



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio genético del mecanismo de muerte inducido por el péptido Iztli-1 en  
*Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Paula Martinell García

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Gabriel del Río Guerra  
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Martha Robles Flores  
Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. noviembre de 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Gabriel del Río Guerra, adscrito al departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular (IFC).

El trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del financiamiento de una beca de maestría proporcionado en el periodo agosto 2012 – agosto 2014.

Una parte de los reactivos y del equipo utilizado en este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de los proyectos IN205911 e IN208014.

Agradezco al posgrado de ciencias bioquímicas de la UNAM por las oportunidades y facilidades otorgadas a sus estudiantes y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por su ayuda para la asistencia al congreso “3rd Conference on Metabolomics and Systems Biology” realizado en San Antonio TX, EUA del 24 al 26 de marzo de 2014. De igual manera agradezco al IFC que me dio todas las facilidades para poder llevar a cabo el trabajo necesario para realizar el presente trabajo.

También agradezco a todos los integrantes del grupo de trabajo del que formé parte (Laboratorio 205-OTE del IFC) por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto, en especial al Dr. Gabriel del Río Guerra por su asesoría y a la Dra. María Teresa Lara Ortiz por el apoyo técnico.

Agradezco al grupo de la Dra. Soledad Funes, del IFC, por las cepas y los consejos técnicos que me proporcionaron y al Dr. Horacio Reyes del Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría por la ayuda que me brindó para realizar ensayos con proteínas.

A mis papás que siempre me han apoyado e incentivado; a mi hermano Víctor que es la persona más importante en mi vida, a Karen y a Kota por ser personas con las que siempre he podido contar en todos los ámbitos y por todas las experiencias que hemos vivido; e, igualmente, a Lalo, Chuy, Marena y Adriana por su valiosa amistad.

## Lista de abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (G-Protein Coupled Receptor)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MAT <sub>a</sub>	Levadura con locus A de apareamiento ( <i>Mating type a</i> )
MAT <sub>α</sub>	Levadura con locus α de apareamiento ( <i>Mating type α</i> )
MEK	Cinasa de MAPK (MAPK Extracelular signal-regulated Kinase)
MEKK	Cinasa de MEK (MAPK Extracelular signal-regulated Kinase Kinase)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEG	Polietilenglicol
PI	péptido Iztli
PI-1	péptido Iztli-1
YPD	Medio de cultivo completo para levadura (Yeast extract/ Peptone/ Dextrose)

## Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1 La feromona $\alpha$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.2 El diseño de los péptidos Iztli	11
2.3 Antecedentes	13
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Metodología	20
6.1. Ensayos de crecimiento	20
6.2. Análisis estadístico	22
6.3. Construcción de mutantes	22
6.4. Transformación de levadura	23
6.5. Verificación de mutaciones	24
6.6. Electroforesis en gel de agarosa	26
6.7. Aislamiento de DNA genómico de levadura	26
7. Resultados y Discusión	27
7.1. Ensayos de crecimiento con mutantes simples	27
7.2. Verificación de mutaciones por PCR	34
7.3. Formulación de segunda hipótesis	35
7.4. Evaluación de mutantes dobles	37
7.5. Verificación de mutaciones de las mutantes dobles	40
7.6. Evaluación de elementos de la vía del crecimiento filamentoso	41
7.7. Verificación de mutaciones (crecimiento filamentoso)	42
7.8. Propuesta de un mecanismo de acción del PI-1	43

8. Conclusiones y Perspectivas	48
9. Referencias	49
10. Anexo	59

## 1. Resumen

Los péptidos sintéticos Iztli (PI) se diseñaron con el objetivo de crear un péptido antimicrobiano que combinara en un mismo dominio la función de feromona  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* y actividad antibacteriana capaz de ocasionar daño mitocondrial. En teoría, cuando los PI se expusieran a *Saccharomyces cerevisiae*; se internalizarían mediante la interacción de la secuencia de la feromona  $\alpha$  con su receptor y matarían a la levadura debido al daño mitocondrial. Sin embargo, se ha observado que los PI, a pesar de conservar la actividad de la feromona y la actividad antibacteriana, producen la muerte en células *MATa* de *S. cerevisiae* mediante una vía independiente al arresto respiratorio o a la apoptosis desencadenada por el daño mitocondrial. Es decir, la inducción de muerte de *S. cerevisiae* es una propiedad emergente de los PI (una propiedad que no se debe a la suma de los efectos de sus componentes).

Algunos de los genes de resistencia a la acción fungicida del PI-1 (péptido Iztli-1) han sido identificados de manera preliminar en trabajos previos a éste, entre estos están incluidos genes de autofagia y genes del ciclo celular. En este trabajo verificamos que la mayoría de estos genes no confiere en realidad resistencia a la acción del PI-1 e identificamos otros genes que si la confieren. Dentro del segundo grupo se encuentran genes de la vía de las MAPK desencadenada por la feromona, éstos presentan diferencias entre el grado de resistencia a la acción fungicida del PI-1 y el grado de resistencia de la respuesta de la feromona  $\alpha$ . Esto indica que el mecanismo desencadenado por el PI-1 que lleva a la muerte de la levadura es distinto a la vía de señalización inducida por la feromona  $\alpha$ . Los resultados del presente trabajo sugieren que el PI-1 no sólo requiere de la activación de los efectores reportados para la vía de la feromona  $\alpha$  para lograr la muerte de la levadura sino también de otra vía activada por las cinasas Fus3 y Kss1. Nuestros resultados descartan diversos mecanismos que se pensaba podían explicar la actividad emergente del PI-1 revelando la complejidad de la acción de este péptido y se propone un modelo de las interacciones genéticas que pueden estar activando el mecanismo de inducción de muerte del PI-1.

## 2. Introducción

El creciente interés que se ha adquirido recientemente en el estudio de sistemas complejos se centra en entender las “propiedades emergentes” como una aproximación para describir las características de dichos sistemas. El concepto de “propiedades emergentes” puede ser descrito de manera general como aquellos fenómenos cuyas propiedades no pueden ser explicadas a partir de la suma de las características de sus componentes de menor complejidad (Corning, 2002; Waldrop, 1992). Un ejemplo es el lenguaje: la combinación de letras y/o sonidos individuales da lugar a un sistema de comunicación con un significado distinto y más complejo que el de sus componentes. Debido a que una propiedad emergente de un sistema biológico no puede ser descrita por el comportamiento de cada uno de sus componentes, es necesario abordar el problema con estrategias alternas a las de la bioquímica tradicional para poder entenderlo y predecirlo. En ese sentido, los modelos matemáticos han demostrado ser de gran utilidad para simular sistemas complejos y explicar sus propiedades emergentes (Maini, 2004), permitiendo de esta manera evaluar el conocimiento previo sobre el sistema modelado (Mast *et al.*, 2014). Existe una amplia gama de sistemas biológicos cuyas propiedades caen dentro de la categoría de “emergentes”; ejemplos de estos incluyen la estructura de una biomolécula hasta el funcionamiento de un ecosistema (Bhalla e Iyengar, 1999; Corning, 2002).

El objeto de estudio del presente trabajo es un péptido sintético en el que se combinan dos funciones en un mismo dominio. La molécula conserva ambas funciones y además adquiere funciones adicionales que no pueden ser explicadas por la combinación de las dos primeras; se puede asegurar entonces que el péptido presenta propiedades emergentes (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012). Resulta interesante estudiar a fondo estas propiedades por dos razones: 1) para entender los mecanismos que permiten que la combinación de dos funciones generen otras nuevas y 2) para encontrar las aplicaciones que las propiedades emergentes puedan tener para controlar determinados procesos celulares.

### 2.1 *La feromona $\alpha$ de Saccharomyces cerevisiae*

El organismo que se ha utilizado para estudiar las propiedades del péptido previamente mencionado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras son

organismos que tienen la posibilidad de vivir con una sola copia de su genoma (haploides) o con dos copias (diploides). El genoma cuenta con un locus llamado *MAT* (“*mating type*”) que es el responsable de definir los dos tipos celulares haploides (*MAT $\alpha$*  o *MAT $\alpha$* ) que existen en estos organismos (Herskowitz, 1983; Strathern *et al.*, 1981). Si dos levaduras de tipos opuestos se aparean, se da lugar a una célula diploide, la cual tiene silenciados los genes de ambos loci *MAT* (Herskowitz, 1983; Winge y Roberts, 1949). Posteriormente, la célula diploide deberá dividirse mediante meiosis para formar cuatro células haploides que podrán reiniciar el ciclo. Para que la unión de dos levaduras haploides del tipo opuesto se lleve a cabo es necesaria la secreción y reconocimiento de feromonas por parte de ambas células. Una vez secretadas al medio extracelular son detectadas por las células del tipo opuesto mediante receptores membranales específicos para la feromona contraria a su tipo de acoplamiento: las células tipo *MAT $\alpha$*  tienen un receptor llamado Ste2 cuyo ligando es la feromona  $\alpha$  (Blumer *et al.*, 1988), mientras que el receptor de las células *MAT $\alpha$*  se denomina Ste3 y es específico para la feromona  $\alpha$  (Hagen *et al.*, 1986). Los receptores Ste2 y Ste3 pertenecen a la familia de receptores compuestos por siete dominios transmembranales y acoplados en el lado citosólico a una proteína G heterotrimérica (Burkholder y Hartwell, 1985; Hagen *et al.*, 1986). En el momento en el que la feromona se une a su receptor de membrana, se activa una cascada de señalización que modifica la expresión genética en la célula mediante factores de transcripción, que promueven el apareamiento de las levaduras (Kurjan, 1992; Sprague y Thorner, 1992).

La vía de señalización de la feromona (Figura 1) involucra al receptor GPCR Ste2 el cual está unido del lado citosólico a una proteína G heterotrimérica; la unión de la feromona  $\alpha$  al receptor Ste2 permite el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, lo cual provoca el desacoplamiento de la subunidad  $\alpha$  (Gpa1) de las subunidades  $\beta$  (Ste4) y  $\gamma$  (Ste18) (Blumer y Thorner, 1990; Herskovitz, 1995). Posteriormente, la subunidad  $\beta\gamma$  liberada recluta a tres proteínas efectoras que son la proteína cinasa de andamiaje Ste5 unida a Ste11, la proteína cinasa Ste20 y el complejo Far1-Cdc24 (Bardwell, 2005; Dowell *et al.*, 1998; Leeuw *et al.*, 1998). Ste50 es una proteína adaptadora que une a Cdc42, a Ste20 y a Ste11 para modular la transducción de la señal (Ramezani-Rad, 2003). La activación de Ste20 causada por Cdc42 conlleva a la reorganización del citoesqueleto de actina para formar la proyección celular llamada “shmoo”, necesaria para que se realice la unión de ambas células (Pruyne y Bretscher,

2000; Holly y Blumer, 1999). Además, la proteína de andamiaje Ste5 se asocia en complejo con Ste11 (MEKK), Ste7 (MEK) y Fus3 (MAPK) para facilitar su interacción (Choi *et al.*, 1994; Pryciak y Huntress, 1998). Ste20 es responsable de activar a Ste11 (Wu *et al.*, 1995) que a su vez activa a Ste7 (Neiman y Herskowitz, 1994), esta última activa entonces a Fus3 y a otra MAPK llamada Kss1 (Errede *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995). Ambas MAPK inhiben la represión del factor de transcripción Ste12 (Bardwell, 2005; Elion *et al.*, 1993) que induce la expresión de genes relacionados con el apareamiento; estos genes regulan por retroalimentación positiva (*STE2, FUS3, FAR1*) o negativa (*SST2, MSG5, GPA1*) la respuesta a la feromona (Enserink y Kolodner, 2010). Far1 es un inhibidor de proteínas cinasas dependientes de ciclinas que al ser fosforilado por Fus3 pasa a su estado activo (Elion *et al.*, 1993) y se une a Cdk1 (también conocido como Cdc28) evitando la unión de este último con las ciclinas Cln1, Cln2 y Cln3 y evitando la progresión del ciclo celular; de esta manera se provoca el arresto de las células en la fase G<sub>1</sub> (Li *et al.*, 2007; Peter y Herskowitz, 1994). Existe evidencia de que Far1 también puede establecer uniones fuertes con las ciclinas Cln1 y Cln2 tras la estimulación de las células con feromona  $\alpha$  (Peter *et al.*, 1993; Tyers y Futcher, 1993). Kss1 también es capaz de activar a Far1 pero tiene una afinidad aproximadamente 10 veces menor que Fus3 por Far1 (Breitkreutz *et al.*, 2001). De hecho, la ausencia de Kss1 no previene el arresto de las células expuestas a la feromona, en contraste con la ausencia de Fus3 que sí impide el arresto (Peter *et al.* 1993).

La subunidad  $\alpha$  de la proteína G (Gpa1) unida al receptor Ste2 regula negativamente la cascada de señalización iniciada por las subunidad  $\beta\gamma$  mediante el retención de Fus3 y mediante la reconstitución del complejo inactivo de la proteína G heterotrimérica (Blackwell *et al.*, 2003; Dohlman y Thorner, 1997). También se ha observado que algunos factores activados por Gpa1 contribuyen positivamente a la señalización de la feromona que incluyen la unión de Bem1 al endosoma (Guo *et al.*, 2003; Slessareva *et al.*, 2006).

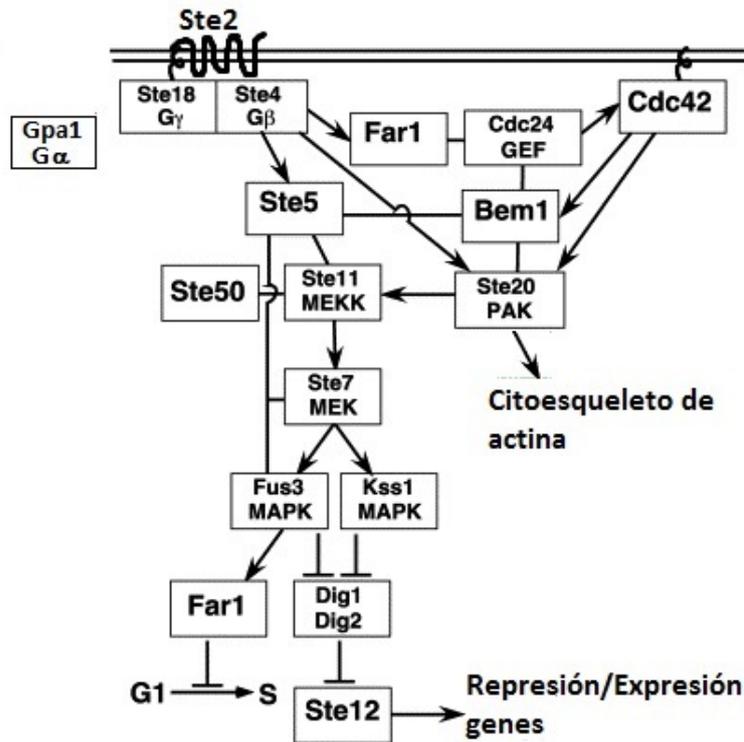


Figura 1. Cascada de señalización inducida por la unión de la feromona  $\alpha$  al receptor Ste2 (Modificada de Bardwell, 2005)

## 2.2 Diseño de los péptidos Iztli

La feromona  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó para diseñar una molécula tipo *hunter-killer* (HK) contra esta levadura. El objetivo de los péptidos HK es inducir la muerte de una célula blanco mediante la internalización de la molécula a través de un receptor específico (Arap *et al.* 1998). El péptido “*hunter*” tiene la propiedad de unirse específicamente a un receptor de la célula a la que se internalizará; el péptido “*killer*” es catiónico y antibacteriano, lo cual le permite, una vez internalizado, dirigirse a la mitocondria y alterar la integridad de su membrana, lo cual conduce a la muerte de la célula (Arap *et al.* 1998; Ellerby *et al.*, 2008; Plesniak *et al.*, 2004).

La feromona  $\alpha$  posee características apropiadas para construir una molécula HK porque es un péptido pequeño que consta de 13 residuos de aminoácidos (WHWLQLKPGQPMY) (Stötzler *et al.*, 1976), al momento de establecer la unión con su receptor induce la internalización del complejo receptor-feromona (Schandel y

Jenness, 1994) y se tiene un vasto conocimiento de las vías de señalización activadas por la feromona que crean un fenotipo distinguible (Clark y Sprague, 1989; Herskovitz, 1995; Kurjan, 1992).

