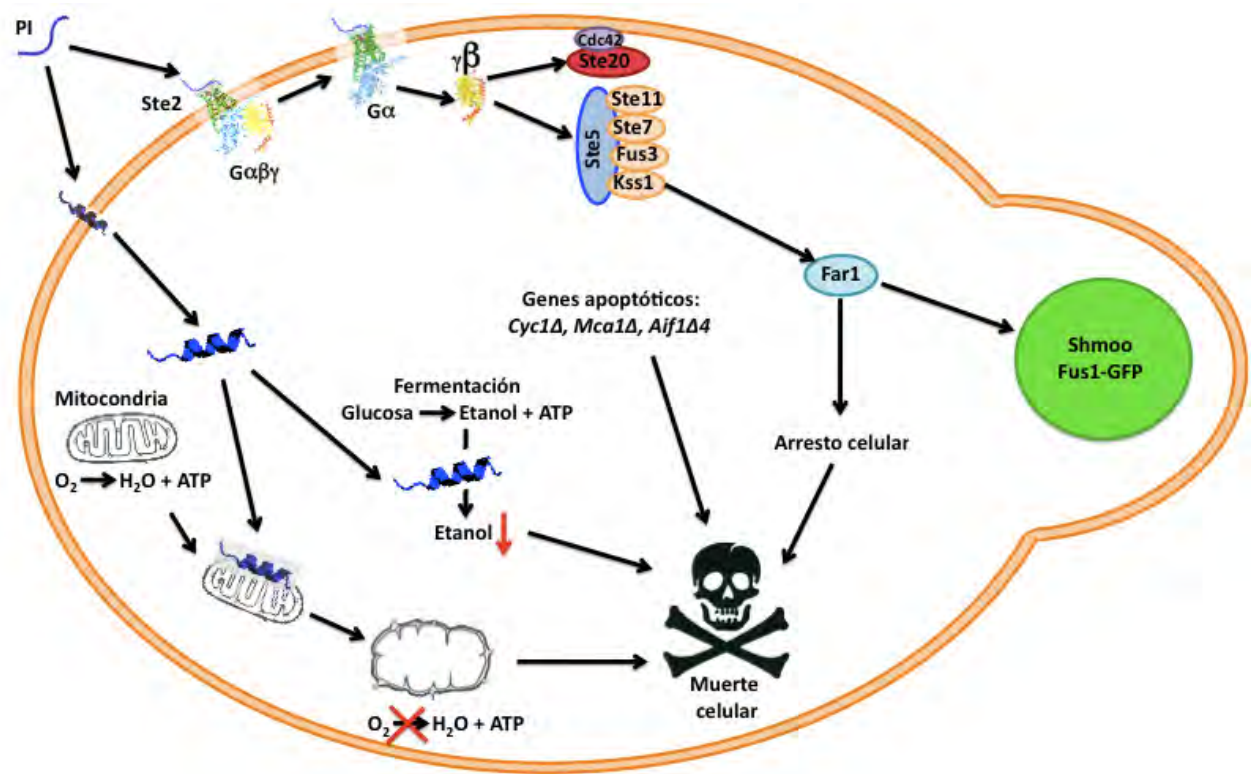
Pero al probar los péptidos Iztli en células *MATa* de *S. cerevisiae* en un medio con un sustrato solamente respiratorio (YPLac), curiosamente se observó que también causan muerte, por lo que si también afectan a la fermentación en este sustrato el daño a la ruta fermentativo no es necesario. En células que solo fermentan (cepa $\rho 0$) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y

cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) (Goldring y cols., 1970) debido a que carecen del DNA mitocondrial en el cual se encuentran codificadas algunas proteínas esenciales para la cadena respiratoria (Foury y cols., 1998), los péptidos también causan muerte de manera independiente a la ruta respiratoria en las células ρ^0 (Figura 27-B).

Considerando que los péptidos Iztli causan inhibición de la respiración, pero que también afectan a células que solo fermentan, se midieron los niveles de etanol producidos en células en presencia y ausencia de los péptidos (Figura 28). El etanol generado por las células tratadas después de 10 minutos es menor en un 87 % con el generado por las no tratadas, indicando que los péptidos Iztli también afectan el metabolismo fermentativo. Esto sugiere dos cosas para el mecanismo de muerte de las células *MATa* por los péptidos Iztli: uno, pueden inhibir tanto a la respiración (células en YPLac) como a la fermentación (células ρ^0) o a ambas (células en YPD) lo cual causa un colapso energético en la célula que con lleva a la muerte. O dos, causan muerte por otra causa independiente al metabolismo y el efecto es tal que puede afectar inhibiendo tanto respiración como fermentación.

Por la prueba de hinchazón sabemos que los péptidos Iztli afectan a la mitocondria, lo cual puede llevar a la liberación de proteínas intra-mitocondriales que podrían desencadenar algún proceso de muerte desconocido hasta el momento; mediante la expresión del gen heterólogo Bax se ha inducido un tipo de apoptosis independiente de caspasas, como tal no existe ese tipo de muerte en este microorganismo debido a la ausencia de una Bax de levadura, pero el resto de las proteínas de la vía están presentes y se expresan, por lo que puede que se usen para otra función o posiblemente un tipo de muerte celular desconocido hasta la fecha.

Una alternativa es que los péptidos Iztli además de dañar a la mitocondria, pueden afectar a otros organelos como el núcleo o la vacuola la cuyo malfuncionamiento llevaran a la célula a su muerte.



Modelo del mecanismo de acción de los péptidos Iztli. Los péptidos Iztli reconocen al receptor Ste2p y activan la ruta de señalización mediada por Ste4p (subunidad β), causando: arresto celular, formación del shmoo y concentración de Fus1 en la punta del shmoo. Los péptidos Iztli penetran las células *MATa* de manera independiente al receptor Ste2p y una vez adentro de la célula inhiben la función mitocondrial y la fermentación, afectando el metabolismo energético. Esta serie de eventos parecen inducir la muerte de la célula. La falta de genes relacionados con la apoptosis (*CYC1*, *AIF1*, *MCA1*) protege a las células *MATa* de la muerte inducida por los péptidos Iztli. Estos resultados indican que el mecanismo de acción de los péptidos Iztli al matar células de levadura difiere del propuesto para los péptidos cazador-asesinos. Para elucidar el mecanismo molecular, será importante en estudios futuros el determinar el o los blancos intracelulares de los péptidos Iztli.

8 CONCLUSIONES

Los péptidos Iztli son “asesinos”, es decir tienen actividad antibacteriana del tipo bactericida contra *E. coli DH10B*.

Los péptidos Iztli mantienen las propiedades de reconocimiento celular (cazador), arresto y formación de shmoo de la feromona alfa.

Los péptidos Iztli al integrar las propiedades cazador y asesino en un solo dominio funcional crearon una nueva actividad capaz de generar muerte celular en las células *MATa* de *S. cerevisiae* a concentraciones micromolares y en porcentajes de muerte del 99%.

Los péptidos Iztli no inducen muerte en las células de *S. cerevisiae* que no expresan el receptor *Ste2p*

El péptido Iztli 1 marcado con el fluoróforo: TAMRA es internalizado en células de *S. cerevisiae MATa* y *MATalfa*, *C. glabrata* y *A. nidulans*, el péptido Iztli 1 marcado con Hilyte fluor-488 también es internalizado en células de *S. cerevisiae MATa* y *MATalfa*, ambos de manera independiente al receptor *Ste2p*.

Los péptidos Iztli para causar muerte a las células *MATa* de *S. cerevisiae* requieren de activar una cascada de MAPquinasas para inducir arresto celular mediante el reconocimiento de la secuencia de la feromona alfa y el receptor *Ste2p*.

Los péptidos Iztli no causan muerte celular por apoptosis, mutantes nulas de los genes apoptóticos: CYC1, AIF1 y MCA1, no protegen de la muerte causada por los péptidos Iztli.

Los péptidos Iztli causan muerte a células *MATa* de *S. cerevisiae* sin importar el o los metabolismos activos: respiratorio, fermentativo o ambos.

Los péptidos Iztli inhiben la respiración celular en células *MATa* y *MATalfa*.

Los péptidos Iztli causan hinchamiento e inhibición de la respiración en mitocondrias aisladas.

La falta de Por1p integrante del canal mitocondrial no selectivo de *S. cerevisiae* evita la muerte causada por los péptidos Iztli.

Los péptidos Iztli reducen la producción de etanol en un 85% en células *MATa* de *S. cerevisiae*.

9 PERSPECTIVAS

El trabajo realizado hasta el momento nos ha permitido conocer más acerca del mecanismo de acción de los péptidos Iztli, confirmando o modificando el modelo planteado. Sin embargo aún quedan partes del mecanismo que se desconocen y en las cuales se puede trabajar.

Se conoce que los péptidos para causar la muerte de las células *MATa* necesitan al receptor Ste2p por la señalización que induce, sin embargo no conocemos cuál de los mecanismos que se activan es el que ayuda en la muerte celular. Se realizó un experimento en el cual se trató con el PI1 a una colección de mutantes nulas, ciertos genes involucrados en la cascada de señalización causaron resistencia a los péptidos Iztli. Se debe comprobar que las mutantes nulas correspondan al gen, determinar a qué nivel de la ruta de señalización deja de existir la resistencia y analizar qué procesos estarían involucrados en la muerte.

Dentro de las rutas que activa la secuencia de feromona del péptido Iztli, está el arresto celular para el cual existe más de una forma de causarlo, entre ellas se encuentra el estrés salino, por lo que se está probando el inducir el arresto mediante sales en células *MATalfa* y agregar los péptidos Iztli, con la expectativa de causar muerte en un tipo de celular que normalmente no muere, pero en el que si es internalizado el péptido y donde si inhibe la respiración, si se produce muerte de esta manera se comprobara que el arresto celular es necesario para que los péptidos Iztli causen muerte y permitiría inducir muerte en células que están arrestadas, como lo son ciertos tipos de cáncer.

Otra de las incógnitas por resolver en el modelo es conocer con qué organelos están interaccionando los péptidos Iztli; sabemos que afecta a las mitocondrias, pero puede estar actuando en otros organelos. Se cuenta con los péptidos marcados con TAMRA y H488 y existen moléculas fluorescentes específicas para marcar organelos específicos, o se pueden usar cepas que ya tienen los organelos marcados con proteínas fluorescentes específicas de esos organelos.

Sería interesante probar los péptidos antibacterianos en los que nos basamos para el diseño de los péptidos Iztli (Cecropina A, Magainin 2 y Ce-Ma) en la misma cepa de *E. coli*, y comparar sus actividades.

Hasta la fecha desconocemos si los péptidos Iztli actúan sobre las mitocondrias debido a la interacción con alguna proteína de la membrana externa o si solamente forman poros en la membrana, esta pregunta podría responderse al sintetizar a los péptidos Iztli en configuración D en vez de L, de esta manera el péptido seguiría siendo un antibacteriano, el cual al probarlo en células aun sería internalizado y en caso de existir una interacción con alguna proteína de la mitocondria la conformación en D la impediría dándose la respiración de manera normal y evitando la muerte en caso de que solamente sea la mitocondria el único blanco intracelular; en el caso de que siguiera ocurriendo la muerte de la célula, pero se inhibiera la respiración esto indicaría que hay otro blanco de los péptidos Iztli dentro de la célula.

10 APÉNDICES

Apéndice 1. Artículo publicado

Moonlighting Peptides with Emerging Function

Jonathan G. Rodríguez Plaza¹, Amanda Villalón Rojas¹, Sur Herrera¹, Georgina Garza-Ramos², Alfredo Torres Larios¹, Carlos Amero³, Gabriela Zarraga Granados⁴, Manuel Gutiérrez Aguilar⁵, María Teresa Lara Ortiz¹, Carlos Polanco Gonzalez^{1*}, Salvador Uribe Carvajal⁵, Roberto Coria⁵, Antonio Peña Díaz⁵, Dale E. Bredesen^{6,7}, Susana Castro-Obregon⁴, Gabriel del Rio^{1*}

1 Biochemistry and Structural Biology Department, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, **2** Biochemistry Department, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, **3** Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, México, **4** Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, México, **5** Molecular Genetics Department, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, **6** Buck Institute for Age Research, Novato, California, United States of America, **7** Department of Neurology, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America

Abstract

Hunter-killer peptides combine two activities in a single polypeptide that work in an independent fashion like many other multi-functional, multi-domain proteins. We hypothesize that emergent functions may result from the combination of two or more activities in a single protein domain and that could be a mechanism selected in nature to form moonlighting proteins. We designed moonlighting peptides using the two mechanisms proposed to be involved in the evolution of such molecules (*i.e.*, to mutate non-functional residues and the use of natively unfolded peptides). We observed that our moonlighting peptides exhibited two activities that together rendered a new function that induces cell death in yeast. Thus, we propose that moonlighting in proteins promotes emergent properties providing a further level of complexity in living organisms so far unappreciated.

Citation: Rodríguez Plaza JG, Villalón Rojas A, Herrera S, Garza-Ramos G, Torres Larios A, et al. (2012) Moonlighting Peptides with Emerging Function. PLoS ONE 7(7): e40125. doi:10.1371/journal.pone.0040125

Editor: Peter Csermely, Semmelweis University, Hungary

Received: February 17, 2012; **Accepted:** June 1, 2012; **Published:** July 13, 2012

Copyright: © 2012 Rodríguez Plaza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: GDR was supported by grants from PAPIIT (IN217708, IN205911) and from SEP-CoNaCyT (82308). SH was supported by a grant from the Academia Mexicana de Ciencias. SCO was supported by grants from PAPIIT (IN221909) and SEP-CoNaCyT (106598). CA was supported by a grant from CONACYT (C01-56431). ATL is supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 60127-Q, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT) grant IN202910 and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal grant PIFUTP09-279. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gdelrio@ifc.unam.mx

* Current address: Subdirección de Epidemiología Hospitalaria y Control de Calidad de la Atención Médica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México

Introduction

Hunter-killer peptides are molecules designed to induce cell death on selected eukaryotic cells [1]. The specificity of their action is based on a hunter moiety, which is a peptide that acts as ligand for a receptor expressed on targeted cells. The induction of cell death is achieved by a killer moiety, which is a mitochondrial active peptide capable of inducing the release of cytochrome-C, caspase activation and ultimately apoptosis. These two moieties are coupled by a linker-peptide, commonly a glycine-glycine peptide. A feature of killer peptides is that they are not toxic to eukaryotic cells, unless these are internalized. Thus, it is assumed that the induction of cell death by hunter-killer peptides is achieved when the killer-peptide is internalized by means of receptor-mediated endocytosis of the hunter-peptide [2]. While these peptides have shown to be effective in treating cancer [3,4,5] or obesity in animal models [6], there is still much room for improvement [7] provided that more studies are conducted about their mechanism of action.

In the current work we aim to create new hunter-killer peptides against *Saccharomyces cerevisiae*, as a further step in understanding

their mechanism of action. In this report we focus on the design of hunter-killer peptides that have the two activities in a single functional domain.

Many proteins are known to have more than one activity in a single domain. The property of proteins having multiple activities is sometimes referred to as moonlighting [8,9]. Moonlighting proteins and peptides presenting more than one activity in a single domain differ from proteins that have multiple activities in multiple domains [10], implying different evolutionary constraints (see below). Additionally, many non-globular moonlighting proteins and peptides exhibit a disordered state [11]. These proteins with a disordered structural state are commonly referred to as natively unfolded proteins (NUP), intrinsically unstructured or intrinsically disordered proteins [12]. This structural plasticity has advantageous consequences, especially in eukaryotic cells, where an increased phenotype is observed without concomitantly increasing the genotype [13].

Based on these features of moonlighting proteins, different evolutionary mechanisms have been proposed to explain the presence of multiple activities in single domain proteins. One mechanism implies that during the evolution of globular

moonlighting proteins, the large unused surfaces have been used for accommodating additional activities; in the second mechanism, the lack of a constrained structure in NUP allows these proteins to perform different activities in different environments through a conformational selection mechanism [14]. In both cases, the addition of a new activity to an existing active-protein has been proposed to lead to an “adaptive conflict”; such conflict refers to the observation that most protein mutants might improve one activity while reducing the other [15]. The engineering of moonlighting peptides could provide further insight into the evolution of moonlight proteins yet, such engineering need to deal with the adaptive conflict. We propose that the combination of multiple activities into one protein domain may generate new function(s). After all, biological systems display emergent properties [16] and moonlighting proteins might be an important, but so far unappreciated mechanism of emergent functionalities in cells.

To test the idea that combining two or more activities in a single functional domain may render emergent properties in peptides, we used a 13-residue long peptide, the α -pheromone from *S. cerevisiae*, as a hunter peptide. From this natively unfolded peptide [17], we designed several moonlighting peptides by adding residues to the α -pheromone to reproduce the physicochemical properties of killer peptides; this rendered 19-residue long peptides. The killer activity requires an alpha-helical conformation, which is a conformation not observed in the α -pheromone peptide [18,19,20]. Finally, these two activities (pheromone and selective antibacterial activities) combined in a single functional domain (selective antibacterial peptide) rendered peptides with a new function: the killing of *S. cerevisiae* cells. We named these Iztli peptides, by reference to the Aztec’s mythology god of sacrifices; by extension, we refer to the hypothesis that leads to the design of these peptides (*i.e.*, merging two activities into a single functional domain may render emergent properties) as the Iztli hypothesis.

Results and Discussion

To facilitate testing for the new activity added to the α -pheromone, we considered that the killing activity should be triggered in an environment different to the α -pheromone receptor; in our case, that would be the bacterial or mitochondrial membrane.

Combining a ligand peptide (hunter) with a selective antibacterial peptide (killer) is known to induce cell death in mammalian cells by hindering mitochondria function [7]. However, we will show that damaging mitochondria function or signaling by the pheromone peptide alone is not enough to kill yeast cells. On the other hand, it has been reported that mutating the α -pheromone in either the N- or C- terminus renders a non-functional peptide [21]. Thus, our approach to add a new activity to the pheromone by adding extra residues in either the N- or C- terminus of the pheromone constitutes an example of an adaptive conflict paradox.

To incorporate the selective antibacterial activity to the α -pheromone, we modified its physicochemical properties (AGADIR score, isoelectric point and hydrophobic moment) to match those of known selective antibacterial peptides by adding every amino acid residue on either N- and/or C- terminus of the α -pheromone (for the strategy followed to design these peptides, please refer to section II in the Supporting Information S1; see Table S2 for the list of peptides tested and Figures S10, S11, S12, S13, S14 and S15 for the evaluation of our designs). Only peptides adding 6 extra residues on the N-terminus of the α -pheromone rendered peptides with predicted physicochemical properties characteristic of known selective antibacterial peptides; these residues locate in the linker

region connecting the multiple copies of the α -pheromone in the protein precursor [22]. Figure 1 shows that indeed Iztli peptides are able to kill bacteria (Figure 1A and 1B) and to evoke mitochondrial swelling (Figure 1C). We also observed that our Iztli peptides maintain pheromone-like activity (Figure 2) similar to that of the original α -pheromone. Thus, Iztli peptides exhibit two activities (pheromone-like activity and antibacterial activity) in a single functional domain (antibacterial domain).

Then we tested the ability of Iztli peptides to kill *S. cerevisiae*, and observed that indeed these peptides have antifungal activity (see Figure 3A and 3B). Note that such variants of the α -pheromone are unlikely to be found in *S. cerevisiae* cells; however, we envision that other yeast species (*e.g.*, *Candida glabrata*, which produces a pheromone similar to the α -pheromone [23]) could select for this class of peptides to outcompete *S. cerevisiae*.

As expected from the embedded pheromone activity of Iztli peptides, the killing activity depends on the presence of the α -pheromone receptor, Ste2p. Indeed, a mutant strain lacking Ste2p was resistant to Iztli peptides (see Figure S1). Furthermore, Iztli peptides conserved the pheromone-binding mode to Ste2p, as can be observed by introducing mutations that have been previously reported to increase (Gln5Ala, Pro8Ala) or reduce (His2Ala, Gly9Ala, Tyr13Ala; numbering referring to the α -pheromone sequence) the affinity of the α -pheromone for the Ste2p receptor [24] (see Figure S2). Finally, the Iztli hypothesis implies that the activity to swell mitochondria and to kill *S. cerevisiae* cells expressing the Ste2p receptor should not reside solely on the 6 residues added to α -pheromone; instead the pheromone-like activity, the antibacterial activity and the capacity to kill yeast cells should be present in a single functional domain. To test this, we treated isolated mitochondria and yeast cells with the six residues at the N-terminus of IP1 (IP1); this peptide did not exhibit any activity (Figures 1 and 3).

These physiological data (Figures 1, 2, 3 and Figures S1 and S2) indicate that Iztli peptides possess pheromone-like activity, antibacterial activity (or to swell mitochondria) and the capacity to kill yeast cells, all embedded in a single functional domain.

