



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Péptido Iztli-1, un péptido antibiótico de  
células en arresto

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Vladimir Juárez Arellano

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Gabriel del Río Guerra  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Francisco Torres Quiroz  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Dr. Jorge Vázquez Ramos  
FACULTAD DE QUIMICA .

Ciudad de México: Febrero, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*A mis padres Esteban Juárez y Agripina Arellano, por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de vida, a mi hermano Esteban Iván Juárez, un gran ejemplo de perseverancia y desarrollo profesional y, no menos importante, a toda mi familia, pilar de mi desarrollo.*

*Mi contribución a la batalla de Gilgamesh...*

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la grata y sabia dirección del Dr. Gabriel del Río Guerra en el laboratorio 205-Oriente del Departamento de Bioquímica en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La investigación fue realizada con apoyos económicos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB-252316), mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (Proyecto IN208817).

Quedo en deuda con la Dra. María Teresa Lara Ortíz, por la ayuda técnica durante la elaboración de este trabajo.

Agradezco el apoyo de mis compañeros de laboratorio 205-oriente, por las experiencias compartidas en el presente proyecto.

Asimismo, extiendo un especial agradecimiento al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por su invaluable apoyo.

Y reconozco la ayuda brindada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en los estudios realizados.



# ABSTRACT

The World Health Organization has stated that microbial resistance to commonly used antibiotics is a global health problem. Existing antibiotics act on dividing cells, so they do not have a toxic effect on cells that stop their cell cycle, such as microbial spores. Identifying antibiotics against arrested cells in their cell cycle represents a novel strategy in the elimination of microbial populations as well as to understand the mechanisms of cell death involved in such a cellular state.

The peptide Iztli 1, PI-1 is able to induce death in bacterial cells or yeast cells that express the  $\alpha$ -pheromone receptor and has the ability to damage the mitochondria of target cells after being internalized (Rodríguez Plaza, Villalón Rojas *et al.*, 2012), although it is reported that the death induced by PI-1 in MAT $\alpha$  cells does not depend on the damage caused to the mitochondria.

The mechanism by which PI-1 MAT $\alpha$  to yeast cells expressing the pheromone receptor  $\alpha$  (MAT $\alpha$  cells of *Saccharomyces cerevisiae*) is unknown. The characterization of the mechanism of action of Peptide Iztli-1 (PI-1), is the main objective of this work. When testing the viability in MAT $\alpha$  cells carrying null mutants of genes involved in the pheromone  $\alpha$  signaling pathway, I have observed that these are necessary for PI-1-induced death because they prevent cell cycle arrest. When isolating MAT $\alpha$  cells (lacking the  $\alpha$  pheromone receptor) by elutriation in the G<sub>1</sub> phase and exposing them to PI-1 do not observe cell death; but those same MAT $\alpha$  cells stopped in their cell cycle, by saline stress or various chemical disruptors of the cell cycle, they were susceptible to death induced by PI-1, confirming the relevance of cell cycle arrest in PI-1 induced death.

A variant of PI-1 incapable of activating the  $\alpha$ -pheromone pathway was generated, and consequently it does not induce cell cycle arrest in MAT $\alpha$  cells. The use of this PI-1 variant can kill MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  cells as long as they are stopped in their cell cycle. The null mutant of the FIG1 gene prevents death induced by PI-1 in MAT $\alpha$

cells even if the cells have been stopped in the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase, which suggests that their mechanisms of action are related to the mechanism of death and not in preventing the arrest of the cell cycle. In addition, PI-1 protein interactors were identified in both yeast (MATa *S. cerevisiae*) and human (HEK293) to evaluate possible common targets of action between both organisms. Our results suggest that PI-1 acts through a different mechanism of action in yeast and in human.

# RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud ha declarado que la resistencia microbiana a los antibióticos de uso común es un problema de salud mundial. Los antibióticos existentes actúan en células en división, por lo que no tienen efecto tóxico sobre las células que detienen su ciclo celular, tales como esporas microbianas. Por ello, identificar antibióticos efectivos contra células detenidas en su ciclo celular representa una estrategia novedosa en la eliminación de poblaciones microbianas, así como la posibilidad de entender los mecanismos de muerte celular involucrados en tal proceso.

El péptido Iztli 1, PI-1 es capaz de inducir muerte en células de bacteria o células de levadura que expresan el receptor de la feromona  $\alpha$ , y tiene la habilidad de dañar a las mitocondria de las células blanco después de ser internalizado (Rodríguez Plaza, Villalon Rojas et al. 2012), aunque se reporta que la muerte inducida por PI-1 en células MAT $\alpha$  no depende del daño causado a la mitocondria.

El mecanismo mediante el cual el PI-1 induce muerte en células de levadura que expresan el receptor de la feromona  $\alpha$  (células MAT $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*) es desconocido, por lo que la caracterización del mecanismo de acción de PI-1 es el objetivo principal de este trabajo. Al ensayar la viabilidad en mutantes nulas de genes involucrados en la vía de señalización de la feromona  $\alpha$ , se comprobó que estos genes son necesarios para la muerte inducida por PI-1, debido a que evitan la detención del ciclo celular. Por otro lado, al aislar células MAT $\alpha$  (carentes del receptor de la feromona  $\alpha$ ) por elutriación en la fase G<sub>1</sub>, y exponerlas a PI-1, no fueron susceptibles al efecto de muerte; en cambio, cuando las células MAT $\alpha$  detenidas en su mayoría en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, por estrés salino o diversos disruptores químicos del ciclo celular, fueron susceptibles a la muerte inducida por PI-1, se confirmó la relevancia de la detención del ciclo celular en la muerte inducida por PI-1.

Se generó una variante del PI-1 incapaz de activar la vía de la feromona  $\alpha$ , y que, como consecuencia, no induce la detención del ciclo celular en células MATa. El uso de esta variante del PI-1 puede inducir muerte en células MATa y MAT $\alpha$  siempre y cuando estén detenidas en su ciclo celular. La mutante nula del gene *FIG1* evita la muerte inducida por PI-1 en células MATa, incluso si las células se encuentran detenidas en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> (fase en donde la célula se encuentra mas protegida a estímulos externos), lo cual sugiere que su mecanismo de acción está relacionado con el mecanismo de muerte y no con prevenir la detención del ciclo celular. Además, se identificaron los interactores proteicos de PI-1 tanto en levadura (MATa *S. cerevisiae*) como en humano (HEK293) para evaluar posibles blancos comunes de acción entre ambos organismos. Así, nuestros resultados sugieren que PI-1 actúa mediante un mecanismo de acción diferente en levadura y en humano.

# 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)
PI	Péptido Iztli
PI-1	Péptido Iztli-1
PI-1-CO-NH <sub>2</sub>	Péptido Iztli-1 con modificación en el camino terminal
YPD	Medio de cultivo completo para levadura (Yeast extract/Peptone/Dextrose)



# ÍNDICE

ABSTRACT	III
RESUMEN	V
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Genes que confieren resistencia contra el Péptido Iztli-1	5
Genes implicados en la vía de las MAPK's confieren resistencia contra el Péptido Iztli-1	6
Efecto de PI-1 en el crecimiento de células MATa en medios respiratorios y fermentativos	8
Evaluación del efecto tóxico de la variante de PI-1 que no activa la vía de la feromona $\alpha$	9
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
METODOLOGÍA	13
Cepas	13
Péptidos	14
Ensayos de crecimiento	15
Ensayos de viabilidad con FUN1	15
Efecto de PI-1 en el crecimiento de cepas varias de <i>S. cerevisiae</i>	16
Arresto en la fase G <sub>1</sub> del ciclo celular de la cepa Mata:hog1 $\Delta$ por estrés hiperosmótico	16
Determinación de la viabilidad celular en células tratadas con PI-1 y arrestadas químicamente	17
Ensayo de interacción de proteínas con PI-1 en células humanas y de levadura	17
Análisis del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i>	18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
PI-1 induce muerte en células de levadura detenidas en su ciclo celular	19
La mutante nula de FIG-1 protege de la muerte inducida por PI-1, por un mecanismo independiente a la vía de la feromona	22
Identificación de interactores protéicos de PI-1 en <i>S. cerevisiae</i> y HEK293	25
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS	38
APÉNDICE I	39
APÉNDICE II	63
Profacgen Raw Data <i>S. cerevisiae</i>	63
Profacgen Raw Data HEK293 ICE III-2	66
ANEXO	68
REFERENCIAS	75



# INTRODUCCIÓN

La identificación de nuevos antibióticos ha promovido mejoras en nuestro conocimiento de distintos mecanismos celulares y, como consecuencia, en la calidad de salud de la población. Los procesos fisiológicos altamente conservados de división celular, diferenciación y muerte, podrían ser considerados como los tres pilares que sustentan el ciclo de la vida, formando una intrincada red de regulación de la homeostasis de los seres vivos.

La desregulación de los procesos primordiales de la división celular y la muerte celular, es la causa de innumerables enfermedades como el cáncer, infecciones y desórdenes neurodegenerativos; este campo de estudio involucra aspectos de regulación de suma complejidad dentro de la célula, lo cual requiere de un abordaje holístico para poder desentrañar los mecanismos que los regulan.

Un abordaje de esta problemática es el diseño de moléculas polifarmacológicas, con propiedades que no pueden ser explicadas a partir de la suma de las características de sus componentes y propiedades emergentes. Dentro de los sistemas biológicos existen innumerables ejemplos de propiedades emergentes, desde la relación de estructura y función de las proteínas, hasta ecosistemas completos como el mismo planeta.

Las características del péptido Iztli-1 son claro ejemplo de propiedades emergentes, pues se ha clasificado como péptido cazador asesino, traducido del inglés: “hunter-killer”. El péptido Iztli -1 fue diseñado a partir de la feromona  $\alpha$ , de la que 13 residuos de sus aminoácidos son considerados “hunter” (Figura 1), debido a su afinidad al receptor Ste2p, naturalmente expresado por células MATa de *S. cerevisiae*.

En el extremo amino de la feromona  $\alpha$ , 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. PI-1 posee la actividad antibacterial, antimitocondrial y es capaz de activar la ruta de señalización de la feromona  $\alpha$  (Rodriguez Plaza, Villalon Rojas et al. 2012).

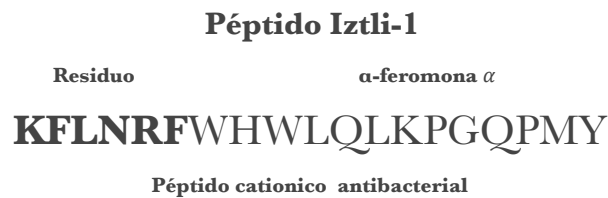


Figura 1. Incorporación de los residuos a la secuencia de  $\alpha$ -feromona  $\alpha$ .

La muerte celular programada (PCD) se produce en los organismos multicelulares y unicelulares. Se ha reportado que *S. cerevisiae* presenta algunas características de PCD durante el apareamiento sexual, algo que para una sola célula podría ser considerado un acto de altruismo (Severin and Hyman 2002, Zhang, Dudgeon et al. 2006). En tal proceso de apareamiento, las células haploides Mata producen feromona  $\alpha$  como una señal para inducir la respuesta de apareamiento en las células MATa; dicha respuesta implica una señalización intracelular que se inicia mediante la activación del receptor de la feromona  $\alpha$  (Ste2p), que activa a su vez la vía de las Mitogen Activate Protein Kinases (MAPK) y que en uno de sus últimos efectores conduce a la detención del ciclo celular ( $G_1$ ) y a cambios morfológicos a nivel global que se describen como el fenotipo Shmoo (Fenotipo que consiste en la generación de un nódulo cuando las células se preparan para la reproducción) (ver Figura 2).

Después de esta señal primaria, la células MAT $\alpha$  debe decidir entre: a) aparearse con una célula MAT $\alpha$  cercana, b) reactivar el ciclo celular o c) inducir muerte celular. En condiciones normales de apareamiento, el 25% de las células dejará de encontrar pareja de apareamiento y morirá a través de un mecanismo de PCD. Adicionalmente, cuando la concentración de feromona  $\alpha$  está por encima de concentraciones fisiológicas, hay 6% de células muertas como consecuencia de muerte celular no apoptótica.

A diferencia de la muerte observada en células MAT $\alpha$  usando altas concentraciones de feromona  $\alpha$ , se ha observado que el 25% de la población muere por un mecanismo no apoptótico y se requiere de la función mitocondrial, el PI-1 elimina la respiración mitocondrial *in vivo* e induce la muerte al 100% de la población.