Las moléculas HK que se diseñaron a partir de la feromona  $\alpha$  recibieron el nombre de péptidos Iztli (PI) (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012) (ver Tabla1 del Anexo). Los 13 residuos de aminoácidos que corresponden a la feromona componen a la sección “*hunter*”, pues reconocen específicamente a las células *MATa* de *S. cerevisiae* mediante su unión al receptor Ste2. Al extremo amino de esta secuencia le fueron adicionados 6 residuos de aminoácidos para generar un péptido con actividad antibacteriana y con la habilidad de dañar a las mitocondrias de las células blanco después de ser internalizado (debido a la similitud en la composición membranal que existe entre bacterias y mitocondrias). De esta forma, se incluye la actividad de feromona dentro de un péptido con actividad antibacteriana. Es decir, los 6 residuos de aminoácidos adicionados no poseen por si solos actividad antibacteriana, pero si los 19 residuos del PI (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012). Cuando las células de *S. cerevisiae* del tipo *MATa* son expuestas a los PI se ven obligadas a realizar respiración fermentativa a causa del arresto respiratorio provocado por el péptido y dentro de un lapso de tiempo de 30 a 120 min después de la exposición al péptido mueren. Sin embargo, se ha observado que el arresto respiratorio no es la causa de la muerte de la levadura y tampoco hay inducción de apoptosis como consecuencia del daño mitocondrial (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012).

Estos resultados indican que los PI inducen un fenotipo (muerte celular) que no es consecuencia directa de las dos actividades que se combinan en ellos (actividad anti-mitocondrial y actividad de feromona). En ese sentido, los PI son un buen modelo para estudiar las propiedades emergentes en sistemas biológicos. Sin embargo, no se cuenta con un marco teórico que permita interpretar correctamente los datos fenotípicos derivados de las propiedades emergentes, por lo tanto, se requiere acumular diferentes evidencias teóricas y experimentales que ayuden a interpretar estos datos (Mast *et al.*, 2014). Para abordar este problema nuestro grupo ha iniciado diferentes estudios destinados a elucidar el mecanismo de acción de estos péptidos Iztli que se resumen a continuación. Este trabajo forma parte de estos estudios.

### 2.3 Antecedentes

Tras realizar ensayos con 4 distintas versiones sintetizadas de péptidos Iztli ( ver Tabla 1 del Anexo), se determinó que el péptido Iztli-1 (PI-1) (KFLNRFHWLQLKPGQPMY) induce la muerte de las células *MATa* de *S. cerevisiae* de manera más eficiente que el resto (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012). Los estudios con el PI-1 han mostrado que la molécula induce en las células *MATa* modificaciones celulares características de la respuesta a la feromona  $\alpha$  incluyendo la morfológica de “*shmoo*”. La figura 2 muestra que la proteína citosólica Fus1, que se caracteriza por sobreexpresarse y concentrarse en la punta de la morfología denominada “*shmoo*” cuando las células son expuestas a la feromona, también se localiza de la misma manera en las células tratadas con PI-1, sugiriendo que la respuesta al PI-1 involucra elementos de señalización similares a los que participan en la respuesta a la feromona.

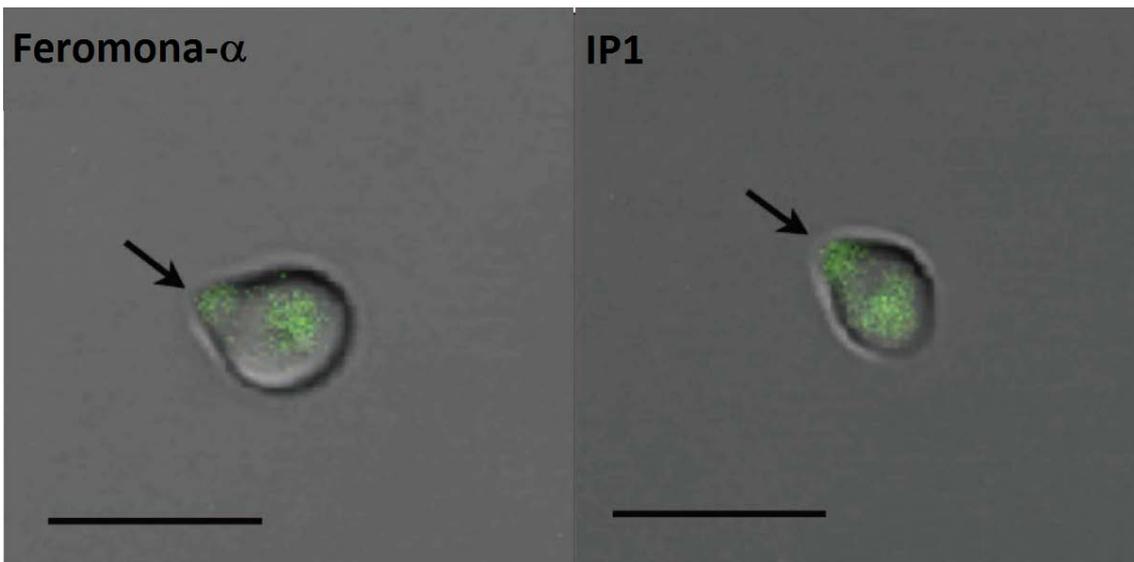


Figura 2. Formación de “*shmoo*” y localización de Fus1-GFP en esta estructura en las células expuestas a feromona  $\alpha$  y a PI. La línea de la escala mide 5 $\mu$ m. (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012)

En la Figura 3 se muestran resultados no publicados de Jonathan Gabriel Rodríguez Plaza, en la que se puede observar que cuando las células *MATa* de *S. cerevisiae* son incubadas en presencia del fragmento de 6 aminoácidos (KFLNRF), que junto con el péptido de la feromona  $\alpha$  forma el PI-1, la tasa de crecimiento de las levaduras es igual a las células incubadas en medio de cultivo y agua (Control). Cuando el mismo tipo de células se crecen en presencia de los dos componentes del PI-1 por

separado (feromona  $\alpha$  (WHWLQLKPGQPMY) y fragmento de 6 aminoácidos (KFLNRF)) a concentraciones equimolares, se observa un crecimiento igual al de las células expuestas únicamente a medio de cultivo con feromona  $\alpha$ , mientras que su crecimiento se ve impedido cuando se incuban en presencia del PI-1. Esto muestra que la propiedad fungicida del PI-1 está dada por la interacción de la secuencia de la feromona  $\alpha$  y de los 6 aminoácidos en un mismo dominio.

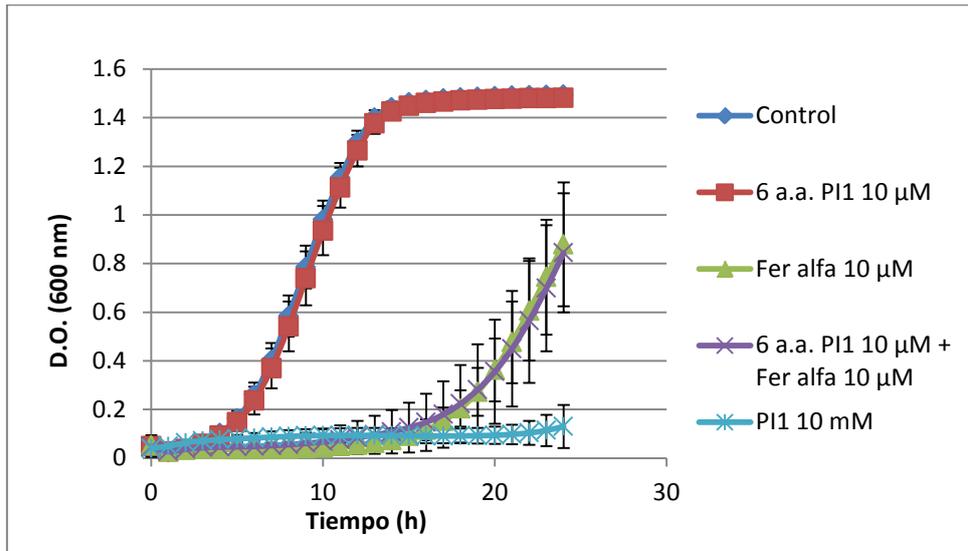


Figura 3. Curvas de crecimiento de células *MATa* de *S. cerevisiae* en presencia de la feromona  $\alpha$ , del fragmento de 6 aminoácidos (KFLNRF) y de ambos péptidos.

Previamente se mencionó que el establecimiento de la unión de la feromona de *S. cerevisiae* a su receptor membranal estimula la internalización del complejo feromona-receptor mediante endocitosis; dicho complejo tiene como destino final la membrana vacuolar (Schandel y Jenness, 1994). Cuando levaduras del tipo *MATa* son expuestas al PI-1, la molécula se localiza en el interior de la célula y se concentra en la vacuola. Sin embargo, cuando las células del tipo *MAT $\alpha$* , que carecen del receptor Ste2, son expuestas al PI-1 la localización de dicho péptido también es en la vacuola (Figura 4). Esto sugiere que la internalización del PI-1 no requiere al receptor de la feromona para llevarse a cabo (Rodríguez Plaza *et al.*, 2014). A pesar de que Ste2 no se requiere para que el PI-1 se internalice, ensayos de viabilidad celular han mostrado que células *MATa* que carecen del gen *STE2* sobreviven cuando son expuestas al PI-1; de igual manera células que no poseen el gen *STE4* (gen que codifica para subunidad  $\beta$  de la proteína G acoplada a Ste2) son inmunes al efecto de muerte del PI-1 (Rodríguez Plaza

*et al.*, 2012). Estos experimentos sugieren que la activación de la vía de señalización de la feromona  $\alpha$  se requiere para inducir la muerte de la levadura.

Se ha reportado que concentraciones altas de la feromona  $\alpha$  ( $>50 \mu\text{M}$ ) provocan la muerte de aproximadamente el 30% de la población de células de *S. cerevisiae* (Severin y Hymann, 2002; Zahng *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando el PI-1 se agrega a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  la población total de células muere, lo cual sugiere que el PI-1 está provocando la muerte de las células mediante un mecanismo distinto que la feromona  $\alpha$ .

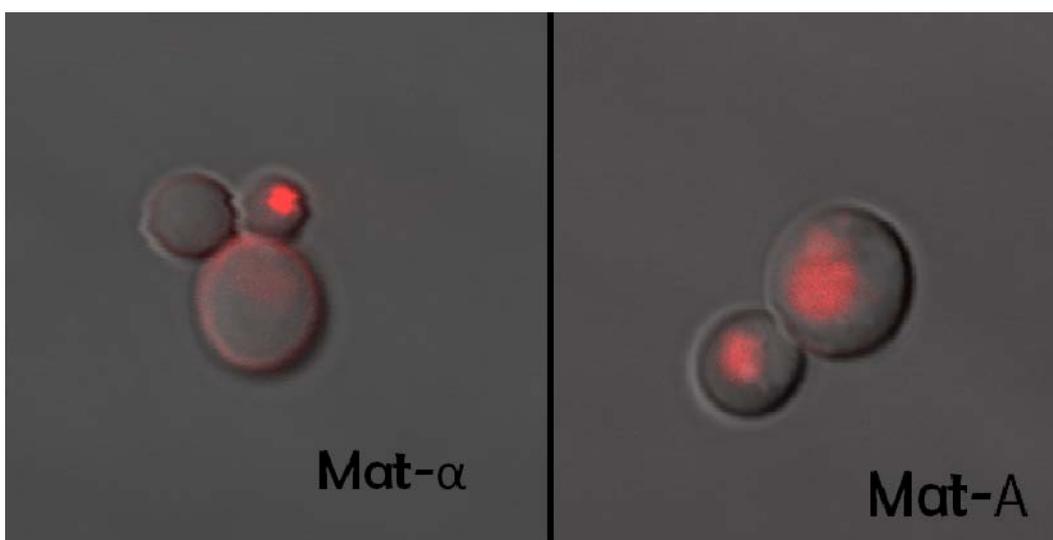


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal tomadas 1h después de exponer a células *MAT $\alpha$*  y *MAT $\alpha$*  al péptido Iztli marcado con TAMRA (rojo). Se puede observar la internalización del péptido en ambas cepas (Rodríguez Plaza *et al.*, 2014).

Para obtener más información sobre el mecanismo mediante el cual el péptido provoca la muerte de *S. cerevisiae* se realizaron ensayos para identificar los genes que son necesarios para que las células mueran. La estrategia experimental fue realizar pruebas de crecimiento en mutantes con deleciones genéticas simples expuestas a feromona  $\alpha$  y al PI-1 y analizar las diferencias en su tasa de crecimiento a lo largo de 24h. Se ensayaron 3744 mutantes distintas y se obtuvo una lista de 575 genes cuya ausencia previene la muerte inducida por el PI-1 (Resultados no publicados de la tesis de Zyanya Daniela González Sandoval).

Dentro de los de genes cuya ausencia protege de la muerte a las levaduras expuestas al PI-1 se identificaron algunos directamente relacionados con autofagia (*ATG3*, *ATG11*, *ATG20*, *VTC1*, *NVJ1*, *UTH1*, *PEP4*, *PEP12*, *IRS4*, *GEA1*, *VPS54*, *SMY1*) y otros relacionados con el control del ciclo celular (*KAR4*, *RME1*, *CLB1*,

*REC104, SSN8, HUG1, STE50, STE20, STE4, FAR1, HSL1, MRC1, MAD1, HHT1, IBD2, BNI1, CNB1*) (Resultados no publicados de la tesis de Zyanya Daniela González Sandoval). Dentro de la lista de genes que controlan en ciclo celular se encuentran algunos que pertenecen a la vía de señalización de la feromona (*STE50, STE20, STE4, FAR1, BNI1*) los cuales son necesarios para que lleve a cabo correctamente el detenimiento del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>.

De acuerdo a la lista de las mutantes que son insensibles a la muerte provocada por PI-1, capta el interés *Far1*. Esta proteína en su forma activa es la causante de detener el ciclo celular de la levadura tras la estimulación con feromona (Figura 1). Por lo tanto, la resistencia de la mutante *far1Δ* al PI-1 sugiere que la condición de arresto celular en la fase G<sub>1</sub> es un evento necesario para que la muerte celular ocurra. Para probar esta hipótesis se indujo el detenimiento del ciclo celular en células *MATα* mediante una vía independiente del receptor *Ste3*. Se sabe que cuando las células de levadura se exponen a altas concentraciones de sales detienen su ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> como una respuesta adaptativa al estrés hiperosmótico y que la ausencia del gen *HOG1* alarga la duración del arresto (Saito y Posas, 2012). Por lo tanto, el experimento se realizó con células *MATα hog1Δ*, las cuales se mantuvieron en una solución 0.4M de NaCl y a las 33h se agregó el PI-1. Como resultado el conteo de la población de células *MATα* disminuyó significativamente con respecto al control (Figura 5) (Resultados no publicados de la tesis de Zyanya Daniela González Sandoval). Por otro lado, se realizaron ensayos de crecimiento con levaduras *MATα* que se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento y que, a causa de escasez de nutrientes, están arrestadas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular; cuando estas levaduras se exponen al PI-1 no se detecta una disminución de la densidad celular a lo largo del tiempo con respecto al control (Resultados no publicados de la tesis de Erika Pelaez Coyotl). Los resultados de los experimentos mencionados hacen suponer que no cualquier vía que conduzca al arresto celular va a causar muerte, sólo el arresto ocasionado por determinadas vías de señalización va a hacer a las células sensibles a la muerte inducida por el PI-1.

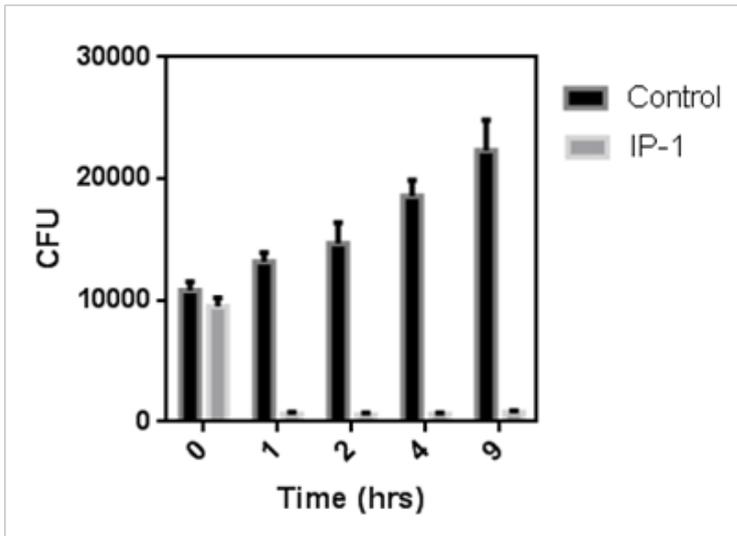


Figura 5. CFUs de células *MATα* arrestadas en el ciclo celular a causa de estrés hiperosmótico, expuestas al péptido Iztli (IP-1) y sin el péptido Iztli (Control).