Structural Properties of Iztli Peptides

According to our design, Iztli peptides should be able to form an α -helical structure (see Supporting Information S1). The α -pheromone is known to be unstructured both in water and in trifluoroethanol (TFE) [19], a structure-inducing solvent. Additionally, nuclear magnetic resonance (NMR) studies had shown that in the presence of membranes, the α -pheromone has five residues in a helical turn at the N-terminus [25]; our peptides were designed to adopt an alpha-helical structure at the N-terminus, thus potentially extending the helical structure adopted by the α -pheromone (Figure S3). To test this, we analyzed the circular dichroism (CD) spectra of our peptides in water and in the presence of TFE. Far-UV CD spectra of all four peptides shows marked differences between water and 50% TFE (Figure S4). In water, the CD spectra show no evidence of α -helix, suggesting that the peptides are essentially disordered. Specifically, each peptide had a larger CD intensity within the 215–230 nm wavelength spectra region. A weaker positive band at ~217–230 nm and a strong negative band around 200 nm are consistent with a polyproline type II (PP_{II}) structure; random coil structures are characterized by a strong negative band below 200 nm and a positive one around 218 nm. However, the side chains of aromatic amino acid residues also contribute to the electronic absorption in the far-UV region and positive bands at 197 nm, 217–220 nm and 235 nm have been attributed to Phe, Tyr and Trp side chains [19]. Since, all peptides have two Trp, one Tyr and one or two

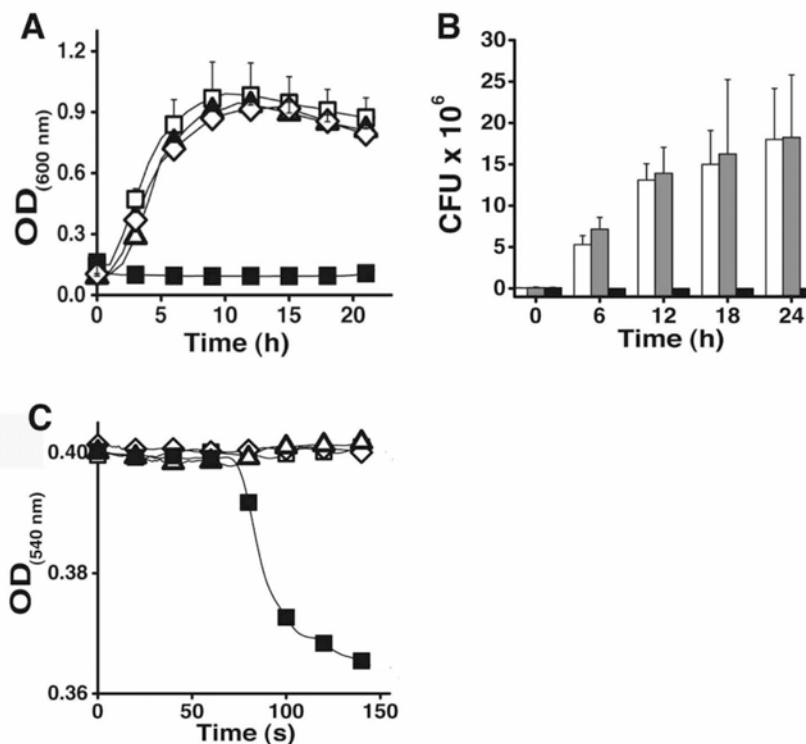


Figure 1. Antibacterial and mitochondrial swelling activities of Iztli peptides. The activity for Iztli peptide IP1 (20 μ M) (■ in A, black bars in B) against the bacteria *E. coli* (DH10B) was tested in two ways: following the optical cell density of the culture at 600 nm (A) and counting the colony forming units (CFU) (B). Three controls are included: LB with no peptide (□ in A, white bars in B), α -pheromone (25 μ M; △ in A, gray bars in B) and the six residues at the N-terminus of IP1 (flP1) (119 μ M; ◇ in A). The results of 4 experiments are presented for plots in A and B. The bars represent standard deviations. Mitochondrial swelling was followed at 540 nm (C) in the presence of Iztli peptide IP1 (■ 117 μ M); three controls were used: distilled water (□), α -pheromone (△ 160 μ M) and flP1 (◇ 100 μ M). Polyethylene glycol 3.4 kDa was added at 180 seconds. Only the IP1 data is shown here; the 3 other IP peptides display similar activity than IP1. doi:10.1371/journal.pone.0040125.g001

Phe residues, the TFE-induced helical signal in the far-UV CD spectra of the peptides would be superimposed to the band around 220–230 nm of the absorption contributions of their aromatic side chains (Figure S4). Thus, we subtracted the absorbance of the peptides in water from the ellipticity values of the CD spectra of peptides in TFE and this differential spectra clearly shows, that Iztli peptides adopts primarily α -helical conformation (see Figure 4). The original and subtracted CD spectra of peptides in TFE were deconvoluted using three different analysis computer programs (see Methods) to obtain the percentages of α -helix. The IP1 and IP2 peptides in TFE were estimated to contain 75–90% α -helix, while the IP3 and IP4 peptides up to 70%.

To confirm the CD observations we determined the crystal structure of IP2, which was the only Iztli peptide that provided crystals useful for diffraction experiments. The IP2 structure was solved at 3.4Å resolution using a seleno-derivative (Met11-SelenoMet11) that retained biological activity (see Figure S5). An alpha-helical structure with up to 3 turns was inferred (Figure S6 in alpha-carbons) that most likely lays in the N-terminus of the peptide: *i.e.*, sequence propensity to form such structure is predicted on the N-terminus and the selenium atom in the Met11-SelenoMet11 variant located at the C-terminus was highly flexible in the crystal (see Table S3 and Figure S7). However, it was not possible to refine the molecular model of the peptide due to a crystal twinning issue (see Supporting Information S1, section

I.10), thus we further studied with NMR spectroscopy the structural properties of this peptide.

A two-dimensional total correlated spectroscopy (2D-TOCSY) spectrum was used for the identification of spin systems whereas a two-dimensional nuclear Overhauser effect (2D-NOESY) spectrum was used to check space connectivities. We found more NOEs cross-peaks (see Figure S8) in the TFE spectra and sequential HN connection for the N-termini residues (data not shown), which were not observed in the H₂O spectrum. These observations are consistent with the CD and X-ray data, confirming our conclusions on the existence of an α -helix at the N-termini.

These structural data (Figure 4 and Figures S3, S4, S5, S6, S7 and S8) indicate that Iztli peptides have the capacity to switch from a random coil to an alpha-helical structure when they are transferred to a non-aqueous solvent. This is consistent with the behavior of disordered moonlighting proteins, which present multiple conformational states (disordered and globular) when they are exposed to different environments.

Emergent Function of Iztli Peptides

Finally, we analyzed the emergent function of Iztli peptides. Like hunter-killer peptides, Iztli peptides combine an antibacterial peptide (killer peptide) with a ligand peptide (hunter peptide). The killer peptide induces mitochondrial damage; such damage in mammalian

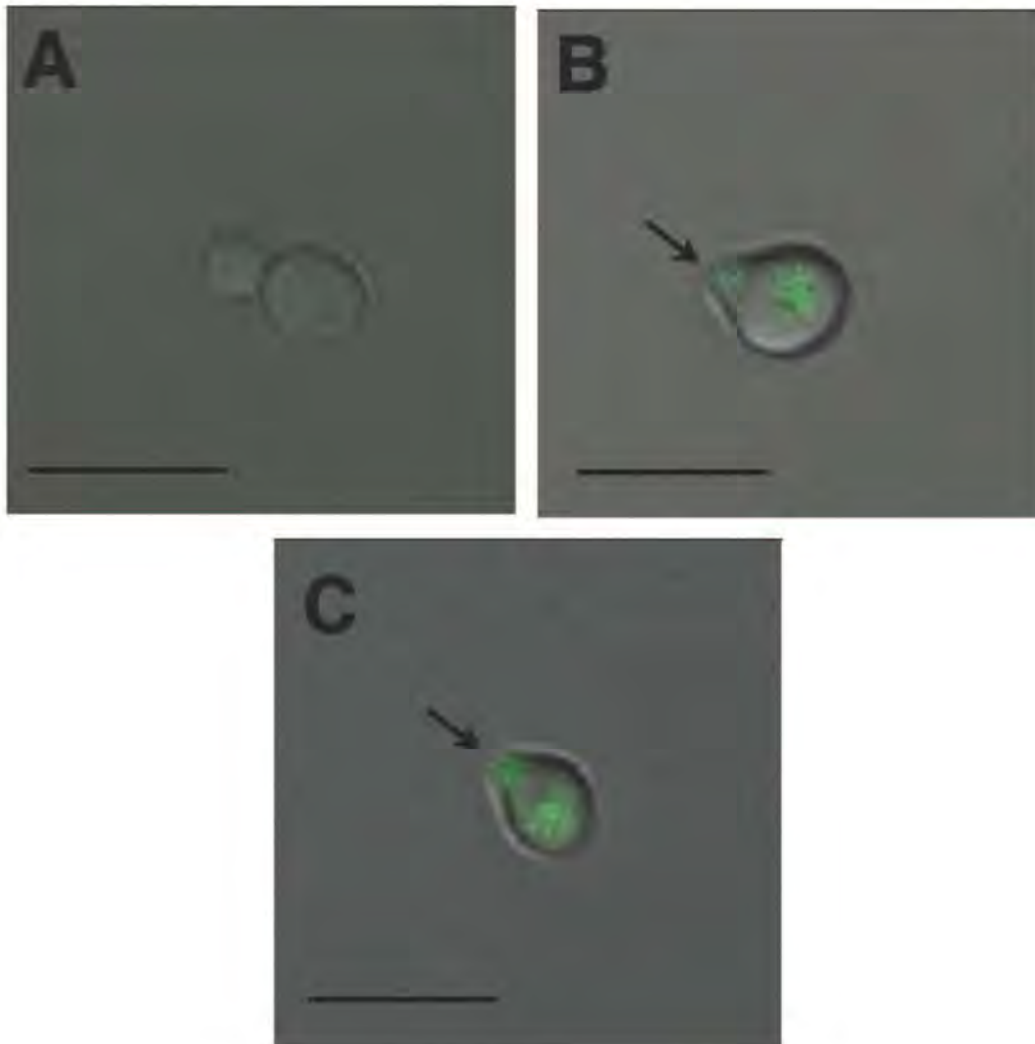


Figure 2. Phormone activity of Iztli peptides. The phormone-like activity of Iztli peptide IP1 was determined in two ways: detecting the activation of Fus1-GFP and observing the Shmoo phenotype. The image presents MatA cells in media without phormone (A) and those presenting both Shmoo phenotype (small protrusion on the cells indicated with the arrow) and the Fus1-GFP fluorescence observed after 1 hr of induction in the presence of either the α -pheromone (B) or the Iztli peptide IP1. (C) This is a compose image from DIC and fluorescence microscopy. Images were generated using a confocal microscope Olympus FluoView FV1000 with a magnification of 60 \times . The scale line is 5 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0040125.g002

cells leads to apoptosis. However, it could be expected that mitochondria damage in yeast cells does not necessarily lead to apoptotic cell death; likewise, phormone signaling at physiological concentrations does not kill all yeast cells (see below). Thus, the observed killing of yeast by Iztli peptides should require more than the independent activities of the hunter (pheromone) or the killer peptides. In agreement with this idea, it should be noted that:

- 1) Cell death induced by Iztli peptides requires the Ste2p transduction system, not simply the Ste2p receptor, since a null mutant of the STE4 gene (which encodes the β subunit of the heterotrimeric G protein coupled to Ste2p in the *S. cerevisiae* mating pathway [26]) was resistant to the killing activity of Iztli peptide 1, IP1 (see Table S1 and Figure S1).
- 2) The absence of the apoptosis-inducing factor (AIF1), the meta-caspase (MCA1) and 25 other apoptotic related genes do not affect the killing by Iztli peptides (Table S1 and Figure S1).
- 3) More than 5 times phormone than Iztli peptides is required to kill *S. cerevisiae* mating type a cells (MatA): α -pheromone induces partial cell death at >50 μ M [27] while our Iztli peptides induced complete cell death at 10 μ M (see Figure 3), suggesting the phormone activity in the Iztli peptides alone cannot explain the observed cell death.
- 4) The α -pheromone at high concentrations may induce a non-apoptotic cell death mechanism that exhibited some dependency on mitochondrial respiration in MatA cells

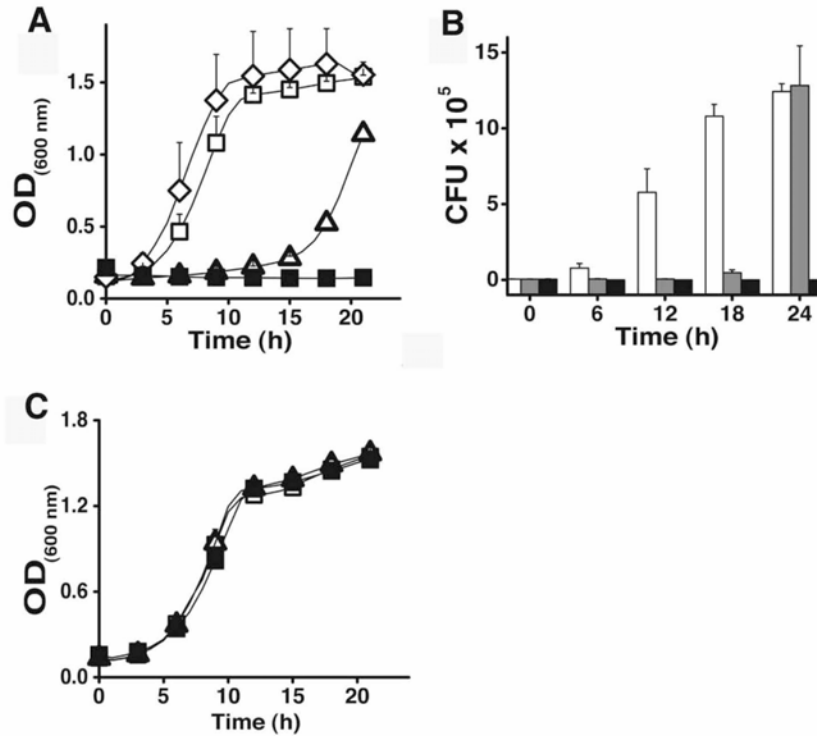


Figure 3. Antifungal activity of Iztli peptides. The activity of the Iztli peptide IP1 (10 μM) (■ in **A**, black bars in **B**) against the MatA cells from *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741) is presented in two formats: Optical cell density (**A**) and CFU (**B**). Cells were grown in YPD. We used three controls: No peptide (□ in **A**, white bars in **B**), α -pheromone (10 μM) (Δ in **A**, gray bars in **B**) and the six residues at the N-terminus (fIP1) (60 μM) (\diamond in **A**). The results of 4 experiments are presented for plots in **A** and **B**. The error bars represent standard deviations. The strain BY4741 ΔSTE2 lacking the receptor for the α -pheromone was tested against the Iztli peptides (**C**): IP1 ■ 10 μM , IP2 ▲ 10 μM for antifungal activity. For these experiments we used no peptide □ and α -pheromone Δ (10 μM) as controls.
doi:10.1371/journal.pone.0040125.g003

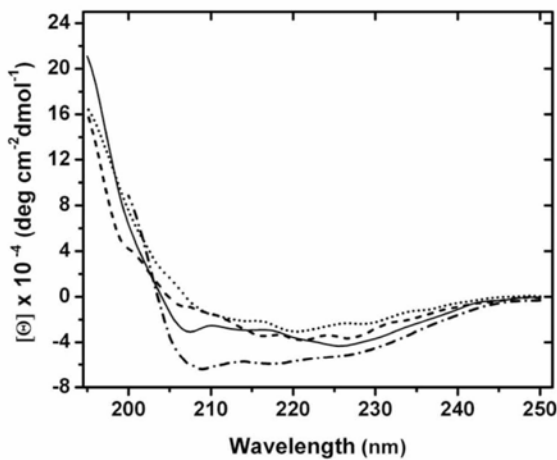


Figure 4. Secondary structure of Iztli peptides in TFE. The observed conformation of the four Iztli Peptides (IP1 dashed-dotted line, IP2 solid line, IP3 dashed line and IP4 dotted line) in 50% Trifluoroethanol is shown. CD spectra of each peptide in water were subtracted from the spectra of corresponding peptide in TFE.
doi:10.1371/journal.pone.0040125.g004

[28]. However, in such cases, cells maintained mitochondrial respiration at all time and only 25% of the cell population was killed by the α -pheromone. Iztli peptides eliminate mitochondrial respiration in vivo (Figure S9) and kill all cells, as no growing cells remain after 24 hours (see Figure 3A and 3B).

These data confirm that cell death induced by Iztli peptides affects mitochondria respiration and depends on the signaling pathway of Ste2p, albeit it is independent of apoptosis. Thus, it is possible that while yeast cells may survive to either cell cycle arrest induced by the α -pheromone or to respiratory-deficient mitochondria, the combination of these two conditions pose critical conditions that the cell cannot surpass. To quantify the level of interaction between these two activities in cell yeast survival, we estimated the relative amount of surviving cells (colony forming units, CFUs) in non-breathing p0 yeast cells (100%), in cells exposed to the α -pheromone (100%) and our Iztli peptide (0.00025%) based on the observed surviving rate in wild-type cells (see Supporting Information S1, section I.6). If swelling mitochondria and arresting the cell cycle would have an independent effect, the survival rate would be at most the sum of the individual effects (100%); yet, the observed survival rate in the presence of Iztli peptides is smaller. Thus, Iztli peptides present an emergent function because it is not simply the result of adding the effect of the two activities alone.

The existence of moonlighting proteins in energy-restricted conditions has been proposed to present an advantage over the maintenance of multiple copies of genes. However, in polyploid cells or cells cultivated in the lab in rich media during many years (e.g., *S. cerevisiae*), such energetic restriction does not prevail and yet moonlighting proteins are present [29]. Alternatively, moonlighting proteins have been proposed to be important in coordinating related cellular activities; consistent with this idea is the existence of moonlighting proteins that combine related activities (e.g., ION is a mitochondrial ATP-dependent protease that is also a mitochondrial chaperone [30]), although this relationship is not clear for all moonlighting proteins (e.g., the band 3 protein of the red blood cell plasma membrane is an anion exchanger and also regulates the rate of glycolysis [31]). To solve these discrepancies, we propose that moonlighting in single-domain proteins occurs only when the combined activities render an emergent function. That is, the use of single-domain moonlighting proteins represents a significant challenge for screening the appropriate sequence that can harbor multiple activities (adaptive conflict) in comparison with moonlighting proteins presenting different activities in different domains. Thus, we propose that single-domain moonlighting proteins are selected over multi-domain when they present new activities beyond those obtained by combining different activities in different domains.

Our Iztli peptides have not been designed to treat cells that represent a health problem, as in the case of hunter-killer peptides. However, we envisioned potential uses for our peptides in basic research, for example: a) eliminating MatA cells in a population (e.g., selection of *S. cerevisiae* mating type α cells (MatAlpha) haploids), b) study the mechanism of action of hunter-killer peptides, c) structure-function studies of moonlighting peptides. In addition, it is clear that the selective antibacterial activity of Iztli peptides has potential clinical applications.

In summary, we have shown that altering the N-terminus region of the mating α -pheromone from *S. cerevisiae* to display selective antibacterial activity (and for swelling mitochondria), rendered peptides capable to induce yeast cell death. Swelling of mitochondria and the pheromone activities in these peptides encompass two conformations that can be switched by the environment. Finally, our designs show that the ability of proteins to combine multiple activities in a single domain may lead to the acquisition of novel functions. This emergent function might be selected in nature, thus eliminating the "adaptive conflict" in the evolution of moonlighting proteins.

Materials and Methods

1.1 Strains

The *S. cerevisiae* strains used for the identification of critical genes involved in the killing activity of the Iztli peptides are listed in Table S1.

To evaluate the antibacterial activity of the Iztli peptides, the *Escherichia coli* DH10B strain, Δ (nrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1 was used.

1.2 Peptides

The mating α -pheromone from *S. cerevisiae* was obtained from Sigma-Aldrich (catalog number T6901). Anaspec, Inc. (USA) synthesized the Iztli peptides (see Table 1). The company verified the purity of these peptides using High-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (see Table S4 and Figures S16 and S17); optimized Fmoc and Boc methodologies were employed for peptide syntheses with free N- and C-termini. Each peptide (2 mg) was diluted in 1 mL of water and

Table 1. Sequences of Iztli peptides.

Name	Sequence
α -pheromone	WHWLQLKPGQPMY
IP1	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY
IP2	RRLKDFWHWLQLKPGQPMY
IP3	KFWKRFWHWLQLKPGQPMY
IP4	RKLOKFWHWLQLKPGQPMY
fIP1	KFLNRF
IP1-His8Ala	KFLNRFWAWLQLKPGQPMY
IP1-Gln11Ala	KFLNRFWHWLALKPGQPMY
IP1-Pro14Ala	KFLNRFWHWLQLKAGQPMY
IP1-Gly15Ala	KFLNRFWHWLQLKPAQPMY
IP1-Tyr19Ala	KFLNRFWHWLQLKPGQPMYA
IP2SEM	RRLKDFWHWLQLKPGQPMY(SeMet)Y

doi:10.1371/journal.pone.0040125.t001

keep at -80°C as stock solutions. The actual concentrations of these solutions were determined at 280 nm using a Nanodrop equipment (Thermo Scientific, USA). All peptides used in this study included only L-amino acids.

1.3 Minimum Inhibitory Concentration

Lyophilized peptides were solubilized in sterile milli-Q water to a final concentration of 4 mg/ml except α -pheromone-PH(Ce-cropin)1, α -pheromone-PH(CeMa)1, PH(SCAP*)2 2 mg/ml and PH(SCAP*)5 20 mg/ml. Serial dilutions of peptides were prepared in sterilized water. These concentrations are reported as the dry weight of each peptide. To determine the actual concentration of these peptides in solution, we estimated the molar absorption coefficient from the absorbance of each peptide at 214 nm [32] using a spectrophotometer HP8452, kindly provided by Dr. Armando Gomez-Puyou. Then, the concentration of each peptide was calculated as: $C = A / (L * MAC)$; where C: concentration (M), A: absorbance (arbitrary unit), L: length of the path of the spectrophotometer cell (cm) and MAC: the molar absorption coefficient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

The antibacterial activity of the synthetic peptides was examined in sterile 100-well plates (HC2 Pat. Pend., Finland) in a final volume of 200 μl as follows: aliquots (25 μl) of a suspension containing bacteria at a concentration of 10^5 CFU/mL in LB medium were added to 75 μl of water containing the peptide. The mixture was completed by the addition of 100 μl of 2 \times -concentrated LB medium. The plates were incubated at 37°C with constant orbital shaking for 10 h (at a rate specified by the equipment provider as "High"). Microbial growth was automatically determined by reading every 60 minutes the optical density at 600 nm with an OY Microplate Reader (Bioscreen C, Finland).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration where no visible growth occurred. At least three different concentrations were tested for each peptide to find the corresponding MIC. All MICs were determined from four independent experiments.

1.5 Detection of Pheromone-like Activity on Iztli Peptides

MatA yeast cells (BY4741) grown for 24 hr in YPD media at 30°C were diluted to a final optical density of 0.4 at 600 nm. These cells were treated with 10 μM of the Iztli Peptide 1 for one hour. After that time, a sample of 10 μL was observed under the

confocal microscope (Olympus FluoView FV1000) at 60× amplification. The images were reconstructed using the software FV viewer provided by the manufacturer of the microscope.