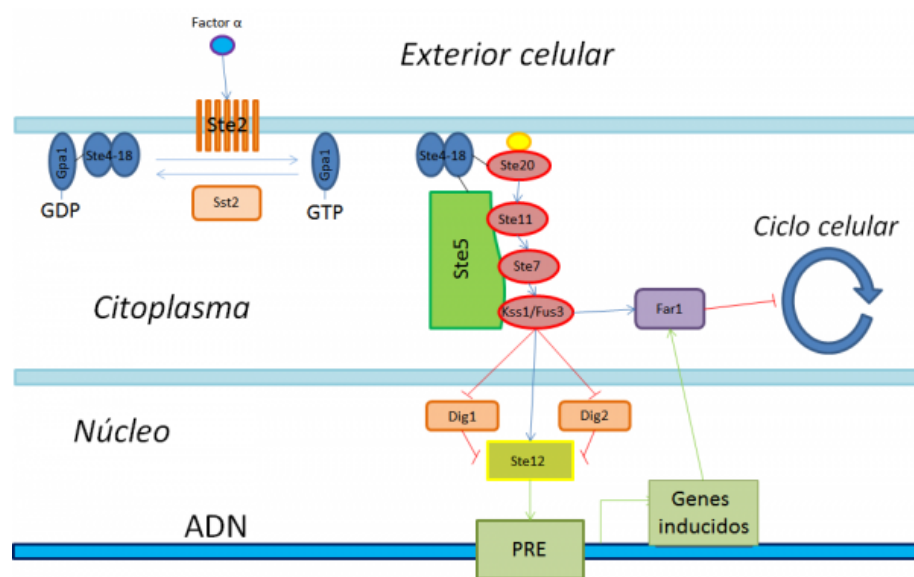


Figura 2. Vía de señalización de la  $\alpha$ -feromona  $\alpha$  al receptor Ste2.

Se ha descrito que la unión de feromona  $\alpha$  a su receptor Ste2p, estimula la internalización del complejo feromona  $\alpha$ -receptor mediante endocitosis, y que dicho complejo tiene como destino final la membrana vacuolar (Schandel and Jenness 1994). Como se mencionó anteriormente, el PI-1 induce muerte en células MAT $\alpha$  que expresa el receptor Ste2p, lo cual no ocurre cuando las levaduras tipo MAT $\alpha$  son expuestas a la acción del péptido. Asimismo, estudios previos sugieren que la

endocitosis mediada por el receptor Ste2p no es necesaria para la internalización de PI-1, mostrando que en ambos tipos de levadura se encontró la presencia de PI-1 en el interior de la célula (Rodríguez Plaza, Morales-Nava et al. 2014).

Ensayos de viabilidad con mutantes nulas en los genes STE2 y STE4 (gen que codifica para subunidad  $\beta$  de la proteína G acoplada a Ste2p (Figura 2)) son resistentes a la muerte inducida por PI-1, lo cual indica que algunos de los mecanismos de señalización que activan la vía de la feromona  $\alpha$  se encuentran relacionados directa o indirectamente con el mecanismo de inducción del PI-1 (Rodríguez Plaza et al., 2012).

# ANTECEDENTES

---

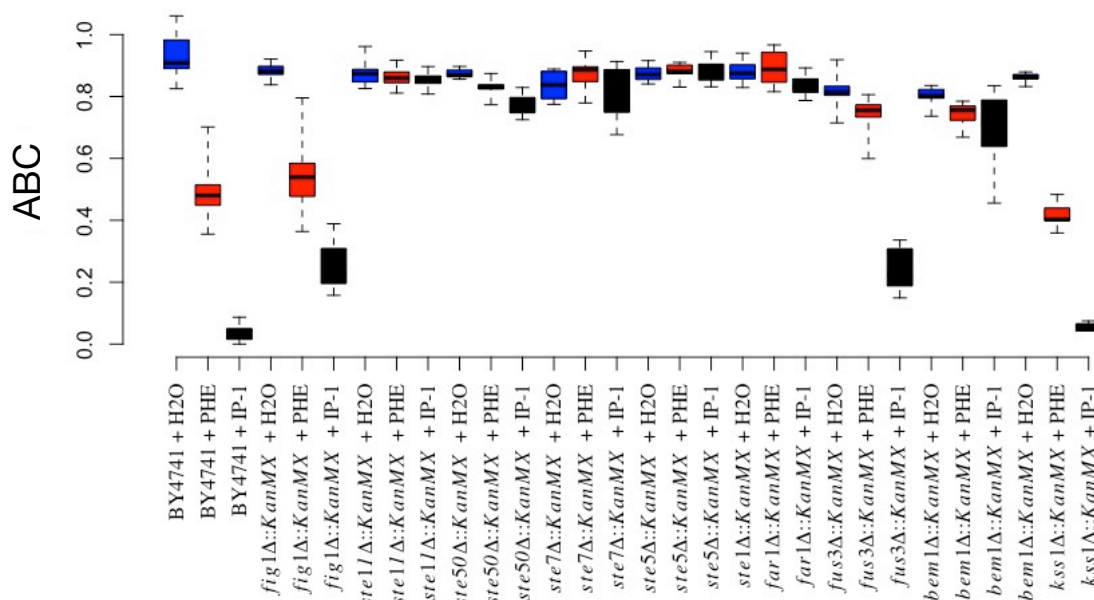
## **Genes que confieren resistencia contra el Péptido Iztli-1**

La resistencia observada en las mutantes nulas STE2 y STE4 sugiere que la activación de la vía de señalización de la feromona  $\alpha$  es requerida para la inducción de muerte. Con el fin de discernir acerca de los mecanismos por lo cuales el PI-1 induce muerte, se realizaron ensayos masivos para identificar los genes que son necesarios para que las células mueran. La estrategia experimental fue realizar pruebas de crecimiento en mutantes con delección genética simple expuestas a feromona  $\alpha$  y PI-1 para analizar las diferencias en su crecimiento a lo largo de 24 horas. Se ensayaron 3,744 mutantes distintas y se obtuvo una lista de 101 genes cuya ausencia previene la muerte inducida por el PI-1.

De los 101 genes cuya ausencia protege a las levaduras, se identificaron algunos relacionados directamente con el control del ciclo celular (KAR4, RME1, CLB1, REC104, SSN8, HUG1, STE50, STE20, STE4, FAR1, HSL1, MRC1, MAD1, HHT1, IBD2, BNI1, CNB1) (Figura 3). Dentro de la lista de genes que controlan el ciclo celular, se encuentran algunos que pertenecen a la vía de señalización de la feromona  $\alpha$  (STE50, STE20, STE4, FAR1, BNI1), los cuales son necesarios para que se lleve a cabo correctamente la detención del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>.

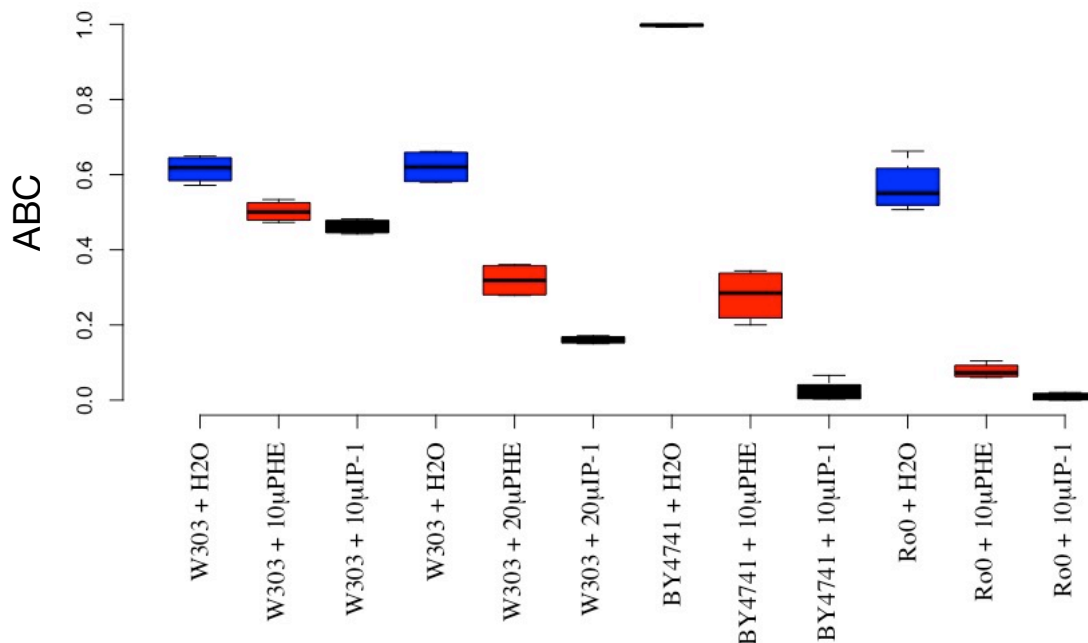
## Genes implicados en la vía de las MAPK's confieren resistencia contra el Péptido Iztli-1

Al estudiar diferentes procesos activados por la señalización de las feromona  $\alpha$  (por ejemplo, autofagia, crecimiento filamentososo o control del flujo de calcio), encontramos que ninguno es relevante para la muerte celular inducida por PI-1. Sin embargo, los mutantes nulos de cada gen implicado en la vía MAPK activada por Ste2p impidieron la muerte celular inducida por PI-1. Resultados previos muestran que los mutantes nulos para los genes STE5, STE7, STE11 y STE50 están completamente protegidos contra la citotoxicidad de PI-1 y la detención del crecimiento celular inducida por la feromona  $\alpha$  y, alternativamente, la mutante nula para *FUS3*, que está río abajo de las MAPK anteriores, presentó una resistencia moderada contra la citotoxicidad del PI-1 e insensibilidad al arresto de la feromona  $\alpha$  (Figura 4).



**Figura 4. Participación de la vía de las MAPK en la inhibición del crecimiento celular inducida por PI-1.** Área bajo la curva de crecimiento relativa (ABC) de absorbancia a 630 nm de cepas nulas expuestas a Péptido Iztli-1 a 10  $\mu$ M (cuadros negros), agua como control (cuadros azules) y feromona  $\alpha$  (cuadros rojos). El ABC mostrada corresponde a un tiempo de 24 horas, recopilando los resultados de al menos 12 experimentos por cepa analizada.

Dentro de la lista de las mutantes que son insensibles a la muerte provocada por PI-1, se encuentra FAR1, el cual codifica para una proteína que en su forma activa es la causante de detener el ciclo celular de la levadura tras la estimulación con feromona  $\alpha$ . La mutante  $\Delta far1$  presenta una protección total contra la feromona  $\alpha$ , similar a la presentada ante el PI-1, mientras que  $\Delta fus3$ , que carece de un gen que se encuentra río abajo de Ste7p pero río arriba de Far1p, protege considerablemente contra la acción del PI-1. Los genes *FIG1* y *BEM1* codifican para proteínas que participan en la señalización de la feromona  $\alpha$  pero que no pertenecen a la vía de las MAPK; de estas cepas, solo la mutante nula en *BEM1* tiene resistencia parcial a la feromona  $\alpha$  y al PI-1. La resistencia de la mutante *far1* $\Delta$  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.



**Figura 5. Efecto del Péptido Iztli-1 en el crecimiento de levaduras en medio fermentativo o respiratorio.** Área bajo la curva de crecimiento relativa (ABC) de la cepas nulas expuestas a Péptido Iztli-1 a 10  $\mu$ M (cuadros negros), agua como control (cuadros azules) y feromona  $\alpha$ .

---

## **Efecto de PI-1 en el crecimiento de células MATa en medios respiratorios y fermentativos**

Previamente, se ha reportado que PI-1 inhibe la respiración en células de levadura o en mitocondrias aisladas, y que es capaz de hinchar a estas mitocondrias aisladas, aunque también notamos que dicha actividad sola o en combinación con la actividad de la feromona  $\alpha$ , no explica la citotoxicidad del Péptido Iztli-1 en células MATa (Rodríguez Plaza, Villalon Rojas et al. 2012).

Datos de crecimiento en células MATa en medios respiratorios y/o de fermentación, mostraron que PI-1 inhibe el crecimiento de células en medios que promueven la capacidad respiratoria o de fermentación (células BY4741 cultivadas en medios YPD); sin embargo, las células crecidas en condiciones respiratorias son más resistentes a la acción tóxica de PI-1 (células W303 cultivadas en medios YPLac) que en las condiciones de fermentación (células BY4741 $\rho$ 0 cultivadas en medios YPD) (Figura 5). Observaciones previas indican que la falta de nutrientes (por ejemplo, en las condiciones de fermentación) puede inhibir la actividad de Pho85p y, por lo tanto, favorecer la detención del ciclo celular en G<sub>1</sub>.

En ausencia de tales estímulos, las células pueden permanecer en G<sub>1</sub> debido un mecanismo distinto del ciclo celular inducido por la detención por feromona  $\alpha$ . Nuestros resultados anteriores mostraron que células carentes del receptor de feromona  $\alpha$  (células MATa) no son destruidas por PI-1 en condiciones de fermentación, sugiriendo que la inducción de la detención del ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> es relevante a la muerte celular inducida por PI-1. Por otra parte, la mayor susceptibilidad a la acción tóxica de PI-1 de células crecidas en medios fermentativos, podría explicarse considerando que en tal estado las células favorecen detener su ciclo celular (Gray, Petsko et al. 2004, Broach 2012).