Como se mencionó anteriormente, un conjunto de genes cuya ausencia protege a las células del PI-1 se caracteriza por estar directamente relacionado con la autofagia, por lo tanto, es posible que este proceso también forme parte del mecanismo de muerte de la levadura. La autofagia es un proceso altamente conservado en los eucariontes que les permite sobrevivir a algunas condiciones estresantes como la falta de nutrientes o el daño irreparable de un organelo, pero también ocurre bajo condiciones normales a un nivel basal para mantener la homeostasis celular (Jan y Kiel, 2010). Fundamentalmente consiste en el transporte de porciones celulares a la vacuola en levaduras (o a lisosomas en mamíferos) para su degradación en componentes más simples que podrán ser reciclados para sintetizar elementos esenciales para la célula. El mecanismo de degradación puede variar dependiendo de los elementos que vayan a reciclarse y de las señales que activen el proceso. A grandes rasgos se puede hacer la distinción morfológica y molecular entre macro y microautofagia, estos tipos de autofagia pueden presentar a su vez una selectividad alta del elemento a degradar o una selectividad reducida (Jan y Kiel, 2010; Kraft *et al.*, 2009). Cabe destacar que la mayoría de los genes autofágicos cuya ausencia protege del PI-1 están relacionados en la levadura con autofagia de selectividad alta (*ATG3*, *ATG11*, *ATG20*, *VPS54*) y con microautofagia (*NVJ1*, *UTH1*, *VTCl*) (Krick *et al.*, 2009; May *et al.*, 2012; Uttenweiler *et al.*, 2007).

En resumen, los antecedentes de este trabajo de tesis sugieren que el arresto del ciclo celular y la autofagia son dos mecanismos moleculares relevantes para la inducción de muerte en células *MATα* de *S. cerevisiae*. Debido a que ninguno de estos

dos mecanismos por sí solo induce muerte celular se puede pensar que su interacción es la que da como resultado la propiedad emergente del PI-1 que conduce a la célula a la muerte, o que alguno de los dos mecanismos no participa realmente en la inducción de muerte. Para evaluar estas opciones, en este trabajo se verificó el efecto de la ausencia de los genes involucrados en autofagia y ciclo celular que preliminarmente se había visto que proveen resistencia a la acción fungicida del PI-1 en la levadura.

### 3. Justificación

Las propiedades de un sistema celular son el resultado de las complejas interacciones entre sus componentes. Estas propiedades tienen comportamientos que no pueden ser entendidos por la suma de sus partes, por lo tanto, para poder comprender la manera en que se generan las propiedades emergentes en los sistemas celulares no basta con tener información sobre los componentes, además se necesita adquirir información sobre el comportamiento del sistema completo (Bhalla e Iyengar, 1999; Corning, 2002). Con el avance en la investigación en biología de sistemas se han logrado comprender diversos mecanismos generadores de propiedades emergentes celulares, los cuáles han demostrado ser útiles para explicar varios fenómenos que operan bajo los mismos principios; sin embargo, aún existen otros fenómenos cuya operación no ha podido ser entendida del todo (Mast *et al.*, 2014). La principal motivación de este trabajo es la elucidación del mecanismo que subyace a la propiedad emergente del PI-1 (muerte celular) mediante un enfoque genético. El esclarecimiento de este mecanismo puede dar las bases para entender otros fenómenos que tengan un comportamiento similar y para ampliar el conocimiento sobre el surgimiento de propiedades emergentes en sistemas moleculares.

Por otro lado, el detenimiento del ciclo celular y la autofagia son dos procesos que parecen ser un requisito para que *S. cerevisiae* muera. Ambos procesos están altamente conservados en eucariontes (Dyczkowski J y Vingron M, 2005; Enserink y Kolodner, 2010; Yorimitsu y Klionsky, 2005). Esto hace pensar que es posible que el PI-1 tenga la capacidad de inducir muerte en otros tipos celulares mediante la alteración de la autofagia y de la detención del ciclo celular. Si así fuera, el PI-1 sería un péptido asesino selectivo cuyo blanco serían células que se encuentren en el estadio G<sub>1</sub> del ciclo celular y en las que el péptido pudiera inducir autofagia. Comúnmente la autofagia se

asocia a vías de supervivencia celular o de alargamiento de vida, tal es el caso de las células cancerígenas (Madeo *et al.*, 2010; Rubinsztein *et al.*, 2011). Si la autofagia inducida por el PI-1 fuera un factor que conduce a la muerte sería una aproximación interesante para estrategias anticancerígenas.

Si se descubriera que el PI-1 requiere de la inducción de arresto celular y de un segundo evento para provocar muerte, entonces ambas condiciones podrían ser inducidas de manera específica en una población celular para convertir a dichas células en un blanco selectivo del PI-1. La inducción del arresto celular en células cancerígenas combinado con otra condición celular que de mayor especificidad ya ha sido abordada como posible estrategia terapéutica (Jin *et al.*, 2002).

Finalmente, en el contexto de las células bacterianas, se sabe que estos organismos pueden presentar una resistencia a los antibióticos que inhiben la síntesis de DNA deteniendo su ciclo celular y manteniéndose arrestados indefinidamente (Kohanski *et al.*, 2010). En estos casos el PI-1 podría ser utilizado para eliminar a las células microbianas arrestadas.

#### 4. Hipótesis

El mecanismo de muerte del PI-1 radica en la inducción de la autofagia y del arresto del ciclo celular en la célula.

#### 5. Objetivos

El objetivo del presente proyecto es identificar los genes involucrados en la inducción del proceso de autofagia y que a su vez se relacionan con el detenimiento del ciclo celular para evaluar su participación en el mecanismo de muerte del PI-1.

## 6. Metodología

### 6.1 *Ensayos de crecimiento*

Para evaluar el efecto que tiene el PI-1 en las distintas cepas mutantes de *S. cerevisiae* se registra el crecimiento de la población celular en un periodo de 24h. Para esto se utiliza un crecínómetro (Synergy™ MX) con el que se registra cada hora la densidad celular midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 600nm (densidad óptica). Con las lecturas obtenidas se construyeron curvas de crecimiento.

Se utilizaron las placas de lectura de media área para el sistema Synergy™ que cuentan con 96 pozos, la capacidad de cada pozo es de 200µl. La cantidad de células con las que se debe iniciar en cada pozo debe tener una densidad óptica a 600nm (OD<sub>600</sub>) dentro del rango de 0.02-0.04. Las cepas silvestres se colocan en medio YPD mientras que las cepas mutantes en una solución de YPD con el antibiótico al que son resistentes (G418 100µg/ml o CloneNat 100 µg/ml). Cada cepa se incuba por separado en presencia del mismo volumen de péptido Iztli-1 (concentración final 10 µM), feromona α (concentración final 10 µM) y de ddH<sub>2</sub>O estéril. El volumen de muestra colocado en cada pozo es de 100 µl. El sistema de incubación debe mantenerse a una temperatura constante de 30°C y con agitación constante.

La curva de crecimiento de las levaduras con YPD y agua se utiliza como un control que muestra el crecimiento normal de la población. Por otro lado, la curva de crecimiento obtenida de las levaduras tratadas con feromona α se utiliza como un segundo control para identificar si el efecto que se observa en las células tratadas con PI-1 depende únicamente a su acción tipo feromona o a otra propiedad adicional.

Una curva de crecimiento de una población celular bajo condiciones normales, presenta una fase de crecimiento exponencial y continúa con una fase estacionaria que inicia cuando la población alcanza un tamaño para el cual la cantidad de nutrientes en el medio es limitante. Las células expuestas a la feromona α se arrestan temporalmente en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular; durante este periodo la población celular no aumentará en tamaño así que la fase exponencial estará retrasada con respecto a las poblaciones sin feromona. El tamaño de la población de levaduras tipo MATa expuestas al PI-1 debería mantenerse constantemente sin crecimiento durante 24h pues las células mueren en

presencia del péptido. Si se realiza el ensayo con una mutante que sea insensible al efecto de muerte del péptido las lecturas de la densidad óptica mostrarán un incremento con el tiempo. Si la curva de crecimiento observada en la mutante tratada con el PI-1 tiene una forma similar a la de las mismas células crecidas en YPD y agua se puede asegurar que la mutación otorga a la cepa una insensibilidad completa al péptido, en un caso distinto en el que el crecimiento de la población expuesta al péptido sea menor que la población control se puede interpretar que el gen ausente en estas cepas participa en alguna vía que está involucrada en la muerte causada por el PI-1, pero su papel en la ruta de la que forma parte es reducido.

Cuando la mutación presente en determinada cepa es responsable de que las levaduras presenten resistencia al péptido se compara la curva de crecimiento de este tratamiento con el de las células expuestas a la feromona  $\alpha$ . Si las curvas de crecimiento son distintas se puede asegurar que la resistencia al PI-1 es independiente de la activación de la vía de la feromona.

Para poder comparar las curvas de crecimiento se estandarizan los valores de OD<sub>600</sub> en los que inicia la curva de crecimiento de cada ensayo y se calcula el área bajo la curva (ABC). Este valor puede utilizarse para conocer el grado de protección que la mutación tiene contra el PI-1 y el grado de respuesta que presenta ante la feromona  $\alpha$ .

El ABC se calcula de la siguiente manera:

$$ABC = \sum_{i=0}^{23} (OD_{600}(i) + OD_{600}(i + 1))/2$$

En cada placa de lectura se colocaban las cepas para ensayar en las tres condiciones mencionadas (YPD+H<sub>2</sub>O, YPD+feromona, YPD+PI-1) por triplicado, de manera que con cada experimento se tenían tres muestras (n=3) de cada cepa en cada condición. El tamaño de las muestras analizadas se incrementaba como múltiplos de tres cada vez que se repitiera el mismo experimento.

Las mutantes que se seleccionaron para realizar los ensayos de crecimiento en este proyecto fueron las mismas que mostraron protección al PI-1 en el ensayo genético masivo y que están relacionadas estrechamente con autofagia y/o con la progresión del ciclo celular; esto se hizo con el fin de corroborar su resistencia al PI-1. Adicionalmente se usaron mutantes que no habían presentado protección al PI-1 de acuerdo al *screening* genético pero que tienen eliminados genes que pudieran contribuir a formar un puente

entre la autofagia y el control del ciclo celular, o mutantes con deleciones de genes que pertenecen a la vía de señalización de la feromona, dentro de este último grupo hay cepas que carecen de genes que se ha reportado que participan en la muerte inducida por concentraciones altas de feromona  $\alpha$  (Zahng *et al.*, 2006).

## 6.2 Análisis estadístico

Se condujo un ANOVA de dos vías para examinar el efecto de las cepas y de las condiciones a las que fueron expuestas (YPD+H<sub>2</sub>O, YPD+Feromona o YPD+PI-1) en el ABC. Se habilitó la comparación múltiple entre grupos mediante la prueba *post hoc* de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con  $p \leq 0.01$ . El software utilizado para realizar las pruebas estadísticas fue SigmaPlot 11.0

## 6.3 Construcción de mutantes

Las cepas con una sola deleción que se utilizaron en este trabajo provienen de la colección de mutantes BY4741 generada a partir del “*Saccharomyces Genome Deletion Project*” y obtenidas de la compañía *Open Biosystems*. Estas levaduras tienen insertado un casete (*KanMX4*) del gen de resistencia al antibiótico geneticina (G418) en el sitio del gen eliminado (Figura 6).

Para construir las mutantes con deleciones en dos genes (dobles mutantes nulas), se toman mutantes simples de la colección ya mencionada y se elimina el segundo gen de interés mediante la técnica de recombinación homóloga con la que se reemplaza el gen por el casete (*NatMX4*) de resistencia al antibiótico nurseotricina (CloneNat). El proceso consiste en realizar una reacción de PCR con el vector que contiene el casete de resistencia al antibiótico (*pGA25-NatMX4*) y con oligonucleótidos que incluyen una sección homóloga al casete *NatMX4* y otra homóloga a las regiones río arriba o río debajo del gen a eliminar. Los nombre y las secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo se muestran en la Tabla 3 del Anexo. Los componentes de la PCR realizada se agregaron en el orden y concentraciones indicados a continuación teniendo un volumen final de 50  $\mu$ l.

35.5 $\mu$ l-X $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O estéril
5 $\mu$ l	<i>Stratagene</i> PCR Buffer 10X
1 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> 50 mM
1 $\mu$ l	dNTPs 10 mM
1 $\mu$ l	primer Fwd 50 $\mu$ M
1 $\mu$ l	primer Rvs 50 $\mu$ M
0.3 $\mu$ g (X $\mu$ l)	plásmido pAG25
2.5 $\mu$ l	DMSO 100%
3 $\mu$ l	DNA Polimerasa <i>Pfu</i>

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

94°C	4 min	
94°C	30 seg	} x30
54°C	30 seg	
72°C	1:30 min	
72°C	2 min	
4°C	$\infty$	

El producto obtenido del PCR, que corresponde al casete de resistencia al antibiótico flanqueado por 50 bases homólogas a la secuencia río arriba y 50 bases homólogas a la secuencia río abajo del gen a eliminar, se utiliza para transformar a una mutante simple con el protocolo de transformación descrito a continuación.

#### 6.4 Transformación de levadura

Incubar la cepa destinada a la transformación en 5 ml de YPD con agitación a 30°C por 16h.

Diluir una porción del cultivo en YPD de manera que se tengan 5 ml con una OD<sub>600</sub> de 0.1-0.2. Incubar 4-5 horas hasta que se alcance una OD<sub>600</sub> de 0.7-1.0.

Colocar 1.5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf y centrifugar a 10,000 rpm durante 2min. Desechar sobrenadante.

Resuspender en 1 ml de agua estéril, centrifugar nuevamente a 10,000 rpm durante 2min y desechar sobrenadante.

Resuspender en 1 ml de 0.1M LiAc. Incubar 10 min a temperatura ambiente.

Centrifugar a 10,000 rpm durante 2 min, desechar sobrenadante.

Agregar 240 µl de PEG 50% w/v, 36 µl de 1M LiAc, 45 µl del producto resultante de la PCR, 10 µl de esperma de salmón 10 mg/ml previamente hervido y 29 µl de agua estéril en el orden indicado.

Agitar tubo con vortex hasta que las células estén completamente resuspendidas.

Incubar a 42°C por 1h.

Centrifugar a 10,000 rpm durante 2min. Desechar sobrenadante y resuspender en 100 µl de agua estéril.

Esparcir los 100 µl en cajas con medio YPD.

Al día siguiente replicar las colonias crecidas en otra placa con el medio selectivo para las transformantes (YPD con G418 100 µg/ml y CloneNat 100 µg/ml).

### 6.5 Verificación de mutaciones

Se realizaron ensayos de PCR con el DNA genómico de las cepas utilizadas para asegurarse que cada mutante tuviera correctamente eliminado el gen de interés. Para extraer el DNA genómico de las células se siguió el protocolo explicado en la sección titulada “*Aislamiento de DNA genómico de levadura*”.

Las mutaciones que contienen el casete *KanMX4* se pueden verificar mediante una reacción de PCR usando un oligonucleótido que es complementario a una sección del gen *KanMX4* (“Kan C primer”) y otro cuya secuencia es complementaria a una sección que se encuentra 200-400pb río abajo del codón de paro del casete de resistencia al antibiótico (“primerD”) (Figura 6). Cada cepa tiene un primerD de verificación distinto y característico que depende del sitio en el que se haya insertado el casete de resistencia. Por lo tanto, la longitud del producto de la PCR es distinta para cada caso.

La estrategia para corroborar la presencia del casete *NatMX4* en el sitio deseado es idéntica a la anteriormente explicada excepto por que el “primer C” es complementario a la secuencia del gen *NatMX4* en lugar de al gen *KanMX4*. Los nombres y la secuencia de los oligonucleótidos usados en este trabajo se enlistan en la Tabla 2 del Anexo.

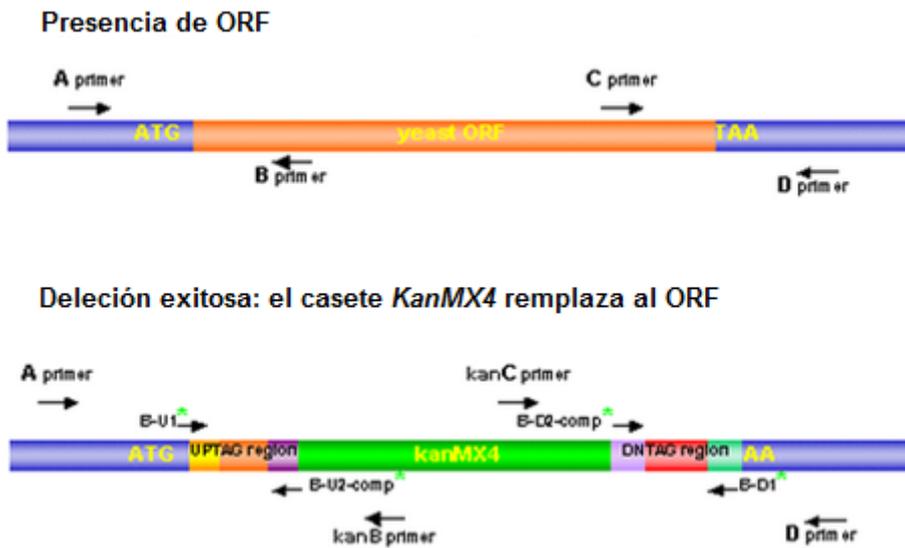


Figura 6. Mapa del gen *KanMX4* insertado en el genoma e la levadura y la posición de los primers de verificación con respecto a dicho gen. (Tomada y modificada del portal de *Saccharomyces Genome Deletion Project*).