1.10 Mitochondrial Swelling and Contraction

We isolated mitochondria as described in Supporting Information S1 (see section I.2). Swelling of mitochondria was determined as reported before [33]. Briefly, fresh mitochondria were diluted in 1 mL of 0.3 M mannitol, 5 mM MES, pH 6.8 (TEA) and 5 μL of ethanol. After 20 seconds, when optical density was stable, the peptides were added. The absorbance at 540 nm was recorded in a DW2 Aminco spectrophotometer (Olis, Inc, USA) in a split mode with magnetic stirring. A decrease in the absorbance was indicative of mitochondrial swelling. To determine the integrity of mitochondrial membranes, 10% of PEG 10 kDa (final concentration) was used to induce water release from mitochondria. Thus, a recovery of the initial values of O.D.540 measurement in the presence of PEG after peptide exposure indicated that mitochondria were swollen by the peptide and not disrupted.

1.11 Measuring Antifungal Activity of Iztli Peptides

An early stationary culture for every assay was obtained from a single colony growing overnight in YPD medium. This culture was used to inoculate a fresh YPD medium to reach 0.04 O.D. in a total volume of 200 μL. Every peptide and strain were tested in 96 well plates, each well containing 200 μL, incubating at 30°C with shaking using a Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland). The activity of these peptides on each strain was determined by following the cultures during 24 hrs and recording the O.D. every hour. Lack of change in O.D. measured during 24 hours was indicative of antifungal activity.

1.14 Circular Dichroism

To determine the structural conformation of the peptides, 0.3 mg of each Iztli peptide was dissolved in 1 mL of water or 50% trifluoroethanol. Circular Dichroism spectra were recorded on a JASCO J-715 Spectropolarimeter (Jasco Inc. U.S.A.) at room temperature using a 1 mm path length cell. Spectra were acquired from 195 to 250 nm. Ellipticity is reported as mean residue molar ellipticity and recorded in terms of molar ellipticity [θ] (deg cm² dmol⁻¹). Estimation of the secondary structure content of the peptides was performed using CDPPro [34], CDNN and KJ2D analysis software programs.

Supporting Information

Figure S1 Screening for resistant genes to Iztli peptides.

The area under the curve (AUC) for each strain of *S. cerevisiae* (BY4741) harboring a gene deletion (referred by the ORF name) tested against IP1 (10 μM) was calculated and charted. The AUC control (0.09) is the value of the IP1 (10 μM) against *S. cerevisiae* WT (BY4741). (TIF)

Figure S2 Antifungal activity of Iztli peptides mutated in the recognition sequence.

The activity of Iztli peptide 1 mutated in: His8Ala ● (2 μM), Gly11Ala ▲ (2 μM), Pro14Ala ▼ (2 μM), Gly15Ala ◆ (2 μM) and Tyr19Ala ★ (2 μM) were tested against *S. cerevisiae* (BY4741), as a control the original IP1 ■ (2 μM) was used. (TIF)

Figure S3 Secondary structure prediction of Iztli Peptides.

The SOPMA method was used to generate the image presented [35]. Predictions were generated using the default

parameters for SOPMA. Iztli peptides have a larger propensity to form an alpha-helix at the N-terminus and random coil at the C-terminus.

(TIF)

Figure S4 Circular dichroism of Iztli peptides. Far-UV CD spectra of IP1 (A), IP2 (B), IP3 (C) and IP4 (D) in water (open symbols) or 50% TFE (closed symbols) are shown. The CD spectra were recorded at 25°C using 0.3 mg/mL (158 μM) of each peptide.

(TIF)

Figure S5 Antifungal and antibacterial activity of IP2-SEM.

The activity of the seleno methionine derivative of IP2 was tested against A) *S. cerevisiae* (BY4741), IP2SEM ► (10 μM), using like controls YPD without peptide □ and IP2 ✕ (10 μM) and B) *E. coli* (DH10B), IP2SEM ► (17 μM), like controls were used LB without peptide □ and IP2 ✕ (17 μM).

(TIF)

Figure S6 Asymmetric unit of the crystal structure of Iztli peptide 2.

The crystal structure of Iztli Peptide 2 was solved at 3.4 Å resolution. Only the alpha-Carbon atoms are presented. The asymmetric unit contains 4 monomers between 11 and 15 residues, each presented as a ribbon of different color.

(TIF)

Figure S7 View of the experimental electron density map.

Crystal structure of the SeMet derivative Iztli peptide 2. The map is represented as a blue mesh, contoured at 1.4 r.m.s.d. (TIF)

Figure S8 NMR data of IP2.

Expanded region of an overlay of 2D-TOCSY (black) and 2D-NOESY (red) spectra of IP2 in H₂O a) and 80% TFE b), illustrating the effect of TFE in the inter-residues NOEs cross-peaks. An increase in the number of inter-residues NOEs cross-peaks in 80% TFE is observed and indicated by arrows and one-letter code for the corresponding amino acid residues. The spectra were recorded on a 700 MHz Varian at 298 K.

(TIF)

Figure S9 In vivo mitochondrial effect by Iztli peptides.

Oxygen consumption of isolated mitochondria of *S. cerevisiae* (BY4741) was measured in presence of Iztli peptide IP1 ■ (58 μM) added 80 second after the start of the tracing; as an indicator of respiratory control, CCCP (1 mM final concentration) was added after 180 seconds. For these experiments we used YPD medium without peptide □, α-pheromone Δ (10 μM) and fIP1 ◇ (100 μM) as controls. Iztli peptides IP2, IP3 and IP4 showed a similar effect on mitochondria than IP1. The experiments were repeated three times and the image shows one representative result. (TIF)

Figure S10 De novo design strategy for selective antibacterial peptides.

The strategy described in this work for designing new selective antibacterial peptides is summarized in the figure as follows: a) The data needed for designing SCAP is indicated on top of the scheme. The arrows indicate the relationships between these data: the calculated physicochemical properties of known SCAP are compared with those of peptide sequences generated *in silico*. b) The specific data used in this study are in the middle of the scheme, that is, the calculated physicochemical properties (AGADIR score, isoelectric point and hydrophobic moment) of Cecropin and Magainin were compared with those obtained from libraries derived from KL and the α-pheromone. c) The new SCAP obtained are indicated at the bottom of the figure (Physicochemically homologous peptides).

(TIF)

Figure S11 Selected designed SCAP from library 1 are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of water (control), the IP1 and IP2 peptides for 72 hrs are shown. The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated using a magnification of 20×.
(TIF)

Figure S12 Dendrogram of designed SCAP obtained from library 2. The 30 peptide sequences derived from the α -pheromone from *S. cerevisiae* that were identified as potential SCAP are shown in a dendrogram. Each peptide sequence is presented as a node leaf in this representation.
(TIF)

Figure S13 Designed SCAP from library 2 are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of the IP1 or IP2 peptides is shown. The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated using a magnification of 10×.
(TIF)

Figure S14 Amphipathic and cationic peptides (control peptides) are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of water and the PH(SCAP*)1, PH(SCAP*)2, PH(SCAP*)3, PH(SCAP*)4, PH(SCAP*)5 and PH(SCAP*)6 peptides are shown. The images were taken 72 hrs after peptide addition (see Methods). The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated with a magnification of 10× for PH(SCAP*)1 and PH(SCAP*)2; 20× for the rest of the peptides.
(TIF)

Figure S15 The physicochemical space of peptides. The frequency of predicted values observed in every peptide of length 8 (20^8 peptides) for A) Isoelectric point and B) hydrophobic moment are displayed. Note that in A) several pH values are not populated (*i.e.*, these have a discrete distribution), while in B) every possible value of hydrophobic moment is found (*i.e.* these exhibit a continuous distribution).
(TIF)

Figure S16 Quality control of Iztli peptides by HPLC. ANASPEC Inc tested each one of the four Iztli peptides reported in this study: A) IP1 \geq 95% purity. B) IP2 $>$ 95% purity. C) IP3 $>$ 95% purity. D) IP4 $>$ 95% purity.
(TIF)

Figure S17 Quality control of Iztli peptides by mass spectrometry. The molecular weight of the four Iztli peptides was determined by ANASPEC Inc. using mass spectrometry: A) IP1:2490.6 g/mol. B) IP2:2501.9 g/mol. C) IP3:2576.6 g/mol. D) IP4:2485.9 g/mol.
(TIF)

References

1. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E (1998) Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr Opin Oncol* 10: 560–565.
2. Obeid M (2009) Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides and chemotherapy is highly improved by targeted cell surface calreticulin-inducer peptides. *Mol Cancer Ther* 8: 2693–2707.
3. Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, Kain R, Rajotte D, et al. (2002) Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1527–1531.
4. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377–380.
5. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, et al. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5: 1032–1038.

Table S1 *Saccharomyces cerevisiae* strains.
(DOC)

Table S2 Designed selective antibacterial peptides. SCAPs designed in this study are presented indicating their names, sequence, predicted isoelectric point (IP) and helical hydrophobic moment (HM). The observed minimum inhibitory concentration for bacteria (MIC) and human cells (Toxicity) are indicated. For comparison, the SCAP used to match their physicochemical properties (Cecropin, Magainin, CeMa) and the α -pheromone are shown at the bottom of the table. Note that several of these peptides did not show any toxicity against bacteria or mammalian cells (*i.e.*, PH(SCAP*)1.6 and the α -pheromone), therefore the corresponding concentration for the MIC or toxicity are preceded with “bigger than” symbol ($>$), indicating that possible toxic concentrations should be larger than those tested in this study. ND: not determined. (*) Data obtained from [36]. See section II.1 in this Supporting Information S1 for the rationale on the nomenclature of these peptides.
(DOC)

Table S3 X-ray data collection and refinement statistics. Values in parentheses are for the last resolution shell.
(DOC)

Table S4 Quality control data for Iztli peptide synthesis. Percentage Peak Area reported by ANASPEC Inc. using High-performance liquid chromatography (HPLC) for the four Iztli peptides.
(DOC)

Supporting Information S1 Materials and methods of supplementary figures and tables. The methods used to the reported supplementary figures and tables are included in this document. Also, the corresponding references for these methods are included in this document.
(DOC)

Acknowledgments

We acknowledge Prof. Wilhelm Hansberg Torres (UNAM), to have proposed the idea to work on the α -pheromone and Dr. Xochitl Perez (UNAM) and her group for technical assistance in preparing the respiration-deficient p0 cells. We thank the core facilities of molecular biology and IT core facility of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. We thank the Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) for NMR instrumentation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GdR SCO DEB JGRP APD SUC RC CA ATL GGR. Performed the experiments: GdR JGRP AVR SH GGR ATL CA GZG MGA MTLO CPG. Analyzed the data: GdR JGRP AVR SH GGR ATL CA CPG SUC SCO. Contributed reagents/materials/analysis tools: GdR SUC RC APD DEB SCO. Wrote the paper: GdR JGRP GGR ATL CA SCO.

13. Rusten TE, Stenmark H (2007) Developmental biology: moonlighting at the pole. *Nature* 445: 497–499.
14. Rea AM, Thurston V, Searle MS (2009) Mechanism of ligand-induced folding of a natively unfolded helixless variant of rabbit I-BABP. *Biochemistry* 48: 7556–7564.
15. Jeffery CJ (2004) Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr Opin Struct Biol* 14: 663–668.
16. Bhalla US, Iyengar R (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283: 381–387.
17. Zhang YL, Marepalli HR, Lu HF, Becker JM, Naider F (1998) Synthesis, biological activity, and conformational analysis of peptidomimetic analogues of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor tridecapeptide. *Biochemistry* 37: 12465–12476.
18. Gounarides JS, Broido MS, Becker JM, Naider FR (1993) Conformational analysis of [D-Ala⁹]alpha-factor and [L-Ala⁹]alpha-factor in solution and in the presence of lipid. *Biochemistry* 32: 908–917.
19. Shenbagamurthi P, Kundu B, Raths S, Becker JM, Naider F (1985) Biological activity and conformational isomerism in position 9 analogues of the des-1-tryptophan,3-beta-cyclohexylalanine-alpha-factor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 24: 7070–7076.
20. Yang W, McKinney A, Becker JM, Naider F (1995) Systematic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor containing lactam constraints of different ring size. *Biochemistry* 34: 1308–1315.
21. Abel MG, Zhang YL, Lu HF, Naider F, Becker JM (1998) Structure-function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone using alanine-scanned analogs. *J Pept Res* 52: 95–106.
22. Kitada K, Hishinuma F (1988) Evidence for preferential multiplication of the internal unit in tandem repeats of the mating factor alpha genes in *Saccharomyces* yeasts. *Curr Genet* 13: 1–5.
23. Muller H, Hennequin C, Gallaud J, Dujon B, Fairhead C (2008) The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryot Cell* 7: 848–858.
24. Lee BK, Khare S, Naider F, Becker JM (2001) Identification of residues of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein-coupled receptor contributing to alpha-factor pheromone binding. *J Biol Chem* 276: 37950–37961.
25. Wakamatsu K, Okada A, Miyazawa T, Masui Y, Sakakibara S, et al. (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: 331–338.
26. Hartwell LH (1980) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *J Cell Biol* 85: 811–822.
27. Severin FF, Hyman AA (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12: R233–235.
28. Zhang NN, Dudgeon DD, Paliwal S, Levchenko A, Grote E, et al. (2006) Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* 17: 3409–3422.
29. Gancedo C, Flores CL (2008) Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 197–210.
30. Suzuki CK, Rep M, van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, et al. (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* 22: 118–123.
31. Low PS, Rathinavelu P, Harrison ML (1993) Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3. *J Biol Chem* 268: 14627–14631.
32. Wakamatsu K, Okada A, Suzuki M, Higashijima T, Masui Y, et al. (1986) Nuclear-magnetic-resonance studies on the conformation of membrane-bound alpha-mating factor. Transferred nuclear Overhauser effect analysis. *Eur J Biochem* 154: 607–615.
33. Das M, Parker JE, Halestrap AP (2003) Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glibenclamide-sensitive KATP channels in rat mitochondria. *J Physiol* 547: 893–902.
34. Sreerama N, R.W Woody (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287: 252–60.
35. Geourjon C, Deleage G (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* 11: 681–684.
36. del Rio G, Castro-Obregon S, Rao R, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett* 494: 213–219.

Supporting Online Material for

Moonlighting peptides with emerging function

Jonathan G Rodríguez Plaza, Amanda Villalón Rojas, Sur Herrera, Georgina Garza-Ramos, Alfredo Torres Larios, Carlos Amero, Gabriela Zarraga Granados, Manuel Gutiérrez Aguilar, María Teresa Lara Ortiz, Carlos Polanco Gonzalez, Salvador Uribe Carvajal, Roberto Coria, Antonio Peña Díaz, Dale E. Bredesen, Susana Castro-Obregon, Gabriel del Rio*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: gdelrio@ifc.unam.mx

This document includes

Supplementary Materials and Methods
Supplementary References
Supplementary Figures

I. Materials and Methods

I.1 Measuring Bacterial viability

The samples were prepared using the same procedure to determine antibacterial activity. However, instead of recording the O.D. in the microplate reader, 5 μ L samples of the cells incubated in the presence of the peptides were taken at 0, 6, 12, 18 and 24 hours. These samples were diluted 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^6 times respectively, and 5 μ L were plated in LB agar plates incubated at 37° C. After 24 hrs the number of colonies were counted for each sample.

I.2 Mitochondria isolation

Mitochondria were obtained as described before [1]. Briefly, yeast was incubated in YPD preculture medium for 24 h at 30° C, with agitation at 250 rpm, then the cells were cultured in YPlac at 30° C for 24 h at 250 rpm to improve respiration. Cells were collected and washed twice by centrifugation. The cells were suspended in cold isolating medium (5 mM MES, 0.6 M mannitol, 0.1% bovine serum albumin; the pH was adjusted to 6.8 with triethanolamine). The cells were disrupted into a Bead-Beater cell homogenizer (Biospec Products, USA) with 0.5 mm diameter glass beads, using three pulses of 20 seconds separated by 40 seconds intervals. After homogenization, mitochondria were isolated by differential centrifugation. The final mitochondrial pellet was resuspended in 500 μ L ice-cold isolation medium. Protein concentration was determined by the Biuret method [2].

I.3 Toxicity against primary cultures of human cells

Human foreskin fibroblasts (HFF) cells were grown in high glucose DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO) and penicillin/streptomycin 100 U/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cultures were incubated at 37°C in 95% air and 5% carbon dioxide with 95% humidity. After 24 hr of plating, 15 micro liters of a stock solution of each peptide was added and 72 hr later cell viability was estimated using the LIVE/DEAD cytotoxicity kit (Molecular Probes L-3224, Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer instructions (4 μ M Eth D-1 and 2 μ M calcein AM were used). The esterase substrate calcein AM gives a green fluorescent product when hydrolyzed; therefore, cells stained green have esterase activity and consequently an intact membrane capable of retaining the esterase product. Ethidium homodimer-1, an impermeable dye that binds DNA, enters only into compromised cellular membranes commonly observed in death cells.

Stock solutions of the different peptides were prepared with the following concentrations: PH(Cecropin)1=4 mg/mL, PH(Magainin)1=4 mg/mL, PH(CeMa)1=4 mg/mL, IP1=4.8 mg/mL, IP2=4.8 mg/mL, PH(SCAP*)1= 4 mg/mL, PH(SCAP*)2= 4 mg/mL, PH(SCAP*)3= 12 mg/mL, PH(SCAP*)4= 12 mg/mL, PH(SCAP*)5= 20 mg/mL, PH(SCAP*)6= 12 mg/mL. These concentrations were chosen to be at least 3 times higher than the detected MIC for each peptide. All these concentrations are the dry weight of each peptide.

Images were taken on a Nikon Eclipse TE300 fluorescence microscope from representative fields. Each peptide was tested in two independent assays, each performed in triplicates.

I.4 Predicted physicochemical properties of peptides

Three properties were predicted for every sequence peptide analyzed in this study: predicted isoelectric point, hydrophobic moment and AGADIR score. We have coded a program in Fortran77 to perform these calculations (but AGADIR) to facilitate the systematic calculation of these properties. The isoelectric point was calculated based on the following formula:

```

Σ i = 10..130(
  pH = i/10;
  Qtotal = Hi/ (1+10(pH-6.5)) + Ki/ (1+10(pH-10.79)) + Ri/(1+10(pH-12.5)) + 1/ (1+10(pH-
8.56)) – [Ci/ (1+10(8.3 -pH)) + Di/(1+10(3.91 -pH)) + Ei/ (1+10(4.25 -pH)) + Yi/ (1+10(10.95
-pH)) + 1/(1+10(3.56 -pH))];
  IF (-1/10 < Qtotal < 1/10) THEN pl = pl + pH; i = i+1;
)

```

where Ci, Di, Ei, Hi, Ki, Ri and Yi are the number of time the amino acids Cystein, Aspartic acid, Glutamic acid, Histidine, Lysine, Arginine and Tyrosine are found in each peptide sequence, respectively. pl is the calculated isoelectric point.

The helical hydrophobic moment was calculated as described previously [3] based on the formula described by Eisenberg and collaborators [4] for the hydrophobic moment plot.

I.5 Computer screening of peptides matching physicochemical properties of known SCAPs

Two strategies were developed for this purpose. In one strategy, in silico libraries of peptides were generated to reproduce the observed physicochemical properties of a known SCAP, namely Cecropin A, Magainin 2 or a hybrid of Cecropin and Magainin here referred to as CeMa (see Table S2). A peptide sequence was considered to reproduce the predicted isoelectric point of a known SCAP if the values differ in no more than 2%. For instance, the predicted isoelectric point values differing in no more than 0.28 units of pH were considered similar. In the case of the helical hydrophobic moment, a peptide sequence was considered to reproduce the observed hydrophobic moment of a known SCAP only if they have the same value with centesimal precision. This decision was based on the observed distribution of these physicochemical properties (see Figure S15). That is, while almost all possible values for the hydrophobic moment are found in peptide sequences, only few predicted isoelectric values are found in peptide sequences. Finally, peptides differing in less than 1 unit of AGADIR score were considered to have the same AGADIR score.

In another strategy, an in silico library of peptides was produced by fragmenting the Cecropin A or Magainin 2 into peptides of length 8 or 12, in order to identify those having the range of physicochemical properties characteristic of known SCAP (del Rio y cols., 2001): 10.8-11.7 for the predicted isoelectric point, 0.4-0.6 for helical hydrophobic moment and an AGADIR score less than 10.0.

I.6 Measuring fungal viability

The samples were prepared using the same procedure as for the determination of antifungal activity. However, instead of recording the O.D. in the microplate reader, 5 µL samples of the cells incubated in the presence of the peptides were taken at 0, 6, 12, 18 and 24 hours. These samples were diluted 10², 10³, 10⁴, 10⁴ and 10⁴ times, respectively, and 5 µL were plated in YPD agar plates incubated at 30° C. After 36 hrs the number of

colonies for each sample were counted.

I.7 Identification of critical genes involved in the Iztli peptides activity

The cultures were prepared as in the antifungal activity assay described before (see above). To identify the strains lacking a gene required to inhibit in at least 50% the normal growth of the cells, the area under the growth curve (AUC) was calculated using software designed ad hoc in our laboratory. Thus, the ratio of the AUCs of the cells in the absence and in the presence of the peptide was determined; any strain rendering a ratio value between 1.0 and 2.0 was considered to carry a deletion of a critical gene.

I.8 Generation of $\rho 0$ strains of *Saccharomyces cerevisiae*

A colony of *S. cerevisiae* was grown in 2 mL of CSM (Complete Supplement Mix) medium with 5 μ L of ethidium bromide (Stock solution: 10 mg/mL, sterilized by filtration) at 30° C for 2 days. A sample of 10 μ L of this culture was added to 2 mL of new CSM medium with 5 μ L of ethidium bromide and incubated at 30° C for 2 days. 10 μ L of the culture were streaked in a YPD plate and incubated at 30° C by 36 hours. A colony was streaked in a new YPD plate and incubated at 30° C for 36 hour. To verify the phenotype the plate was replicated with velvet in YPD and YPEG (3% glycerol, 3% ethanol) plates.

I.9 Mitochondrial respiration

Oxygen consumption of isolated mitochondria exposed to the Iztli peptides was measured using a YSI model 5300 Oxygraph (Yellow Springs Instrument Co. USA) equipped with a Clark electrode in a 1 mL water jacketed chamber (at 30° C). Such experiments were designed to determine the respiration of mitochondria in its coupled state (state IV). The oxygraph was interfaced to a PC with a voltmeter MUL-600 (Steren, México). Mitochondria (0.5 mg protein/mL) were added to a reaction mixture containing 0.6 M mannitol, 5 mM MES, pH 6.8 (adjusted with triethanolamine), 20 mM KCl, 0.5 mM MgCl, 4 mM Phosphate. Substrate was ethanol 5 μ L/mL. Stock solutions were 2.0 M KCl, 1.0 and 1 M Pi-Tris, pH 6.8. CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, 5mM) was used to probe that the mitochondrial oxidative phosphorylation coupling, that is, to test for complex IV state. Oxygen consumption was recorded in the absence of peptides for 30 seconds to determine the basal respiration rate of intact mitochondria. After that, the peptides were added at the final concentrations indicated in Figure S9. A zero slope indicates inhibition of the respiration.