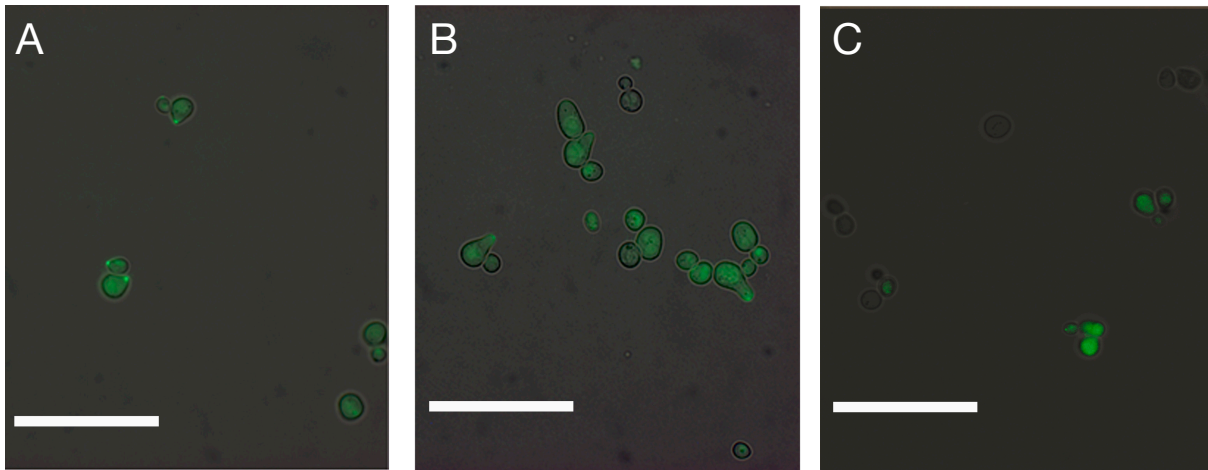
---

## **Evaluación del efecto tóxico de la variante de PI-1 que no activa la vía de la feromona $\alpha$**

Teniendo presente que PI-1 activa la señalización de la feromona  $\alpha$ , se sintetizó una variante de PI-1 que no induce señalización. Se ha observado previamente que la modificación del extremo C-terminal de la feromona  $\alpha$  reduce significativamente su actividad (Naider and Becker 2004). Para reproducir este efecto en PI-1, se sintetizó una versión modificada en el C-terminal de PI-1; es decir, que se incorporó un grupo amida al extremo carboxilo. Nos referimos a este péptido como PI-1-CO-NH<sub>2</sub>.

Se observó que las células MATa expuestas a 10  $\mu$ M de PI-1-CO-NH<sub>2</sub> presentaron una curva de crecimiento normal, mientras que las mismas células tratadas con feromona  $\alpha$  mostraron una extensión de la fase Lag de la curva de crecimiento, correspondiente a una detención transitoria del ciclo celular; sin embargo, PI-1-CO-NH<sub>2</sub> induce una inhibición parcial del crecimiento de células MATa a 40  $\mu$ M. La inhibición del crecimiento observada por PI-1-CO-NH<sub>2</sub> a 40  $\mu$ M no está mediada por la activación de la ruta de la feromona  $\alpha$ , este hecho fue confirmado mediante el uso de la expresión de FUS1-GFP, al no observar aparición del fenotipo de shmoo, así como tampoco la presencia de FUS1-GFP en las células al ser tratadas con PI-1-CO-NH<sub>2</sub>.

Contando con un derivado de Péptido Iztli-1 que no inhibe el crecimiento de células MATa a 10  $\mu$ M como consecuencia de su incapacidad de activar la vía de la feromona  $\alpha$ , se evaluó la exposición de células MATa a una mezcla de PI-1-CO-NH<sub>2</sub> con feromona  $\alpha$ , demostrando que el tratamiento de las células MATa con ambos péptidos restaura el efecto de muerte del Péptido Iztli-1, confirmando además que PI-1-CO-NH<sub>2</sub> no puede inhibir el crecimiento de las células MATa debido a la falta de actividad de la feromona  $\alpha$  y, en consecuencia, a la incapacidad de inducir el arresto del ciclo celular (Rodríguez Plaza 2014).



**Figura 6. PI-1-CO-NH<sub>2</sub> no activa la señalización de feromona  $\alpha$ .** La activación de la ruta de feromona  $\alpha$  se detectó mediante la expresión de FUS1p-GFP. **A)** Las células MATa tratadas con 10  $\mu$ M de feromona  $\alpha$  muestran formación de shmoo con FUS1p-GFP en su extremo. **B)** Las células MATa tratadas con 10  $\mu$ M de PI-1 muestran formación de shmoo y fluorescencia de FUS1p-GFP en su punta. Debido a la muerte celular inducida por PI-1, menos células presentan fluorescencia en su punta; sus formas anómalas en la imagen identifican las células de la muerte. **C)** Las células MATa tratadas con 10  $\mu$ M de PI-1-CO-NH<sub>2</sub> no brotan ni presentan la fluorescencia característica de FUS1p-GFP en la punta del brote, incluso después de 8 horas de tratamiento; las pocas celdas que muestran fluorescencia en este panel probablemente sean células muertas como se deduce de las formas anómalas de estas celdas. La longitud de la barra blanca es 50  $\mu$ m.

---

## Justificación

Si el PI-1 puede inducir muerte solo en células que están detenidas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, PI-1 sería el primer antibiótico descrito selectivo para matar células en detención del ciclo celular. Por otro lado, esta capacidad de PI-1 de actuar sobre un mecanismo conservado en células de mamífero, ofrece la aplicación de PI-1 en terapias contra el cáncer, en especial en subpoblaciones de células dentro de los tumores, responsables del crecimiento tumoral y de la recurrencia, que se han denominado células madre cancerígenas (CSC) (Stingl and Caldas 2007).

Las CSC son resistentes a muchos tratamientos actuales, incluyendo la quimioterapia y la radioterapia ( Diehn and Clarke 2006, Fillmore and Kuperwasser 2008, Diehn, Cho et al. 2009), esto sugiere que muchas terapias contra el cáncer, mientras logran eliminar la mayor parte de las células tumorales en proliferación, fallan al eliminar a las CSC que se mantienen en arresto celular y sobreviven para generar nuevos tumores. En este proyecto propongo evaluar la capacidad de PI-1 para inducir muerte en células en detención del ciclo celular, y determinar la dependencia de esta muerte ante diferentes vías de inducción del arresto del ciclo celular.

---

## **Hipótesis**

El péptido Iztli-1 induce una muerte en *S. cerevisiae* dependiente de la detención del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>.

---

## **Objetivo general**

Determinar si el péptido Iztli-1 es capaz de inducir muerte solo en células detenidas en su ciclo celular.

---

## **Objetivos específicos**

- Evaluar si la muerte celular inducida por PI-1 en *S. cerevisiae* depende de la detención del ciclo celular en G<sub>1</sub> en células que activan la vía de la feromona  $\alpha$  y células que no la activan.
- Identificar genes necesarios para la muerte inducida por el PI-1 en *S. cerevisiae*.
- Establecer una metodología para cuantificar viabilidad y fase del ciclo celular en célula única dentro de una población de *S. cerevisiae*.

# METODOLOGÍA

## Cepas

Las cepas de *S. cerevisiae* usadas en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1.

Cepa	Genotipo	Fuente
BY4741	MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Open Biosystems, Yeast Parental Strain
BY4741 null mutants	MATa, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, gen nulo:: KANMX4 Genes nulos: atg11, ayt1, bre2, cms1, cox17, cyc3, dep1, dnm1, drs2, elm1, erv46, frt2, fun14, gat3, isa2, mht1, ntg1, nup60, oye2, pep4, por1, psr2, saw1, seo1, sir4, snc1, snf7, spo7, spo75, ste20, ste4, swc3, swd1, syn8, ubr2, uip3, uth1, atg3, atg19, tor1, meh1, slm4, gtr2, vac8, nvj1, pep4, aup1, uth1, gea1, irs4, vtc1, vtc2, vtc3, vtc4, vps51, vps52, vps53, vps54, ypt6, pbs1, pho81, rim15, fig1, cch1, mid1, lrg1, rvs161, pea1, pea2, ste5, ste7, ste11, ste50, fus3, kss1, bem1, bni1, kar4, rme1, hal9, xbp1, hms1, skn7, put3, msn4, mga1, fkh2.	Open Biosystems, YKO MATa Strain Collection
BY4742	MATalfa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Open Biosystems, Yeast Parental Strain

ACLY394	MATa bar1Δ cdc28-as2 Δprm1::PPRM1-YFP::his5+	Alejandro Colman Lerner, 2013
ACLY387	MATa bar1Δ Δprm1::PPRM1- YFP::his5+	Alejandro Colman Lerner, 2013
BY4741 ρ <sup>0</sup>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Rodríguez- Plaza, 2012

---

## Péptidos

La feromona  $\alpha$  utilizada en los experimentos fue obtenida de la compañía Sigma-Aldrich (Número de catálogo T6901). El Péptido Iztli-1 fue sintetizado por Anaspec Inc. (USA). El PI-1-CO-NH<sub>2</sub> fue sintetizado por el Prof. Rudolf Volkmer en Charité, Berlín, con una pureza de >95%. 1 mg de cada reactivo fue diluido en agua destilada, y su concentración se determinó con una lectura de 280 nm en el Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

La compañía que sintetizó los péptidos verificó la pureza usando HPLC y espectrometría de masas; las metodologías Fmoc y Boc fueron empleadas para sintetizar los péptidos sin modificaciones en sus N- y C- terminales, con excepción de PI-CO-NH<sub>2</sub>. Todos los aminoácidos usados en este trabajo incluyeron solo L-aminoácidos. El His-tagged-PI-1 fue sintetizado por la compañía Genscript con pureza >90%.

Nombre	Secuencia	Peso molecular (g/mol)
Péptido Iztli-1	KFLNRFHWLQLKPGQPMY	2490
PI-1-CO-NH <sub>2</sub>	KFLNRFHWLQLKPGQPMY-CO-NH <sub>2</sub>	2490
FER	HWLQLKPGQPMY	1684
His-tagged-PI-1	HHHHHHKFLNRFHWLQLKPGQPMY	3310

---

## Ensayos de Crecimiento

La evaluación del efecto de muerte inducido por PI-1, PI-1-CO-NH<sub>2</sub>, se ensayó en distintos cultivos en fase estacionaria temprana, los cuales fueron obtenidos por colonia única y cada una de las cepas utilizadas fue tratada con cada uno de los Péptidos en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%), a una densidad óptica (600 nm) inicial de 0.12 en un volumen total de 100 µl.

---

## Ensayos de viabilidad con FUN1

LIVE/DEAD Yeast Viability Kit (Invitrogen, USA) de la compañía Molecular Probes, se usó para analizar la viabilidad. Cultivos de *S. cerevisiae* fueron crecidos en medios MMC por 16 horas; posteriormente estos cultivos se diluyeron a una densidad óptica de 0.12 a 600 nm y tratados bajo diferentes estímulos. Luego, se recolectaron muestras en diferentes tiempos para determinar la viabilidad. En cada punto de recolección se tomaron 50 µl de cultivos, que fueron centrifugados a 13,000 rpm por 10 segundos, después se lavaron por duplicado en agua destilada y se suspendieron en 20 µl de una solución de Glucosa-HEPES (2% D- (+)-glucosa y 10 mM Na-HEPES). Las muestras fueron tratadas con 5 µM de FUN1 por 30 minutos a 30 °C en agitación constante a 250 rpm; posteriormente, 15 µl de los cultivos teñidos fueron analizados en el microscopio acoplado a citometría AMNIS Imaging Flow Cytometer (ImageStream X Mark II).

---

## **Efecto de PI-1 en el crecimiento de cepas varias de *S. cerevisiae***

Con el fin de determinar el efecto de PI-1 en el crecimiento de las cepas BY4741, se inocularon 4 ml de las cepas nulas BY4741, *far1Δ*, *far3Δ*, *far7Δ*, *far8Δ*, *far9Δ*, *far10Δ*, *far11Δ* y BY4742 *hog1Δ*, las cuales fueron incubadas a 30 °C en agitación constante a 250 rpm durante 16 horas y, posteriormente, diluidas a una densidad óptica de 0.12 a 600 nm. 100 µl de cultivo fueron crecidos en placas estériles de 96 pozos (Corning Costar, USA). En donde correspondiera, se añadió a cada pozo en la placa, PI-1 a una concentración final de 10 µM, 10 µM de feromona  $\alpha$  o agua destilada como control. Las placas fueron incubadas en Synergy MX Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc.) por 24 horas a 30 °C en agitación constante, y la densidad celular fue estimada por la absorbancia medida a 600 nm cada 30 minutos.