Los ensayos de PCR se realizan con la enzima *Taq* polimerasa en un volumen final de 50  $\mu$ l, en los tubos para PCR se adicionan los componentes en el siguiente orden y a las concentraciones indicadas

35.5 $\mu$ l-X $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O estéril
5 $\mu$ l	<i>New England</i> PCR Buffer 10X
1 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> 50 mM
1 $\mu$ l	dNTPs 10 mM
5 $\mu$ l	primer Fwd 10 $\mu$ M
5 $\mu$ l	primer Rvs 10 $\mu$ M
0.3 $\mu$ g (X $\mu$ l)	DNA genómico
3 $\mu$ l	DNA Polimerasa <i>Taq</i>

El programa utilizado en el termociclador es el siguiente:

94°C	5 min	
95°C	45 seg	} x35
64°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
18°C	∞	

### 6.6 *Electroforeisis en gel de agarosa*

Para observar los productos de la PCR se cargan las muestras en un gel de agarosa 1% en buffer SD con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). En cada pozo del gel se agregan 12.5 µl que contienen 5 µl de H<sub>2</sub>O, 2.5 µl de buffer de carga (*Invitrogen*) y 5 µl del producto de la PCR. Para el marcador de peso molecular los 12.5 µl que se cargan al pozo están compuestos de 7.5 µl de H<sub>2</sub>O, 2.5 µl de buffer de carga (*Invitrogen*) y 2.5 µl del marcador de peso molecular (0.1 mg/ml) (*DNA Ladder Plus2, Invitrogen*). El gel se mantiene sumergido en buffer SD sometido a una corriente de 50V durante 75min.

### 6.7 *Aislamiento de DNA genómico de levadura*

Tomar 1.5 ml de cultivo de levadura incubado durante 24 h a 30°C.

Centrifugar a 3500 rpm durante 3.5min a temperatura ambiente.

Remover el medio de cultivo y resuspender el pellet en 50 µl de buffer STES y 50 µl de buffer TE (pH 7.6).

Agregar 100 µl de esferas de vidrio de 0.4 mm de diámetro.

Agregar 100 µl de fenol:cloroformo, mezclar las fases orgánica y acuosa con un Vortex durante 1 min.

Centrifugar los tubos a 12800 rpm durante 5 min a temperatura ambiente

Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y agregar 250 µl de etanol 100% y 10 µl de AcNa 3 M. Mantener a 0°C durante 15min.

Centrifugar a 12800 rpm por 10min a 4°C para recuperar el precipitado de los ácidos nucleicos.

Remover el sobrenadante y lavar el pellet en 100 µl de etanol 70%.

Centrifugar a 12800 rpm por 1min a temperatura ambiente.

Remover el sobrenadante y esperar 15 min a que el pellet se seque.

Redisolver el pellet en 40 µl de buffer TE (pH7.6)

La preparación de las soluciones mencionadas en la sección de Métodos se describe en el Anexo.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 *Ensayos de crecimiento con mutantes simples*

La lista de mutantes seleccionadas para ensayarse pueden dividirse en tres grupos por comodidad: las que carecen de genes relacionados con autofagia o autofagia-ciclo celular (*atg3Δ*, *atg11Δ*, *atg19Δ*, *tor1Δ*, *meh1Δ*, *slm4Δ*, *gtr2Δ*, *vac8Δ*, *nvj1Δ*, *pep4Δ*, *aup1Δ*, *uth1Δ*, *gea1Δ*, *irs4Δ*, *vtc1Δ*, *vtc2Δ*, *vtc3Δ*, *vtc4Δ*, *vps51Δ*, *vps52Δ*, *vps53Δ*, *vps54Δ*, *ypt6Δ*, *pbs1Δ*, *pho81Δ*, *rim15Δ*), las que carecen de un gen relacionado con la respuesta a la feromona α (*fig1Δ*, *cch1Δ*, *mid1Δ*, *lrg1Δ*, *rvs161Δ*, *pea1Δ*, *pea2Δ*, *ste5Δ*, *ste7Δ*, *ste11Δ*, *ste50Δ*, *fus3Δ*, *kss1Δ*, *far1Δ*, *slt2Δ*, *bem1Δ*, *bni1Δ*, *kar4Δ*, *rme1Δ*) y las que tienen eliminado un gen involucrado en el ciclo celular pero que no tiene relación directa con autofagia o con respuesta a la feromona (*hal9Δ*, *xbp1Δ*, *hms1Δ*, *skn7Δ*, *put3Δ*, *msn4Δ*, *mga1Δ*, *fkh2Δ*). Los genes relacionados con la vía de la feromona se seleccionaron basándose en dos hechos: 1) que en estudios previos la mutante *far1Δ* ha mostrado una protección a los efectos del PI-1 (Resultados no publicados de la tesis de Zyanya Daniela González Sandoval) y Far1 es blanco de las MAPK activadas por la vía de la feromona. 2) Que ciertos genes que participan en la respuesta de la feromona están involucrados en la muerte inducida por altas concentraciones de feromona α (Zahng *et al.*, 2006) y quizá un mecanismo similar podría estar involucrado en la muerte

inducida por el PI-1.

En la Tabla 1 se muestra la descripción de los genes ausentes en las mutantes ensayadas.

Tabla 1. Descripción de las principales funciones de los genes ausentes en las mutantes seleccionadas para los ensayos de crecimiento.

<b>Nombre gen</b>	<b>ORF</b>	<b>Descripción</b>
<i>ATG3</i>	YNR007C	Enzima tipo E2; involucrada en autofagia y en la vía Cvt (cytoplasm-to-vacuole-targeting)
<i>ATG11</i>	YPR049C	Proteína adaptadora para pexofagia y la vía Cvt; dirige el cargo para empaquetarlo en las vesículas.
<i>ATG19</i>	YOL082W	Receptor de la vía Cvt
<i>TOR1</i>	YJR066W	Subunidad de TORC1, un complejo que controla el crecimiento en respuesta a los nutrientes por medio de la traducción, transcripción, biogénesis ribosomal, transporte de nutrientes y autofagia.
<i>MEH1</i>	YKR007W	Componente de los complejos EGO y GSE; EGO está involucrado en la regulación de la microautofagia y GSE se requiere para la localización adecuada de la proteína Gap1
<i>SLM4</i>	YBR077C	Componente de los complejos EGO y GSE; esencial para la integridad y función de EGO
<i>GTR2</i>	YGR163W	Proteína putativa de unión a GTP; subunidad de los complejos EGO y GSE
<i>VAC8</i>	YEL013W	Proteína membranal de la vacuola requerida para la vía Cvt; interactúa con Nvj1 para las uniones núcleo-vacuola
<i>NVJ1</i>	YHR195W	Proteína anclada a la membrana nuclear interna, interactúa con la proteína vacuolar Vac8 para promover la formación de las uniones núcleo-vacuola.
<i>PEP4</i>	YPL154C	Proteasa aspartilo vacuolar (proteínasa A); requerida para la maduración posttraduccional de las proteinasas vacuolares
<i>AUPI</i>	YCR079W	Proteína fosfatasa mitocondrial tipo 2C (PP2C); involucrada en mitofagia
<i>UTH1</i>	YKR042W	Proteína de la membrana interna mitocondrial, su rol en mitofagia no es certero; implicada en la biogénesis de la pared celular, en la respuesta de estrés oxidativo, en el "life span" durante hambruna y en la muerte celular
<i>GEA1</i>	YJR031C	Proteína involucrada en el transporte vesicular entre el aparato de Golgi y el RE, en la organización de Golgi y del citoesqueleto de actina
<i>IRS4</i>	YKR019C	Proteína involucrada en regular los niveles de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en la autofagia.
<i>VTC1</i>	YER072W	Subunidad del complejo VTC, este complejo está involucrado en el tráfico de membranas, en la acumulación vacuolar de polifosfato, en microautofagia y en la fusión vacuolar independiente de autofagia
<i>VTC2</i>	YFL004W	Subunidad del complejo VTC
<i>VTC3</i>	YPL019C	Subunidad del complejo VTC
<i>VTC4</i>	YJL012C	Polimerasa polifosfato de la membrana vacuolar. Subunidad del complejo VTC
<i>VPS51</i>	YKR020W	Componente del complejo GARP; GARP se requiere para reciclar proteínas de los endosomas en el Golgi y para la mitosis después del detenimiento causado por daño a DNA

<b>VPS52</b>	YDR484W	Componente del complejo GARP; involucrada en la localización de actina y quitina
<b>VPS53</b>	YJL029C	Componente del complejo GARP; requerida para la localización de proteínas vacuolares
<b>VPS54</b>	YDR027C	Componente del complejo GARP
<b>YPT6</b>	YLR262C	GTPase de la familia Rab involucrada en la vía de secreción, requerida para la fusión de las vesículas derivadas del endosoma con el Golgi y para la maduración de la carboxipeptidasa Y vacuolar
<b>PBS1</b>	YLR342W	Subunidad catalítica de la 1,3-beta-D-glucano sintasa; involucrada en la síntesis y mantenimiento de la pared celular. Su ausencia produce defectos en la endocitosis
<b>PHO81</b>	YGR233C	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas; regula los complejos Pho80-Pho85 y Pcl7-Pho85 en respuesta a los niveles de fosfato. Indirectamente regula la progresión del ciclo celular y la distribución vacuolar
<b>RIM15</b>	YFL033C	Proteína cinasa involucrada en la proliferación celular en respuesta a nutrientes. Substrato de las cinasas Pho80-Pho85
<b>FIG1</b>	YBR040W	Proteína integral de membrana requerida para un apareamiento eficiente. Es posible que participe en el sistema de baja afinidad de influjo de Ca <sup>2+</sup> , el cual afecta la señalización celular y la fusión célula-célula durante el apareamiento
<b>CCH1</b>	YGR217W	Canal de alta afinidad a calcio mediado por voltaje; involucrado en el influjo de calcio en respuesta a estrés ambiental y a la exposición a feromona
<b>MID1</b>	YNL291C	Proteína integral de membrana del RE y de la membrana plasmática; funciona como un canal de calcio, requerido para el influjo de Ca <sup>2+</sup> tras la estimulación por feromona
<b>LRG1</b>	YDL240W	Proteína activadora de GTPasa; funciona como un regulador negativo de la vía de integridad de la pared celular mediada por Pkc1; regulador negativo de la biosíntesis de 1,3-beta-glucano; requerida para la fusión celular eficiente.
<b>RVS161</b>	YCR009C	Proteína de balsas lipídicas; regula la polarización del citoesqueleto de actina, la endocitosis, polaridad celular, fusión celular y la viabilidad celular seguida de hambruna o estrés osmótico
<b>PEA1</b>	YLL021W	Componente del polarisoma; participa en la organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado
<b>PEA2</b>	YER149C	Subunidad del polarisoma; requerido para el establecimiento de la polaridad, crecimiento apical del "bud", formación de shmoo y diferenciación filamentosa, también juega un rol en el influjo de Ca <sup>2+</sup> y en la fusión celular
<b>STE5</b>	YDR103W	Proteína de andamiaje de las MAPK que responden a la feromona; acopla la activación del receptor de la feromona unido a proteína G con la activación de las MAPK
<b>STE7</b>	YDL159W	MAP cinasa involucrada en la respuesta de la feromona y en la vía del crecimiento filamentoso
<b>STE11</b>	YLR362W	MEK cinasa involucrada en la respuesta de la feromona, en la vía del crecimiento filamentoso y en la vía de respuesta a alta osmolaridad. La abundancia de esta proteína incrementa la respuesta al estrés de replicación de DNA.
<b>STE50</b>	YCL032W	Proteína adaptadora involucrada en la respuesta de apareamiento, de crecimiento filamentoso y de osmotolerancia
<b>FUS3</b>	YBL016W	MAPK involucrada en el apareamiento; inhibe en crecimiento filamentoso durante el apareamiento
<b>KSS1</b>	YGR040W	MAPK involucrada en las vías de transducción de señales del

		crecimiento filamentosos y de la respuesta de la feromona
<b>FAR1</b>	YJL157C	Inhibidor de CDK; durante la respuesta a la feromona la fosforilación de Far1 por Fus3 resulta en la asociación e inhibición del primero con Cdc28-Cln
<b>SLT2</b>	YHR030C	MAPK involucrada en regular la integridad de la pared celular, la progresión del ciclo celular y la retención del mRNA nuclear en el choque térmico; requerida para mitofagia y pexofagia
<b>BEM1</b>	YBR200W	Proteína de andamiaje involucrada en el establecimiento de la polaridad celular y la morfogénesis
<b>BNI1</b>	YNL271C	Formina; componente del polarisoma, involucrada en procesos celulares como la división celular y la orientación del huso mitótico que requieren la formación de cables de actina polarizados.
<b>KAR4</b>	YCL055W	Factor de transcripción requerido para la respuesta a la feromona; también se requiere durante la meiosis
<b>RME1</b>	YGR044C	Proteína con dedo de zinc involucrada en el control de la meiosis y mitosis
<b>HAL9</b>	YOL089C	Factor de transcripción putativo que contiene un dedo de zinc; su sobreexpresión incrementa la tolerancia a sal y su ausencia disminuye esta tolerancia
<b>XBPI</b>	YIL101C	Represor transcripcional; se une a promotores de secuencias de algunos genes de ciclinas; su expresión es inducida por estrés o hambruna durante la mitosis o durante la meiosis tardía.
<b>HMS1</b>	YOR032C	Proteína similar a la familia myc de factores de transcripción; su sobreexpresión produce crecimiento hiperfilamentoso
<b>SKN7</b>	YHR206W	Factor de transcripción y regulador de respuesta nuclear; se requiere para la inducción óptima de los genes de choque térmico en respuesta a estrés oxidativo; involucrado en la osmoregulación
<b>PUT3</b>	YKL015W	Activador transcripcional; se une a secuencias específicas de reclutamiento de genes y se requiere para el direccionamiento de genes a la periferia nuclear; regula genes de utilización de prolina.
<b>MSN4</b>	YKL062W	Activador transcripcional que responde a estrés; se une al DNA e induce la expresión de genes de respuesta a estrés
<b>MGA1</b>	YGR249W	Proteína similar al factor de transcripción de choque térmico
<b>FKH2</b>	YNL068C	Factor de transcripción que juega un papel importante en la expresión de los genes de la fase G2/M; regula positivamente la elongación y juega un rol negativo en la silenciamiento de la cromatina

Las mutantes se incubaron durante 24h en el medio de cultivo YPD+H<sub>2</sub>O, YPD+feromona  $\alpha$  o YPD+PI-1 y se midió en área formada bajo su curva de crecimiento (ABC) (ver la sección de Métodos para una descripción detallada sobre el cálculo del ABC). Al comparar el ABC de cada cepa y condición se comprobó que ninguna mutante del grupo de genes relacionados con autofagia o autofagia-ciclo celular o del grupo de genes relacionados únicamente a ciclo celular protege de la muerte provocada por el PI-1 (Figura 7). Por el contrario, las mutantes que sí mostraron una resistencia a la muerte fueron algunas de las que pertenecen al grupo de genes involucrados en la vía de señalización de la feromona (*STE50*, *STE11*, *STE7*, *STE5*, *FUS3*, *FAR1*, *FIG1*, *BEM1*).

En la Figura 8 se muestra el valor de ABC de las cepas que sobrevivieron en presencia del PI-1.