I.10 Crystallization and crystal diffraction of Iztli peptides

To obtain stable crystals of the Iztli peptides multiple crystallization solutions were tested using the General Screen HT kit (Hampton Research, USA). The peptide was dissolved at a concentration of 32 mg/mL. Crystals were obtained using ammonium sulfate 0.5 M, sodium citrate 100 mM pH 5.6 and lithium sulphate 1 M at 30° C. Crystals were frozen at -173° C with a lithium sulfate 2 M solution. To solve the atomic structure of the Iztli peptides, methionine in the 18th position of Iztli peptide 2 was replaced by a selenomethionine. Data collection was performed at the Life Sciences Collaborative Access Team (LS-CAT) 21-ID-F beamline at the Advance Photon Source (APS) in Argonne, IL, USA. Data processing and integration was performed with XDS (SigAno= 2.644 of the SeMet dataset from the useful range of 60 to 3.4 Å resolution) [5] and MOSFLM [6] and reduced with SCALA [7]. Phases were obtained with the SHELXD program (University of Göttingen, Germany) with the support of Prof. George M. Sheldrick

from Göttingen University. We were not able to refine the molecular model obtained (R_{free} stuck at 49.49%) due to a crystal-twinning problem (twin fraction of 0.326). The electron density is extremely poor and it does not allow us to assign the peptide sequence unambiguously (see Figure S7 and Table S3). We are however confident in the alanine molecular model that we were able to provide, as we obtain a molecular replacement solution using PHASER [8] with high Z-scores using the native data (Z-scores for the rotation and translation functions, respectively: 5.9 and 12.9, using the solution with 4 helices in the asymmetric unit obtained from the SeMet derivative).

I.11 NMR spectroscopy

All NMR spectra were recorded on a 700 MHz Varian VNMR-S spectrometer equipped with a cryogenically-cooled triple resonance pulsed field gradient probe at the LANEM, in Cuernavaca Mexico. Two-dimensional NMR spectra, NOESY (mixing time 200 ns) and TOCSY (mixing time 75 ms) of the IP2 were recorded in H₂O and 80% TFE at 298K. All spectra were composed of 8192 complex points in the direct dimension and 1024 complex points in the indirect dimension. All data were processed and analyzed with NMRPipe [9] and CARRA [10].

II. Design of Izlti Peptides

Izlti peptides are the result of adding a selective antibacterial activity to the α -pheromone; thus, here we describe how to obtain peptides capable to display selective antibacterial activity. We have previously shown that a group of cationic antibacterial peptides (CAPs) display selective action against bacteria. Selective refers to the ability of these peptides not to be toxic to human cells at least at the minimum inhibitory concentration displayed in bacteria. Thus, selective antibacterial peptides here are referred to Selective Cationic Antibacterial Peptides or SCAPs.

Our approach is based on the notion that physicochemical properties determine the SCAPs activity. Thus, any peptide sequence sharing similar physicochemical properties values to known SCAPs may also display SCAP activity (see Figure S10). We refer to these peptides as physicochemically homologous.

To test this idea, two approaches for *de novo* design of SCAPs pharmacophores mimicking the possible mechanisms for the emergence of new genes in nature were used: from pseudo-genes [11] and from highly repetitive sequences [12]. In the last case, we used repeats of Lysine and Leucine residues (see Figure S10, Library 1); in the first case, we used the α -pheromone from *S. cerevisiae* (see Figure S10, Library 2) because it does not have the characteristic physicochemical pattern of SCAPs (see Table S2) nor has any detectable antibacterial activity (see Table S2).

II.1 Peptide nomenclature

We assumed the following nomenclature: any peptide designed by physicochemical homology is named using the prefix PH (Physicochemically Homologous), followed by the name of the parent SCAP in parenthesis (in this case, Cecropin A, Magainin 2, CeMa or SCAP* for peptides designed based on every known SCAP), and an integer number. For instance, PH(Cecropin)1 refers to the peptide numbered 1, physicochemically homologous

to Cecropin A. In the case where the SCAP was built from an existing peptide (*i.e.*, α -pheromone), the name starts with the name of the existing peptide followed by the PH nomenclature; *e.g.* alpha-pheromone-PH(Cecropin)1 refers to a peptide labeled 1 designed from the α -pheromone that matches the physicochemical properties of Cecropin. For simplicity, alpha-pheromone-PH(Cecropin)1 and alpha-pheromone-PH(CeMa)1 are referred in the main text of this work as Iztli peptide IP1 and IP2, respectively.

II.2 SCAP from Library 1

This library included peptides of 9, 10 and 11 residues, with a total of $2^9 + 2^{10} + 2^{11} = 512+1,024+2,048=3,584$ different peptide sequences. From this library only 1 peptide of length 9 matched the properties of Magainin 2, 1 peptide of length 10 matched the properties of Cecropin A and 1 peptide of length 11 matched the properties of the CeMa peptide (see Table S2). These 3 peptides (PH(Cecropin)1, PH(Magainin)1 and PH(CeMa)1; see section II.1 for the rationale on the nomenclature of these peptides) were chemically synthesized and experimentally tested showing antibacterial activity (see Table S2). The toxicity against human cells of peptides PH(Magainin)1 and PH(CeMa)1 was tested; as shown in Figure S11, peptide PH(CeMa)1 formed some precipitates and consequently the cells did not look healthy, but none of the peptides induced cell death detectable by Ethidium homodimer-I staining, and had intact plasma membrane after 72 hr of exposure.

II.3 SCAP from Library 2

An *in silico* library was developed that added up to 6 amino acids on each end of the α -pheromone. This library contained a total of 344,857,923 peptide sequences (peptide library's size = $\sum (19i)^*(i+1)$; where *i*: number of amino acid residues included to the α -pheromone on either extreme; 1,2,3...6). From these, 30 sequences matched the predicted physicochemical values of Cecropin A or CeMa (no matches were found with Magainin 2), and 2 groups were observed based on their sequence similarity (see Figure S12). One peptide sequence from each group was synthesized and experimentally tested for antibacterial activity and toxicity against human cells. We found that peptides IP1 and IP2 presented anti-bacterial activity (see Table S2) and no toxicity against human cells (see Figure S13).

II.4 SCAP from Control Library

A library was generated from Cecropin A and Magainin 2 as a control. In this control library, Cecropin and Magainin 2 were fragmented into peptides of 8 to 12 amino acids and new cationic and amphipathic peptides were identified with values of physicochemical properties that are not present in known SCAP. For instance, a peptide may be found in this control library that has a hydrophobic moment value (*e.g.*, 0.49) within the observed range of values found in the known SCAP (0.40-0.60), but that particular hydrophobic moment value is not found in any known SCAP (*e.g.*, 0.43, 0.44, 0.56). Note that the length of these peptides include the lengths of those designed from library 1 with SCAP activity (*i.e.*, PH(Cecropin)1, PH(CeMa)1 and PH(Magainin)1); such small peptides are unlikely to form helical structures and thus it is possible to expect that any cationic and amphipathic peptide of these lengths would have SCAP activity. Six peptides were detected using this approach (see Table S2 for peptides named PH(SCAP*)1..6). None of these peptides showed any significant antibacterial activity (see Table S2) and none were toxic against human cells (see Figure S14).

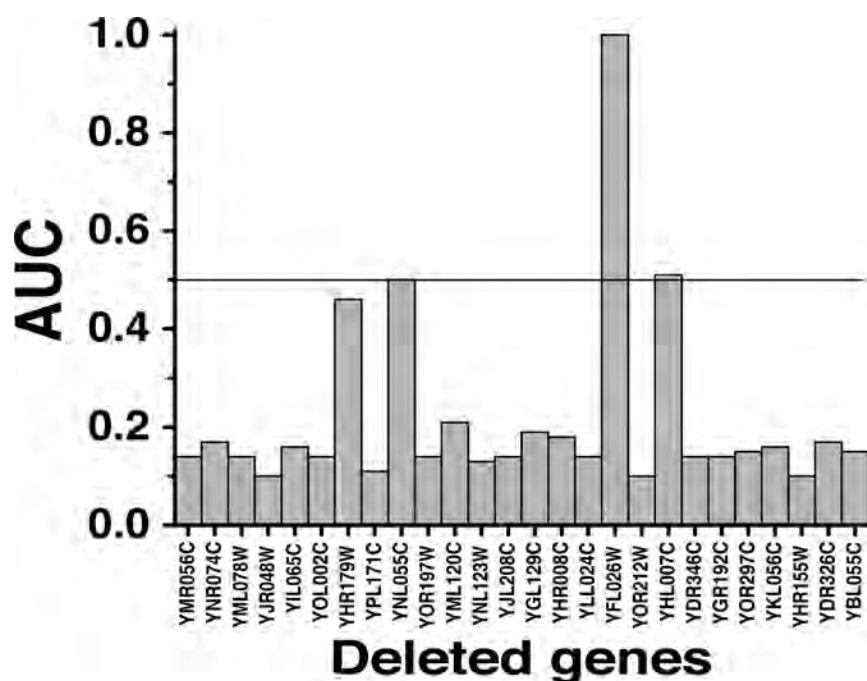
II.5 Distribution of physicochemical properties

We systematically explored the values of two physicochemical properties of every peptide with 8 amino acid residues ($20^8 = 2.56 \times 10^{11}$ peptide sequences). Note that our results so far included the use of three properties. However, here we did not use the AGADIR score because we noticed in a random sampling of small peptides (9 residues long), that AGADIR score is always within the range of known SCAP (data not shown). We observed that not every combination of physicochemical values is possible (Figures S15A and S15B). Thus, we considered that any two peptide sequences share identical physicochemical properties values when a) the predicted isoelectric point differ in no more than 2% and b) the predicted hydrophobic moment have the same value with centesimal precision. Finally, peptides differing in less than 1 unit of AGADIR score were considered to have the same AGADIR score.

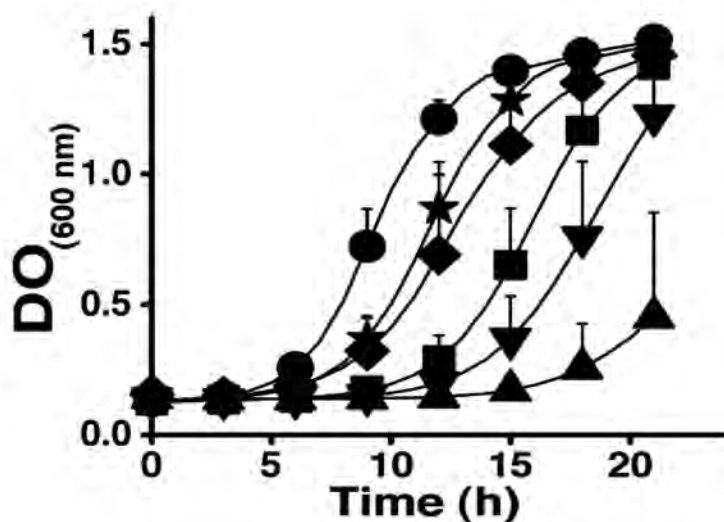
Supplementary references

1. Pena A, Pina MZ, Escamilla E, Pina E (1977) A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett* 80: 209-213.
2. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
3. del Rio G, Castro-Obregon S, Rao R, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett* 494: 213-219.
4. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 179: 125-142.
5. Kabsch, W., Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography*, 1993. 26(6): p. 795-800.
6. Leslie, A.G.W. (1992) Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography 26.
7. Collaborative, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, 1994. 50(5): p. 760-763.
8. McCoy, A.J., et al., Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 2007. 40(4): p. 658-674.
9. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, et al. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6: 277-293.
10. Keller R (2004) *The computer Aided Resonance Assignment*; Verlag C, editor.
11. Begun DJ (1997) Origin and evolution of a new gene descended from alcohol dehydrogenase in *Drosophila*. *Genetics* 145: 375-382.
12. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 21: 991-1007.

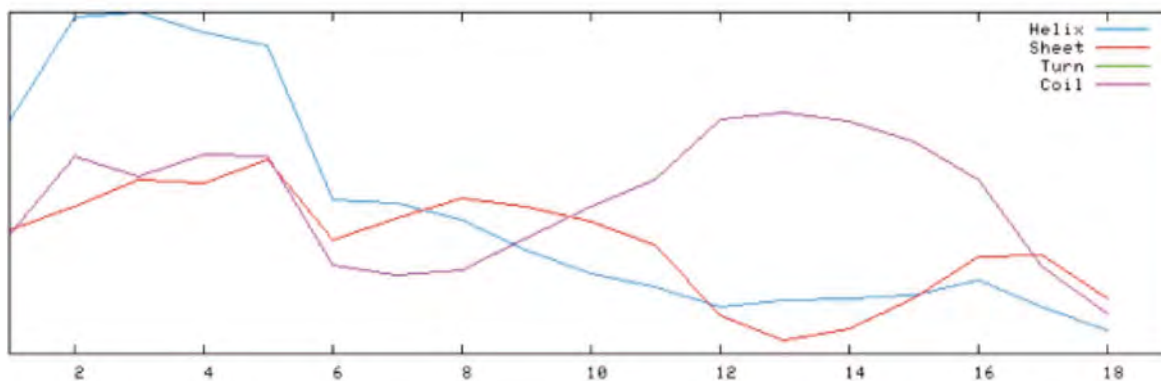
Supplementary Figures



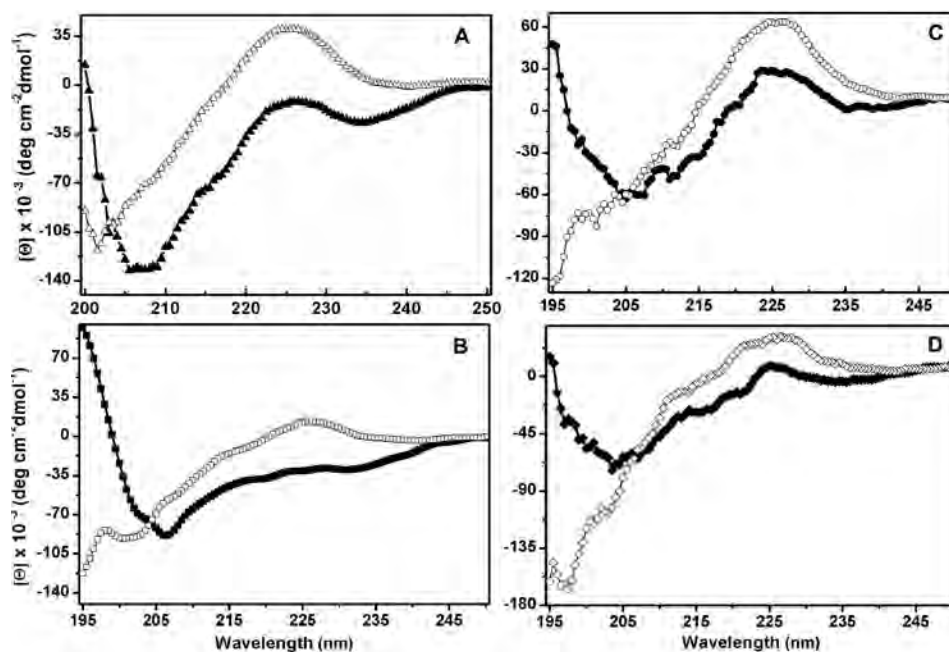
Supplementary Figure 1. Screening for resistant genes to Iztli peptides. The area under the curve (AUC) for each strain of *S. cerevisiae* (BY4741) harboring a gene deletion (referred by the ORF name) tested against IP1 (10 mM) was calculated and charted. The AUC control (0.09) is the value of the IP1 (10 mM) against *S. cerevisiae* WT (BY4741).



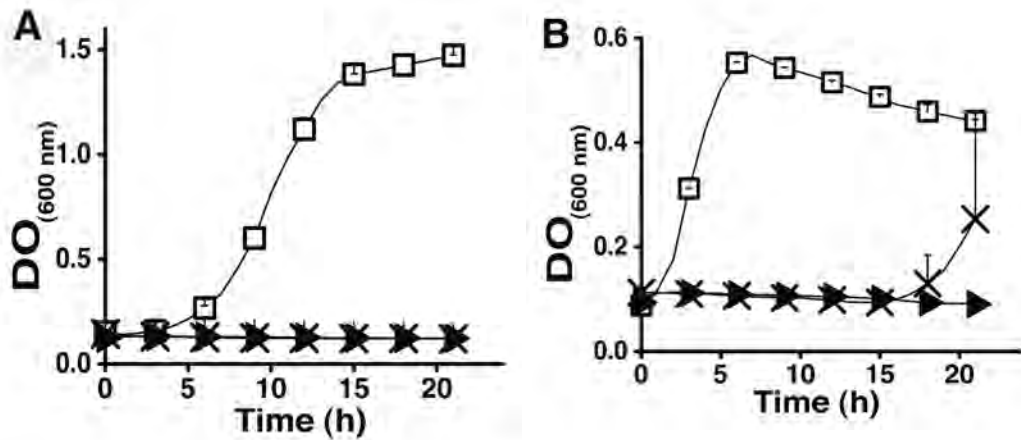
Supplementary Figure 2. Antifungal activity of Iztli peptides mutated in the recognition sequence. The activity of Iztli peptide 1 mutated in: His8Ala ● (2 mM) Gly11Ala ▲ (2 mM), Pro14Ala ▼ (2 mM), Gly15Ala ◆ (2 mM) and Tyr19Ala ★ (2 mM) were tested against *S. cerevisiae* (BY4741), as a control the original IP1 ■ (2 mM) was used.



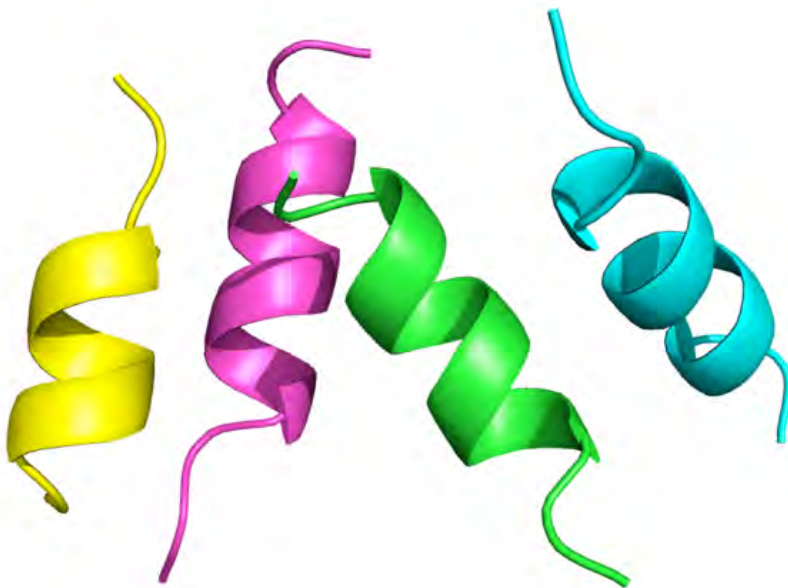
Supplementary Figure 3. Secondary structure prediction of Iztli Peptides. The SOPMA method was used to generate the image presented [35]. Predictions were generated using the default parameters for SOPMA. Iztli peptides have a larger propensity to form an alpha-helix at the N-terminus and random coil at the C-terminus.



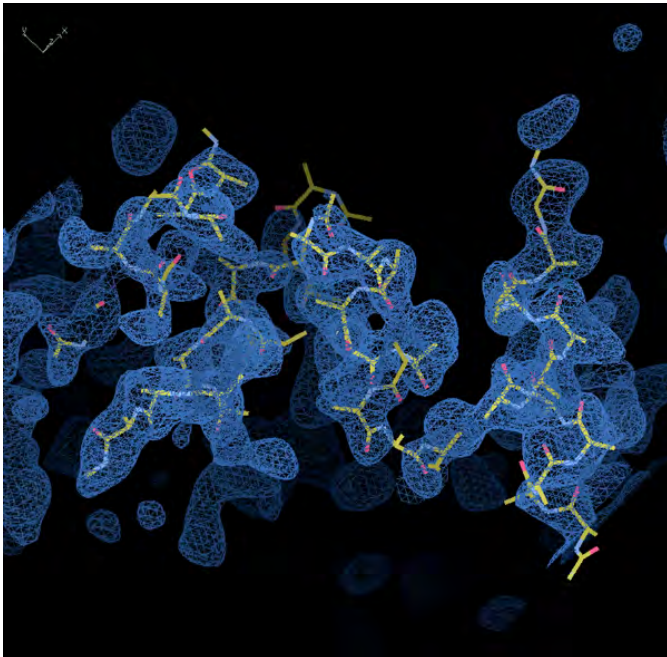
Supplementary Figure 4. Circular dichroism of Iztli peptides. Far-UV CD spectra of IP1 (A), IP2 (B), IP3 (C) and IP4 (D) in water (open symbols) or 50% TFE (closed symbols) are shown. The CD spectra were recorded at 25uC using 0.3 mg/mL (158 mM) of each peptide.



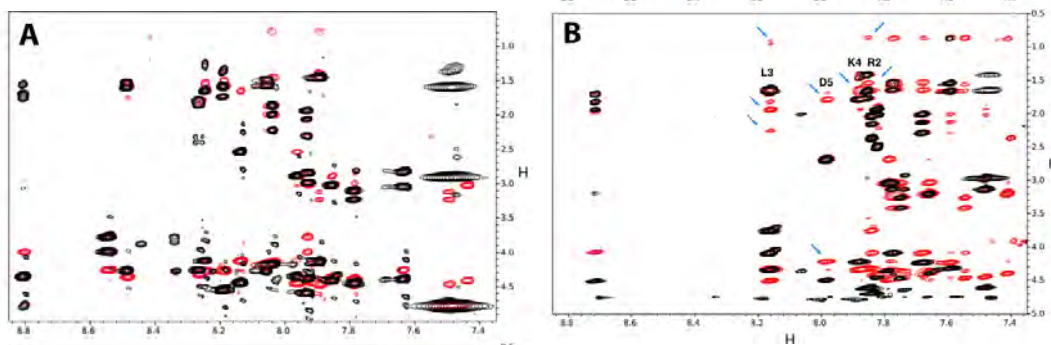
Supplementary Figure 5. Antifungal and antibacterial activity of IP2-SEM. The activity of the seleno methionine derivate of IP2 wastested against A) *S. cerevisiae* (BY4741), IP2SEM ▶ (10 μ M), using like controls YPD without peptide □ and IP2 × (10 μ M) and B) *E. coli* (DH10B), IP2SEM ▶ (17 μ M), like controls were used LB without peptide □ and IP2 × (17 μ M).