---

## **Arresto en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular de la cepa Mata:*hog1Δ* por estrés hiperosmótico**

Las células fueron crecidas en 4 ml por 16 horas a 30 °C y, posteriormente, diluidas a una densidad de 0.12 a 600 nm, 50 µl de cultivo fueron incubados con medio YPD y 0.6 M NaCl en un volumen final de 100 µl por 36 horas. Después de este tiempo, las células fueron tratadas con PI-1 a una concentración de 10 µM y agua destilada como control.



---

## **Determinación de la viabilidad celular en células tratadas con PI-1 y arrestadas químicamente**

Las células fueron crecidas como se describe previamente. Los cultivos diluidos fueron mantenidos en condiciones de crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 y, posteriormente, a esta densidad, fueron tratadas con 15 µg/ml de Nocodazole durante 3 horas, para así, ser sincronizadas en la fase M del ciclo celular. Después se realizó lavado con medio YPD para adicionar una concentración de 5 µM de TBT por 2 horas. Transcurrido este tiempo, la mayoría de la población se encontraba arrestada en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular (ver sección Análisis del ciclo celular en *S. cerevisiae*). Posteriormente, los cultivos fueron tratados con PI-1, PI-1-CO-NH<sub>2</sub> y, como control, se observaron células que no recibieron ningún tratamiento para evaluar las fases del ciclo celular y viabilidad.

---

## **Ensayo de interacción de proteínas con PI-1 en células humanas y de levadura**

Los análisis fueron realizados solo con His-tagged-PI-1 (ver Péptidos), el cual fue acorde a lo reportado en el Anexo, (reporte de la compañía prestadora de servicios Profacgen). Brevemente, el PI-1 fue adherido a una columna, por la cual se pasaron los extractos proteicos de células humanas (HEK 293) o de levadura (*S. cerevisiae*). Las proteínas que se mantuvieron adheridas a la columna fueron identificadas por espectrometría de masas, se identificaron en el software ProteinPilot 5 (AB SCIEX) bajo los siguientes parámetros: Tipo de muestra = Identificación; Digestión = tripsina; Instrumento = TripleTOF 5600. Los datos obtenidos se compararon con la base de datos de proteínas de las especies correspondientes descargadas de Uniprot (ver Anexo). La fiabilidad de la proteína ProtScore sin uso fue >1.3 E = 95% como el estándar de confianza.

---

## **Análisis del ciclo celular en *S. cerevisiae***

Células bajo diferentes tratamientos fueron diluidas a una concentración final de 0.4 a 600 nm, lavadas con agua destilada y fijadas en 70% EtOH/30% agua por toda la noche. Las células fueron lavadas con PBS 1X en tres ocasiones y tratadas con 0.1 mg/ml RNase A (Sigma, Aldrich) a 37 °C por 45 min. Antes de realizar el análisis del ciclo, las células fueron teñidas con 5 nM de Ioduro de propidio (493 nm excitación and 632 nm emisión; Molecular Probes, Eugene, OR). Células en fase exponencial de crecimiento fueron usadas como control de las fases del ciclo celular.

Las muestras fueron analizadas en AMNIS ImageStream. Mediante el uso del software de adquisición INSPIRE, se capturaron 15,000 imágenes de células por muestra en campo claro y el canal rojo para el análisis del ciclo celular. La señal del canal rojo (Ioduro de propidio) y campo claro fueron colectados en el Canal 4 (595-660 nm) y Canal 1 (420–480 nm) respectivamente. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa IDEAS v3.0. Para realizar el análisis del ciclo celular, fue calculado el parámetro RMS (por sus siglas en ingles, valor cuadrático medio); muestras con valores de RMS < 0.6 en el campo claro (canal 1) fueron excluidas del análisis por considerarse fuera de foco.

Después, a partir de esta población de células bien enfocadas, fue calculado el parámetro de la relación aspecto radio (aspect-ratio) y el área de las células en el campo claro, ambas características fueron graficadas y se seleccionó un conjunto de células individuales, es decir, se eliminaron eventos que incluían a dos o más células. Finalmente, de esta población se calculó la intensidad de la señal registrada en el canal 4 (rojo) y se graficó contra el aspect-ratio obtenido del campo claro como se describió anteriormente.

En este gráfico se definieron 3 regiones características de los distintos estadios del ciclo celular. A partir de las imágenes de cada región, fueron identificadas visualmente tres características morfológicas del ciclo celular en *S. cerevisiae*: núcleo simple sin brote ( $G_1$ ), núcleo redondo con brote visible (fase-S), núcleo dividido o alargado y brote largo ( $G_2/M$ ). Para cada región así definida, se determinaron los porcentajes de células presentes en cada uno de estos estadios del ciclo celular.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## **PI-1 induce muerte en células de levadura detenidas en su ciclo celular**

Los resultados son reportados en el artículo “*An Antimicrobial Peptide Induces FIG1-Dependent Cell Death During Cell Cycle Arrest in Yeast*” (ver Apéndice I), y arrojan que PI-1 es un antibiótico selectivo para células de levadura detenidas en su ciclo celular. El PI-1 ofrece la oportunidad del estudio de nuevos mecanismos de muerte durante la detención del ciclo celular.

El PI-1 fue diseñado a partir de la estructura de la feromona  $\alpha$  y es capaz de inducir muerte en células MATa de *S. cerevisiae*. Con el uso de análisis de citometría de flujo acoplada a microscopía multifotónica, se evaluó la viabilidad celular después del tratamiento con el PI-1, encontrando que fue capaz de inducir la muerte en más del 96% de la población en menos de 1 hora. Adicionalmente a este fenómeno, evaluamos las fases del ciclo celular en las que se encontraban las células tratadas con PI-1 y observamos que las poblaciones se encontraban altamente enriquecidas en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular.

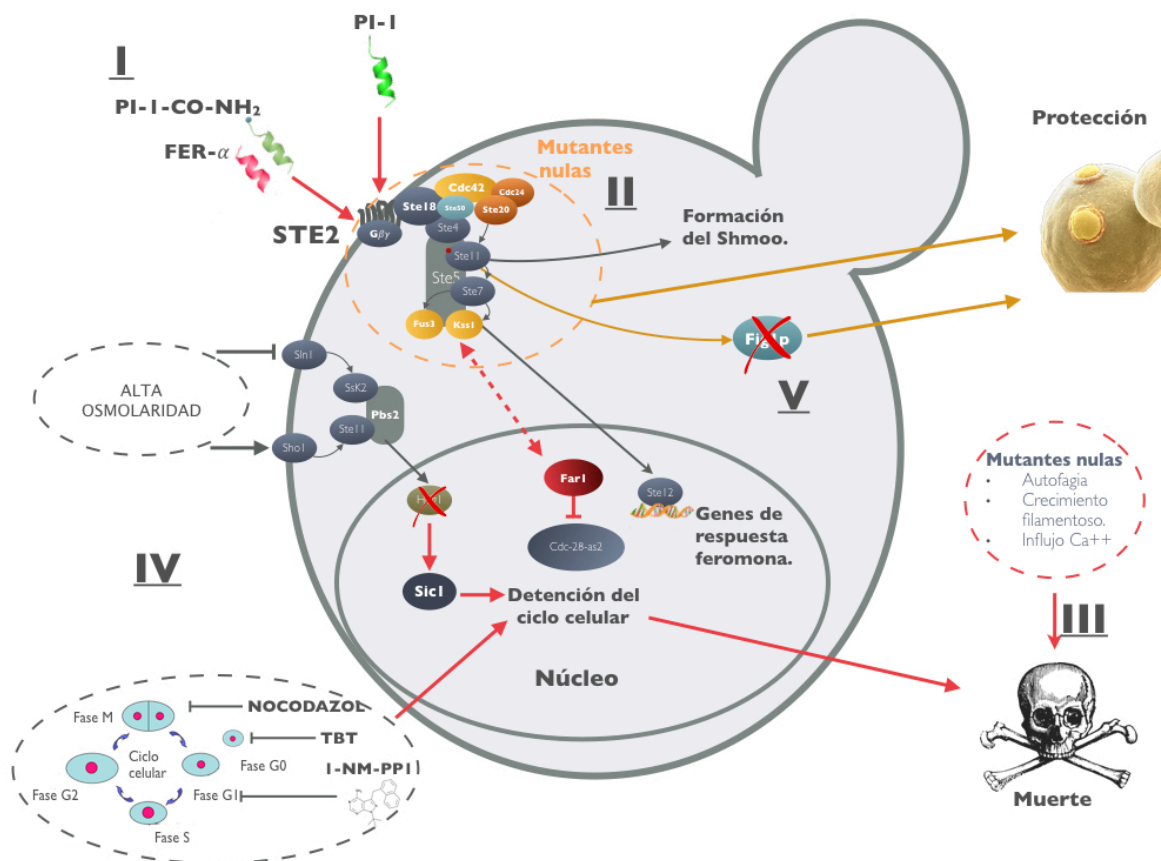
Se realizaron ensayos de viabilidad en células MATa portadoras de mutantes nulas de genes involucrados en la vía de señalización de la feromona  $\alpha$  (*STE2*, *STE50*, *STE11*, *STE7*, *STE5*, *FUS3* y *FAR1*), y encontramos que los genes que participan en la vía de señalización de la feromona  $\alpha$  en células MATa brindan protección contra los efectos tóxicos del PI-1. En los antecedentes del presente trabajo, se había descartado la participación de mecanismos moleculares (crecimiento filamentoso, autofagia, influjo de calcio) que se activan por la vía de la feromona en paralelo al arresto del ciclo celular. Por lo tanto, mis resultados sugieren que la muerte inducida por PI-1 requiere, o bien de la activación de las MAPK, o bien de la detención del ciclo celular.

Evaluamos si la fase del ciclo celular o la detención eran relevantes en el proceso de inducción de muerte en respuesta al estímulo con PI-1. Con el uso de elutriación, aislamos células MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$  en la fase G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M; las células MAT $\alpha$ , independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encontraban, fueron inhibidas en su crecimiento al exponerlas a PI-1, mientras que la cepa MAT $\alpha$  no sufría de inhibición del crecimiento celular al exponerla a PI-1. Las células MAT $\alpha$  detenidas en su ciclo celular, por estrés salino o disruptores químicos del ciclo celular (Nocodazol, TBT), fueron susceptibles a la muerte inducida por PI-1, confirmando la relevancia de la detención del ciclo celular en la muerte inducida por PI-1 (Figura 7).

La vía de la feromona  $\alpha$  involucra la activación de la vía de las MAPKs, la cual señala la detención del ciclo celular. Se generó una variante del PI-1 capaz de unirse al receptor Step2p, pero incapaz de activar la vía de la feromona  $\alpha$  y, por lo tanto, de inducir la detención del ciclo celular. El uso de esta variante del PI-1 (denominada PI-1-CO-NH<sub>2</sub>) es capaz de inducir muerte en células MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$  si son detenidas en su ciclo celular, independientemente de la estrategia de detención del ciclo celular empleada: estrés salino, uso de disruptores del ciclo celular o la inactivación directa en la variante de la proteína *CDC28-as1* por el fármaco 1-NM-PPI (ver Figura 7).

Resultados previos mostraron que PI-1 induce muerte en células MAT $\alpha$  por un mecanismo diferente de la apoptosis inducida por la feromona  $\alpha$  en concentraciones fisiológicas (Rodríguez Plaza, Villalon Rojas et al. 2012), lo que sostiene que un nuevo mecanismo de inducción de muerte pudiera estar involucrado. Estudios de inducción de muerte en cepas con actividad fermentativa o respiratoria indican que el mecanismo de acción de PI-1 no depende de la actividad respiratoria y contrasta con la dependencia reportada en la inducción de muerte en condiciones no fisiológicas; sin embargo, se observa protección a la acción tóxica de PI-1 en una cepa nula para FIG1 (ver Figura 3), que también protege contra la inhibición del crecimiento celular rápido inducida por la feromona  $\alpha$  en concentraciones no fisiológicas (Zhang, Dudgeon et al. 2006).

La actividad de flujo de calcio de FIG1 no es necesaria para la muerte celular rápida inducida por la feromona  $\alpha$  y FIG1 no participa en la activación de la vía MAPK; estos resultados han llevado a la idea de que Fig1p y Mpk1p son dos ramas independientes de la respuesta de feromona  $\alpha$  que están reguladas por Fus3p, Far1p, Bni1p, Spa2p, Pea2p, Rvs161p, Fus2p y Fus1p (Muller, Mackin et al. 2003). Por otro lado, mis resultados muestran que la mutante nula del gene *FIG1* evita la muerte inducida por PI-1 en células MATa incluso si las células se encuentran detenidas en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> por una vía distinta a la vía de la feromona, lo cual sugiere que su mecanismo de acción está relacionado al mecanismo de muerte y no en prevenir la detención del ciclo celular (Figura 7).