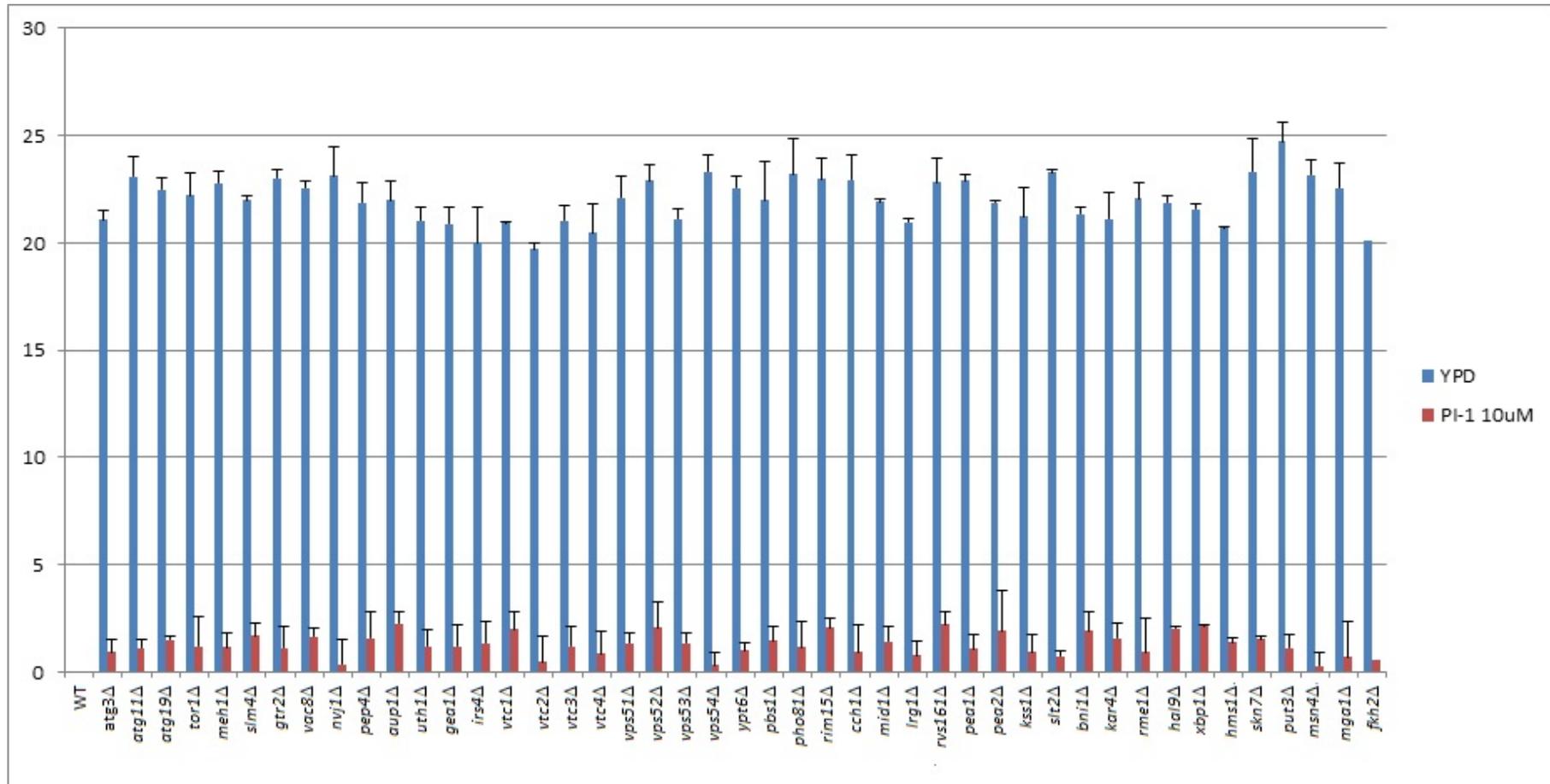


Figura 7. Tasa de crecimiento de las mutantes que no mostraron resistencia a la muerte inducida por el PI-1. Se muestra el ABC de las mutantes crecidas en YPD+H<sub>2</sub>O y de las crecidas en YPD+PI-1 10 µM.

La cepa silvestre en presencia de la feromona  $\alpha$  presenta una tasa de crecimiento reducida en comparación con las cepa crecida en YPD+H<sub>2</sub>O esto refleja un retraso en el crecimiento de las células expuestas a la feromona causado por del arresto del ciclo celular. Se puede observar que el ABC de la cepa silvestre expuesta al PI-1 tiene un valor muy bajo debido a que la población celular inicial no creció con el paso del tiempo. Las cepas *ste11* $\Delta$ , *ste7* $\Delta$  y *ste5* $\Delta$  tienen un ABC en presencia de la feromona  $\alpha$  y del PI-1 que no difiere significativamente del ABC de las cepas crecidas en medio de cultivo con agua indicando que estas cepas son resistentes por completo a los efectos de la feromona y del PI-1. El ABC de *ste50* $\Delta$  en YPD+H<sub>2</sub>O difiere ligeramente del ABC obtenida de la incubación con feromona  $\alpha$  o PI-1, por lo tanto su resistencia a estas sustancias es casi completa. Se puede observar en la Figura 8 que  $\Delta$ *far1* presenta una protección total a la feromona  $\alpha$  pero no al PI-1, mientras que  $\Delta$ *fus3*, que carece de un gen que se encuentra río debajo de Ste7 pero río arriba de Far1, presenta una protección parcial tanto a la feromona  $\alpha$  como al PI-1. Por otro lado, *fig1* $\Delta$  y *bem1* $\Delta$  tienen eliminados genes que codifican para proteínas que participan en la señalización de la feromona pero que no pertenecen a la vía de las MAPK; estas cepas también presentan una protección parcial a la feromona  $\alpha$  y al PI-1.

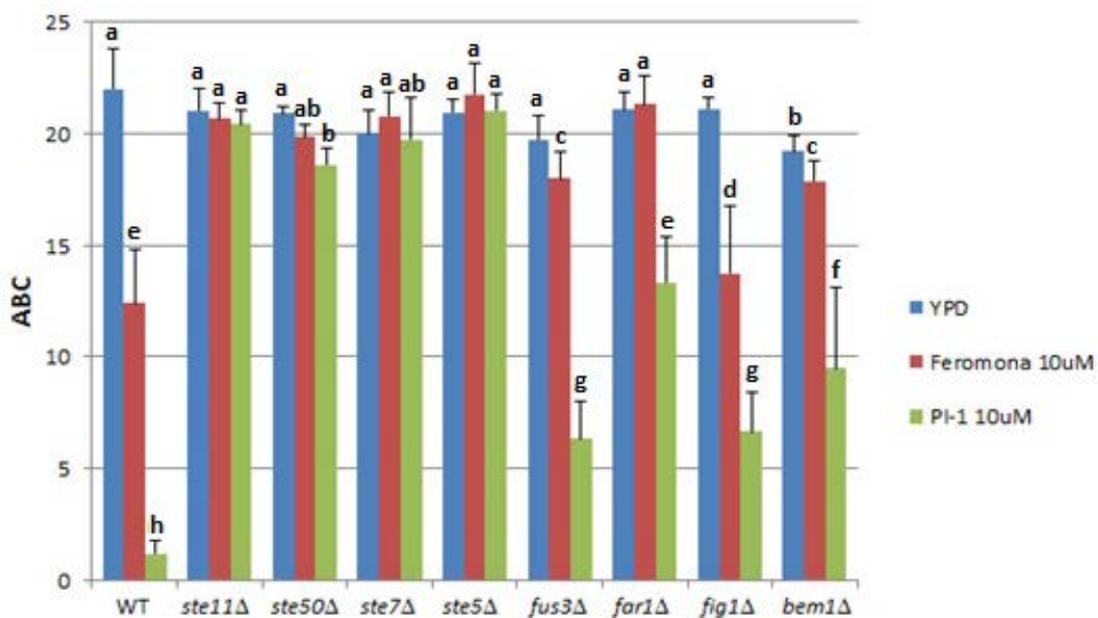


Figura 8. Tasa de crecimiento de las mutantes simples que mostraron resistencia a la muerte provocada por el PI-1. En la gráfica se presenta el ABC de las cepas crecidas en YPD + H<sub>2</sub>O, en YPD + feromona  $\alpha$  10  $\mu$ M y en YPD + PI-1 10  $\mu$ M durante 24h. n=15

En ensayos de crecimiento realizados anteriormente con concentraciones de PI-1 menores a 10  $\mu\text{M}$  se mostró que la mutante *far1* $\Delta$  presentaba una resistencia total a la muerte inducida por el péptido (Trabajo no publicado de Zyanya Daniela González Sandoval), a diferencia de los resultados de este trabajo en los que el ABC de *far1* $\Delta$  con PI-1 10  $\mu\text{M}$  es significativamente menor a el ABC de la misma cepa crecida en YPD. Con el objetivo de determinar el efecto de la concentración del PI-1 en el grado de resistencia a la muerte de la cepa *far1* $\Delta$  se incubó dicha cepa en presencia de distintas concentraciones de PI-1 (1.5, 3, 6 y 10  $\mu\text{M}$ ) y se compararon las variaciones en su tasa de crecimiento con las de la cepa silvestre (Figura 9). Se puede observar que a una concentración de PI-1 de 3  $\mu\text{M}$ , la cepa silvestre muestra un decremento significativo en su crecimiento (Figura 9), sin embargo, el ABC de *far1* $\Delta$  a esta concentración de PI-1 no presenta diferencias significativas con el ABC de la cepa crecida sin PI-1 (control). Con concentraciones mayores de PI-1 se reduce significativamente con respecto al control la tasa de crecimiento tanto de la cepa silvestre como de la cepa *far1* $\Delta$  (Figura 9). Con base a estos resultados, los ensayos de crecimiento realizados posteriormente en este trabajo se hicieron utilizando el PI-1 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , debido a que con esta condición se observa en la cepa silvestre un aumento nulo en la OD<sub>600</sub> a lo largo de 24h.

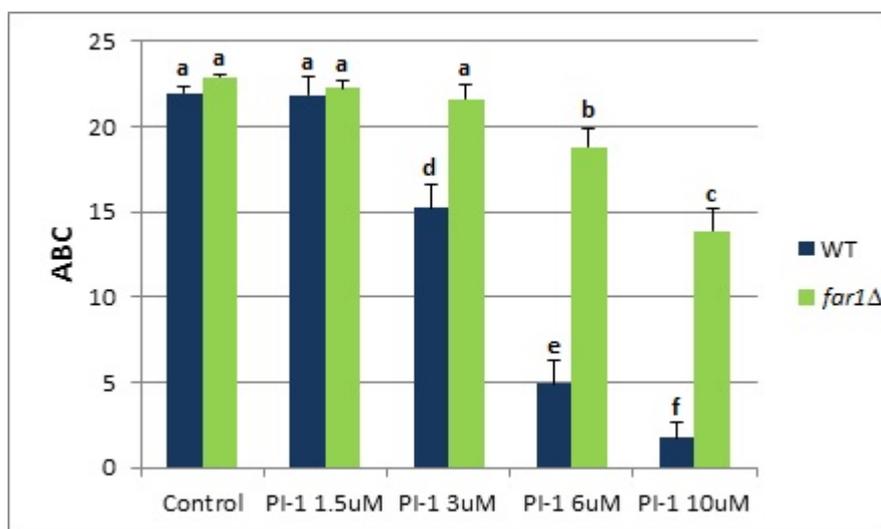


Figura 9. Tasa de crecimiento de la cepas silvestres y *far1* $\Delta$  en presencia de diferentes concentraciones de PI-1. n=3

## 7.2 Verificación de mutaciones por PCR

Se extrajo el DNA de las cepas que mostraron protección al PI-1 y de la cepa *kss1Δ* y se comprobó por PCR que las mutantes tenían el casete de resistencia a geneticina (*KanMX4*) insertado en el sitio correcto (Figura 10). El tamaño del producto de PCR esperado por cada mutación a verificar se muestra en la Tabla 2. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de PCR se muestran en la Tabla 2 del Anexo.

A pesar de que *kss1Δ* no es resistente a la muerte inducida por el PI-1, se decidió verificar la delección de la cepa, ya que es una mutante crucial para entender la participación de la vía de las MAPK en el mecanismo de muerte, como se verá más adelante.

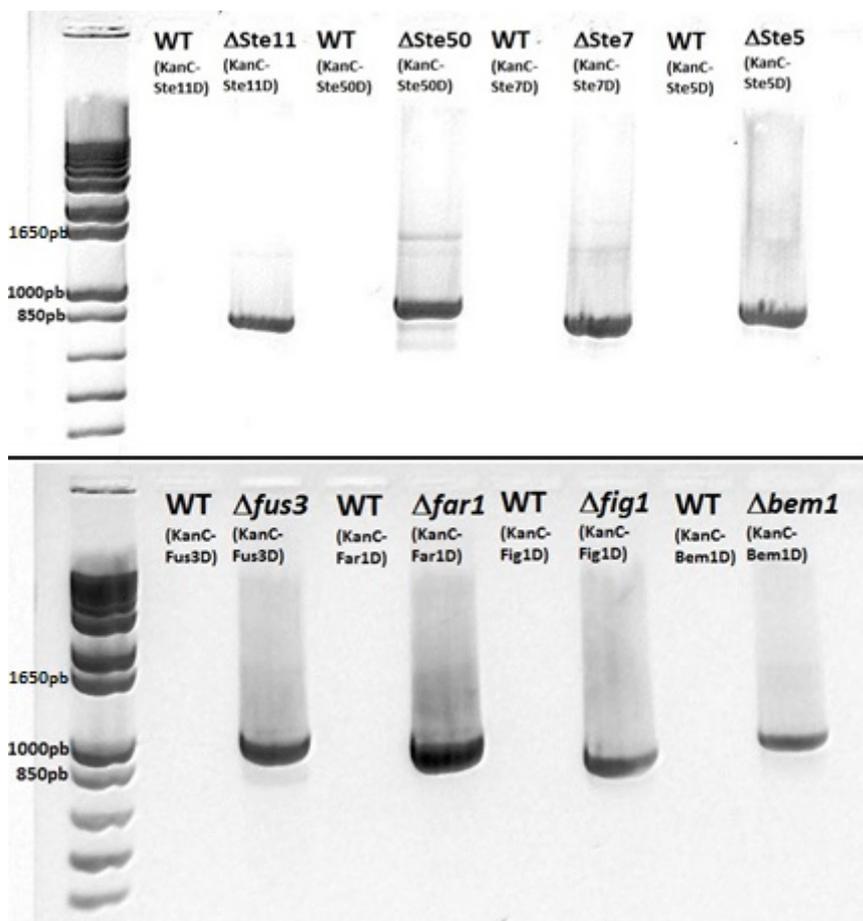


Figura 10. Productos de PCR corridos en gel de agarosa 1%. Todos los productos son de la longitud esperada lo cual indica que cada mutante tiene el casete de *KanMX4* insertado en el sitio correcto. En cada carril se indica el genoma que se utilizó como DNA templado en cada PCR y entre paréntesis los pares de oligonucleótidos.

Tabla 2. Se muestran los pares de oligonucleótidos utilizados para verificar las mutaciones de las cepas que resistieron a la muerte del PI-1 y el tamaño esperado del producto de la PCR.

Genotipo por verificar	Oligonucleótidos utilizados (Fwd, Rvs)	Tamaño esperado del producto
<i>ste11Δ::KanMX4</i>	KanC, Ste11 D	859pb
<i>ste50Δ::KanMX4</i>	KanC, Ste50 D	1011pb
<i>ste7Δ::KanMX4</i>	KanC, Ste7 D	905pb
<i>ste5Δ::KanMX4</i>	KanC, Ste5 D	967pb
<i>fus3Δ::KanMX4</i>	Kan C, Fus3D	1111pb
<i>kss1Δ::KanMX4</i>	Kan C, Kss1D	943pb
<i>far1Δ::KanMX4</i>	KanC, Far1 D	984pb
<i>fig1Δ::KanMX4</i>	KanC, Fig1 D	907pb
<i>bem1Δ::KanMX4</i>	KanC, Bem1 D	998pb

### 7.3 Formulación de segunda hipótesis

Fig1 es una proteína integral de membrana que forma parte de la vía de la feromona y se encarga de regular el sistema de entrada de  $Ca^{2+}$  de baja afinidad y de permitir la fusión célula-célula durante el apareamiento (Muller *et al.*, 2003). Probablemente su relación con la muerte provocada por el PI-1 tenga que ver con su ubicación en la membrana de la célula, más que con la entrada de  $Ca^{2+}$ , ya que la ausencia de factores que son necesarios para la actividad del sistema de entrada de  $Ca^{2+}$  de baja afinidad como Rvs161, Pea1 y Pea2 (Muller *et al.*, 2003), no protegen de la muerte (Figura 7). Posiblemente la presencia de Fig1 en la membrana facilita la entrada del PI-1, por lo tanto, en las cepas  $\Delta fig1$  se disminuye el efecto fungicida del péptido. Son necesarios más estudios para verificar esta hipótesis que no forma parte de la motivación original de este trabajo. Posiblemente los ensayos de internalización del péptido descritos previamente sirvan para probar esta hipótesis (Rodríguez Plaza *et al.*, 2014).

Bem1 es una proteína involucrada en establecer la polaridad celular y formar la estructura de “shmoo” (Madden and Snyder, 1998). Esta proteína interactúa con las proteínas Ste5 y Ste20, por lo tanto, es un puente que comunica la vía de las MAPK con las modificaciones en el citoesqueleto de actina que se requieren para el apareamiento (Leeuw *et al.*, 1995). La protección parcial de  $\Delta bem1$  a los efectos del PI-1 sugiere que

la morfogénesis provocada por la feromona también influye en la muerte provocada por este péptido.

Las proteínas llamadas “*STE*” reciben ese nombre porque cuando alguna de ellas es disfuncional las células no logran aparearse exitosamente con levaduras del tipo opuesto a causa de una falla en el arresto del ciclo celular, es decir, son estériles (STErile) (Hartwell, 1980). Específicamente las mutantes “*ste* $\Delta$ ” que se ensayaron en este trabajo carecen de proteínas que se encuentran río arriba de Far1; sin ellas Far1 es incapaz de activarse e inducir el arresto de las células, por lo tanto, es de esperarse que la tasa de crecimiento en presencia de la feromona  $\alpha$  de las mutantes *ste11* $\Delta$ , *ste5* $\Delta$ , *ste7* $\Delta$ , *ste50* $\Delta$  y *far1* $\Delta$  sea la misma que en presencia que en YPD+H<sub>2</sub>O. Este fenómeno se refleja en los resultados obtenidos (Figura 8), con excepción de la cepa  $\Delta$ *ste50*; la diferencia entre el ABC de las células crecidas en YPD+H<sub>2</sub>O y en YPD+feromona  $\alpha$  es significativa a pesar de no ser muy grande (diferencia=1.04 unidades t=6.635). Esto ya ha sido reportado en la literatura (Wu *et al.*, 1999) donde se demuestra que Ste50 es un activador de Ste11 pero que su ausencia no evita por completo la activación de este último.