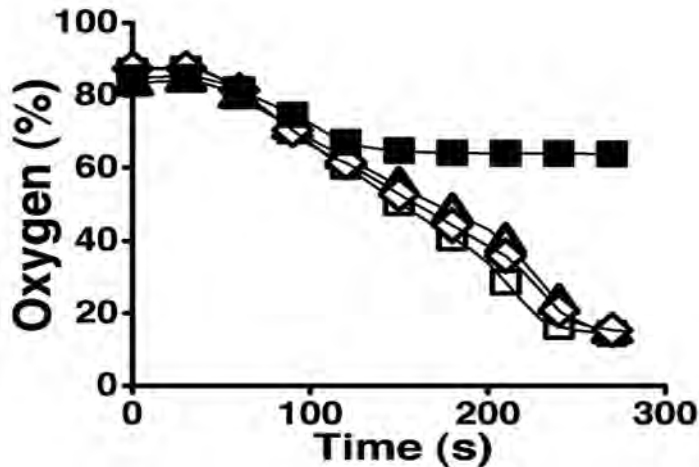
Supplementary Figure 6. Asymmetric unit of the crystal structure of Iztli peptide 2. The crystal structure of Iztli Peptide 2 was solved at 3.4 Å resolution. Only the alpha-Carbon atoms are presented. The asymmetric unit contains 4 monomers between 11 and 15 residues, each presented as a ribbon of different color.



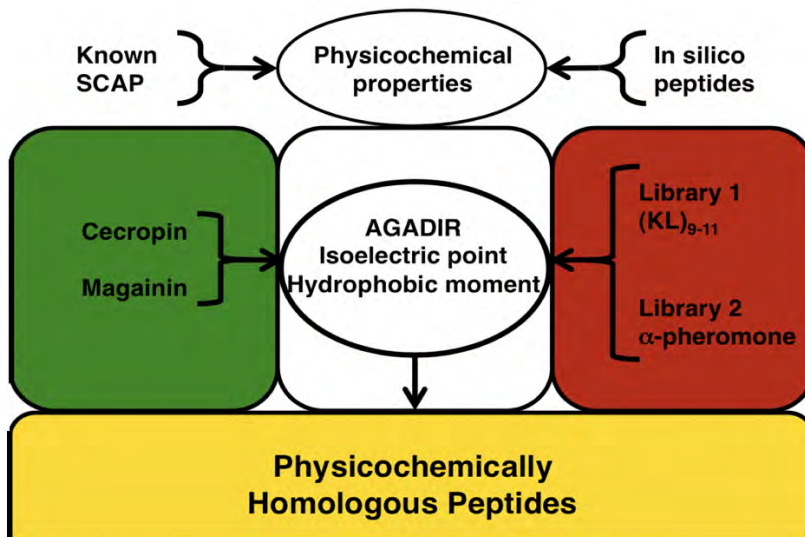
Supplementary Figure 7. View of the experimental electron density map. Crystal structure of the SeMet derivative Iztli peptide 2. The map is represented as a blue mesh, contoured at 1.4 r.m.s.d.



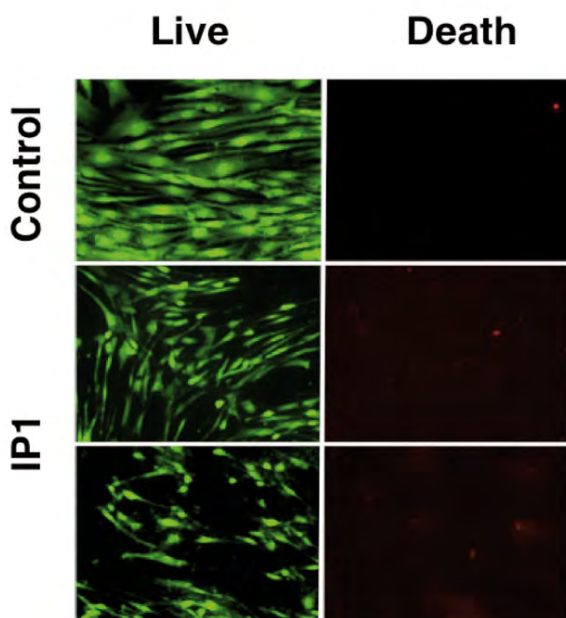
Supplementary Figure 8. NMR data of IP2. Expanded region of an overlay of 2D-TOCSY (black) and 2D-NOESY (red) spectra of IP2 in H₂O a) and 80% TFE b), illustrating the effect of TFE in the inter-residues NOEs cross-peaks. An increase in the number of inter-residues NOEs cross-peaks in 80% TFE is observed and indicated by Arrows and one-letter code for the corresponding amino acid residues. The spectra were recorded on a 700 MHz Varian at 298 K.



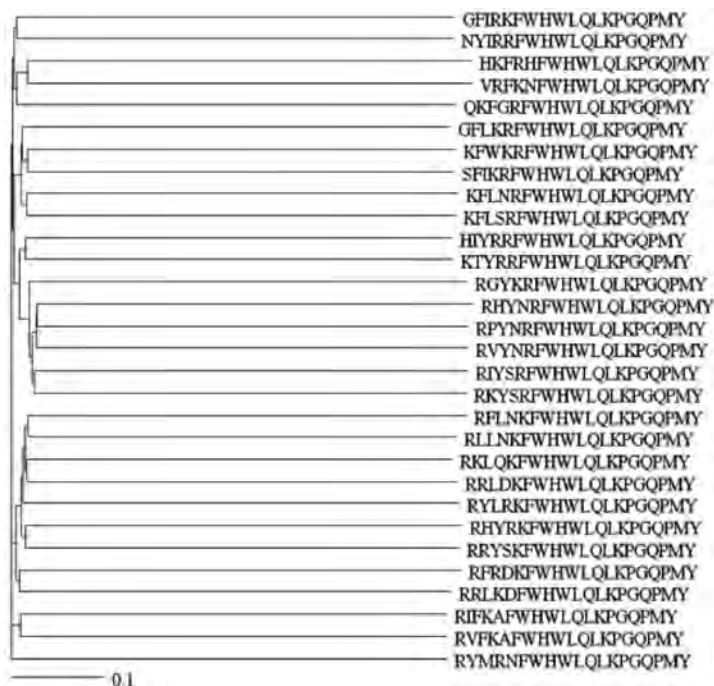
Supplementary Figure 9. In vivo mitochondrial effect by Iztli peptides. Oxygen consumption of isolated mitochondria of *S. cerevisiae* (BY4741) was measured in presence of Iztli peptide IP1 ■ (58 μ M) added 80 second after the start of the tracing; as an indicator of respiratory control, CCCP (1 mM final concentration) was added after 180 seconds. For these experiments we used YPD medium without peptide □, alpha-pheromone Δ (10 μ M) and fIP1 \diamond (100 μ M) as controls. Iztli peptides IP2, IP3 and IP4 showed a similar effect on mitochondria than IP1. The experiments were repeated three times and the image shows one representative result



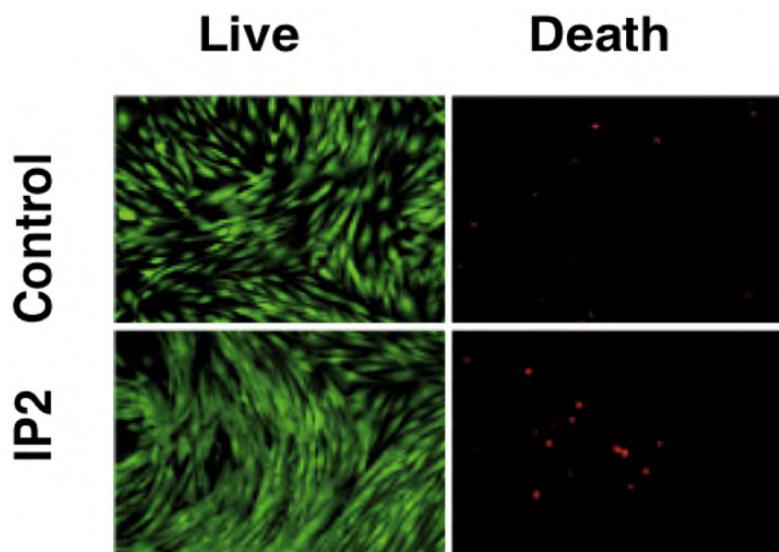
Supplementary Figure 10. De novo design strategy for selective antibacterial peptides. The strategy described in this work for designing new selective antibacterial peptides is summarized in the figure as follows: a) The data needed for designing SCAP is indicated on top of the scheme. The arrows indicate the relationships between these data: the calculated physicochemical properties of known SCAP are compared with those of peptide sequences generated in silico. b) The specific data used in this study are in the middle of the scheme, that is, the calculated physicochemical properties (AGADIR score, isoelectric point and hydrophobic moment) of Cecropin and Magainin were compared with those obtained from libraries derived from KL and the alpha-pheromone. c) The new SCAP obtained are indicated at the bottom of the figure (Physicochemically homologous peptides).



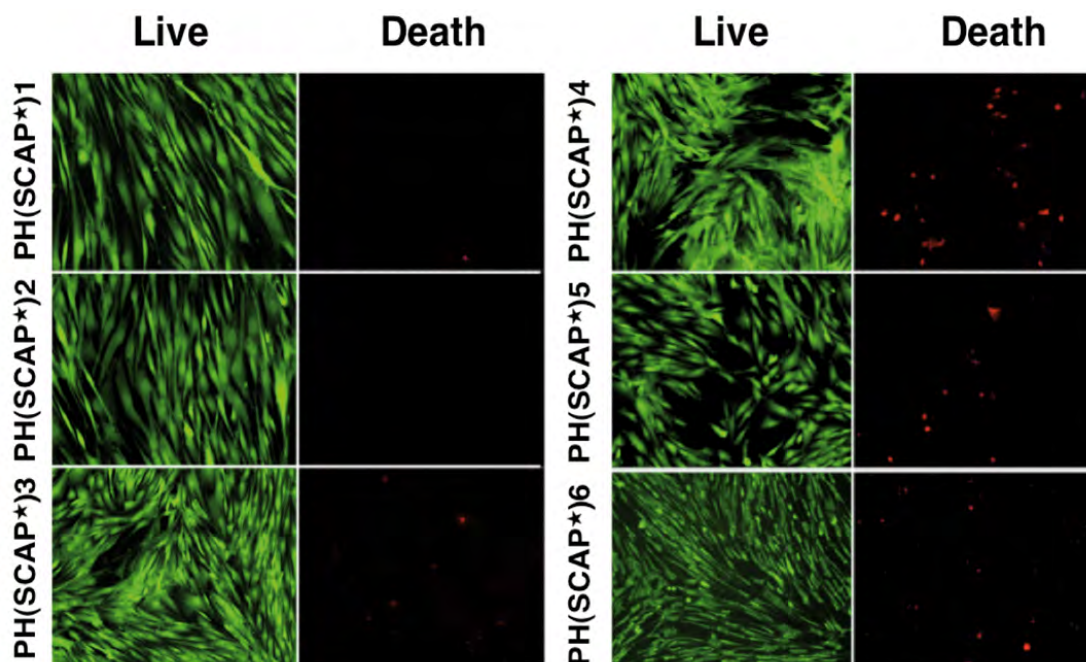
Supplementary Figure 11. Selected designed SCAP from library 1 are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of water (control), the IP1 and IP2 peptides for 72 hrs are shown. The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated using a magnification of 20X.



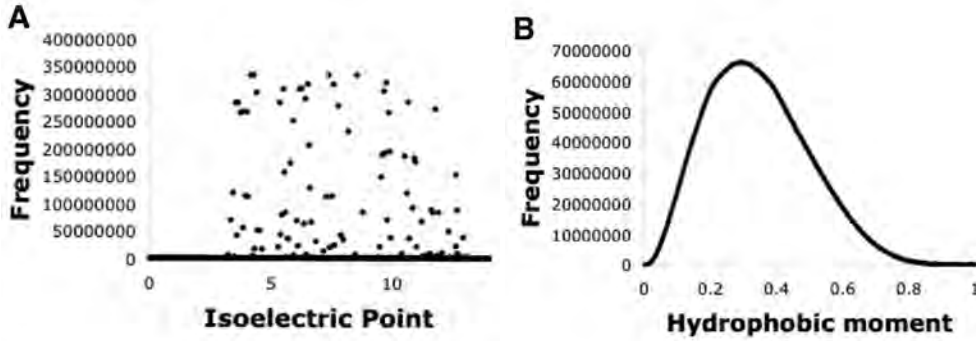
Supplementary Figure 12. Dendrogram of designed SCAP obtained from library 2. The 30 peptide sequences derived from the aphermone from *S. cerevisiae* that were identified as potential SCAP are shown in a dendrogram. Each peptide sequence is presented as a node leaf in this representation.



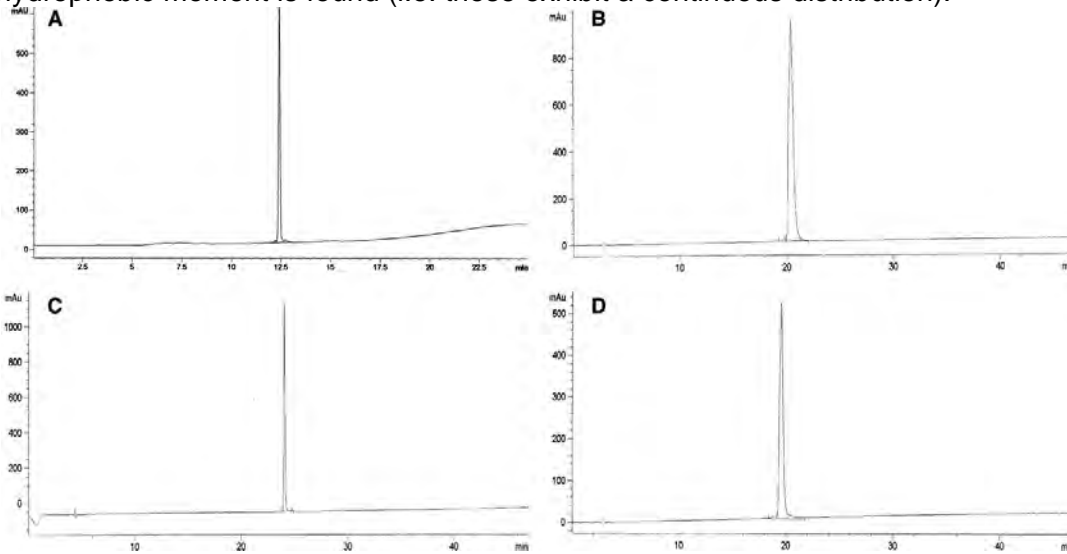
Supplementary Figure 13. Designed SCAP from library 2 are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of the IP1 or IP2 peptides is shown. The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated using a magnification of 10X.



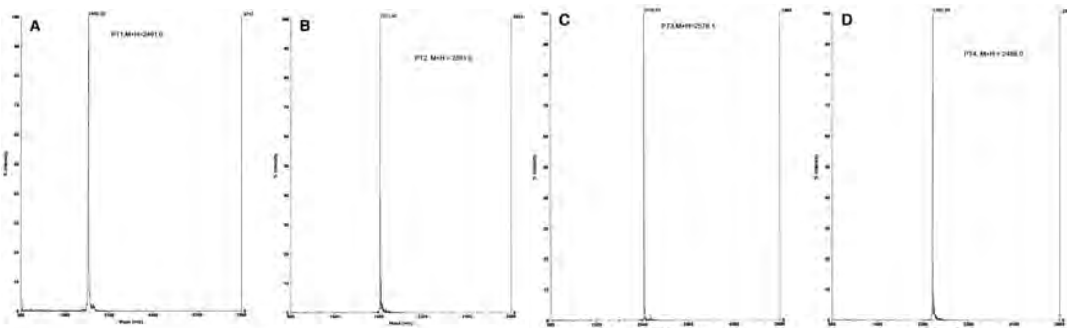
Supplementary Figure 14. Amphipathic and cationic peptides (control peptides) are not toxic on HFF cells. The viability of human foreskin fibroblasts (HFF) cells in the presence of water and the PH(SCAP*)1, PH(SCAP*)2, PH(SCAP*)3, PH(SCAP*)4, PH(SCAP*)5 and PH(SCAP*)6 peptides are shown. The images were taken 72 hrs after peptide addition (see Methods). The image shows the living cells stained in green and dead cells stained in red. The images were generated with a magnification of 106 for PH(SCAP*)1 and PH(SCAP*)2; 206 for the rest of the peptides.



Supplementary Figure 15. The physicochemical space of peptides. The frequency of predicted values observed in every peptide of length 8 (208 peptides) for A) Isoelectric point and B) hydrophobic moment are displayed. Note that in A) several pH values are not populated (i.e., these have a discrete distribution), while in B) every possible value of hydrophobic moment is found (i.e. these exhibit a continuous distribution).



Supplementary Figure 16. Quality control of Iztli peptides by HPLC. ANASPEC Inc tested each one of the four Iztli peptides reported in this study: A) IP1 95% purity. B) IP2 95% purity. C) IP3 95% purity. D) IP4 95% purity.



Supplementary Figure 17. Quality control of Iztli peptides by mass spectrometry. The molecular weight of the four Iztli peptides was determined by ANASPEC Inc. using mass spectrometry: A) IP1: 2490.6 g/mol. B) IP2: 2501.9 g/mol. C) IP3: 2576.6 g/mol. D) IP4: 2485.9 g/mol.

Supplementary Table S1. *S. cerevisiae* strains

Strain	Genotype	Strain	Genotype
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
BY4741	<i>MATa atg11Δ</i>	BY4741	<i>MATa pep4Δ</i>
BY4741	<i>MATa ayt1Δ</i>	BY4741	<i>MATa por1Δ</i>
BY4741	<i>MATa bre2Δ</i>	BY4741	<i>MATa psr2Δ</i>
BY4741	<i>MATa cms1Δ</i>	BY4741	<i>MATa saw1Δ</i>
BY4741	<i>MATa cox17Δ</i>	BY4741	<i>MATa seo1Δ</i>
BY4741	<i>MATa cyc3Δ</i>	BY4741	<i>MATa sir4Δ</i>
BY4741	<i>MATa dep1Δ</i>	BY4741	<i>MATa snc1Δ</i>
BY4741	<i>MATa dnm1Δ</i>	BY4741	<i>MATa snf7Δ</i>
BY4741	<i>MATa drs2Δ</i>	BY4741	<i>MATa spo7Δ</i>
BY4741	<i>MATa elm1Δ</i>	BY4741	<i>MATa spo75Δ</i>
BY4741	<i>MATa erv46Δ</i>	BY4741	<i>MATa ste20Δ</i>
BY4741	<i>MATa frt2Δ</i>	BY4741	<i>MATa ste4Δ</i>
BY4741	<i>MATa fun14Δ</i>	BY4741	<i>MATa swc3Δ</i>
BY4741	<i>MATa gat3Δ</i>	BY4741	<i>MATa swd1Δ</i>
BY4741	<i>MATa isa2Δ</i>	BY4741	<i>MATa syn8Δ</i>
BY4741	<i>MATa mht1Δ</i>	BY4741	<i>MATa ubr2Δ</i>
BY4741	<i>MATa ntg1Δ</i>	BY4741	<i>MATa uip3Δ</i>
BY4741	<i>MATa nup60Δ</i>	BY4741	<i>MATa uth1Δ</i>
BY4741	<i>MATa oye2Δ</i>		

Supplementary Table S2. Designed selective antibacterial peptides

Name	Sequence	IP	HM	MIC (μM)	Toxicity (μM)
PH(Cecropin)1	KKLLKLLKLL	11.3	0.44	10	ND
PH(Magainin)1	LKKLLKLLL	11.1	0.56	40	>120
PH(CeMa)1	LKKLLKLLKLL	11.3	0.43	30	>90
IP1	KFLNRFHWLQLK PGQPMY	11.1	0.44	20	>36
IP2	RRLKDFHWLQLK PGQPMY	11.1	0.44	20	>36
PH(SCAP*)1	KWKLFFKI	11.3	0.50	153	>460
PH(SCAP*)2	GKFLHSAK	10.8	0.42	>300	>500
PH(SCAP*)3	KFLHSAKK	11.1	0.45	>300	>500
PH(SCAP*)4	FLHSAKFK	10.8	0.57	>300	>500
PH(SCAP*)5	HSAKKFGK	11.1	0.40	>300	>500
PH(SCAP*)6	GKFLHSAKKFGK	11.3	0.45	>300	>500
Cecropin A	KWKLFFKIEKVGQN IRDGIIKAGPAVAV VGQATQIAK	11.2	0.44	0.1 (*)	>50 (*)
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGK AFVGEIMNS	10.8	0.56	16 (*)	>170 (*)
CeMa	KWKLFFKIGIGAVLK VLTGGLPALIS	11.4	0.43	0.1 (*)	> 1000 (*)
Alpha-Pheromone	HWLQLKPGQPMY	9.55	0.27	>18	ND

SCAPs designed in this study are presented indicating their names, sequence, predicted isoelectric point (IP) and helical hydrophobic moment (HM). The observed minimum inhibitory concentration for bacteria (MIC) and human cells (Toxicity) are indicated. For comparison, the SCAP used to match their physicochemical properties (cecropin, magainin, CeMa) and the α -Pheromone are shown at the bottom of the table. Note that several of these peptides did not show any toxicity against bacteria or mammalian cells (*i.e.*, PH(SCAP*)1..6 and the α -Pheromone), therefore the corresponding concentration for the MIC or toxicity are preceded with “bigger than” symbol (>), indicating that possible toxic concentrations should be larger than those tested in this study. ND: not determined. (*) Data obtained from (del Rio y cols., 2001). See section II.1 in this supplementary material for the rationale on the nomenclature of these peptides.