**Figura 7. Péptido Iztli-1, un antibiótico específico de células de levadura detenidas en su ciclo celular. I)** PI-1 induce muerte en células MATa que expresan el receptor Ste2p de la feromona  $\alpha$  (FER- $\alpha$ ). **II)** Mutantes nulos de la vía de feromona  $\alpha$  y MAPKs protegen del efecto del PI-1. **III)** Mutantes nulos de genes inducidos por la feromona  $\alpha$  que participan en autofagia, crecimiento filamentosos e influjo de Ca<sup>++</sup> no protegen de la muerte inducida por PI-1. **IV)** PI-1 induce muerte en células detenidas en su ciclo celular por diferentes vías (alta osmolaridad, nocodizal+TBT, 1-NM-PP1, feromona  $\alpha$ ). **V)** La mutante nula de *FIG1* protege de la muerte inducida por PI-1 por un mecanismo que no evita la detención del ciclo celular.

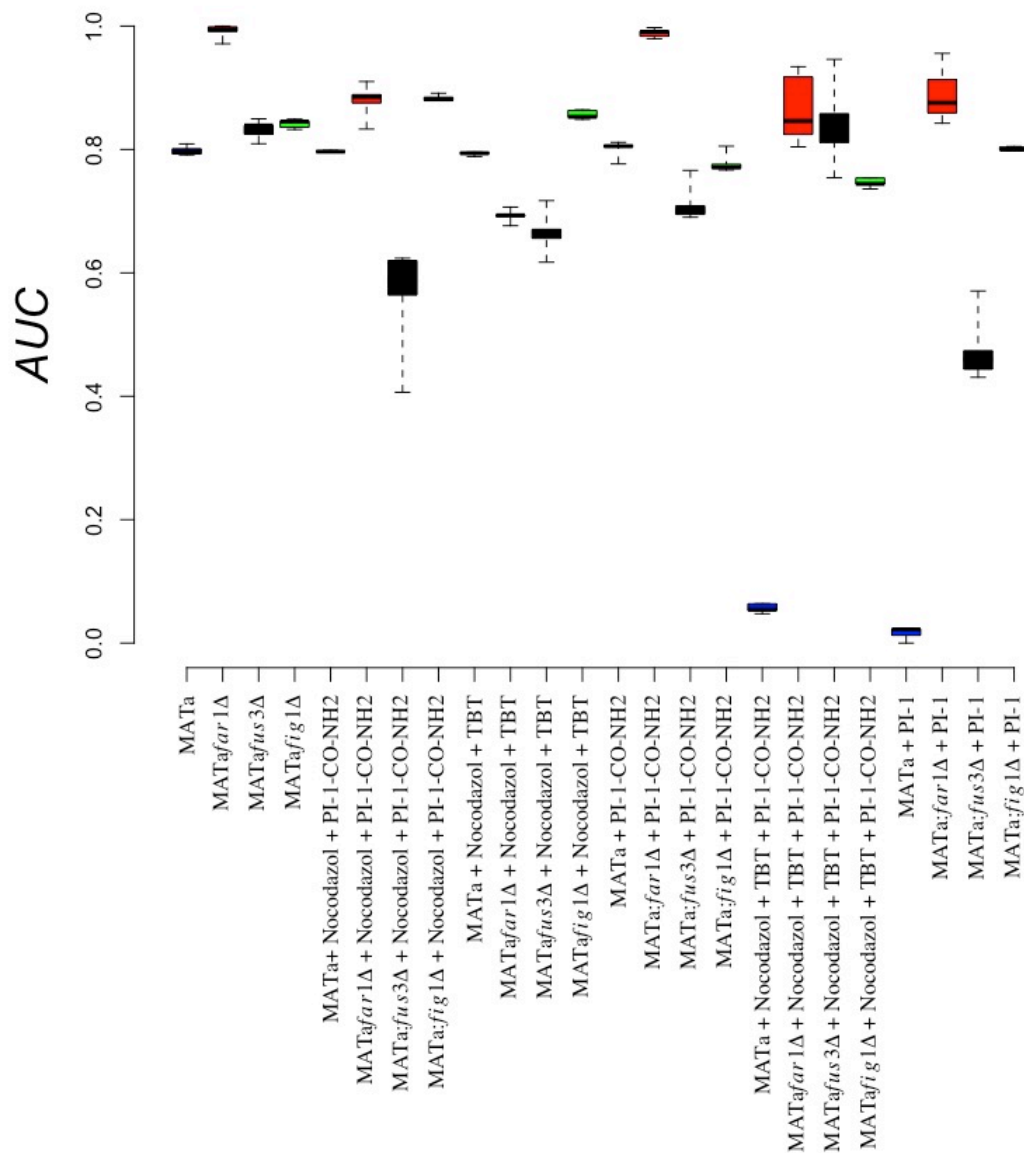
---

## **La mutante nula de FIG-1 protege de la muerte inducida por PI-1, por un mecanismo independiente a la vía de la feromona**

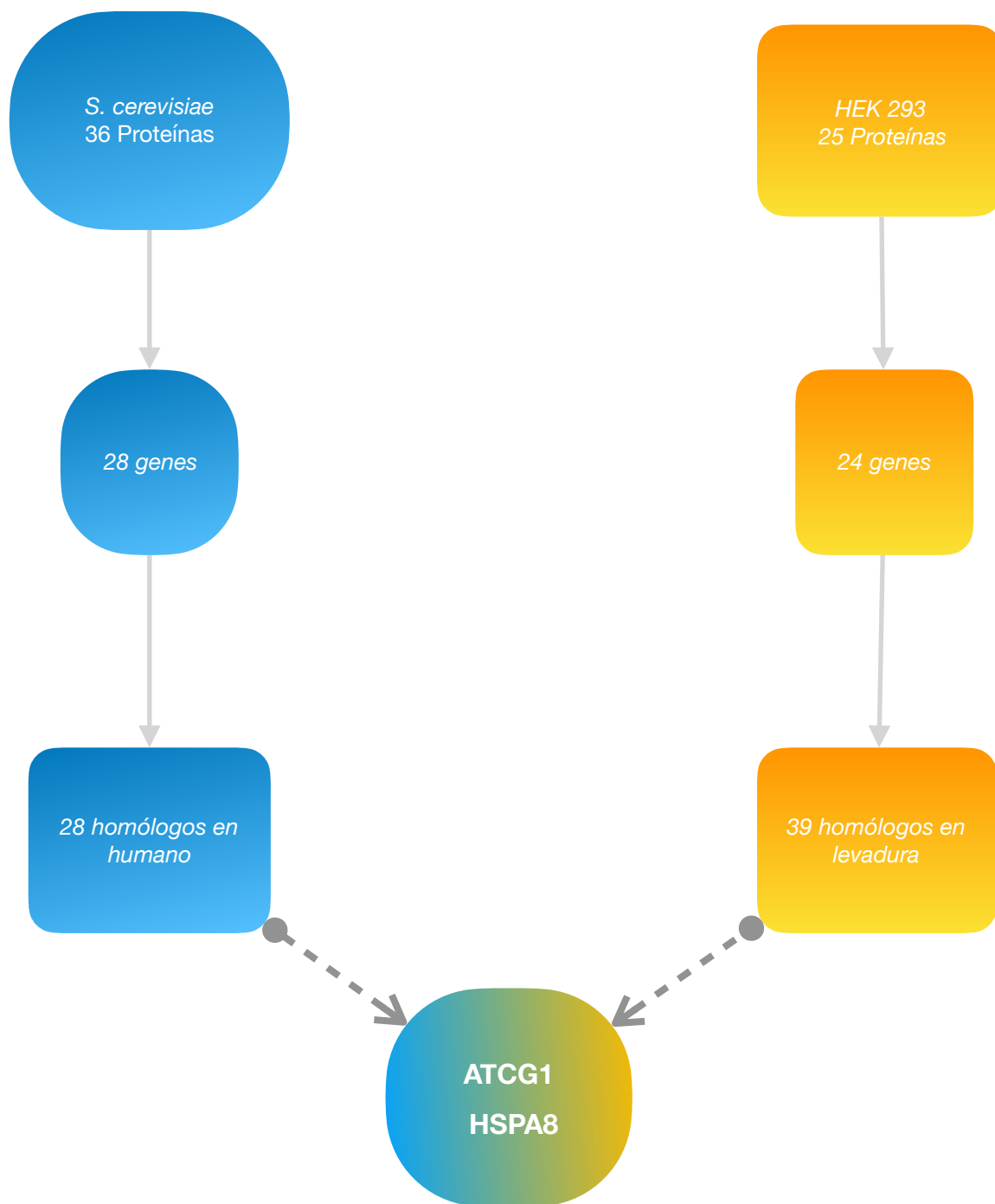
Conociendo que la mutante nula de *FIG1* es capaz de proteger contra la actividad antifungal inducida por PI-1 en células MATa de *S. cerevisiae*, el siguiente paso fue establecer si la mutante nula de *FIG1* al ser sincronizada con nocodazol en la fase M del ciclo celular, posteriormente detenida con TBT en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> de su ciclo celular y, finalmente, ser tratadas con PI-1-CO-NH<sub>2</sub>, sería susceptible a la acción tóxica de la variante de PI-1 que no activa la vía de la feromona. Como controles, evaluamos el efecto de estas condiciones en cepas que llevan las mutantes nulas de los genes *FAR1* y *FUS3*. La vía de MAPK fosforila a las cinasas Fus3 y Far1 para inducir la detención del ciclo celular; ambas proteínas son reguladores de la actividad internalizadora de calcio de baja afinidad de Fig1.

La mutante de *FAR1* confirió resistencia a las células de la acción tóxica de PI-1 o PI-1-CO-NH<sub>2</sub> en células arrestadas, mientras que la mutante nula en *FUS3* muestra menor resistencia (Figura 8). En respuesta a la feromona  $\alpha$ , la fosforilación de Far1p por MAPK Fus3p resulta en asociación e inhibición de Cdc28p-Cln y la inducción de la detención del ciclo celular (Tyers and Futcher 1993). Fus3p inhibe el crecimiento filamentoso durante el apareamiento, fosforilando a Tec1p, inhibiendo el reclutamiento de Ste5p. Por otra parte, *FAR1* y *FUS3* pueden regular la actividad de FIG1 en presencia de la activación de la ruta de la feromona.

Nuestros resultados descartan que la protección que confiere la falta de *FUS3*, *FAR1* y *FIG1* involucre la vía de la feromona (células arrestadas con nocodazol+TBT usando la variante PI-CO-NH<sub>2</sub>, la cual no activa la vía de la feromona). La función de los genes *FUS3* y *FAR1* debe involucrar al mecanismo de muerte inducido por PI-1, debido a que ofrecen protección aun cuando la célula se encuentra en detención del ciclo celular; es decir, *FUS3*, *FAR1* y *FIG1* son genes que participan en el mecanismo de muerte inducido por PI-1 en levadura. *FIG1* es el único gen que confiere protección contra el PI-1 y se encuentra independiente de la señalización de la feromona  $\alpha$ , incluso se observa protección cuando la célula es detenida por fármacos disruptores del ciclo celular.



**Figura 8. Prueba de toxicidad en mutantes nulas *FAR1*, *FUS3* y *FIG1* en detención del ciclo celular por disruptores químicos del ciclo celular tratadas con PI-1-CO-NH<sub>2</sub>.** Área bajo la curva de crecimiento relativo (ABC) de la cepas nulas (estos genes el locus fue sustituido por *KanMX*) expuestas a PI-1-CO-NH<sub>2</sub> o PI-1 a 10 μM **Silvestre** (cuadros azules), ***FAR1*** (cuadros rojos), ***FUS3*** (cuadros negros), ***FIG1*** (cuadros verdes). El ABC mostrada corresponde a un tiempo de 24 horas, recopilando los resultados de al menos 6 experimentos individuales por gen.



**Figura 9.** Diagrama de comparación de las interacciones encontradas en levadura y humano. Se realizó la búsqueda de genes que codifican para las proteínas que interactúan con PI-1 y los genes ortólogos en levadura y humano respectivamente.



---

## Identificación de interactores proteicos de PI-1 en *S. cerevisiae* y HEK293

El mecanismo de acción del Péptido Iztli-1 depende de los mecanismos regulados por los genes anteriormente descritos. En el ensayo de interacciones de proteínas con PI-1, tanto en células de humano (HEK293) como en células de levadura *S. cerevisiae* (ver y Métodos), se buscó identificar los posibles blancos de acción del fármaco en procesos celulares, no se realizó este experimento con el péptido modificado PI-1-CO-NH<sub>2</sub>.