Todas las cepas que tienen eliminado un gen “*STE*” presentan la misma resistencia a la feromona  $\alpha$  que al PI-1 (Figura 8), apoyando la hipótesis de que el arresto del ciclo celular en G1 es un requisito para que el PI-1 provoque la muerte de las células. Sin embargo, llama la atención que la cepa *far1* $\Delta$  rompe con este esquema: a pesar de que el ABC de la condición YPD+H<sub>2</sub>O no presenta diferencias significativas al compararse con el ABC de la condición con feromona  $\alpha$ , el ABC que corresponde al crecimiento con PI-1 es significativamente menor comparada con las dos anteriores (Figura 8). Es decir, la ausencia de *FAR1* no permite que la población celular expuesta al PI-1 recupere por completo el crecimiento que tienen las células en medio de cultivo sin el péptido. Esto sugiere que, si bien el detenimiento en el ciclo celular causado por la activación de Far1 es un evento que participa en la muerte de la levadura, este fenómeno no es la única causa de la muerte.

Otra mutante cuyo comportamiento llama la atención es  $\Delta$ *fus3*, la ausencia de esta MAPK directamente río arriba de Far1 presenta una protección parcial tanto a la feromona  $\alpha$  como al PI-1 (Figura 8). Se ha reportado en estudios previos que Kss1 es una MAPK que en ausencia de Fus3 puede fosforilar a Far1, aunque con una menor eficiencia que Fus3 (Breitkreutz *et al.*, 2001; Peter *et al.* 1993), probablemente a esto se

deba la protección parcial que la cepa  $\Delta fus3$  presenta al PI-1. Una manera de saber si Kss1 es efectivamente la proteína que está previniendo que la ausencia de Fus3 conlleve a la inactivación completa de Far1 es ver el comportamiento de  $kss1\Delta$  con feromona  $\alpha$  y con el PI-1. Sin embargo, está reportado que la ausencia de Kss1 es prescindible para que las células se arresten exitosamente en respuesta a la feromona, pues Fus3 es capaz de transmitir la señal por sí sola (Peter *et al.* 1993; Sabbagh *et al.*, 2001). De acuerdo con estos antecedentes, los resultados de  $kss1\Delta$  obtenidos en el presente trabajo muestran que la cepa no es resistente al arresto inducido por la feromona  $\alpha$  y tampoco protege de la muerte provocada por el PI-1. Por lo tanto, la mutante simple  $kss1\Delta$  no provee suficiente información sobre el mecanismo de acción del PI-1. Para ello, es necesario eliminar simultáneamente a *FUS3* y a *KSS1* para interrumpir completamente la señal que conduce a la activación de Far1 (Elion *et al.*, 1991) y ver el efecto que Kss1 tiene en células expuestas al PI-1.

Con base a los resultados obtenidos surgen dos hipótesis:

- 1) Si la ausencia de la MEKK Ste11, de la MEK Ste7 o de la proteína de andamiaje Ste5 previenen totalmente la muerte provocada por el PI-1, pero la ausencia de la MAPK Fus3 protege de manera parcial, es posible que una cepa que carezca de *FUS3* y de *KSS1* recupere la protección total al PI-1.
- 2) Por otro lado, dado que la proteína responsable de detener el ciclo celular de la levadura, Far1, no protege por completo de la muerte inducida por el PI-1 pero los elementos río arriba sí ( $ste11\Delta$ ,  $ste5\Delta$ ,  $ste7\Delta$ ), hipotetizamos que existe otro mecanismo complementario al arresto del ciclo celular que provoque la muerte de las células y que también sea desencadenado por la MEKK Ste11 y la MEK Ste7.

#### 7.4 Evaluación de dobles mutantes

Para esclarecer la participación de la cascada de las MAPK en el mecanismo de muerte del PI-1 se construyó la doble mutante *MATa kss1Δ::KanMX4 fus3Δ::NatMX4*.

Cuando esta cepa se creció en presencia de feromona  $\alpha$  se obtuvo el resultado que ya se ha reportado en estudios previos (Elion *et al.*, 1991) que es una resistencia total al arresto celular (Figura 11). Cuando esta cepa se creció en presencia del PI-1 la resistencia a la muerte también fue completa pues el ABC no presenta diferencias significativas con el ABC de las condiciones YPD+ feromona  $\alpha$  o YPD+H<sub>2</sub>O (Figura 11). Es decir, el efecto de resistencia a la muerte observado en la ausencia de los genes *FUS3* y *KSS1* es mayor que el de la suma del efecto de resistencia de la mutante simple *fus3* $\Delta$  y de la mutante simple *kss1* $\Delta$ , lo que se puede traducir en que los genes presentan una relación epistática de tipo sinérgica (Otto y Feldman, 1997). Estos resultados indican que el mecanismo de muerte del PI-1 es totalmente dependiente de la activación de la vía de las MAPK. Sin embargo, la supresión conjunta de *KSS1* y *FUS3* no logra explicar por qué las células con la delección del gen *FAR1* no presentan una protección total a la acción del PI-1, como sucede cuando son expuestas a la feromona  $\alpha$ , apoyando la idea de que además del detenimiento del ciclo celular provocado por Far1 debe existir otro evento que provoque la muerte de las células que sea independiente al arresto pero dependiente de Fus3 y/o Kss1 (y de los elementos río arriba de estas MAPK).

Como la ausencia del gen *KSS1* no protege a las células de la muerte, es poco probable que Kss1 sea el elemento encargado de regular un mecanismo de muerte complementario al arresto celular en G<sub>1</sub>. Por otro lado, es probable que el grado de protección al PI-1 que presenta *fus3* $\Delta$  no sólo sea el reflejo del abatimiento parcial del detenimiento del ciclo celular sino también el reflejo del abatimiento de un segundo mecanismo involucrado en la muerte.

Con el objetivo de averiguar si Fus3 es responsable no sólo de activar a Far1 sino también a otro elemento que cause muerte en las células se construyó la doble mutante *MATa far1* $\Delta$ ::*KanMX4 fus3* $\Delta$ ::*NatMX4*. Si Fus3 fuera responsable de activar un segundo proceso necesario para la muerte, entonces la cepa *far1* $\Delta$ *fus3* $\Delta$  presentaría una resistencia al PI-1 mayor que la mutante simple *far1* $\Delta$ , pues la doble mutante estaría evitando la posibilidad de detener el ciclo celular (por la ausencia de *FAR1*) y la posibilidad de activar el segundo mecanismo de muerte (por la ausencia de *FUS3*).

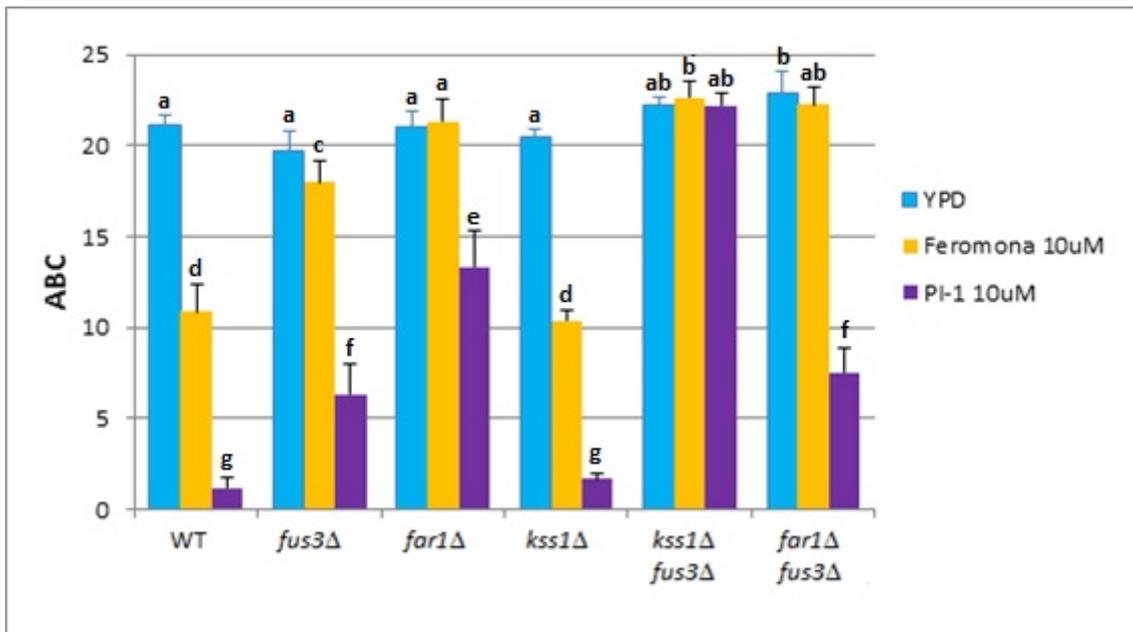


Figura 11. ABC de las cepas crecidas en YPD + H<sub>2</sub>O, en YPD + feromona  $\alpha$  10  $\mu$ M y en YPD + PI-1 10  $\mu$ M durante 24h. n=13 para *far1Δfus3Δ* y *kss1Δfus3Δ*, n=15 para las demás cepas.

Al exponer a la doble mutante *far1Δfus3Δ* a la feromona  $\alpha$  se verificó que su tasa de crecimiento no presentaba diferencias significativas con el crecimiento de la cepa en YPD+H<sub>2</sub>O. Este resultado es predecible pues esta cepa carece del factor que permite que las células detengan su ciclo de reproducción (Chang and Herskowitz, 1990; Peter and Herskowitz, 1994). Cuando se creció la doble mutante en presencia del PI-1 se obtuvo un ABC significativamente menor que el ABC de la condición YPD+H<sub>2</sub>O o YPD+feromona  $\alpha$  (Figura 11). Sorprendentemente, el ABC de *far1Δfus3Δ* con PI-1 también es significativamente menor que el ABC de la mutante simple *far1Δ* con PI-1 (Figura 11). Si se compara la tasa de crecimiento en YPD+PI-1 de *far1Δfus3Δ* con la cepa *fus3Δ* no se obtiene una diferencia significativa (Figura 11). Es decir, el efecto de resistencia a la muerte que la mutante simple *fus3Δ* tiene en presencia del PI-1 predomina sobre el efecto de la mutante simple *far1Δ*, esto se puede traducir en que *FUS3* presenta dominancia epistática sobre *FAR1* (Cordell, 2002). Dicho fenómeno sugiere que existe una vía controlada por las MAPK (Fus3/Kss1) que predomina sobre el papel que juega Far1 cuando el PI-1 activa la ruta de las MAPK.

### 7.5 Verificación de mutaciones de las dobles mutantes

En la Figura 12 se presentan los geles de agarosa con los productos de las PCR realizadas para verificar que el casete de resistencia a antibiótico estuviera insertado en el sitio correcto del genoma. El tamaño del producto de PCR esperado por cada mutación a verificar se muestra en la Tabla 3. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de PCR se muestran en la Tabla 2 del Anexo.

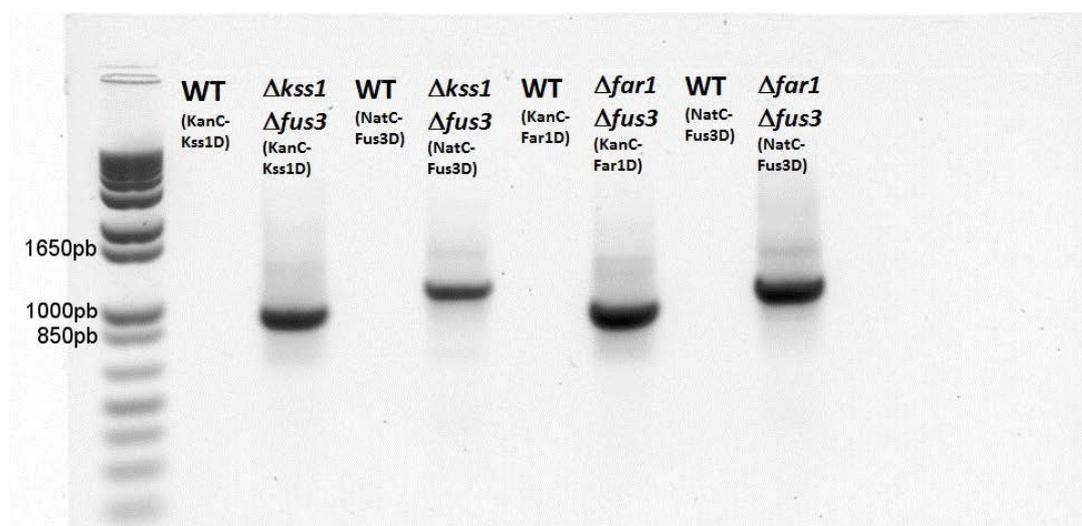


Figura 12. Productos de PCR corridos en gel de agarosa 1%. Se realizaron las reacciones para verificar la inserción del casete *NatMX4* en el sitio del gen *FUS3* y la inserción del casete *KanMX4* en el sitio del gen *FAR1* y del gen *KSS1*. En cada carril se indica el genoma que se utilizó como DNA templado en cada PCR y entre paréntesis los pares de oligonucleótidos.

Tabla 3. Pares de oligonucleótidos utilizados para verificar las mutaciones de las cepas y tamaño esperado del producto de la reacción.

Genotipo verificar	por	Oligonucleótidos utilizados (Fwd, Rvs)	Tamaño esperado del producto
<i>fus3Δ::NatMX4</i>		NatC, Fus3D	1111pb
<i>far1Δ::KanMX4</i>		KanC, Far1 D	984pb
<i>kss1Δ::KanMX4</i>		KanC, Kss1 D	943pb

Los productos obtenidos en las reacciones realizadas con el genoma de las cepas mutante son de la longitud esperada y dicho producto no aparece en las reacciones realizadas con el genoma de levadura silvestre. Estos resultados corroboran el genotipo de las mutantes utilizadas en el presente trabajo.

## 7.6 Evaluación de elementos de la vía del crecimiento filamentoso.

El crecimiento filamentoso en la levadura ocurre cuando hay una disponibilidad limitada de determinados nutrientes (Gimeno *et al.*, 1992; Palecek *et al.*, 2002). Ésta es la única vía reportada en la literatura que comparte la misma cascada de MAPK que la respuesta a la feromona (Ste20, Ste11, Ste7, Fus3/Kss1). El grado de activación de Fus3 y Kss1 es lo que determina la respuesta a la feromona o la respuesta al crecimiento filamentoso, lo cual está definido por el contexto celular (Bardwell *et al.*, 1998). Es decir, mientras que la MAPK predominante en la respuesta a la feromona es Fus3 (Elion *et al.*, 1991), la que predomina en el crecimiento filamentoso es Kss1 (Madhani *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998). A pesar de que ambos procesos requieren de la actividad de las mismas proteínas río arriba de Fus3 y Kss1, se sabe que cada proceso mantiene su especificidad. Se ha sugerido que la predominancia de una ruta sobre la otra depende de una fosforilación sostenida contra una fosforilación transitoria de estas MAPK (Sabbagh *et al.*, 2001). También se ha sugerido que depende de la selectividad dada por proteínas de andamiaje (van Drogen y Peter, 2002)

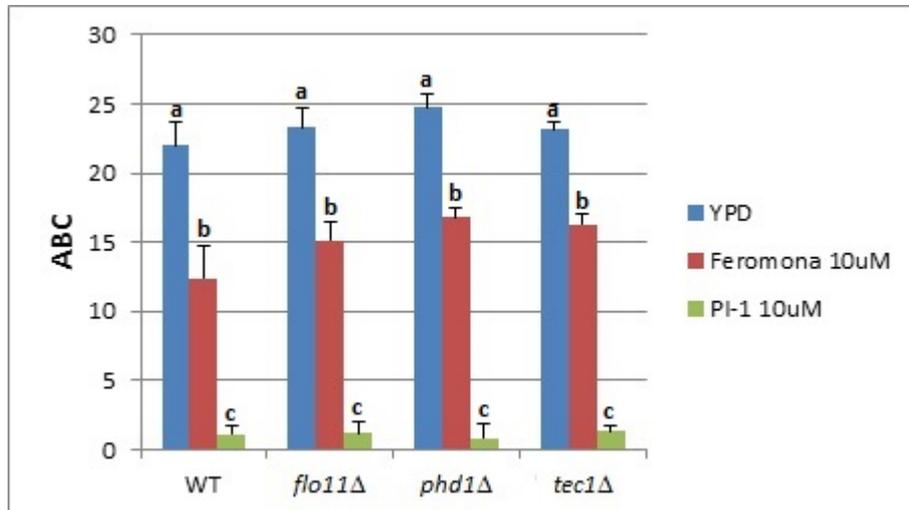


Figura 13. Tasa de crecimiento de mutantes simples que tiene deletados genes indispensables para el crecimiento filamentoso. Se muestra el ABC de las cepas crecidas en YPD + H<sub>2</sub>O, en YPD + feromona  $\alpha$  10 $\mu$ M y en YPD + PI-1 10 $\mu$ M durante 24h. n=6

Si la activación de la vía de las MAPK estuviera activando o desinhibiendo la respuesta del crecimiento filamentoso y este evento fuera responsable de la muerte de las células MATa de *S. cerevisiae*, entonces mutantes que tengan deletados genes

indispensables para el crecimiento filamentosos mostrarían un fenotipo de resistencia a la muerte. Para probar esto se seleccionaron tres mutantes con deleciones en los genes TEC1, PHD1 y FLO11. Tec1 es un factor de transcripción que se une al factor de transcripción Ste12; la activación de la mayoría de los genes del crecimiento filamentosos depende de la unión Tec1-Ste12 (Chou *et al.*, 2006; Madhani y Fink, 1997). Phd1 es un activador transcripcional que regula la expresión de algunos genes de la respuesta del crecimiento filamentosos y se ha observado que la sobreexpresión de este gen induce este tipo de respuesta (Gimeno y Fink, 1994). Finalmente, Flo11 es una focolina cuya transcripción está regulada por Tec1-Ste12 y por Phd1; esta proteína es requerida para la formación de interconexiones fibrosas entre las células durante la respuesta de crecimiento filamentosos (Rupp *et al.*, 1999). Está reportado que la ausencia de alguno de los tres genes descritos previamente evita que las células desarrollen crecimiento filamentosos (Chen y Fink, 2006; Jin *et al.*, 2008). En la Figura 13 se muestran los resultados de los ensayos de crecimiento con las mutantes  $\Delta flo11$ ,  $\Delta phd1$  y  $\Delta tec1$ ; se observa que en presencia de PI-1 ninguna de ellas muestra resistencia a la muerte.