Supplementary T able S3. X-ray data collection and refinement statistics

Values in parentheses are for the last resolution shell

Parameters	Values	
	Native	SeMet
Data collection statistics	Native	SeMet
Space group	P3 ₂ 12	P3 ₂ 12
Unit cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	37.1, 37.1, 96.6	37.5 37.5, 96.3
α , β , γ angles (degrees)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Resolution range (Å)	48.3-2.2 (2.32-2.20)	48.1-3.0 (3.17-3.00)
No. of reflections	14,444 (1,570)	27,068 (3,681)
No. of unique reflections	3,635 (524)	1,658 (229)
Data completeness (%)	90.9 (90.7)	99.2 (98.5)
R_{sym} (%)	2.3 (22.2)	3.8 (9.5)
I/σ	1.7 (3.4)	12.6 (7.9)
Mn(I)/sd	22.3 (3.8)	53.2 (23.3)
No. of peptides in asymmetric unit	4	4
Wilson B-factor (Å ²)	59.8	84.2

Supplementary Table S4. Percentage Peak Area reported by ANASPEC Inc. using High-performance liquid chromatography (HPLC) for the four Iztli peptides.

Peptide	Peak #	Ret Time (min)	Area [mAU*sec]	Height [mAU]	Area %
IP1	1	12.207	52.042	7.500	1.4917
	2	12.418	3352.167	607.768	96.0871
	3	12.732	84.468	7.431	2.4212
IP2	1	19.78	266.1	13.1	0.9
	2	20.41	2788->	946.1	99.1
IP3	1	24.03	9142.2	1214.7	99.3
	2	24.76	61.1	9.4	0.7
IP4	1	19.16	197.0	6.5	1.6
	2	19.55	1207->	519.3	98.4

Apéndice 2. Artículo sometido a revisión para su publicación en el Journal of Biological Chemistry (JBC)

Cell Penetrating Peptides and Cationic Antibacterial Peptides: two sides of the same coin

Jonathan G. Rodriguez Plaza¹, Rosmarbel Morales-Nava², Christian Diener¹, Gabriele Schreiber³, Zyanya D Gonzalez¹, Maria Teresa Lara Ortiz¹, Ivan Ortega Blake², Omar Pantoja³, Rudolf Volkmer⁴, Edda Klipp⁵, Andreas Herrmann⁵, Gabriel Del Rio^{1,*}

¹ Biochemistry and structural biology department; Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N Ciudad Universitaria, 04510 México D.F, México.

² Materials science and biophysics department; Instituto de Ciencias Físicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad S/N, Col. Chamilpa 62210 Cuernavaca, Morelos, México

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos, México 62250

⁴ Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Hessische Str. 3-4, 10117 Berlin and Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Robert-Roessle Str. 10, 13125 Berlin, Germany

⁵ Theoretische und Molekulare Biophysik, Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstr. 42, 10115 Berlin, Germany.

* Corresponding author: gdelrio@ifc.unam.mx.

Running title: Functional redundancy of CPPs and CAPs

Keywords: cellular membrane, electrophysiology, computational modeling, functional redundancy

Background: Iztli peptides (IP) are a new class of antibacterial peptides that could be internalized by receptor-mediated endocytosis in yeast.

Results: IP-1 penetrates cells independently of endocytosis and makes pores in membranes with large electric potential.

Conclusions: Antibacterial peptides like IP-1 may have the ability to penetrate cells independent of endocytosis.

Significance: Antibacterial peptides with penetrating activity are robust to control bacterial infections.

SUMMARY

Cell penetrating peptides (CPP) and cationic antibacterial peptides (CAP) have similar physicochemical properties and yet, it is not understood how such similar peptides display different activities. To address this question, we used Iztli peptide 1 (IP-1) since it has both CPP and CAP activities. Combining experimental and computational modeling of the internalization of IP-1, we show that this is not internalized by receptor-mediated endocytosis, yet it permeates into many different cell types, including fungi and human cells. We also show that IP-1 makes pores depending on the electrical potential of

the targeted membrane: IP-1 makes pores in the presence of high electrical potential at the membrane, such as those found in bacteria and mitochondria. These results provide the basis to understand the functional redundancy of CPPs and CAPs.

Hunter-killer peptides (HKPs) combine two activities: a ligand peptide (hunter sequence) and a cationic antibacterial peptide (killer sequence) (1). HKPs were designed to selectively induce cell death of target cells; such design is aimed to eliminate undesired tissues in an organism. Indeed, HKPs have been applied successfully to treat cancer (2) and obesity (3) in animal models. The mechanism of action of these peptides proposes that the hunter sequence recognizes a receptor on the cell's surface and upon binding the hunter sequence may be internalized by receptor-mediated endocytosis carrying with it the killer sequence. Inside the cell, the killer sequence targets mitochondria, which share similar structure with bacteria, to destabilize their membrane and ultimately induce apoptosis (4).

The ability to deliver macromolecules inside cells is important both in academic research as well as in biotechnological applications, such as drug delivery and gene therapy (5). Chemical and physical methods

have been developed to deliver cargo molecules inside cells. These methods, *e.g.* electroporation, and cationic lipids/liposomes, have been shown to deliver hydrophobic macromolecules, yet these induce cellular side effects and are limited to *in vitro* applications (6). Cell Penetrating Peptides (CPPs) overcome some of these limitations and HIV-Tat, penetratin, transportan, and octa-arginine among others represent extensively studied CPPs (7). Many CPPs are able to deliver themselves, small cargo and relatively large macromolecules directly across the cellular plasma membrane (8).

Understanding the penetrating mechanism of CPPs is important to controlling the delivery of macromolecules by CPPs. In this sense, HIV-Tat and nona-arginine peptides have been shown to be internalized by endocytosis (9), yet other CPPs use an energy-independent mechanism of internalization (5). Despite such difference common features exist; for instance, most CPPs do not show any cell specificity, are amphipathic and present a net positive charge (10). Relevant to this work is that Cationic Antibacterial Peptides (CAPs), like the ones used in HKPs, are also amphipathic and cationic (11). It is not clear though, how peptides with similar physicochemical features such as CPPs and CAPs can perform two distinct functions: CPPs penetrate eukaryotic cells without any apparent toxicity and CAPs kill bacteria. Given their similar physicochemical properties the explanation to this functional difference may reside in the target cell and not in the peptide itself. If so, CPPs may work as CAPs in the presence of bacterial cells. In agreement with this idea, several CPPs have been shown to have antibacterial activity (12,13). Furthermore, given that CPPs and CAPs act on cellular membranes, it can be assumed that these membranes modulate their functions. In terms of the mechanism of action proposed for the interaction with cellular membranes, CAPs are able to make pores by 'barrel-stave', 'carpet' or 'toroidal-pore' mechanisms (14); such pores ultimately end up killing bacterial cells. On the other hand, CPPs cross eukaryotic cellular membranes without making pores. To the best of our knowledge, there is no evidence that may explain how a cellular membrane may switch a CPP to become a CAP.

We have recently described a new class of HKPs (15): Iztli peptides (IPs). IPs are CAPs that harbor a hunter sequence (see Figure 1). To study the mechanism of action of these peptides,

IPs were designed to target *Saccharomyces cerevisiae* using the alpha-pheromone as the hunter sequence; only mating type A (*MATa*) cells expressing the receptor for the alpha-pheromone (Ste2p) would be killed by the action of IPs. Indeed, four IPs (IP-1, IP-2, IP-3 and IP-4) sharing the same pheromone sequence but differing in 6 residues at the N-terminus were shown to have antibacterial activity, to swell mitochondria, to induce the pheromone response pathway and only *MATa* cells expressing the Ste2p receptor were killed by IPs (15). However, this cannot be taken as evidence for cellular uptake via Ste2p.

In the current work, we study the mechanism of internalization of IP-1 at concentrations required to kill cells. Our results indicate that IP-1 is internalized into many cell types in absence of receptor-mediated endocytosis, yet binding to the receptor is relevant for the killing. We also show that IP-1 form pores only in the presence of high electric potential values. The relevance of our findings is discussed in terms of the biological and biotechnological advantage of multi-functional peptides, such as IPs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and peptides

The strains used in this study were: *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*), *Δdid4::kanMX*, *Δypt7::kanMX*, *Δrvs161::kanMX*, *Δpep5::kanMX*, *Δyck1::kanMX* and *Δyck2::kanMX*; BY4742 (*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) purchased from OpenBiosystems (USA), *Candida glabrata* CGM99 (*Ura3D::Tn903(G418^R)*, Trp 1D) and *Aspergillus nidulans CLK43*; these last two were kindly provided respectively by Dra. Irene Castaño (IPICYT, San Luis Potosi, Mexico) and Dr. Jesus Aguirre Linares (IFC, UNAM, Mexico). See Table 1 for a detailed list of the cell lines used in this study.

For the electrophysiological experiments 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) dissolved in chloroform and powdered cholesterol (chol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and stored in the dark at - 20 °C. Potassium chloride (KCl, ACS grade) and calcium chloride (CaCl₂, ACS grade) were purchased from Merck (Naucalpan, Mexico). All organic solvents were ACS grade and were purchased from J. T. Baker

(Xalostoc, Mexico). Borosilicate glass capillaries were obtained from World Precision Instruments (Sarasota, FL). Praxair (Cuernavaca, México) supplied high-purity nitrogen gas.

The mating pheromone α -factor from *S. cerevisiae* was purchased from Sigma-Aldrich (catalog number T6901). Anaspec, Inc. produced the Iztli peptide 1 (IP-1) and IP labeled with Hilytefluor 488, while TAMRA-IP-1 was synthesized in the group of Dr. Rudolf Volkmer at the hospital Charite, Berlin, Germany. See Table 2 for the sequences of the peptides used in this study.

Measuring the cell death induced by Iztli peptide 1

An early stationary culture for every assay was obtained from a single colony of BY4741 and every endocytosis null-mutant grew overday in YPD medium (yeast extract 1 %, peptone 2 %, glucose 2 %). These cultures were used to inoculate a fresh YPD medium to reach a 0.03 O.D. in a total volume of 200 μ L. BY4741 strain was tested against TAMRA-IP-1 (62.9 μ M) or Hilytefluor 488-IP-1 (26.9 μ M) and every endocytosis null mutant was tested against alpha pheromone (10 μ M) and PI-1 (10 μ M) in a 100 wells honeycomb plate, each containing 200 μ L, incubating at 30° C with shaking using a Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd). The activity of these peptides on each strain was determined by measuring the Optical Density at 600 nm every hour during 24 h.

Modeling the internalization of Iztli peptides

The models were implemented based on the processes depicted in Figures 3A and 3B. The biochemical reactions were assumed to follow mass-action kinetics and resulted in the ordinary differential equations provided below. Model simulations were performed using the LSODA solver and an evolutionary optimization algorithm performed fitting to the measured time course of dead cells. Here, we used the implementations within the modeling software Copasi (<http://www.copasi.org>). For each model only two parameters had to be fitted (denoted as k_E/k_D and k_{In}/k_D in Figure 3A and 3B). The remaining parameters were obtained from previously published measurements.

Models were considered significant when they could reproduce the measured time course significantly better than a zero-intercept linear reference model. Thus, we obtained p-values for the entire time course, or parts of it,

from F-tests comparing the linear model to the fit provided by the optimization of the models. Those analyzes were performed in R (<http://www.r-project.org>).

Endocytosis model

The endocytosis model comprised the reactions from Figure 3A. This resulted in the following set of ordinary differential equations (square brackets denote concentrations, the indices e , m , v , c denote locations in the extracellular medium, the membrane, (pre)vacuole and cytosol, respectively):

$$\begin{aligned} \frac{d[Ste2_m]}{dt} &= k2[Ste2_m Iztli_m] - k1[Ste2_m][Iztli_e] + k5 \\ \frac{d[Ste2_m Iztli_m]}{dt} &= k1[Ste2_m][Iztli_m] - (k2 + k3)[Ste2_m Iztli_m] \\ \frac{d[Ste2_v Iztli_v]}{dt} &= k3[Ste2_m Iztli_m] - (k4 + kE)[Ste2_v Iztli_v] \\ \frac{d[Ste2_v]}{dt} &= kE[Ste2_v Iztli_v] - k4[Ste2_v] \\ \frac{d[Iztli_e]}{dt} &= kE[Ste2_v Iztli_v] - k4[Iztli_e] \end{aligned}$$

The cell volume was chosen as $4.9 \cdot 10^{-15}$ L. Due to the large volume of the extracellular medium, the extracellular concentration of IP-1 was treated as a constant referring to the amount used in the experiments. The number of dead cells, n_D , in the population was expressed by the minimal concentration of IP-1 within the cells in order to kill a cell, k_D , by the formula:

$$n_D = n_{tot} \frac{P_{in}}{k_D}$$

Here, n_{tot} denotes the total number of cells in the population and was obtained by fitting a fourth-order polynomial in time to the C.F.U. measurements of untreated cells. P_{in} denoted the concentration of IP-1 inside the cells which had escaped the (pre)vacuole. All simulations and fits were performed using Copasi (<http://www.copasi.org>).

The parameters k_1 through k_5 were obtained from literature. k_2 was obtained as 10^{-3} s^{-1} from a mean of 3 direct measurements (16-18). k_1 was then calculated from k_2 and the mean k_D for Ste2p binding to α -factor from 9 experiments, resulting in $k_1 = 0.185 \mu M^{-1} s^{-1}$ (18-26). We assumed that dissociation of α -factor from Ste2p has the same kinetics in the (pre)vacuole prior to degradation. The rate of endocytosis of Ste2p in presence of α -factor, k_3 , was derived from the published half-time of 5 minutes as $2.3 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ (27). The degradation rate

of internalized Ste2p, k_4 , was obtained from the half-life of total Ste2p in the presence of α -factor in cycloheximide treated cultures as $5.8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (24). Because α -factor is normally degraded along with Ste2p, we assumed that the degradation rate of IP-1 within the cells happens with the same rate as for Ste2p. The synthesis rate of Ste2p, k_5 , was chosen as $7 \cdot 10^{-5} \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ to counteract the degraded Ste2p after about 90 minutes, as reported earlier (20).

The rate of IP-1 escaping from the endosome, k_E , as well as the lethal IP-1 concentration, k_D , were obtained by fitting the model to the measured time course of dead cells by an evolutionary optimization algorithm. We required the parameter values to stay in biologically reasonable intervals. k_E was required to stay in the range of 0 to 1 s^{-1} and k_D within 0 to $10 \mu\text{M}$. The best fit estimated k_E and k_D as 1 s^{-1} and $0.13 \mu\text{M}$, respectively. One should note that the fit forces the model to realize an almost immediate escape of IP-1 from the vacuole. See Table 3 for a list of parameters and values used in these models.

Direct model

The direct model comprised only an internalization of IP-1, which depends on its affinity for Ste2p as indicated in Figure 3B. The resulting ordinary differential equation is:

$$\frac{d[Iztl_i]}{dt} = k_{In}[Iztl_e] - k_4[Iztl_i]$$

The same assumptions as in the endocytosis model were made and we fitted k_{In} and k_D as before. Here k_D was again bounded between 0 and $10 \mu\text{M}$ and k_{In} was kept between 0 and infinity. The fitted parameters were $k_{In} \approx 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_D \approx 8.9 \mu\text{M}$.

Confocal microscopy of labeled Iztli peptide

For the internalization images presented in this study, *S. cerevisiae* MAT α (BY4741), MAT α (BY4742) cells or *C. glabrata* cells were grown at 30°C for 24 h in synthetic complete (SC) media (yeast nitrogen base w/o amino acids 0.67 %, potassium phosphate monobasic 0.1 %, glucose 2 %, amino acids 0.079 %); afterwards they were diluted to a final optical density of 0.4 at 600 nm and treated with $68.9 \mu\text{M}$ of the TAMRA-IP-1 or $89.9 \mu\text{M}$ of Hilytefluor 488-IP-1 for one hour at 30°C . In the case of *Aspergillus nidulans* these were grown as previously reported (28); briefly, cells were grown in supplemented glucose minimal nitrate medium and 2×10^5 spores were suspended in 2

mL of water and incubated 60 minutes at 37°C at 300 rpm with TAMRA-IP-1 ($13.77 \mu\text{M}$). In every case, $80 \mu\text{L}$ from these samples were centrifuged at 300 rpm for 5 minutes, removed the supernatant and the samples were observed under the confocal microscope (Olympus FluoView FV1000) at 60x amplification. HEK239 and NL20 human cell lines were grown to 80% confluence in DMEM medium supplemented with 2mM GlutaMax, 50 UI/mL penicillin, $50 \mu\text{g/mL}$ streptomycin and 15% fetal bovine serum (FBS) at 30°C and 5% CO_2 . Cells were treated with trypsin and washed twice with PBS and recovered by centrifugation. The pellet was resuspended in Opti-Mem $^\circledast$ to reduce serum fluorescence and 2×10^4 cells were cultured in a Chamber Slide $^\circledast$ system (NUNC $^\circledast$ Lab-Tek $^\circledast$ II-C 2TM) and incubated for an hour to allow the adhesion of cells to the bottom of the slide to form a monolayer. Afterwards HEK239 cells were treated with $13 \mu\text{M}$ and NL20 cells with $24 \mu\text{M}$ TAMRA-tagged Iztli Peptide 1 and visualized using confocal microscopy (Olympus FLUOVIEW FV-1000) at an emission wavelength of 570 nm for different times. For such purpose a CO_2 chamber was used during the analysis. All images were reconstructed using the software FV viewer provided by the manufacturer of the microscope.

Small unilamellar vesicle preparation

POPC and chol were stored at -20°C and used without further purification. Stock chloroform solutions for every lipid were prepared once a week and stored at -20°C . Chol and POPC solutions were mixed to obtain the desired mol fraction of sterol (30 %). Evaporation of the solvent was done in a rotative evaporator (B-177; Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). The suspension was prepared by adding the working solution (5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES [pH 8.0]) to the film deposited in the flask in an N_2 -enriched atmosphere and then treated in an ultrasonic bath to produce dispersion and obtain unilamellar vesicles (29). The suspension was stored for 2 h under refrigeration ($4-6^\circ \text{C}$) prior to the bilayer formation and peptide incorporation

Micropipette fabrication

Glass capillaries with filament (1.00 mm external diameter and 0.58 mm internal diameter) from World Precision Instruments were pulled using the P2000 instrument from Sutter Instruments (Novato, CA). Micropipettes

were then silanized and filled with the same working solution used for the preparation of Small Unilamellar Vesicles (SUV's) and used within the following 60 to 120 min. The average resistance of micropipettes in the working solution was $3.46 \pm 2.80 \text{ G}\Omega$.

Solvent-free tip-dip lipid bilayer formation

The controlled-temperature chamber was electrically insulated within a Faraday cage and suspended in elastic bands to reduce the mechanical vibration. A sample of the SUV's was put in the chamber. The sample was settled for 10 min at the desired temperature, and then a bilayer was formed at the tip of the micropipette by consecutive immersion in SUV's suspension until a capacitive response to the square potential applied was observed (30, 31). The standard seals obtained in this manner were of $\sim 400 \text{ G}\Omega$ with a 2 kHz low pass filter and a current root mean-square (I_{rms}) $\sim 0.12 \text{ pA}$. When the bilayer was formed, the proper amount of Iztli peptide stock solution was added in order to obtain the desired concentration and after the equilibrium conditions, the 5 min experiments were done.

A sample of the SUV was put in a controlled-temperature chamber. The sample was settled for 10 min at the desired temperature, and then a bilayer was formed at the tip of the micropipette by consecutive immersion in SUV suspension until a capacitive response to the square potential applied was observed (30,31). The standard seals obtained in this manner were of $\sim 250 \text{ G}\Omega$ with current root mean-square (I_{rms}) $\sim 0.12 \text{ pA}$ and a 2-kHz low pass filter. At this point, the proper amount of the peptide stock solution was carefully added in order to obtain the desired concentration. The chamber was electrically insulated with a Faraday cage and suspended in elastic bands to reduce the mechanical vibration.

Pore formation of Iztli peptide 1 on artificial membranes

SUVs, micropipettes and solvent-free tip-dip lipid bilayers were prepared as described above. To observe the possible formation of pores in these membranes, the electrical measurements of the current signal were amplified with an Axopatch 200B set to voltage-clamp mode, 2-kHz low pass filter and maximal scaling output; digitally converted with a Digidata 1200A, acquired with the aid of pClamp 8.2 software at a frequency of 10 kHz

(all from Molecular Devices Analytical Technologies, California, USA) and stored in a personal computer. The bilayer seal was measured by applying a square 5-mV step potential. The sampling rate was set to 100 μs . Once the seal was formed, the I_{rms} obtained consistently was $0.12 \pm 0.03 \text{ pA}$. The temperature of the experiments was $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The Iztli peptide was added in solution to have a concentration of 10 μM . The potentials applied in all of the reported experiments were 150 and 200 mV. Care has to be taken in order to be sure that experiments are being done in an equilibrium situation. We determined the average conductance as a function of time and discovered that this property needs 15 – 20 min to attain equilibrium. All records were a posteriori baseline-corrected using a fortran program. The occupancies obtained were defined as the ratio of the time expended in one state to the total time of experiment. The average currents reported correspond to the average value of all points registered in a given time. The average currents reported correspond to an average current in a 5min experiment obtained from an all points histogram. All graphics were done with Grace software, a 2D graph-plotting tool, for Unix-like operating systems.

GO term enrichment estimation

To determine the participation of endocytosis on the killing mediated by IP-1, we analyzed the enrichment of GO terms in the 291 genes known to affect endocytosis (see supplementary Table S1). For this analysis we used as a control set the set of genes in yeast. We used the service provided by GO (http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term_enrichment).

RESULTS

Iztli peptide 1 is not internalized through receptor-mediated endocytosis

Based on the proposed mechanism of action for HKPs (4), it would be expected that the rate of killing yeast cells by IPs would be proportional to the rate of internalization. If so, the reduction or elimination of Ste2p endocytosis may affect the killing by IP-1. To test this, we compared the fractions of dead cells in the absence and presence of IP-1 for 6 strains reported to fail endocytic internalization of Ste2p in *MATa* cells and for wild-type (see Figure 2). Our results show that Ste2p-mediated

endocytosis does not play a role in the killing of *MATa* cells, yet endocytic uptake independent of Ste2p is not discarded. Furthermore, even though Ste2p-mediated endocytosis is discarded, Ste2p signaling is required for the killing of *MATa* by IP-1 (15): null mutants for *STE2* or other critical genes involved in the pheromone signaling cascade in a *MATa* genotype protect against the killing by IP-1; thus binding to Ste2p may play a role in the killing mechanism of action of IP-1.