De los datos proporcionados por la compañía **Profacgen**, se descartaron los resultados que se duplicaban en la tabla contenida en el Apéndice II, **His tagged peptide + *S. cerevisiae*** y **His tagged + *S. cerevisiae***. Asimismo, de este conjunto resultante se descartaron las secuencias relacionadas con queratina, considerada una contaminación natural por su abundancia en la célula (ver Anexo), y en el caso de las interacciones de humano (HEK293) se siguieron los mismos criterios. Una vez identificadas las interacciones del PI-1 con ambos tipos celulares, se buscaron pares homólogos entre los genes que codifican las proteínas de humano y levadura con interacción al PI-1 en las bases de datos YeastMine (<https://www.yeastgenome.org>) y HumanMine (<http://www.humanmine.org>).

Así, identifiqué que las 36 proteínas que interactúan con PI-1 en levadura, solo codifican en 28 genes (ver Tabla 2) y, en todos los casos, existe un gen homólogo en humano. De las 25 proteínas que interactúan con PI-1 encontradas en HEK293, las cuales se codifican en 24 genes (ver Tabla 3), se encontraron 39 genes ortólogos en levadura. Al realizar la comparación de listas de ortólogos, encontré dos genes que son compartidos en ambas listas: *ATCG1*, que codifica para la actina gamma 1, y *HSPA8*, que codifica para la proteína de choque térmico de 70 kDa (Figura 9).

**Tabla 2.** Descripción de la función principal de las proteínas que interactúan con el PI-1 en *S. cerevisiae*.

Nombre sistemático	Nombre estándar	Nombre del gen	Descripción
YDL127W	PCL2	Pho85 CycLin	Pho85 CycLin Cyclin interactúa con la cinasa dependiente de ciclina Pho85p; miembro de la subfamilia similar a Pcl1,2, implicado en la regulación del crecimiento polarizado, la morfogénesis y la progresión a través del ciclo celular; se localiza en sitios de crecimiento celular polarizado; PCL2 tiene un paralog, PCL9, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YDR116C	MRPL1	Proteína ribosómica mitocondrial, subunidad grande	Proteína ribosomal mitocondrial de la subunidad grande.
YDR141C	DOP1	Homólogo de <i>A. nidulans</i> DOPey	Proteína que contiene el dominio de cremallera de leucina localizado en Golgi; involucrada en el endosoma del transporte de Golgi, la organización del RE, el establecimiento de la polaridad celular y la morfogénesis; detectada en mitocondrias altamente purificadas en estudios de alto rendimiento.
YDR453C	TSA2	Antioxidante específico de tiol	Tiorredoxina peroxidasa citoplásmica inducible por estrés; coopera con Tsa1p en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre utilizando tiorredoxina como donante de hidrógeno; la eliminación potencia el fenotipo mutador de los mutantes tsa1; la abundancia de proteína aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN; TSA2 tiene un parálogo, TSA1, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YDR464W	SPP41	Supresor de PrP4	Proteína de función desconocida, implicada en la regulación negativa de la expresión de los componentes del spliceosoma PRP4 y PRP3; se relocaliza al citosol en respuesta a la hipoxia.
YFL039C	ACT1	ACTin	Actina; proteína estructural implicada en la polarización celular, endocitosis y otras funciones del citoesqueleto.
YFL048C	EMP47		Componente de membrana integral de vesículas revestidas con COPII derivadas de ER; funciona en el transporte de ER a Golgi; EMP47 tiene un parálogo, EMP46, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YFR005C	SAD1	Montaje SnRNP defectuoso	Proteína de dominio de dedos de zinc conservada implicada en el corte y empalme pre-ARNm; crítica para el empalme de casi todos los genes que contienen intrones; requerida para el ensamblaje del snRNA U4 en la partícula U4 / U6.
YGL094C	PAN2	Poli (A) que une proteína poli (A) ribonucleasa dependiente	Subunidad catalítica del complejo de poli (A) - ribonucleasa Pan2p-Pan3p; se involucra en actos complejos para controlar la longitud de la cola de poli (A) y regular la estequiometría y la actividad de los complejos de reparación de la post-replicación.
YGR178C	PBP1	Proteína de union ha Pab1p	Componente de gránulos de estrés inducidos por privación de glucosa; involucrado en el ensamblaje de gránulos dependientes del cuerpo P, similar a la ataxina-2 humana; interactúa con Pab1p para regular la poliadenilación de ARNm; interactúa con Mkt1p para regular la traducción HO; la proteína aumenta en abundancia y la distribución relativa al núcleo aumenta con el estrés de replicación del ADN.

YGR192C	TDH3	Triose-fosfato Deshidrogenasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), isozima 3; involucrado en glucólisis y gluconeogénesis; tetrámero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3 bis-fosfoglicerato; detectado en el citoplasma y la pared celular. Los péptidos antimicrobianos derivados de GAPDH secretados por <i>S. cerevisiae</i> son activos contra una amplia variedad de levaduras y bacterias relacionadas con el vino; se une al ARN rico en AU.
YGR240C	PFK1	Phosphofruktokinasa	Subunidad alfa de la fosfofructoquinasa heterooctamérica; involucrada en la glucólisis, indispensable para el crecimiento anaeróbico activado por fructosa-2,6-bisfosfato y AMP; la mutación inhibe la inducción de glucosa de los genes relacionados con el ciclo celular.
YHR023W	MYO1	MYOsina	Cadena pesada de miosina tipo II; requerida para citocinesis de tipo salvaje y separación celular; se localiza en el anillo de actomiosina; se une a las cadenas ligeras de miosina Mlc1p y Mlc2p a través de sus motivos IQ1 e IQ2 respectivamente.
YIL105C	SLM1	Synthetic Lethal con Mss4	La proteína de unión a fosfoinosítido PI4,5P (2) forma un complejo con Slm2p; actúa río abajo de Mss4p en una ruta que regula la organización del citoesqueleto de actina en respuesta al estrés; sustrato complejo y efector TORC2; la abundancia de proteína aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN; SLM1 tiene un parólogo, SLM2, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YIL148W	RPL40A	Proteína ribosomal de la subunidad grande	Proteína de fusión L40A de la subunidad 60S de ubiquitina-ribosómica; escindida para producir ubiquitina y proteína ribosomal L40A; la ubiquitina puede facilitar el ensamblaje de la proteína ribosomal en los ribosomas; homóloga a la proteína ribosomal de mamífero L40, sin homólogo bacteriano; RPL40A tiene un parólogo, RPL40B, que surgió de la duplicación completa del genoma; la distribución relativa al núcleo aumenta con el estrés de replicación del ADN.
YIR007W	EGH1	Cryptococcus neoformans EGCp2 Homolog	Steryl-beta-glucosidasa con amplia especificidad para agliconas; tiene un papel en el catabolismo de ergosteril-beta-glucósido; requerida para la morfología vacuolar normal.
YJL052W	TDH1	Triose-fosfato Deshidrogenasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), isozima 1; involucrado en glucólisis y gluconeogénesis; tetrámero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3 bis-fosfoglicerato; detectado en el citoplasma y la pared celular; la abundancia de proteína aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN. Los péptidos antimicrobianos derivados de GAPDH secretados por <i>S. cerevisiae</i> son activos contra una amplia variedad de levaduras y bacterias relacionadas con el vino.
YJR009C	TDH2	Triose-fosfato Deshidrogenasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), isozima 2; involucrado en glucólisis y gluconeogénesis; tetrámero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3 bis-fosfoglicerato; detectado en el citoplasma y la pared celular; la abundancia de proteína aumenta en respuesta al estrés de replicación del ADN. Los péptidos antimicrobianos derivados de GAPDH son activos contra una amplia variedad de levaduras y bacterias relacionadas con el vino; TDH2 tiene un parólogo, TDH3, que surgió de la duplicación del genoma completo.

YJR113C	RSM7	Subunidad ribosómica pequeña de las mitocondrias	Proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad pequeña; tiene similitud con la proteína ribosomal <i>E. coli</i> S7.
YKL014C	URB1	Biogénesis ribosómica no saludable	Proteína requerida para la acumulación normal de rRNA 25S y 5.8S; proteína nucleolar; asociada con la partícula pre ribosomal 27SA2; se ha propuesto que puede participar en la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S.
YKL201C	MNN4	MaNNosyltransferase	Putativo regulador positivo de manosilfosfato transferasa Mnn6p; implicado en la manosilfosforilación de oligosacáridos unidos a N; la expresión aumenta en las fases de crecimiento logarítmico tardío y estacionario; la secuencia de codificación contiene polimorfismos de longitud en diferentes cepas; MNN4 tiene un parálogo, YJR061W, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YKR079C	TRZ1	tRNase Z	tRNA 3'-end endonucleasa tRNase Z; también se localiza en las mitocondrias e interactúa genéticamente con la exonucleasa Rex2; homóloga del candidato humano, gen de susceptibilidad al cáncer de próstata ELAC2.
YLR335W	NUP2	Poro nuclear	Nucleoporina implicada en el transporte nucleocitoplásmico; se une a las caras nucleoplásmica o citoplásmica del complejo de poro nuclear, dependiendo de los niveles de Ran-GTP; también tiene un papel en la organización de la cromatina.
YMR036C	MIH1	Mitotic Inducer Homolog	Proteína tirosina fosfatasa implicada en el control del ciclo celular; regula el estado de fosforilación de Cdc28p; homólogo de <i>S. pombe</i> cdc25.
YMR065W	KAR5	KARyogamy	Proteína requerida para la fusión de la membrana nuclear durante la cariogamia; se localiza en la membrana con una porción soluble en el lumen del retículo endoplásmico, puede formar un complejo con Jem1p y Kar2p; similar a la proteína Brambleberry de pez cebra; la expresión del gen está regulada.
YMR092C	AIP1	Proteína que interactúa con actina	Participa en la despolimerización de los filamentos de actina.
YMR205C	PFK2	Phosphofruktokinasa	La subunidad beta de la fosfofructoquinasa heterooctamérica; involucrada en la glucólisis; indispensable para el crecimiento anaeróbico; activada por fructosa-2,6-bisfosfato y AMP; la mutación inhibe la inducción de glucosa de los genes relacionados con el ciclo celular.
YMR301C	ATM1	ABC Transporter, mitocondrial	Transportador de casete de unión a ATP de membrana interna mitocondrial (ABC); exporta precursores sintetizados mitocondrialmente de cúmulos de hierro-azufre (Fe / S) al citosol; el homólogo humano ABCB7 puede complementar levadura mutante nulo.
YOL086C	ADH1	Alcohol deshidrogenasa	Alcohol deshidrogenasa; isozima fermentativa activa como homo- o heterotetrámeros; requerido para la reducción de acetaldehído a etanol, el último paso en la ruta glucolítica; ADH1 tiene un parálogo, ADH5, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YOL148C	SPT20	Supresor de Ty	Subunidad del complejo regulador de la transcripción SAGA; involucrado en mantener la integridad del complejo; las muestras mutantes reducen la elongación de la transcripción en el ensayo de fase de ejecución G-less (GLRO).

YOR193W	PEX27	PEroXisome relacionado	Proteína periférica de membrana peroxisomal; involucrada en el control del tamaño y el número de peroxisomas, interactúa con Pex25p; PEX27 tiene un parálogo, PEX25, que surgió de la duplicación del genoma completo.
YOR279C	RFM1	Factor de represión del elemento de esporulación media	Componente del complejo Sum1p-Rfm1p-Hst1p; Rfm1p, une la histona desacetilasa Hst1p con la proteína de unión a ADN Sum1p; este complejo está involucrado en la represión transcripcional de los genes de esporulación media y en el inicio de la replicación del ADN.
YPL273W	SAM4	Metabolismo de S-adenosilmetionina	S-adenosilmetionina-homocisteína metiltransferasa; funciona junto con Mht1p en la conversión de S-adenosilmetionina (AdoMet) a metionina para controlar la relación metionina / AdoMet; SAM4 tiene un parálogo, YMR321C, que surgió de una duplicación.
YPR080W	TEF1	Factor de elongación de la traducción	Factor de elongación traslacional EF-1 alfa. La forma activa unida a GTP, se une y administra el tRNA aminoacilado en el sitio A de los ribosomas para la elongación de los polipéptidos nacientes; función de pluriempleo como un enlace de actina y agrupando proteína; la asociación con GTPasa Rho1p en la membrana vacuolar puede facilitar la remodelación de la F-actina; involucrado en la reexportación de tRNA desde el núcleo.

**Tabla 3.** Descripción de las principales funciones de los genes que codifican para las proteínas que interactúan con el PI-1 en células humanas HEK293.