### 7.7 Verificación de mutaciones (crecimiento filamentosos)

En la Figura 14 se presentan los geles de agarosa con los productos de las PCR realizadas para verificar las mutaciones de las tres cepas relacionadas al crecimiento filamentosos. El tamaño del producto de PCR esperado por cada mutación a verificar se muestra en la Tabla 4. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de PCR se muestran en la Tabla 2 del Anexo.

Tabla 4. Pares de oligonucleótidos utilizados para verificar las mutaciones de las cepas y tamaño esperado del producto de la reacción.

Genotipo por verificar	Oligonucleótidos utilizados (Fwd, Rvs)	Tamaño esperado del producto
<i>tec1</i> $\Delta$ ::KanMX4	KanC, Tec1D	982pb
<i>flo11</i> $\Delta$ ::KanMX4	KanC, Flo11D	904pb
<i>phd1</i> $\Delta$ ::KanMX4	KanC, Phd1D	989pb

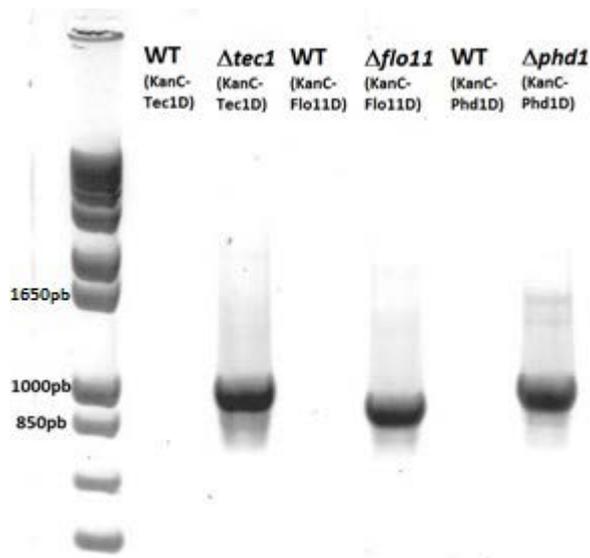


Figura 14. Productos de PCR corridos en gel de agarosa 1% para verificar la correcta inserción del casete KanMX4 en las cepas  $\Delta tec1$ ,  $\Delta flo11$  y  $\Delta phd1$ . En cada carril se indica el genoma que se utilizó como DNA templado en cada PCR y entre paréntesis los pares de oligonucleótidos.

### 7.8 Propuesta de un mecanismo de acción del PI-1

En la literatura no existen reportes de otras vías además de la respuesta a la feromona y del crecimiento filamentoso que estén controladas por la cascada de las MAPK (Ste11, Ste7, Fus3/Kss1), sin embargo los resultados del presente trabajo sugieren que debe existir una vía dependiente de las MAPK que esté involucrada en la muerte inducida por el PI-1.

Tomando en cuenta las relaciones epistáticas que existen entre Kss1-Fus3 y Far1-Fus3 y pudiendo descartar la vía del crecimiento filamentoso como un mecanismo de muerte complementario a la activación de Far1, se construyó un modelo (Figura 15) que puede explicar el fenotipo que las mutantes de la vía de las MAPK presentan al ser expuestas al PI-1. En este modelo se respetan las interacciones reportadas entre las MAPK (Ste11 activa a Ste7 y esta última activa a Fus3 y a Kss1) (Herskowitz, 1995). En este modelo se destaca el hecho de que la presencia de *FUS3* evita que Kss1 presente altos niveles de fosforilación/activación y que, por el contrario, la ausencia de *FUS3* provoca un aumento en la fosforilación/activación de Kss1 (Gartner *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1995; Madhani *et al.*, 1997). Se presume que Far1 sólo puede ser activada por Fus3, pues, a pesar de que se ha reportado que Kss1 es capaz de fosforilar a Far1 (Breitkreutz

*et al.*, 2001), existen reportes que indican que en el contexto de la feromona una mutante nula  $\Delta fus3$  evita por completo el arresto del ciclo celular provocado por Far1 mientras que una mutante nula  $\Delta kss1$  no previene el arresto (Elion *et al.*, 1991). La activación de Far1 es responsable de inducir un mecanismo de muerte en las células, sin embargo, como se mencionó anteriormente, este fenómeno no es responsable de la totalidad de la muerte causada por el PI-1. Se propone que Kss1 y Fus3 son responsables de desencadenar un segundo mecanismo de muerte (complementario al provocado por Far1) mediante la activación o inhibición de un elemento que es denominado “GenX” (debido a que se desconoce su identidad). En este modelo se asume que la tasa de activación/inhibición del “GenX” es mayor por parte de Kss1 que por parte de Fus3. Finalmente, se sabe que cuando Far1 está activo establece una unión con el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Cdc24 (Eserink, 2010); este complejo se dirige a la membrana y provoca el intercambio de GDP por GTP de la GTPasa Cdc42 activando de esta manera a Ste20 (Moskow *et al.*, 2000). La activación de Ste20 promueve a su vez la de Ste11, es decir, Far1 está promoviendo un ciclo de retroalimentación positiva de la vía de las MAPK al liberar a Cdc24.

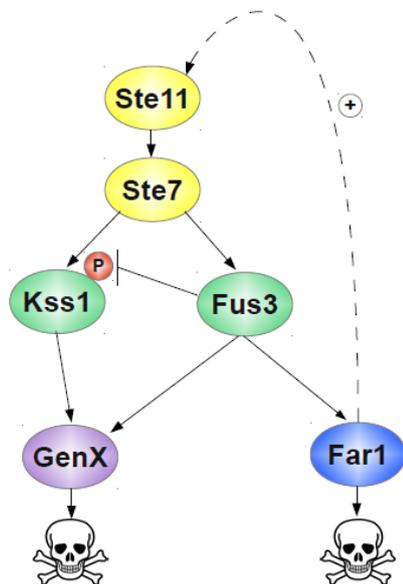


Figura 15. Modelo de interacciones genéticas que explica la manera en que la vía de las MAPK desencadenada por el PI-1 puede estar activando dos vías que conducen a las células a la muerte.

En el contexto de una cepa silvestre en presencia del PI-1, Fus3 está evitando que Kss1 se fosforile/active por lo que este último es incapaz de activar/inhibir al GenX.

Sin embargo, Fus3 está activando los dos mecanismos de muerte exitosamente mediante la activación de Far1 y la activación/inhibición del GenX. Far1 además contribuye al mantenimiento de la señalización de las MAPK mediante su ciclo de retroalimentación positiva. Esto se traduce en una muerte total de la población celular expuesta al PI-1.

De acuerdo a este modelo, si Kss1 se quita del sistema no habrá ninguna diferencia fenotípica con la cepa silvestre en presencia de PI-1, ya que normalmente la activación de Kss1 está siendo reprimida por Fus3, lo cual coincide con los resultados de la mutante  $\Delta kss1$ . Por otro lado, en la mutante nula  $\Delta fus3$  en presencia de PI-1 no se evita la fosforilación de Kss1, por lo tanto, esta última activa/inhibe al GenX. Sin embargo, Far1 no puede ser activado por Fus3 entonces sólo uno de los dos mecanismos de muerte está presente y no hay retroalimentación positiva de la vía de las MAPK, lo que se traduce en una muerte parcial de la población celular. Si Far1 es deletado no puede activar el mecanismo de muerte que le corresponde ni retroalimentar la vía de las MAPK. No obstante, el segundo mecanismo desencadenado por el GenX está presente ya que Fus3 está activa. Debido a que se estableció que el GenX tiene una menor tasa de activación/inhibición por Fus3 que por Kss1 entonces hay una menor activación del mecanismo de muerte en las mutantes  $\Delta far1$  que en las mutantes  $\Delta fus3$ , lo cual se refleja en el fenotipo de estas mutantes cuando son expuestas al PI-1. En la doble mutante  $\Delta kss1\Delta fus3$  se están abatiendo los dos mecanismos de muerte ya que no se cuenta con ninguna de las dos MAPK capaces de desencadenarlos. De acuerdo al modelo, se observa una resistencia completa a la muerte provocada por el PI-1 en estas cepas. En cambio, la doble mutante  $\Delta far1\Delta fus3$  tiene el mismo fenotipo que la mutante simple  $\Delta fus3$  pues por un lado se evita la inhibición de la fosforilación/activación de Kss1 y por otro se impide activar el mecanismo de muerte desencadenado por Far1.

Con la intención de identificar al GenX se hizo una búsqueda en la base de datos de BIOGRID para identificar a los genes que se han reportado que presentan algún tipo de interacción tanto con *FUS3* como con *KSS1*. De esta búsqueda se obtuvo una lista con 49 genes. Para filtrar esta lista se consideró que Fus3 y Kss1 activen el mecanismo de muerte dependiente del GenX mediante la activación o inhibición del este último, es decir, la activación del GenX por arriba de los niveles basales o la reducción de su actividad por debajo de los niveles basales puede comprometer la viabilidad celular. Con base a esto se buscó entre la lista del 49 interactores de Fus3 y Kss1 los genes que presentaran una reducción en la viabilidad celular o en el crecimiento vegetativo a causa

de su sobreexpresión o de su delección. La lista de los 30 genes que cumplen dicho fenotipo se muestra detalladamente en la Tabla 5.

Llama la atención que *BEM1* se encuentra dentro de esta lista, pues la ausencia de este gen protege parcialmente de la muerte inducida por el PI-1 (Figura 8), lo que significa que la activación de Bem1 por Fus3 o Kss1 podría estar desencadenando un mecanismo de muerte. La sobreexpresión de Bem1 podría validar esta hipótesis, pero a la fecha no se ha reportado el fenotipo de una cepa sobreproductora de Bem1. Por lo tanto, no se puede suponer que la hiperactivación de esta proteína por parte de las MAPK río abajo, sino permitir la movilización del citoesqueleto de actina para formar la estructura de “shmoo” (Eserink, 2010). Es decir, Bem1 es necesaria para la adecuada transducción de la señal de la feromona que permite la movilización del citoesqueleto (Madden y Synder, 1998). Es posible que bajo el contexto del PI-1, Fus3 y Kss1 estén hiperactivando a Bem1 causando de esta manera defectos en las modificaciones morfológicas de la célula y que la combinación de este fenómeno con el detenimiento del ciclo celular causado por Far1 esté conduciendo a la muerte de las células MATa de *S. cerevisiae*.

Tabla 5. Se enlistan los genes que presentan algún tipo de interacción con Fus3 y con Kss1 y cuya ausencia o sobreexpresión compromete la viabilidad y/o crecimiento del organismo.

Gen	ORF	Sobreexpresión			Mutante Nula			Participa en vía de la feromona
		No viable	Viabilidad: reducida	Crecimiento vegetativo:	No viable	Viabilidad: reducida	Crecimiento vegetativo:	
<i>ACT1</i>	YFL039C	X		detenido, tasa reducida	X			
<i>ADO1</i>	YJR105W						tasa reducida	
<i>AKR1</i>	YDR264C			reducido, tasa reducida			tasa reducida	X
<i>ASK10</i>	YGR097W			tasa reducida				
<i>BCK2</i>	YER167W			tasa reducida				
<i>BDF2</i>	YDL070W			tasa reducida				

<i>BEM1</i>	YBR200W						reducido, tasa reducida	X
<i>BUB1</i>	YGR188C			tasa reducida		X	tasa reducida	
<i>BUD27</i>	YFL023W			reducido, tasa reducida	X		reducido, tasa reducida	
<i>CDC14</i>	YFR028C			tasa reducida	X			
<i>CDC25</i>	YLR310C				X			
<i>CKB1</i>	YGL019W			tasa reducida				
<i>CLN3</i>	YAL040C			tasa reducida				
<i>DIG1</i>	YPL049C						anormal, tasa reducida	X
<i>GPA2</i>	YER020W			tasa reducida			tasa reducida	
<i>HOG1</i>	YLR113W					X	detenido, tasa reducida	
<i>MCM2</i>	YBL023C				X			
<i>MIG1</i>	YGL035C			reducido, tasa reducida				
<i>PAC10</i>	YGR078C						reducido, tasa reducida	
<i>RCK1</i>	YGL158W			tasa reducida				
<i>RGC1</i>	YPR115W			tasa reducida				
<i>RPD3</i>	YNL330C						tasa reducida	
<i>RPN6</i>	YDL097C				X			
<i>SAS10</i>	YDL153C			reducido	X			
<i>SNF1</i>	YDR477W						ausente, tasa reducida	
<i>STE12</i>	YHR084W	X		tasa reducida				X
<i>THP2</i>	YHR167W			tasa reducida			reducido, tasa reducida	
<i>UBP10</i>	YNL186W			reducido, tasa reducida			reducido	
<i>UBP9</i>	YER098W			tasa reducida				
<i>UPC2</i>	YDR213W			reducido				

La presencia de fenotipos que comprometen la viabilidad está marcada con una "X" y en el caso del crecimiento vegetativo se especifica el tipo de defecto que presentan las mutantes.

## 8. Conclusiones y Perspectivas

Se comprobó que el mecanismo celular desencadenado por el PI-1 que provoca la muerte de las levaduras necesita de la activación de la vía de la feromona y es totalmente dependiente de la presencia de las dos MAPK Fus3 y Kss1. Debido a que Far1 no es responsable de la totalidad de la muerte de las células es posible que las MAPK Fus3 y Kss1 estén promoviendo un segundo mecanismo de muerte. Los resultados obtenidos a partir de este trabajo sugieren que el PI-1 puede estar causando la hiperactivación de Bem1 por parte de Fus3 o Kss1 y esta hiperactivación puede ser responsable de la muerte de la levadura. Esto implicaría que la combinación del detenimiento del ciclo celular (causado por la activación de Far1) con defectos en la movilización del citoesqueleto de actina (causado por la hiperactivación de Bem1) conduce a las células MATa de *S. cerevisiae* a la muerte.

Para probar esta hipótesis es preciso evaluar a la doble mutante  $\Delta bem1 \Delta far1$  en presencia del PI-1 esperando una resistencia completa de esta cepa a la muerte. Si no se obtuviera el resultado deseado con esta cepa se pueden encontrar entre los demás interactores de Fus3 y Kss1 otras opciones que puedan explicar satisfactoriamente la manera en que el detenimiento del ciclo celular puede ocasionar la muerte de las levaduras al combinarse con otro proceso celular. Con base en estos resultados se podría validar mediante Western Blot la hiperactivación de Bem1 o de la proteína codificante del GenX.

Los resultados de este trabajo muestran que la ruta de activación de las MAPK inducida por PI-1 es diferente a la inducida por la feromona alfa en *S. cerevisiae*. Estos resultados confirman las observaciones iniciales de nuestro grupo sobre las propiedades emergentes de los péptidos Iztli (Rodríguez Plaza *et al.*, 2012). Estas propiedades emergentes podrían ser consecuencia de que el PI-1 esté actuando de forma independiente a la vía de las MAPK y que esta actividad altere la señalización canónica de la feromona en *S. cerevisiae*. De acuerdo a resultados reportados de nuestro grupo (Rodríguez Plaza *et al.*, 2014), el PI-1 es capaz de internalizarse en células MATa de forma independiente a la endocitosis del receptor Ste2; esta internalización podría causar una respuesta celular que altere la vía canónica de señalización de la feromona. Queda por investigar los blancos intracelulares de PI-1 para entender cómo estos cambios logran alterar la señalización canónica de la feromona.