Thus, to test whether endocytosis might explain the observed kinetics of cell death induced by IPs, we built a kinetic model for internalization of the IPs using the reported rates related to the internalization of the pheromone (32) (see Figure 3A). In this model the number of IPs inside cells depends on the affinity of the pheromone to its receptor (Ste2p or any other with similar affinity), the degradation rate of the pheromone and the endocytosis rate of the pheromone; all those rates have been reported and were used for modeling. On the other hand, the rate of escape from endosomes and the number of IP molecules required to kill cells are not known; these two quantities were estimated by fitting the model to the observed number of dead cells (quantified from the number of colony forming units; see Methods). The adjustment between the observed and calculated values for the number of dead cells is presented in Figure 3C. We observed that the model assuming receptor-mediated endocytosis could not reproduce the observed time course of dead cells, since it predicts a plateau phase due to depletion of free receptors at the membrane by endocytosis; such plateau is not observed in the experimental data ($p > 0.14$, see Figure 3C). In contrast, when we did not consider endocytosis of the peptide, but still binding of IP-1 to Ste2p (see Figure 3B), the model fit could significantly reproduce the number of dead cells over time ($p < 4.2 \times 10^{-3}$, see Figure 3C). These results are in agreement with our observation about a mechanism of internalization different from Ste2p-mediated endocytosis, yet requiring Ste2p binding for killing activity. Note that the use of all-D enantiomers to discard receptor-mediated endocytosis does not apply to the study of IP-1 considering the requirement of Ste2p binding for killing *MATa* cells.

To further analyze the involvement of endocytosis in the killing by IP-1 (beyond receptor-mediated endocytosis), we carried out a genetic screening on 291 out of 441 null mutant

annotated on SGD (<http://www.yeastgenome.org>) to affect endocytosis in yeast (see Supplemental Table S1). Four out of these 291 ORFs (YHR161C, YKL081W, YKL119C, YOR141C) fully protected *MATa* cells from the killing by IP-1 (see Supplemental Table S1). To evaluate if the effect of these four ORFs could implicate the functioning of the core endocytosis machinery for the killing activity of IP-1, we conducted two complementary analyses. First, we identified those mutants with the largest annotated effect on endocytosis (YDR017C, YDR173C, YJL204C, YOR089C, YKL126W; see Supplemental Table S1) and observed that none protected against the killing by IP-1; these results suggest that the core machinery of endocytosis is not participating in the killing by IP-1. Second, we were able to group 30 out of the 291 ORFs by the endocytosis GO term, and noticed that only one of these fully protected against IP-1 killing activity (YHR161C, involved in clathrin cage assembly; see Supplemental Table S1), further supporting that the core machinery of endocytosis does not play a role on the killing of *MATa* by IP-1. Thus, even though four genes related to endocytosis protect against the killing of IP-1, overall endocytosis does not seem to play a role on the killing.

Izli peptides are cell-penetrating peptides

To determine the presence of IP-1 inside cells, the peptide was modified with two different fluorophores: TAMRA and Hilytefluor 488. The last one was based on previous results on the alpha-pheromone (33); note that the use of these two fluorophores was to discard that any possible observed internalization was independent on the specific use of a given fluorophore. Both peptides maintained antifungal activity (see Figure 4A) and were internalized by *MATa* cells (see Figure 4B). While IP-1 fully inhibited the growth of *MATa* cells at 10 μM (15), TAMRA derivate of IP-1 (TAMRA-IP-1) had almost half the activity (MIC=40 μM) of the Hilytefluor 488 derivative (MIC=27 μM). We used the TAMRA derivative for the rest of our studies. *MATa* cells exposed to TAMRA-IP-1 for 15 min showed strong staining of the cell membrane and after 30 min the peptide was also localized inside the cells (see Figures 5A, 5B, 5C and 5D). To evaluate wheter the internalization was dependent on the Ste2p

receptor, the *MAT α* cells were also exposed to this labeled peptide (see Figure 6A). Finally, other fungi (see Figure 6B) and human cells (see Figure 6C) were exposed to the IP-1 and in all cases the peptide was internalized without any observable toxicity (data not shown). These results further support the notion that IP-1 internalization is independent of Ste2p-mediated endocytosis.

***Iztl* peptides make channels at high membrane potentials**

We determined the ability of IP-1 to induce ion transport across lipidic bilayers. For this we considered its action on POPC plus 30% cholesterol artificial membranes. We did not observe any electrical conductance induced by the peptide at 50 or 100 mV (data not shown). Yet at 150 and 200 mV there was observable activity. An example of the varied electrical activity produced by IP-1 can be seen in Figure 7A, where longer lasting transmembrane pores can be seen alongside very short events of varied conductance. They all have, however, well defined conductances as can be seen from the corresponding histogram in Figure 7B.

These results raised the question that even for eukaryotic-like membranes, IP-1 could make pores provided a large electric potential. Plants, like bacteria and mitochondria, maintain a large transmembrane potential due to the action of plasma membrane H⁺ pumps fuelled by ATP (34). IP-1 did not alter the resting membrane potential of soybean roots with low potentials (<100 mV); however, we could not find cells with high potentials (>100 mV) (data not shown).

DISCUSSION

HKPs have been shown to have the potential to treat cancer and obesity among others (1). The basis for their use as therapeutics is their selectivity: only the cells expressing the receptor for the hunter peptide should internalize the killer peptide and consequently only those cells should be eliminated. Even when the results in animal models have shown the effectiveness of these peptides, some toxicity has been reported in other tissues besides those targeted in animals (3,4). This toxicity could be explained considering the presence of the receptor for the hunter peptide in other tissues than the target one. Our results suggest an alternative explanation for the observed toxicity of HKPs. That is, we showed that when a killer

peptide (*e.g.*, IP-1, see Figure 1) present CPP activity (see Figures 4A-C, 5A-D and 6A-C) it may lose the specificity provided by the hunter peptide. Accordingly, we showed that IP-1 is not internalized via receptor-mediated endocytosis (see Figures 2 and 3) or endocytosis at all (see Supplemental Table S1). However, IP-1 is still able to kill *MAT α* cells as long as the pheromone receptor is activated by the peptide (15).

In that sense, some of CPPs (35) by themselves may be expected to work like HKPs; that is, since some CPPs have the ability to display CAP activity, their internalization carries a killer peptide (CAPs) within cells. If so, those CPPs may affect mitochondria function. In agreement with this idea, a recent metabolomic analysis comparing the toxic potential of four CPPs (transportan, penetratin, HIV Tat derived peptide and nona-arginine) showed the toxicity of transportan (36), suggesting the potential CAP activity of transportan. The toxicity was estimated by the effect on cellular redox potential and energy depletion, both related to mitochondria function. In a similar fashion, some CAPs may as well display CPP activity. Indeed, magainin 2 has been shown to translocate across phospholipid bilayers (37).

To study the basis of this redundant function of CPPs and CAPs, we hypothesized that the membrane potential may play a role on switching between these activities. In agreement with this idea, we have previously reported that IPs alter the membrane stability of mitochondria and kill bacteria, but do not affect the viability of mammalian cells (15). Additionally, here we showed that IP-1 is capable of making pores in artificial membranes only when a large electric potential (> 100 mV) is present (see Figures 7A-B). These results are in agreement with recent reports showing that some CPPs in the presence of bacteria switch from a penetrating peptide conformation to a pore-forming peptide capable of killing/swelling cells (12,13). Understanding the mechanism involved in this functional switch may assist in designing non-toxic CPPs.

In that sense, it has been observed that natural antibiotics, peptides and polyenes can form different membrane structures that allow for transmembrane transport, detergent like carpet disruption, pores and tores, independently of other intracellular actions (see for example (38,39)). It is also clear that their activities are strongly dependent on the environmental conditions (40). For example, the dependence on the transmembrane electric potential to form

pores has been observed for polyenes (41) and for Alamethicin (42). Hence, it is not surprising that IP-1 presents this behavior. IP-1 forms transmembrane channels of different conductivity, similar to Amphotericin B (43) and Alamethicin (44), and also detergent like activity, similar to Nystatine (41) and Alamethicin (42). In either case, the environmental conditions can affect helix formation for peptides (39) and/or the aggregation of monomers for polyenes (45). Such situation may prevail for IP-1 and may explain the dual role observed in this study.

Considering the complexity of biological systems (46), our observations about the overlapping roles of CPPs and CAPs represent a special case of functional redundancy. Functional redundancy in genes occurs when one gene has the ability to perform the function of another gene. A common example of such genetic redundancy is found in gene duplications (47). A consequence for a system with these redundant capabilities is the emergence of robustness (48). In the case of antibacterial peptides, it can be appreciated the robustness this redundancy confers to CAPs: by acquiring the ability to get internalized by eukaryotic cells they can become more effective antibiotics by killing bacteria cells residing both at the extracellular and intracellular spaces of eukaryotic cells. Additionally, under certain circumstances some bacteria may reduce their membrane potential (*e.g.* sporulation) thus preventing CAPs to disrupt their membrane (49). In such case, the possibility that CAPs may permeate cellular membranes with low electric potential and act upon an intracellular target may provide an alternative mechanism to maintain their antibiotic activity.

The multi-functionality of CAPs has been recognized as well in the context of neurodegenerative diseases; for instance, the beta-amyloid peptide that is commonly associated to Alzheimer's disease exerts antimicrobial activity against common infectious bacteria (50) and substance P displays features of CAP and has antibacterial activity (11). Yet, neither every peptide involved in neurodegeneration can be expected to have an antibacterial activity (51) nor every CPP may have a CAP activity. Identifying the different functionalities of CAPs may have an impact on hunter-killer peptides design as discussed before or in the etiology of different diseases where peptides (*e.g.*, amyloid, penetrating) may be present, such as in Alzheimer's disease.

Finally, the present work provides an experimental system (IP targeted against *S. cerevisiae*) and mathematical model (see Figure 3 and Methods) that may be useful to further characterize the mechanism of internalization of CPPs and to explore alternatives to control the selectivity of CPPs and HKPs.

In summary, our results show that IP-1, a HKP targeted against *S. cerevisiae*, penetrates cells in an endocytosis independent fashion, providing a new way to explain the observed toxicity of HKPs. Additionally, our results show that CAP activity may be tailored to act as CPP by large membrane potentials. These results provide the basis to explain the biological relevance of the observed functional redundancy of some cationic antibacterial peptides and cell-penetrating peptides as well as to emphasize the relevance to improve on the classification of antimicrobial peptides.

REFERENCES

1. Ellerby, H. M., Bredesen, D. E., Fujimura, S., and John, V. (2008) Hunter-killer peptide (HKP) for targeted therapy. *Journal of medicinal chemistry* **51**, 5887-5892
2. Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (2002) Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1527-1531
3. Kolonin, M. G., Saha, P. K., Chan, L., Pasqualini, R., and Arap, W. (2004) Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nature medicine* **10**, 625-632
4. Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G. D., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., and Pasqualini, R. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature medicine* **5**, 1032-1038

5. Vives, E. (2005) Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?". *J Control Release* **109**, 77-85
6. Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G., and Heitz, F. (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1839-1849
7. Jones, A. T., and Sayers, E. J. (2012) Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *J Control Release* **161**, 582-591
8. Pooga, M., and Langel, U. (2005) Synthesis of cell-penetrating peptides for cargo delivery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **298**, 77-89
9. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **8**, 848-866
10. Zorko, M., and Langel, U. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 529-545
11. del Rio, G., Castro-Obregon, S., Rao, R., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E. (2001) APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS letters* **494**, 213-219
12. Li, L., Shi, Y., Su, G., and Le, G. (2012) Selectivity for and destruction of Salmonella typhimurium via a membrane damage mechanism of a cell-penetrating peptide ppTG20 analogue. *International journal of antimicrobial agents*
13. Nan, Y. H., Park, I. S., Hahm, K. S., and Shin, S. Y. (2011) Antimicrobial activity, bactericidal mechanism and LPS-neutralizing activity of the cell-penetrating peptide pVEC and its analogs. *J Pept Sci* **17**, 812-817
14. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews* **3**, 238-250
15. Rodríguez Plaza JG, V. R. A., Herrera S, Garza-Ramos G, Torres Larios A, Amero C, Zarraga Grandos G, Gutierrez Aguilar M, Lara Ortiz MT, Polanco Gonzalez C, Uribe Carvajal S, Coria R, Peña Díaz A, Bredesen DE, Castro-Obregon S, del Rio G. (2012) Moonlighting Peptides with Emerging Function. *PloS one* **7**
16. Raths, S. K., Naider, F., and Becker, J. M. (1988) Peptide analogues compete with the binding of alpha-factor to its receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **263**, 17333-17341
17. Jenness, D. D., Burkholder, A. C., and Hartwell, L. H. (1983) Binding of alpha-factor pheromone to yeast a cells: chemical and genetic evidence for an alpha-factor receptor. *Cell* **35**, 521-529
18. Bajaj, A., Celic, A., Ding, F. X., Naider, F., Becker, J. M., and Dumont, M. E. (2004) A fluorescent alpha-factor analogue exhibits multiple steps on binding to its G protein coupled receptor in yeast. *Biochemistry* **43**, 13564-13578
19. Blumer, K. J., Reneke, J. E., and Thorner, J. (1988) The STE2 gene product is the ligand-binding component of the alpha-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **263**, 10836-10842
20. Jenness, D. D., and Spatrack, P. (1986) Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *S. cerevisiae*. *Cell* **46**, 345-353
21. Dube, P., and Konopka, J. B. (1998) Identification of a polar region in transmembrane domain 6 that regulates the function of the G protein-coupled alpha-factor receptor. *Molecular and cellular biology* **18**, 7205-7215
22. David, N. E., Gee, M., Andersen, B., Naider, F., Thorner, J., and Stevens, R. C. (1997) Expression and purification of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor

- receptor (Ste2p), a 7-transmembrane-segment G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**, 15553-15561
23. Dosil, M., Schandel, K. A., Gupta, E., Jenness, D. D., and Konopka, J. B. (2000) The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Molecular and cellular biology* **20**, 5321-5329
 24. Chen, Q., and Konopka, J. B. (1996) Regulation of the G-protein-coupled alpha-factor pheromone receptor by phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **16**, 247-257
 25. Lee, B. K., Khare, S., Naider, F., and Becker, J. M. (2001) Identification of residues of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein-coupled receptor contributing to alpha-factor pheromone binding. *The Journal of biological chemistry* **276**, 37950-37961
 26. Weiner, J. L., Gutierrez-Steil, C., and Blumer, K. J. (1993) Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *The Journal of biological chemistry* **268**, 8070-8077
 27. Hicke, L., Zanolari, B., and Riezman, H. (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *The Journal of cell biology* **141**, 349-358
 28. Soid-Raggi, G., Sanchez, O., and Aguirre, J. (2006) TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **59**, 854-869
 29. Paternostre, M., Ollivon, M., and Bolard, J. (1996) Preparation and membrane protein reconstitution. in *Manual on membrane lipids* (E, P. ed.), Springer, Berlin. pp
 30. Coronado, R., and Latorre, R. (1983) Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. *Biophysical journal* **43**, 231-236
 31. Suarez-Isla, B. A., Wan, K., Lindstrom, J., and Montal, M. (1983) Single-channel recordings from purified acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipets. *Biochemistry* **22**, 2319-2323
 32. Ty Thomson, K. B., Jim Faeder, Ilya Sytchev, Drew Endy. (2012) YeastPheromoneModel. http://yeastpheromonemodel.org/wiki/Main_Page. Accessed August 2012.
 33. Toshima, J. Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A. C., King, D. S., and Drubin, D. G. (2006) Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5793-5798
 34. Palmgren, M. G. (2001) PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 817-845
 35. Henriques, S. T., Melo, M. N., and Castanho, M. A. (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *The Biochemical journal* **399**, 1-7
 36. Kilk, K., Mahlapuu, R., Soomets, U., and Langel, U. (2009) Analysis of in vitro toxicity of five cell-penetrating peptides by metabolic profiling. *Toxicology* **265**, 87-95
 37. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1995) Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* **34**, 6521-6526
 38. Cohen, B. E. (2010) Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *The Journal of membrane biology* **238**, 1-20

39. Morgera, F., Vaccari, L., Antcheva, N., Scaini, D., Pacor, S., and Tossi, A. (2009) Primate cathelicidin orthologues display different structures and membrane interactions. *The Biochemical journal* **417**, 727-735
40. Gonzalez-Damian, J., and Ortega-Blake, I. (2010) Effect of membrane structure on the action of polyenes II: nystatin activity along the phase diagram of ergosterol- and cholesterol-containing POPC membranes. *The Journal of membrane biology* **237**, 41-49
41. Recamier, K. S., Hernandez-Gomez, A., Gonzalez-Damian, J., and Ortega-Blake, I. (2010) Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. *The Journal of membrane biology* **237**, 31-40
42. Mak, D. O., and Webb, W. W. (1995) Two classes of alamethicin transmembrane channels: molecular models from single-channel properties. *Biophysical journal* **69**, 2323-2336
43. Venegas, B., Gonzalez-Damian, J., Celis, H., and Ortega-Blake, I. (2003) Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature. *Biophysical journal* **85**, 2323-2332
44. Harriss, L. M., Cronin, B., Thompson, J. R., and Wallace, M. I. (2011) Imaging multiple conductance states in an alamethicin pore. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 14507-14509
45. Huang, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., and Wang, E. (2002) Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical journal* **83**, 3245-3255
46. Oltvai, Z. N., and Barabasi, A. L. (2002) Systems biology. Life's complexity pyramid. *Science (New York, N.Y)* **298**, 763-764
47. Birchler, J. A., and Veitia, R. A. (2012) Gene balance hypothesis: Connecting issues of dosage sensitivity across biological disciplines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
48. Kafri, R., Springer, M., and Pilpel, Y. (2009) Genetic redundancy: new tricks for old genes. *Cell* **136**, 389-392
49. McBride, S. M., and Sonenshein, A. L. (2011) The dlt operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, England)* **157**, 1457-1465
50. Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., and Moir, R. D. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS one* **5**, e9505
51. Kagan, B. L., Jang, H., Capone, R., Teran Arce, F., Ramachandran, S., Lal, R., and Nussinov, R. (2013) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Molecular pharmaceutics* **9**, 708-717

Acknowledgement- We thank the technical support from the IT core facility and the microscopy core facility at the Institute of Cellular Physiology/UNAM, Mexico. We also thank Biol. Olivia Sánchez and Dr. Jesus Aguirre at the Institute of Cellular Physiology/UNAM, Mexico for providing the materials and expertise to perform the experiments with *Aspergillus nidulans*.

FOOTNOTES

This work was supported in part by the Alexander von Humboldt Foundation, CONACyT (82308) and PAPIIT (IN205911) to GDR.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Iztli peptide 1. Embedding the alpha-pheromone sequence into a cationic antibacterial peptide sequence. Note that the residues added to the alpha-pheromone (bold letters) do not present any antibacterial or antifungal activity and were added to the pheromone to match the physicochemical properties of cationic antibacterial peptides (11).

Figure 2. Cell death effect of six null mutants preventing internalization of Ste2p. Six strains carrying gene null mutants (YKL002W, YML001W, YCR009C, YMR231W, YHR135C, YNL154C) reported to reduce the internalization of Ste2p were compared in their ability to affect the killing by IP-1 with the wild-type strain (BY4741). The figure presents the area under the growth curves (summation of OD₆₀₀ values recorded every hour is presented as percentage) of these six mutants plus the wild-type strain in the presence (ORF name+IP-1; gray bars) and in absence (ORF name; black bars) of IP-1. The figures present the average data obtained from 4 independent experiments; the lines on top of each bar represent the standard deviation calculated for each data set. The optical density was followed in the Synergy MX plate-reader (BioTek) incubated at 30 C.

Figure 3. Models for Iztli peptides internalization on yeast cells. (A) The model assuming an endocytic import of Iztli peptide via Ste2p (X denotes degradation). (B) The model assuming permeation of Iztli peptide where the peptide may cross the membrane independent of Ste2p. (C) Comparison of the two models fitted to the measured C.F.U. time course of dead cells (n=8, bars denote standard deviation). The model assuming direct import generally performed better, noticeable for early time points.

Figure 4. Analysis of two fluorogenic derivatives of Iztli peptide 1. The antifungal activity (A) and the ability to get internalized by *Saccharomyces cerevisiae* MAT α cells (B) are shown for the TAMRA-IP-1 (left side, red) and Hilytefluor 488-IP-1 (right side, green). The change in cell density over time is presented in the presence (black symbols) or in the absence of these peptides (white symbols): squares TAMRA-IP-1, triangles Hilytefluor 488-IP-1. Scale bars in B) are 5 μ m.

Figure 5. Time dependent internalization of Iztli peptide 1 in yeast cells. TAMRA-IP1 was used to follow the internalization of the peptide in MAT α cells. The sites where the peptide is found near or within cells appear as red dots. Scale bars are 5 μ m.

Figure 6. Iztli peptide 1 gets internalized by different cell types. *Saccharomyces cerevisiae* MAT α cells (A), *Candida glabrata* (left in panel B), *Aspergillus nidulans* (right in panel B), HEK239 (left in Panel C) and NL20 (right in Panel C) human cells were exposed to TAMRA-IP-1 (colored red) to test for its internalization.

Figure 7. Iztli peptide 1 makes pores. A) Example of a 5 minutes record of electrical activity for IP-1 in POPC membrane with 30% mol cholesterol in a transmembrane electric potential of 200 mV. The inset corresponds to a 10 sec section showing an example of pores formed. B) All points histogram of current through the membrane of the full record in A). Each point corresponds to a 100 μ s sampling.