<b>Identificador primario del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>
10155	TRIM28	Motivo tripartito 28
158078	EEF1A1P5	Factor de elongación de traducción eucariota 1 pseudogen alfa
1743	DLST	Dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa
1890	TYMP	Timidina Fosforilasa
1937	EEF1G	Factor de elongación 1 gamma
3192	HNRNPU	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea U
3309	HSPA5	Familia de proteínas de choque térmico A (Hsp70) miembro 5
3312	HSPA8	Familia de proteínas de choque térmico A (Hsp70) miembro 8
3313	HSPA9	Familia de proteínas de choque térmico A (Hsp70) miembro 9
3315	HSPB1	Familia de proteínas de choque térmico B (small) miembro 1
3320	HSP90AA1	Proteínas de choque térmico 90 familia alpha clase A miembro 1
3939	LDHA	Lactato deshidrogenasa A
5315	PKM	Piruvato cinasa M1/2
6136	RPL12	Proteína ribosomal L12
6223	RPS19	Proteína ribosomal S19
696	BTN1A1	Butirofilina subfamilia 1 miembro A1
71	ACTG1	Gamma actina 1
7175	TPR	Proteína de la cesta nuclear, región promotora translocada
7184	HSP90B1	Proteína de choque térmico 90 miembro de la familia beta 1
81892	SLIRP	SRA stem-loop interacting RNA binding protein
8340	HIST1H2BL	Histona 1 Familia H2B Miembro 1
8359	HIST1H4A	Histona 1 Familia H4 Miembro
8570	KHSRP	Proteína reguladora de empalme tipo KH

El papel de FIG1 en la muerte celular inducida por PI-1 se relaciona con proteínas que interactúan con el PI-1. En estudios de interacción de proteína con PI-1, el péptido es capaz de mostrar interacción con 36 proteínas, de las cuales una gran mayoría esta relacionada con el metabolismo energético, un interactor del PI-1 es la proteína PCL1, que interactúa con la quinasa dependiente cíclica Pho85p, implicada en la regulación del crecimiento polarizado y la morfogénesis, así como en la progresión a través del ciclo celular. Pho85p regula la progresión del ciclo celular en G<sub>1</sub> en respuesta a los niveles de nutrientes (Huang, Friesen et al. 2007), ya que fosforila al inhibidor del ciclo celular Sic1p y contribuye a la degradación de Sic1p, promoviendo la salida de la etapa G<sub>1</sub> del ciclo celular (Nishizawa, Kawasumi et al. 1998).

Sic1p es un inhibidor del complejo Cdc28-Clb que controla la transición G<sub>1</sub>/S previniendo la prematura salida de G<sub>1</sub> y asegurando la integridad del genoma (Weinreich, Liang et al. 2001), por lo tanto, su actividad impide la progresión hacia la fase S y contribuye en la detención en G<sub>1</sub>. Sic1p también funge como diana de Hog1p (Escote, Zapater et al. 2004), que puede ser activado por diferentes formas de estrés, como el hiperosmótico y, como previamente mencionamos, la falta de *HOG1* en presencia de estrés salino detiene a las células en la fase G<sub>1</sub>, haciendo que sean susceptibles al efecto de inducción de muerte de PI-1, incluso células MATa carentes del receptor Step4p.

El retraso dependiente de Hog1p podría ser importante para permitir que Hog1p induzca la expresión de genes antes de la detención del ciclo celular y un evento que nos permita tener una ventana de eventos en los que PI-1 mantenga interacción con proteínas que se encuentren involucradas en su mecanismo de muerte (Yaakov, Duch et al. 2009).

Dentro del conjunto de proteínas que interactúan con PI-1, encontramos a KAR5p, una proteína requerida para la fusión de la membrana nuclear durante la Cariogamia, donde forma un complejo con Jem1p y Kar2p (Rogers and Rose 2014); Jem1p se requiere para la fusión nuclear durante el apareamiento (Cariogamia), y funciona junto con la proteína Scj1p, en el plegamiento de proteínas y control de

calidad en RE y en conjunto con Hsp70 (BiP/Kar2p) (Makio, Nishikawa et al. 2008), en donde la activación de proteínas de choque térmico es una respuesta natural al insulto de PI-1.

Las mutantes nulas de FIG1 al ser expuestas a PI-1, presentan una viabilidad mayor al 70%, lo que sugiere que PI-1 puede estar induciendo la muerte celular a través de un mecanismo que escapa a la regulación de la integridad de la pared celular y, en consecuencia, del proceso de apareamiento; este hecho es una fuerte evidencia de que la función de inducción de muerte de Fig1p no ha sido reportada. PI-1 induce una muerte celular diferente a la mediada por la feromona  $\alpha$  en concentraciones fisiológicas, lo cual sugiere un nuevo mecanismo de muerte inducido protagonizado por Fig1p.

Es muy probable que la actividad de FIG1 en la inducción de muerte por PI-1 se encuentre presente en células de mamífero, debido a que FIG1 codifica para una proteína con cuatro regiones transmembranales que comparte un motivo similar con la superfamilia de proteínas PMP-22 / EMP / MP20 / Claudin. La actividad relacionada con la muerte inducida por FIG1 en levadura, podría estar conservada en mamíferos, debido a que FIG1 pertenece funcional y estructuralmente a los miembros de esta super familia, PMP-22 (PERP). Así, la sobreexposición a p53 en células de mamífero, como a muchas otras proteínas de la familia PMP-22 y tetraspan, provoca la inducción de apoptosis (Ihrie and Attardi 2004); este fenómeno puede explicar la pérdida de PERP en adenomas pituitarios granulados agresivos (Kiseljak-Vassiliades, Mills et al. 2017) y su activación transcripcional por p53 durante la apoptosis en células de mamíferos (Kiseljak-Vassiliades, Mills et al. 2017). Más recientemente, se ha observado que PERP participa en la inflamación celular durante la infección por *Salmonella* (Bedkowska, Lawicki et al. 2009, Hallstrom and McCormick 2016).

Las proteínas que interactúan con PI-1 en células HEK293 son 23, y algunas de ellas están relacionadas con la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR, por sus siglas en inglés); respuesta al estrés celular relacionado con el retículo endoplasmático. UPR es una respuesta al estrés que se



conserva entre mamíferos, así como en levaduras y nematodos; se activa debido a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplasmático. En este contexto, la respuesta UPR persigue dos objetivos principales: restaurar la función normal de la célula, deteniendo la traducción de proteínas y activando las vías de señalización que permitan incrementar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas, o bien, si la célula no consigue este primer objetivo en un cierto lapso de tiempo o si la anomalía persiste, la respuesta UPR inicia un proceso de muerte celular (Uguz, Naziroglu et al. 2009).

Las proteínas de choque térmico HSP tienen un papel importante en la inducción de respuesta antitumoral, en el transporte de péptidos, como reguladores inmunogénicos, o actuando como inmunoestimulantes, induciendo la activación y maduración de células dendríticas (DC) (Gardner and Ruffell 2016). De las proteínas que se relacionan con PI-1 en células 293HEK, algunas interactúan con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II HSP90AA1, HSPA8 y PKM, la cual es una piruvato quinasa que estimula la activación transcripcional mediada por POU5F1 que juega un papel en la muerte celular independiente de caspasa en células tumorales (Stetak, Veress et al. 2007, Lee, Kim et al. 2008). PKM se transloca al núcleo, donde esto es suficiente para inducir la muerte celular independiente de caspas (Luo, Hu et al. 2011, Chen, Wang et al. 2015).

El análisis de genes homólogos entre los interactores del péptido en los conjuntos de humano y levadura, mostró dos genes en común, la gamma actina ATCG1, una proteína que se localiza abundantemente en la célula y se encuentra sobre representada en los análisis de interacción proteína - proteína. Por el contrario, HSPA8 es un gen que codifica a la proteína HSP70 como una chaperona que se relaciona con diversos procesos moleculares implicados en una amplia variedad de procesos celulares como la protección del proteoma al estrés, el plegamiento y transporte de polipéptidos recién sintetizados, la activación de la proteólisis de proteínas mal plegadas y la formación y disociación de complejos de proteínas. Además, juega un papel fundamental en el sistema de control de calidad de las

proteínas, asegurando su correcto plegamiento, replegamiento de las proteínas mal plegadas y control de la orientación de las proteínas para su posterior degradación.

La relación entre la muerte celular y el arresto del ciclo celular ha sido descrita en mamífero (Wiman and Zhivotovsky 2017) y levadura, y se ha propuesto que debe haber programas para inducir la muerte celular (Severin and Hyman 2002); sin embargo, no está claro cómo las células se comprometen con un programa de muerte celular, especialmente cuando están en una etapa detenida del ciclo celular, en la cual se protegen contra estímulos externos (Valcourt, Lemons et al. 2012).

La efectividad de PI-1 en MATa y células MAT $\alpha$  (en comparación con lo observado con feromona  $\alpha$ , por ejemplo), los mutantes genéticos y la variante PI-1 descrita en este trabajo, hacen de este sistema una metodología para el estudio de los mecanismos de comunicación entre la detención del ciclo celular y muerte celular en levadura. La relación entre detención del ciclo celular y muerte en levadura sentará principios que permitan tener un impacto en otros organismos, bajo la consideración de que el ciclo celular es un mecanismo altamente conservado entre todas las especies, y este hecho permitirá el diseño de moléculas citotóxicas dirigidas a la regulación del ciclo celular, un mecanismo reconocido como posible blanco terapéutico para tratamiento de diferentes cánceres (Waldman, Zhang et al. 1997).

Recientemente, se ha propuesto que uno de los mecanismos que conduce a la recurrencia del cáncer se da en células inactivas (detenidas), debido a que pueden adecuar su maquinaria transcripcional en respuesta a los fármacos. La presente información muestra una ventana de oportunidad para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos dirigidos a las células inactivas (detenidas), como método para tratar cánceres recurrentes (Gupta, Onder et al. 2009, Ehrhardt, Wachter et al. 2013, Wells, Griffith et al. 2013).

Así, será necesario el desarrollo de compuestos polifarmacéuticos que combinen la actividad de detención del ciclo celular y muerte celular; los péptidos cazadores/ asesinos, compuestos de un péptido ligando (cazador) fusionado a un péptido

antibacteriano/antimitocondrial (asesino), representan una clase de compuestos polifarmacéuticos útil en el tratamiento del cáncer (Arap, Pasqualini et al. 1998, Ellerby, Arap et al. 1999, Arap, Haedicke et al. 2002).

El desarrollo de fármacos que induzcan la muerte de células quiescentes podrían ser una alternativa para el combate contra microorganismos tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Neisseria meningitidis*, que detienen su ciclo celular y así evaden la acción de los antibióticos de uso común. Puesto que los antibióticos que existen en la actualidad actúan en células en división, estos no tienen efecto tóxico sobre las células que no están dividiéndose, tales como esporas microbianas.

# CONCLUSIONES

- La muerte inducida por PI-1 requiere la detención del ciclo celular y no solo llegar a la fase G<sub>1</sub>.
- La participación de genes involucrados en procesos celulares (autofagia, flujo de calcio, crecimiento filamentoso) activados por la vía de la feromona  $\alpha$  no son requeridos en la muerte inducida por PI-1.
- STE2 y los genes de la vía MAPKs son necesarios para la muerte inducida por PI-1 solo por prevenir la detención del ciclo celular.
- La detención del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, por una activación independiente al receptor STE2, es suficiente para inducir la muerte celular por acción del PI-1.
- FIG1 es necesario para la muerte inducida por PI-1, y su mecanismo es independiente de la detención del ciclo celular.
- EL Péptido Iztli-1 es capaz de inducir muerte durante la detención del ciclo celular.
- El Péptido Iztli-1 es capaz de inducir muerte en células detenidas en su ciclo celular por una vía independiente de las MAPK.
- La vía MAPK solo fue relevante en la inducción de muerte de PI-1 por su acción de inducir el arresto del ciclo celular.
- El Péptido Iztli-1 induce la muerte en células MAT $\alpha$ , detenidas en fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> del ciclo celular.

- PI-1 es un tipo especial de péptido cazador-asesino que combina (ver Figura 1) una secuencia de péptido cazador que se une específicamente a un receptor de feromona  $\alpha$  en las células diana para inducir la detención del ciclo celular y una secuencia de péptido asesino que se internaliza a través del receptor del péptido cazador.
- La señalización del péptido cazador (feromona  $\alpha$ ) que induce la detención del ciclo celular, es relevante en la muerte inducida por el PI-1 solo por su capacidad de detener el ciclo celular.

# PERSPECTIVAS

Los mecanismos que gobiernan la inducción de muerte inducida por PI-1 en un arresto del ciclo celular, requieren de un enfoque global para ser desentrañados; por lo que, en una primera aproximación, es relevante estudiar los efectos de muerte del PI-1 en mutantes dobles que carezcan de los genes *FIG1* y *HOG1*, lo que nos permitirá resaltar el papel de *FIG1* sobre el arresto del ciclo celular y la capacidad de protección ante el insulto del PI-1, y, asimismo, en un abordaje global, es conveniente analizar las interacciones que tiene el PI-1 con las proteínas involucradas en el arresto del ciclo celular, lo que nos permitirá elucidar si existe un complejo que se encuentra mediando, induciendo y/o activando el efecto de muerte que induce el PI-1 en un arresto del ciclo celular.