## 9. Referencias

Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. **Chemotherapy targeted to tumor vasculature.** *Curr Opin Oncol.* 1998, 10: 560–565.

Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y. **Ultrastructural Analysis of the Autophagic Process in Yeast: Detection of Autophagosomes and Their Characterization.** *J Cell Biol.* 1994, 124: 903–913.

Bhalla US e Iyengar R. **Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways.** *Science.* 1999, 283: 381-387.

Bardwell L. **A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway.** *Peptides.* 2005, 26:339-50

Bardwell L, Cook JG, Zhu-Shimoni JX, Voora D, Thorner J. **Differential regulation of transcription: repression by un-activated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95:15400–15405.

Blackwell E, Halatek IM, Kim HJ, Ellicott AT, Obukhov AA, Stone DE. **Effect of the pheromone-responsive G(alpha) and phosphatase proteins of *Saccharomyces cerevisiae* on the subcellular localization of the Fus3 mitogen-activated protein kinase.** *Mol Cell Biol.* 2003, 23:1135-50.

Blumer KJ, Reneke JE, Thorner J. **The STE2 gene product is the ligand-binding component of the a-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.* 1988, 263: 10836-10842.

Blumer KJ y Thorner J. **Beta and gamma subunits of a yeast guanine nucleotide-binding protein are not essential for membrane association of the alpha subunit but are required for receptor coupling.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87(11):4363-7

Breitkreutz A, Boucher L, Tyers M. **MAPK specificity in the yeast pheromone**

**response independent of transcriptional activation.** *Curr Biol.* 2001, 11:1266-71.

Breitkreutz A, Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz BJ, Stark C, Liu G, Ahn J, Dewar-Darch D, Reguly T, Tang X, Almeida R, Qin ZS, Pawson T, Gingras AC, Nesvizhskii AI, Tyers M. **A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast.** *Science.* 2010, 328: 1043-6.

Burkholder AC y Hartwell LH. **The yeast alpha-factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the *STE2* gene.** *Nucleic Acids Res.* 1985, 13:8463-75.

Chang F y Herskowitz I. **Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: *FARI* is an inhibitor of a G1 cyclin, *CLN2*.** *Cell.* 1990, 63:999-1011.

Chen H y Fink GR. **Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols.** *Genes Dev.* 2006, 20:1150-61

Choi KY, Satterberg B, Lyons DM, Elion EA. **Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*.** *Cell.* 1994, 78:499-512.

Chou S, Lane S, Liu H. **Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol.* 2006, 26:4794-805.

Clark KL y Sprague GF Jr. **Yeast pheromone response pathway: characterization of a suppressor that restores mating to receptorless mutants.** *Mol Cell Biol.* 1989, 9:2682-94.

Cordell HJ. **Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans.** *Human Molecular Genetics.* 2002, 11: 2463-8.

Dohlman HG y Thorner J. **RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins.**

*J Biol Chem.* 1997, 272:3871-4

Dowell SJ, Bishop AL, Dyos SL, Brown AJ, Whiteway MS. **Mapping of a yeast G protein betagamma signaling interaction.** *Genetics.* 1998, 150:1407-17

Dyczkowski J y Vingron M. **Comparative analysis of cell cycle regulated genes in eukaryotes.** *Genome Inform.* 2005, 16:125-31.

Elion EA, Brill JA, Fink GR. **FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88:9392-6

Elion EA, Satterberg B, Kranz JE. **FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1.** *Mol Biol Cell.* 1993, 4:495-510

Ellerby HM, Bredesen DE, Fujimura S, John V. **Hunter-killer peptide (HKP) for targeted therapy.** *J Med Chem.* 2008, 51: 5887-92.

Enserink JM, Kolodner RD. **An overview of Cdk1-controlled targets and processes.** *Cell División.* 2010, 5:11.

Errede B, Gartner A, Zhou Z, Nasmyth K, Ammerer G. **MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 in vitro.** *Nature.* 1993, 362:261-4.

Gimeno CJ y Fink GR. **Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development.** *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14:2100-2112.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. **Unipolar cell divisions in the yeast *S.cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS.** *Cell.* 1992, 68: 1077–1090.

Gartner A, Jovanović A, Jeoung DI, Bourlat S, Cross FR, Ammerer G. **Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve**

**inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, *in vivo*.** *Mol Cell Biol.* 1998, 18:3681-91.

Gartner A, Nasmyth K, Ammerer G. **Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of *FUS3* and *KSSI*.** *Genes Dev.* 1992, 6: 1280–1292

Guo M, Aston C, Burchett SA, Dyke C, Fields S, Rajarao SJ, Uetz P, Wang Y, Young K, Dohlman HG. **The yeast G protein alpha subunit *Gpa1* transmits a signal through an RNA binding effector protein *Scp160*.** *Mol Cell.* 2003; 12(2):517-24

Hagen DC, McCaffrey C, Sprague GF Jr. **Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone, a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83:1418-1422.

Hartwell LH. **Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone.** *J Cell Biol.* 1980, 85:811-22.

Herskowitz I. **MAP kinase pathways in yeast: for mating and more.** *Cell.* 1995, 80:187-197.

Herskowitz I. **Cellular differentiation, cell lineages, and transposable genetic cassettes in yeast.** *Curr Top Dev Biol.* 1983, 18:1-14.

Holly SP y Blumer KJ. **PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Biol.* 1999, 147:845-56

Jan AK y Kiel W. **Autophagy in unicellular eukaryotes.** *Phil. Trans. R. Soc.* 2010, 365: 819-830

Jin R, Dobry CJ, McCown PJ, Kumar A. **Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression.** *Mol Biol Cell.* 2008, 19:284-96.

Jin Z, Dicker DT, El-Deiry WS. **Enhanced sensitivity of G1 arrested human cancer cells suggests a novel therapeutic strategy using a combination of simvastatin and TRAIL.** *Cell Cycle*. 2002, 1:82-9.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. **How antibiotics kill bacteria: from targets to networks.** *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 423–435.

Konopka JB y Fields S. **The pheromone signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1992, 62:95-108.

Kraft C, Reggiori F, Peter M. **Selective types of autophagy in yeast.** *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1793:1404-12.

Krick R, Mühe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, Eskelinen EL, Thumm M. **Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits.** *Autophagy*. 2009, 5:270-2.

Kurjan J. **Pheromone response in yeast.** *Annu. Rev. Biochem.* 1992, 61:1097- 1129.

Leeuw T, Fourest-Lieuvin A, Wu C, Chenevert J, Clark K, Whiteway M, Thomas DY, Leberer E. **Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin.** *Science*. 1995, 270:1210-3

Li X, Gerber SA, Rudner AD, Beausoleil SA, Haas W, Villén J, Elias JW, Gygi SP. **Large-Scale Phosphorylation Analysis of  $\alpha$ -Factor-Arrested *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Proteome Research*. 2007, 6: 1190-1197

Ma D, Cook JG, Thorner J. **Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway.** *Mol Biol Cell*. 1995, 6:889-909

Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. **Can autophagy promote longevity?** *Nat Cell Biol*. 2010, 12:842-6.

Madden K y Snyder M. **Cell polarity and morphogenesis in budding yeast.** *Annu Rev Microbiol.* 1998, 52:687-744

Madhani HD y Fink GR. **Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling.** *Science.* 1997, 275:1314-7.

Madhani HD, Styles CA, Fink GR. **MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation.** *Cell.* 1997, 91:673-84.

Maini PK. **Using mathematical models to help understand biological pattern formation.** *C. R. Biologies.* 2004, 327: 225-234

Mast FD, Ratushny AV, Aitchison JD. **Systems cell biology.** *J Cell Biol.* 2014, 206:695-706.

May AI, Devenish RJ, Prescott M. **The Many Faces of Mitochondrial Autophagy: Making Sense of Contrasting Observations in Recent Research.** *International Journal of Cell Biology.* 2012

Moskow JJ, Gladfelter AS, Lamson RE, Pryciak PM, Lew DJ. **Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol.* 2000, 20: 7559–7571

Muller EM, Mackin NA, Erdman SE, Cunningham KW. **Fig1p facilitates Ca<sup>2+</sup> influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* 2003, 278:38461-9.

Neiman AM y Herskowitz I. **Reconstitution of a yeast protein kinase cascade *in vitro*: activation of the yeast MEK homologue *STE7* by *STE11*.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91:3398-402

Otto SP y Feldman MW. **Deleterious mutations, variable epistatic interactions, and the evolution of recombination.** *Theor Popul Biol.* 1997, 51:134-47.

Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ. **Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth.** *Microbiology*. 2002, 148:893-907.

Peter M, Gartner A, Horecka J, Ammerer G, Herskowitz I. ***FARI* links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast.** *Cell*. 1993, 73:747-60.

Peter M, Herskowitz I. **Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1.** *Science*. 1994, 265:1228-31.

Plesniak LA, Parducho JJ, Ziebart A, Geierstanger BH, Whiles JA, Melacini G, Jennings PA. **Orientation and helical conformation of a tissue-specific hunter-killer peptide in micelles.** *Protein Sci*. 2004, 13:1988-96.

Pruyne D y Bretscher A. **Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states.** *J Cell Sci*. 2000, 113:365-75.

Pryciak PM y Huntress FA. **Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway.** *Genes Dev*. 1998, 12:2684-97

Ramezani-Rad M. **The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast.** *Curr Genet*. 2003, 43:161-70.

Rodriguez Plaza JG. **Caracterización de la actividad y estructura de los péptidos Troyanos.** Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, UNAM. México D.F., 2009, pp. 50.

Rodriguez Plaza JG, Morales-Nava R, Diener C, Schreiber G, Gonzalez ZD, Lara Ortiz MT, Ortega Blake I, Pantoja O, Volkmer R, Klipp E, Herrmann A, Del Rio G. **Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin.** *J Biol Chem*. 2014, 289:14448-57

Rodríguez Plaza JG, Villalón Rojas A, Herrera S, Garza-Ramos G, Torres Larios A, Amero C, Zarraga Granados G, Gutiérrez Aguilar M, Lara Ortiz MT, Polanco Gonzalez C, Uribe Carvajal S, Coria R, Peña Díaz A, Bredesen DE, Castro-Obregon S, del Rio G. **Moonlighting Peptides with Emerging Function.** *PLoS One.* 2012, 7: e40125

Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. **Autophagy and aging.** *Cell.* 2011, 146:682-95.

Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G. **MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene.** *EMBO J.* 1999, 18:1257-69.

Sabbagh W, Flatauer LJ, Bardwell AJ, Bardwell L. **Specificity of MAP Kinase Signaling in Yeast Differentiation Involves Transient versus Sustained MAPK Activation.** *Mol Cell.* 2001, 8: 683–691.

Saito H y Posas F. **Response to hyperosmotic stress.** *Genetics.* 2012, 192:289-318.

Schandel KA y Jenness DD. **Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor.** *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14: 7245-7255

Severin FF, Hyman AA. **Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*.** *Curr Biol.* 2002, 12:R233-5.

Shai Y. **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999, 1462: 55-70.

Simon C, Tardivo L, Tam S, Svrtkapa N, Fan C, de Smet AS, Motyl A, Hudson ME, Park J, Xin X, Cusick ME, Moore T, Boone C, Snyder M, Roth FP, Barabási AL, Tavernier J, Hill DE, Vidal M. **High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network.** *Science.* 2008, 322:104-10.

Sprague GF y Thorner JW. **Pheromone response and signal transduction during the**

**mating process of *Saccharomyces cerevisiae*.** In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. E. W. Jones, J. R. Pringle, J. R. Broach, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.1992, pp. 657-744.

Stötzler D, Kiltz HH, Duntze W. **Primary Structure of  $\alpha$ -Factor Peptides from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eur. J. Biochem.* 1976, 69: 397-400.

Strathern, J, Hicks J, Herskowitz I. **Control of cell type in yeast by the mating type locus: the al-a2 hypothesis.** *J. Mol. Biol.* 1981, 147: 357-372.

Tyers M y Futcher B. **Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes.** *Mol Cell Biol.* 1993, 13:5659-69.

Uttenweiler A, Schwarz H, Neumann H, Mayer A. **The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy.** *Mol Biol Cell.* 2007, 18:166-75.

van Drogen F y Peter M. **MAP Kinase Cascades: Scaffolding Signal Specificity Dispatch.** *Current Biology.* 2002, 12:53–55.

Waldrop, M. Mitchell. **Complexity. The Emerging Science at the Edge of Order and Chaos.** Touchstone. USA, NY, 1992.

Winge O y Roberts C. **A gene for diploidization on yeast.** *C R Trav Lab Carlsberg Ser Physiol.* 1949, 24:341-346

Wu C, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M. **Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Biol Cell.* 1999, 10:2425-40.

Wu C, Whiteway M, Thomas DY, Leberer E. **Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* 1995, 270:15984-

92.

Yorimitsu T y Klionsky DJ. **Autophagy: molecular machinery for self-eating.** *Cell Death Differ.* 2005, 2:1542-52.

Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, Hirozane-Kishikawa T, Gebreab F, Li N, Simonis N, Hao T, Rual JF, Dricot A, Vazquez A, Murray RR, Zhang NN, Dudgeon DD, Paliwal S, Levchenko A, Grote E, Cunningham KW. **Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones.** *Mol Biol Cell.* 2006, 17: 3409-22.

## 10. Anexo

### Péptidos Iztli y feromona $\alpha$

Tabla 1. Se muestran las secuencias de las 4 versiones sintetizadas de péptidos Iztli y la secuencia del péptido de las feromona  $\alpha$ .

Nombre del péptido	Secuencia
Péptido Iztli-1 (PI-1)	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY
Péptido Iztli-2 (PI-2)	RRLKDFWHWLQLKPGQPMY
Péptido Iztli-3 (PI-3)	KFWKRFWHWLQLKPGQPMY
Péptido Iztli-4 (PI-4)	RKLQKFWHWLQLKPGQPMY
Feromona $\alpha$	WHWLQLKPGQPMY

### Oligonucleótidos para PCR

#### *Verificación de mutaciones*

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para verificar el genotipo de las cepas mutantes.

Nombre oligonucleótido	Secuencia 5'→3'
Kan C Fwd	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
Nat C Fwd	TACCAACAAATACAAGCCTACA
Ste11D Rvs	ATCTTACTTGATTTTATTCCAGGGG
Ste50D Rvs	CATTATCCAAACATGAAAATAAGGC
Ste7D Rvs	TGGTTGTGGCATAAAAATAAAGAAT
Ste5D Rvs	GAATGAAAAGCAATATACGCAAGAT
Fus3D Rvs	AATCACTACTTTGGTAGTTTGACGC
Kss1D Rvs	GTGTTGATATCGCCTCTTTGATTAC
Far1D Rvs	TGCTACAACCATGTTGGTATAATTG
Fig1D Rvs	AAATTTCTGGAGCTTTGTTACATTG
Bem1D Rvs	CATGCATTATGATTGAGTGGAAATA
Tec1D Rvs	GATGTGTATTGGCTGGTTTACTTCT
Flo11D Rvs	CCAATACTACCGGTACTTGTTCCTTG
Phd1D Rvs	ATGTTTCAAAAAGGCATCATATTGT

### *Construcción de mutantes dobles*

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para crear el producto con el que se transformaron mutantes simples con el objetivo de crear mutantes dobles.

<b>Nombre oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>
<b>Delección FUS3 Fwd</b>	CTTTCTTCTAATAGCTAGTTCGTTTGA ACTACAAGGAAATAA GGCAGAGAACATGGAGGCC CAGAATACCCT
<b>Delección FUS3 Rvs</b>	CAGCGGCTAATACGTATGT CATATGTACATATGTATATGTGTA CGTATATCAGTATAGCG ACCAGCATTAC

### **Preparación de soluciones**

#### *Medios de cultivo*

##### *YPD*

- 1% Extracto de levadura
- 2% Peptona
- 2% Glucosa

#### *Extracción de DNA*

##### Buffer STES

- 0.2M Tris-HCl (pH 7.6)
- 0.5M NaCl
- 0.1% SDS
- 0.01M EDTA

Almacenar a temperatura ambiente

##### Buffer TE

- 10M Tris-HCl (pH 7.6)
- 1mM EDTA

Almacenar a temperatura ambiente

## *Electroforesis DNA*

### Buffer SB 50X (pH=8.0-8.5)

250mM      Borato de sodio decahidratado

500mM      Hidróxido de sodio

Ajustar pH con ácido bórico. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de usar diluir a 1X y mantener a 4°C

### Gel de agarosa 1%

1g      Agarosa

80ml    Buffer SB 1X

Aforar a 100ml, calentar con agitación hasta que la mezcla se torne transparente.

Agergar 5µl de Bromuro de etidio (10mg/ml) y revolver.

Verter el líquido en el molde y esperar 20min a que gelifique.