TABLES
Table 1. Cell lines

Organism	Strain	ORF	Genotype	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks
		YKL002W	<i>MATa Adid4</i>	
		YML001W	<i>MATa Δypt7</i>	
		YCR009C	<i>MATa Δrvs161</i>	
		YMR231W	<i>MATa Δpep5</i>	
		YHR135C	<i>MATa Δyck1</i>	
	Endocytosis null mutants (see supplemental Table S1)	<i>MATa Δgene::kanMX</i>		
	BY4742	YNL154C	<i>MATa Δyck2</i>	Open Biosystems YKO MATa Strain Collection-Glycerol Stocks
<i>Candida glabrata</i>	CGM99	WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Domergue R. et al. Science. (2005) May 6;308(5723). Pp:866-70.
<i>Aspergillus nidulans</i>	CLK43	WT	<i>Ura3D::Tn903(G418^R), Trp 1D</i>	Kawasaki L, et al. Mol Microbiol. 2002 Aug;45(4):1153-63.
		WT	<i>pabaA1 yA2; veA1</i>	

Table 2. Synthetic peptides

Name	Sequence	Measured molecular weight (g/mol)
α-pheromone	NH ₂ -WHWLQLKPGQPMY-COOH	1684
IP-1	NH ₂ -KFLNRFHWLQLKPGQPMY-COOH	2490.8
TAMRA-IP-1	TAMRA- KFLNRFHWLQLKPGQPMY-COOH	2903.2
Hilytefluor 488-IP-1	NH ₂ -KFLNRFHWLQLK(GGG-CO-(CH ₂) ₅ -S-maleimido Hilytefluor488)-PGQPMY-COOH	3335.4

Table 3. Data for modeling MATa killing by IP-1 dependent on cellular internalization

Model	Parameter	Value
Endocytosis/Direct	Cell volume	4.9x10 ⁻¹⁵ l
Endocytosis/Direct	k_I	0.185μM ⁻¹ s ⁻¹
Endocytosis/Direct	K_2	10 ⁻³ s ⁻¹
Endocytosis/Direct	K_3	2.3x10 ⁻³ s ⁻¹
Endocytosis/Direct	K_4	5.8x10 ⁻⁴ s ⁻¹
Endocytosis/Direct	K_5	7x10 ⁻⁵ μMs ⁻¹
Endocytosis	k_D	0.13μM
Endocytosis	k_E	1s ⁻¹
Direct	k_{In}	2.5x10 ⁻⁴ s ⁻¹
Direct	k_D	8.9μM

Added Residues α -pheromone from *Saccharomyces cerevisiae*



Figure 1. Iztli peptide 1. Embedding the alpha-pheromone sequence into a cationic antibacterial peptide sequence. Note that the residues added to the alpha-pheromone (bold letters) do not present any antibacterial or antifungal activity and were added to the pheromone to match the physicochemical properties of cationic antibacterial peptides (11).

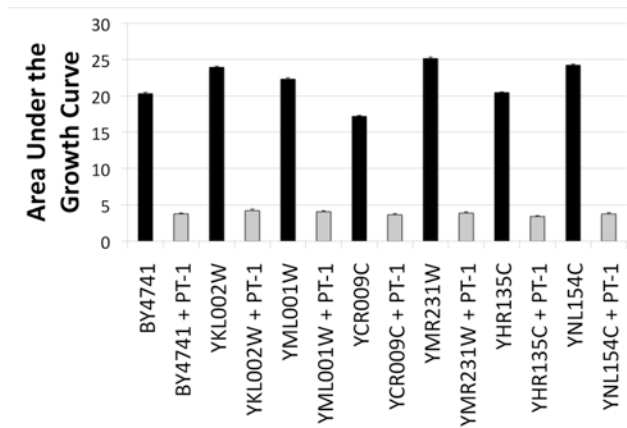


Figure 2. Cell death effect of six null mutants preventing internalization of Ste2p. Six strains carrying gene null mutants (YKL002W, YML001W, YCR009C, YMR231W, YHR135C, YNL154C) reported to reduce the internalization of Ste2p were compared in their ability to affect the killing by IP-1 with the wild-type strain (BY4741). The figure presents the area under the growth curves (summation of OD₆₀₀ values recorded every hour is presented as percentage) of these six mutants plus the wild-type strain in the presence (ORF name+IP-1; gray bars) and in absence (ORF name; black bars) of IP-1. The figures present the average data obtained from 4 independent experiments; the lines on top of each bar represent the standard deviation calculated for each data set. The optical density was followed in the Synergy MX plate-reader (BioTek) incubated at 30 C.

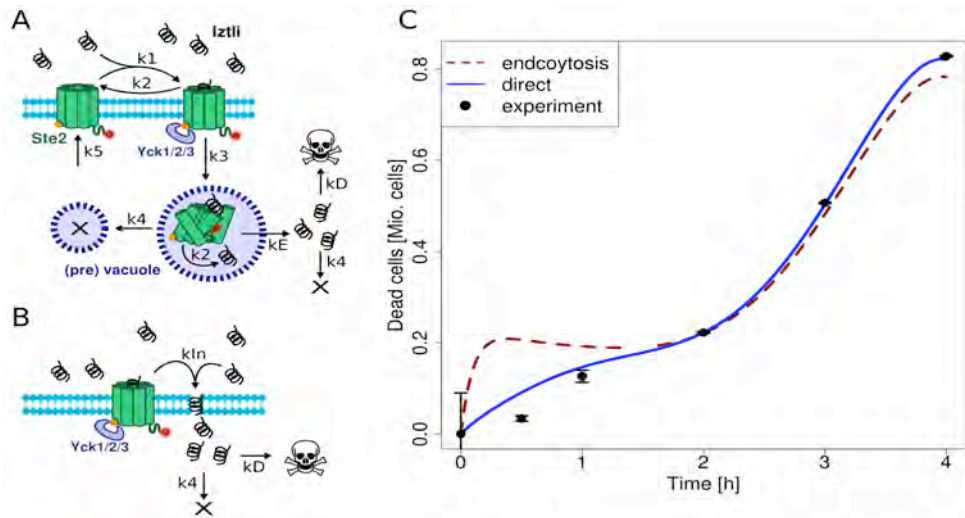


Figure 3. Models for Iztli peptides internalization on yeast cells. (A) The model assuming an endocytic import of Iztli peptide via Ste2p (X denotes degradation). (B) The model assuming permeation of Iztli peptide where the peptide may cross the membrane independent of Ste2p. (C) Comparison of the two models fitted to the measured C.F.U. time course of dead cells ($n=8$, bars denote standard deviation). The model assuming direct import generally performed better, noticeable for early time points.

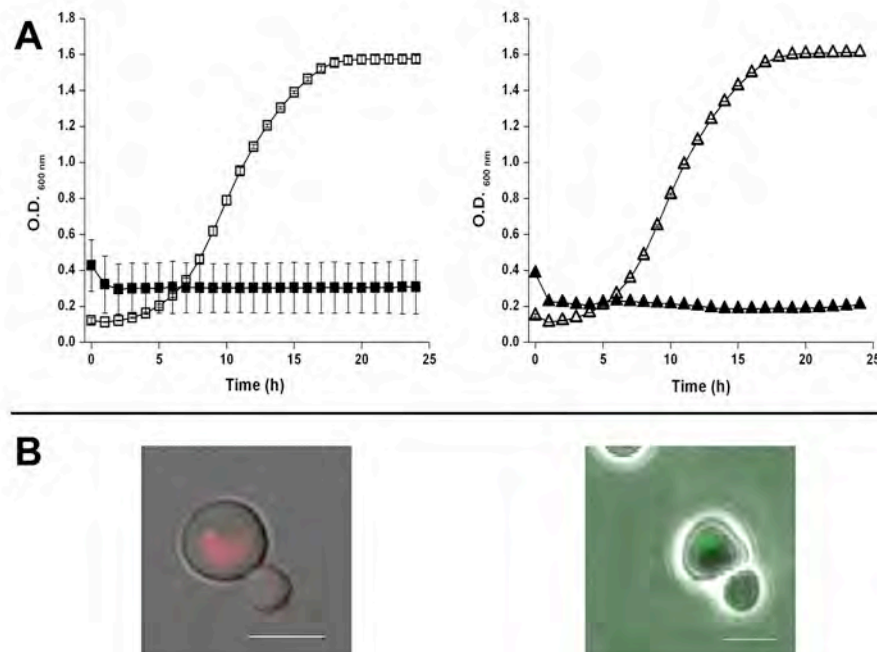


Figure 4. Analysis of two fluorogenic derivatives of Iztli peptide 1. The antifungal activity (A) and the ability to get internalized by *Saccharomyces cerevisiae* MATa cells (B) are shown for the TAMRA-IP-1 (left side, red) and Hilytefluor 488-IP-1 (right side, green). The change in cell density over time is presented in the presence (black symbols) or in the absence of these peptides (white symbols): squares TAMRA-IP-1, triangles Hilytefluor 488-IP-1. Scale bars in B) are 5 μm .

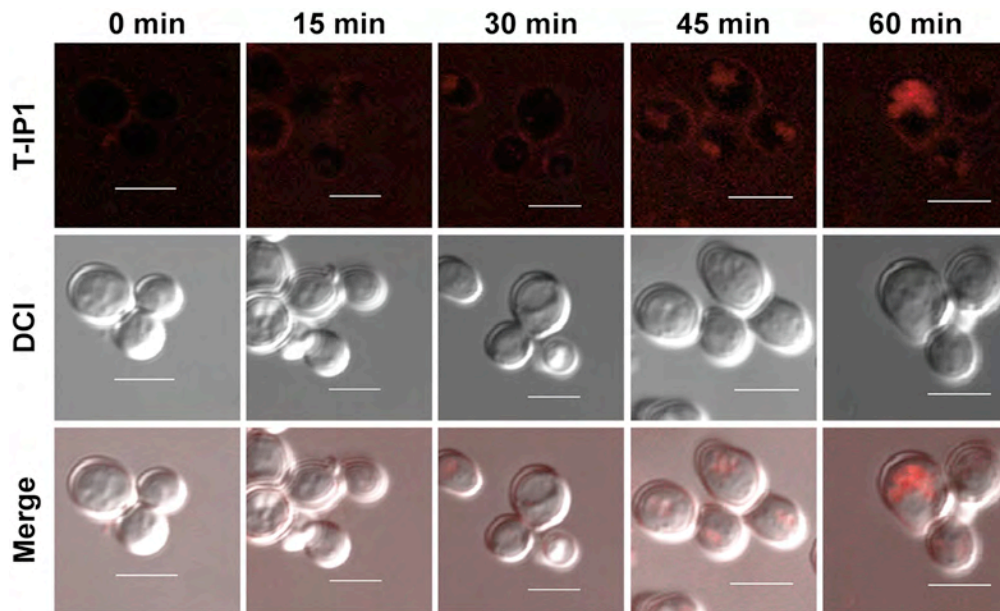


Figure 5. Time dependent internalization of Iztli peptide 1 in yeast cells. TAMRA-IP1 was used to follow the internalization of the peptide in *MATa* cells. The sites where the peptide is found near or within cells appear as red dots. Scale bars are 5 μ m.

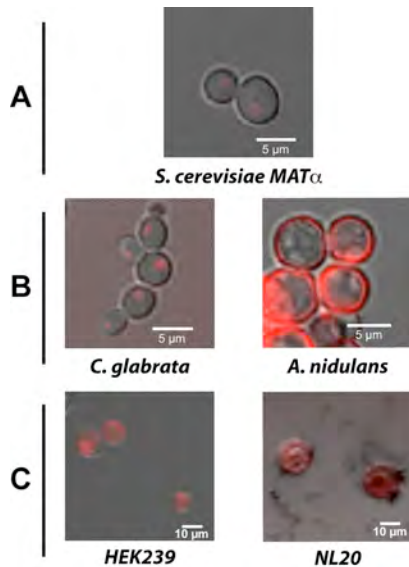


Figure 6. Iztli peptide 1 gets internalized by different cell types. *Saccharomyces cerevisiae* *MATa* cells (A), *Candida glabrata* (left in panel B), *Aspergillus nidulans* (right in panel B), HEK239 (left in Panel C) and NL20 (right in Panel C) human cells were exposed to TAMRA-IP-1 (colored red) to test for its internalization.

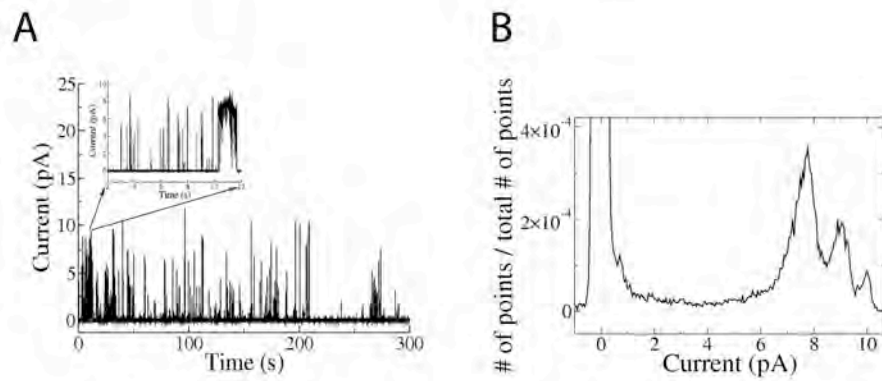


Figure 7. Iztli peptide 1 makes pores. A) Example of a 5 minutes record of electrical activity for IP-1 in POPC membrane with 30% mol cholesterol in a transmembrane electric potential of 200 mV. The inset corresponds to a 10 sec section showing an example of pores formed. B) All points histogram of current through the membrane of the full record in A). Each point corresponds to a 100 μ s sampling.

Apéndice 3. Patente

Dentro de los logros llevados a cabo durante el doctorado, se encuentra presentación ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la solicitud de patente titulada "Péptidos con actividad antibacteriana y antiparasitaria y diseño de los mismos " el día 21 de junio de 2012, a la cual se le designó el número MX/a/2012/007260, ver documento anexo en la siguiente pagina. Actualmente la UNAM se encuentra en proceso de promoción de la patente ante diversas empresas farmacéuticas o biotecnológicas para la generación de convenios de explotación y desarrollo de la misma.



Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI.

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisinal de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Sello
Folio de entrada
Fecha y hora de recepción

Solicitud
Expediente: MX/a/2012/007260
Fecha: 21/JUN/2012 Hora: 12:38
Folio: MX/E/2012/046878 275364



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
2) Nacionalidad (es): MEXICANA
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.
4) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): GABRIEL DEL RÍO GUERRA Y JONATHAN GABRIEL RODRIGUEZ PLAZA.
7) Nacionalidad (es): MEXICANA Y MEXICANA
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: ABRAHAM ZEPEDA NO. 27, COLONIA BELLAVISTA, C.P. 62130
Población, Estado y País: CUERNAVACA, MORELOS
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ R.G.P. DDAJ-14782
13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL 14) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): 56 65 46 44
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. LAURA CORTÉS SÁNCHEZ, LIC. YESICA MARIBEL CORONEL RIVERA, LIC. ROGIO JUÁREZ VÁZQUEZ

17) Denominación o Título de la Invención: "PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIPARASITARIA Y DISEÑO DE LOS MISMOS"

18) Fecha de divulgación previa: Día Mes Año
19) Clasificación Internacional: uso exclusivo del IMPI

20) Divisinal de la solicitud: Número Figura jurídica
21) Fecha de presentación: Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada: País Día Mes Año No. de serie

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
X	1 Comprobante de pago de la tarifa	X	2 Documento de cesión de derechos
X	34 Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
X	7 Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
X	1 Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
X	1 Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		46	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CD. UNIVERSITARIA, D.F. A 19 DE JUNIO DE 2012
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

11 REFERENCIAS

Abel, M. G., Y. L. Zhang, H. F. Lu, F. Naider and J. M. Becker (1998). "Structure-function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone using alanine-scanned analogs." J Pept Res **52**(2): 95-106.

Anderson, H. W. (1917). "Yeast-Like Fungi of the Human Intestinal Tract." The Journal of Infectious Diseases **21**(4): 341-386.

Arap, W., W. Haedicke, M. Bernasconi, R. Kain, D. Rajotte, S. Krajewski, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini and E. Ruoslahti (2002). "Targeting the prostate for destruction through a vascular address." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1527-1531.

Arkowitz, R. A. (2009). "Chemical gradients and chemotropism in yeast." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(2): a001958.

Bagnat, M. and K. Simons (2002). "Cell surface polarization during yeast mating." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14183-14188.

Balzan, R., K. Sapienza, D. R. Galea, N. Vassallo, H. Frey and W. H. Bannister (2004). "Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source." Microbiology **150**(Pt 1): 109-115.

Bardwell, L. (2004). "A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway." Peptides **25**(9): 1465-1476.

Bardwell, L. (2005). "A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway." Peptides **26**(2): 339-350.

Cunningham, C. W., A. Mukhopadhyay, G. H. Lushington, B. S. Blagg, T. E. Prisinzano and J. P. Krise (2010). "Uptake, distribution and diffusivity of reactive fluorophores in cells: implications toward target identification." Mol Pharm **7**(4): 1301-1310.

del Rio, G., S. Castro-Obregon, R. Rao, H. M. Ellerby and D. E. Bredesen (2001). "APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide." FEBS Lett **494**(3): 213-219.

Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson and B. P. Cormack (2005). "Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI." Science **308**(5723): 866-870.

- Dyer, P. S., M. Paoletti and D. B. Archer (2003). "Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*." Microbiology **149**(Pt 9): 2301-2303.
- 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 and R. Pasqualini (1999). "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides." Nat Med **5**(9): 1032-1038.
- Ellerby, H. M., D. E. Bredesen, S. Fujimura and V. John (2008). "Hunter-killer peptide (HKP) for targeted therapy." J Med Chem **51**(19): 5887-5892.
- Feldmann, H. (2005). "Yeast Molecular Biology: A Short Compendium on Basic Features and Novel Aspects." Adolf-Butenandt-Institute University of Munich.
- Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier and B. Purnelle (1998). "The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **440**(3): 325-331.
- Gerlag, D. M., E. Borges, P. P. Tak, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini, E. Ruoslahti and G. S. Firestein (2001). "Suppression of murine collagen-induced arthritis by targeted apoptosis of synovial neovasculature." Arthritis Res **3**(6): 357-361.
- Goldring, E. S., L. I. Grossman, D. Krupnick, D. R. Cryer and J. Marmur (1970). "The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide." J Mol Biol **52**(2): 323-335.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." J Biol Chem **177**(2): 751-766.
- Greenhalf, W., C. Stephan and B. Chaudhuri (1996). "Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **380**(1-2): 169-175.
- Herskowitz, I. (1988). "Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Rev **52**(4): 536-553.
- Hohmann, S. (2002). "Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts." Microbiol Mol Biol Rev **66**(2): 300-372.
- Javadpour, M. M., M. M. Juban, W. C. Lo, S. M. Bishop, J. B. Albery, S. M. Cowell, C. L. Becker and M. L. McLaughlin (1996). "De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity." J Med Chem **39**(16): 3107-3113.

- Jeffery, C. J. (1999). "Moonlighting proteins." Trends Biochem Sci **24**(1): 8-11.
- Jeffery, C. J. (2003). "Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks." Trends Genet **19**(8): 415-417.
- Jeffery, C. J. (2004). "Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins." Curr Opin Struct Biol **14**(6): 663-668.
- Kawasaki, L., O. Sanchez, K. Shiozaki and J. Aguirre (2002). "SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **45**(4): 1153-1163.
- Kolonin, M. G., P. K. Saha, L. Chan, R. Pasqualini and W. Arap (2004). "Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue." Nat Med **10**(6): 625-632.
- Ligr, M., F. Madeo, E. Fröhlich, W. Hilt, K.-U. Fröhlich and D. H. Wolf (1998). "Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast." FEBS Letters **438**(1-2): 61-65.
- Logothetis, S., G. Walker and T. Nerantzis Elias (2007). "Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability." Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke **2007**(113): 271-284.
- Madeo, F., E. Frohlich and K. U. Frohlich (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." J Cell Biol **139**(3): 729-734.
- Madeo, F., E. Frohlich, M. Ligr, M. Grey, S. J. Sigrist, D. H. Wolf and K. U. Frohlich (1999). "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast." J Cell Biol **145**(4): 757-767.
- Manon, S., X. Roucou, M. Guérin, M. Rigoulet and B. Guérin (1998). "Minireview: Characterization of the Yeast Mitochondria Unselective Channel: A Counterpart to the Mammalian Permeability Transition Pore?" Journal of Bioenergetics and Biomembranes **30**(5): 419-429.
- Merlini, L., O. Dudin and S. G. Martin (2013). "Mate and fuse: how yeast cells do it." Open Biol **3**(3): 130008.
- Milletti, F. (2012). "Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape." Drug Discov Today **17**(15-16): 850-860.

Muller, H., C. Hennequin, J. Gallaud, B. Dujon and C. Fairhead (2008). "The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types." Eukaryot Cell **7**(5): 848-858.

Munoz, V. and 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): 275-296.

Naider, F. and 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): 1441-1463.

Pena, A., M. Z. Pina, E. Escamilla and E. Pina (1977). "A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria." FEBS Lett **80**(1): 209-213.

Rea, A. M., V. Thurston and M. S. Searle (2009). "Mechanism of ligand-induced folding of a natively unfolded helixless variant of rabbit I-BABP." Biochemistry **48**(31): 7556-7564.

Rodriguez Plaza, J. G. (2009). Caracterización de la actividad y estructura de los péptidos troyanos. Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodriguez Plaza, J. G., A. Villalon Rojas, S. Herrera, G. Garza-Ramos, A. Torres Larios, C. Amero, G. Zarraga Granados, M. Gutierrez Aguilar, M. T. Lara Ortiz, C. Polanco Gonzalez, S. Uribe Carvajal, R. Coria, A. Pena Diaz, D. E. Bredesen, S. Castro-Obregon and G. del Rio (2012). "Moonlighting peptides with emerging function." PLoS One **7**(7): e40125.

Schandel, K. A. and D. D. Jenness (1994). "Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor." Mol Cell Biol **14**(11): 7245-7255.

Slessareva, J. E., S. M. Routt, B. Temple, V. A. Bankaitis and H. G. Dohlman (2006). "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome." Cell **126**(1): 191-203.

Tompa, P., C. Szasz and L. Buday (2005). "Structural disorder throws new light on moonlighting." Trends Biochem Sci **30**(9): 484-489.

Toshima, J. Y., J. Toshima, M. Kaksonen, A. C. Martin, D. S. King and 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): 5793-5798.

Trabulo, S., A. L. Cardoso, A. M. Cardoso, C. M. Morais, A. S. Jurado and M. C. Pedroso de Lima (2013). "Cell-penetrating peptides as nucleic acid delivery systems: from biophysics to biological applications." Curr Pharm Des **19**(16): 2895-2923.

Uribe-Carvajal, S., L. A. Luevano-Martinez, S. Guerrero-Castillo, A. Cabrera-Orefice, N. A. Corona-de-la-Pena and M. Gutierrez-Aguilar (2011). "Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain." Mitochondrion **11**(3): 382-390.

Wong, S., M. A. Fares, W. Zimmermann, G. Butler and K. H. Wolfe (2003). "Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*." Genome Biol **4**(2): R10.