En una segunda instancia, resultaría un gran aporte el entendimiento de la relación entre el arresto del ciclo celular y la muerte, especialmente en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, la cual, entre sus objetivos busca proteger a la célula de estímulos externos y, de igual manera, de gran interés, evaluar si los mecanismos de señalización son conservados, y si el efecto en modelos de células que presenten alta resistencia a fármacos involucra un mecanismo de arresto del ciclo celular como medio de defensa.



## An Antimicrobial Peptide Induces FIG1-Dependent Cell Death During Cell Cycle Arrest in Yeast

Vladimir J. Arellano<sup>1</sup>, Paula Martinell García<sup>1,2†</sup>, Jonathan G. Rodríguez Plaza<sup>2†</sup>, María T. Lara Ortiz<sup>1</sup>, Gabriele Schreiber<sup>2</sup>, Rudolf Volkmer<sup>3,4</sup>, Edda Klipp<sup>2</sup> and Gabriel Del Rio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Theoretische Biophysik, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany, <sup>3</sup> Institut für Medizinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, <sup>4</sup> Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Germany

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Octavio Luiz Franco,  
Universidade Católica de Brasília,  
Brazil

#### Reviewed by:

Autar Krishen Mattoo,  
United States Department  
of Agriculture, United States  
Anbarasu Kumarasamy,  
Bharathidasan University, India  
Elizabete de Souza Cândido,  
Universidade Católica Dom Bosco,  
Brazil

#### \*Correspondence:

Gabriel Del Rio  
gdelrio@ifc.unam.mx

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work.

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Antimicrobials, Resistance  
and Chemotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 02 November 2017

Accepted: 23 May 2018

Published: 14 June 2018

#### Citation:

Arellano VJ, Martinell García P,  
Rodríguez Plaza JG, Lara Ortiz MT,  
Schreiber G, Volkmer R, Klipp E and  
Del Rio G (2018) An Antimicrobial  
Peptide Induces FIG1-Dependent Cell  
Death During Cell Cycle Arrest  
in Yeast. *Front. Microbiol.* 9:1240.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.01240

Although most antibiotics act on cells that are actively dividing and non-dividing cells such as in microbe sporulation or cancer stem cells represent a new paradigm for the control of disease. In addition to their relevance to health, such antibiotics may promote our understanding of the relationship between the cell cycle and cell death. No antibiotic specifically acting on microbial cells arrested in their cell cycle has been identified until the present time. In this study we used an antimicrobial peptide derived from  $\alpha$ -pheromone, IP-1, targeted against MATa *Saccharomyces cerevisiae* cells in order to assess its dependence on cell cycle arrest to kill cells. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy of various null mutations of genes involved in biological processes activated by the pheromone pathway (the mitogen-activated protein kinase pathway, cell cycle arrest, cell proliferation, autophagy, calcium influx) showed that IP-1 requires arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> in order to kill yeast cells. Isolating cells in different cell cycle phases by elutriation provided further evidence that entry into cell cycle arrest, and not into G<sub>1</sub> phase, is necessary if our peptide is to kill yeast cells. We also describe a variant of IP-1 that does not activate the pheromone pathway and consequently does not kill yeast cells that express the pheromone's receptor; the use of this variant peptide in combination with different cell cycle inhibitors that induce cell cycle arrest independently of the pheromone pathway confirmed that it is cell cycle arrest that is required for the cell death induced by this peptide in yeast. We show that the cell death induced by IP-1 differs from that induced by  $\alpha$ -pheromone and depends on FIG1 in a way independent of the cell cycle arrest induced by the pheromone. Thus, IP-1 is the first molecule described that specifically kills microbial cells during cell cycle arrest, a subject of interest beyond the process of mating in yeast cells. The experimental system described in this study should be useful in the study of the mechanisms at play in the communication between cell cycle arrest and cell death on other organisms, hence promoting the development of new antibiotics.

**Keywords:** antimicrobial peptide, cell cycle arrest, cell death, *Saccharomyces cerevisiae*, cytometry, microscopy, gene deletions, pheromone pathway

## INTRODUCTION

Programmed cell death (PCD) occurs in both multicellular and unicellular organisms and constitutes a homeostatic mechanism in cell populations (Andersen and Kornbluth, 2013). There is significant evidence supporting the existence in *Saccharomyces cerevisiae* of genetic programs for induction of cell death (Munoz et al., 2012). In recent decades, it was shown that *S. cerevisiae* features PCD during sexual mating (Severin and Hyman, 2002). In such mating processes, haploid MAT $\alpha$  (mating type  $\alpha$ ) cells produce  $\alpha$ -pheromone as a signal to induce the mating response in MATa (mating type a) cells and vice versa; this response involves multiple intracellular signaling events that start with the activation of the  $\alpha$ -pheromone receptor (Ste2p), which upregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which in turn leads to cell cycle arrest (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) and morphological changes collectively described as the shmoo phenotype (Dohlman and Thorner, 2001). After this primary signal, the MATa cells make a decision: to mate with a MAT $\alpha$  cell, to recover from the arrest, or to activate a cell death program. Even under normal mating conditions, 6% of cells will fail to find a mating partner and die through an apoptosis-like mechanism; alternatively, when the pheromone concentration is above physiological concentrations, up to 25% of cells die as a consequence of three independent waves of non-apoptotic cell death (Zhang et al., 2006). Thus, cell death can take place during cell cycle arrest in *S. cerevisiae*. Whether or not this cell death depends on cell cycle arrest is still unknown, but there is evidence for a relationship between these two molecular processes. For instance, the induction of random death by  $\alpha$ -pheromone as a consequence of transcriptional squelching has been excluded in consideration of the uniformity of cell cycle arrest induced by  $\alpha$ -pheromone (Dolan, 1996); chitin synthesis is required for cell cycle progression and viability, and its production is induced by  $\alpha$ -pheromone (Shaw et al., 1991); slow and fast cell death induced by  $\alpha$ -pheromone were inhibited by null mutants of genes that regulate cell cycle arrest (*FUS3* and *FAR1*) (Zhang et al., 2006). Thus, mating involves cell cycle arrest and PCD, and while both processes may be induced by the pheromone, it is not known whether or not the PCD induced by the pheromone takes place during the cell cycle arrest. In that sense, *S. cerevisiae* and its mating process constitute a convenient experimental system to study the antibiotic action of a molecule during cell cycle arrest. Furthermore, the identification of antibiotic molecules that induce PCD in cells arrested in their cell cycle will be relevant for the development of new classes of antibiotics; such antibiotics have not been described in the literature, only cell cycle disruptors (Shapiro and Harper, 1999; Errington, 2010; Sass and Brötz-Oesterhelt, 2013; Senese et al., 2014).

Previously, we described a family of antimicrobial peptides derived from  $\alpha$ -pheromone (Rodriguez Plaza et al., 2012), referred to as Iztlil peptides (IPs). These peptides include the 13 amino acid residues of the  $\alpha$ -pheromone sequence, together with a six amino acid residue addition at the N-terminus of this sequence; the addition of these six residues gives the peptide sequences the same physicochemical properties of known antimicrobial peptides and consequently these peptides

were expected to show antimicrobial activity.  $\alpha$ -pheromone was included in these peptides in order to target the peptides' antimicrobial action against *S. cerevisiae* cells that express the  $\alpha$ -pheromone receptor (e.g., MATa cells). Our initial characterization of one of these peptides, IP-1, showed that IP-1 maintained pheromone-like activity (e.g., MATa cells exposed to IP-1 exhibited the shmoo phenotype) and inhibited the growth of *S. cerevisiae* cells only if the latter expressed the  $\alpha$ -pheromone's receptor; such inhibition of growth was more effective than that achieved by  $\alpha$ -pheromone. In the present work, we show that IP-1 induces cell death in MATa or MAT $\alpha$  cells upon the induction of cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> whether through the  $\alpha$ -pheromone receptor or otherwise. Our results show that entry into cell cycle arrest, but not entry into G<sub>1</sub> phase or maintenance of cell cycle arrest, is required for IP-1-induced cell death in MATa cells. This cell death depends not only on cell cycle arrest, but also on *FIG1*, a gene that codes for an integral membrane protein required for cell death induced by the pheromone at non-physiological concentrations. The potential uses of IP-1 in basic and applied research are analyzed in light of these results.

## MATERIALS AND METHODS

All biological and chemical materials were handled in accordance with Official Mexican Standards (NOM-087-SEMARNAT-SSA12002).

### Strains

The *S. cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. The null mutant strains were acquired from Open Biosystems and the strains carrying the CDC28-as1 mutant were kindly provided by Prof. Alejandro Colman Lerner.

### Peptides

$\alpha$ -Pheromone peptide was obtained from Sigma-Aldrich (T6901) at  $\geq 93\%$  purity. IP-1 was synthesized by AnaSpec, Inc. (United States) at  $>95\%$  purity. Prof. Rudolf Volkmer at the Charité in Berlin synthesized IP-1-CO-NH<sub>2</sub> and obtained  $>95\%$  purity. For each peptide, an initial 1 mg/mL solution of peptide in distilled water was prepared and the actual concentration was determined at 280 nm using a NanoDrop device (Thermo Fisher Scientific, United States); this stock solution was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The sequences and molecular weights of each peptide used in this study are presented in Table 2.

### Measuring the Inhibition of Growth Induced by Peptides

An early stationary phase inoculum was obtained from a single colony growing overnight at  $30^{\circ}\text{C}$  in YPD medium (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) of all of the strains used in this study. These inocula were diluted to reach an optical density of 0.12 at 600 nm in a total volume of 100  $\mu\text{L}$  YPD medium and treated with the peptides listed in Table 2 at 10  $\mu\text{M}$  final concentration, except in the case of pheromone and IP-1-CO-NH<sub>2</sub>, where concentrations of 1, 5, 20,



**TABLE 1 |** Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>HIS3Δ1 LEU2Δ0 MET15Δ0 URA3Δ0</i>	Open Biosystems, yeast parental strain collection, glycerol stocks
BY4742	<i>HIS3Δ1 LEU2Δ0 LYS2Δ0 URA3Δ0</i>	Open Biosystems, yeast parental strain collection, glycerol stocks
BY4741 null mutants	The following genes were replaced with the <i>KanMX4</i> marker: <i>ATG11, AYT1, BRE2, CMS1, COX17, CYC3, DEP1, DNM1, DRS2, ELM1, ERV46, FRT2, FUN14, GAT3, ISA2, MHT1, NTG1, NUP60, OYE2, PEP4, POR1, PSR2, SAW1, SEO1, SIR4, SNC1, SNF7, SPO7, SPO75, STE20, STE4, SWC3, SWD1, SYN8, UBR2, UIP3, UTH1, ATG3, ATG19, TOR1, MEH1, SLM4, GTR2, VAC8, NVJ1, PEP4, AUP1, UTH1, GEA1, IRS4, VTC1, VTC2, VTC3, VTC4, VPS51, VPS52, VPS53, VPS54, YPT6, PBS1, PHO81, RIM15, FIG1, CCH1, MID1, LRG1, RVS161, PEA1, PEA2, STE5, STE7, STE11, STE50, FUS3, KSS1, BEM1, BNI1, KAR4, RME1, HAL9, XBP1, HMS1, SKN7, PUT3, MSN4, MGA1, FKH2</i>	Open Biosystems, YKO MATa strain collection, glycerol stocks
ACLY394	W303 (MATa): <i>BAR1Δ CDC28-as1 ΔPRM1::PPRM1-YFP::HIS5+</i>	Shokat et al., 2000; glycerol stock
ACLY387	W303 (MATa): <i>BAR1Δ ΔPRM1::PPRM1-YFP::HIS5+</i>	Shokat et al., 2000; glycerol stock
BY4741 $\rho 0$	<i>HIS3Δ1 LEU2Δ0 MET15Δ0 URA3Δ0</i>	This study; glycerol stock

**TABLE 2 |** Peptide sequences used in this study.

Name	Sequence	Molecular weight (g/mol)
IP-1	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY	2490
PI-1-CO-NH <sub>2</sub>	KFLNRFWHWLQLKPGQPMY-CO-NH <sub>2</sub>	2490
$\alpha$ -Pheromone	WHWLQLKPGQPMY	1684

and 40  $\mu$ M were used when specified. These mixtures were grown in sterile 96-well half-area plates (Corning Costar,

United States) and incubated in a Synergy MX Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc.) for 24 h at 30°C at a constant orbital shaking (300 rpm) and cell density was estimated by recording the absorbance of the culture at 600 nm every hour. The area under this growth curve (AUC) was obtained by adding the optical density measured each hour. Comparison between the AUCs observed for cells with no treatment and the AUCs exposed to different peptides defined the level of growth inhibition exerted by the peptides. Every null mutant associated with the MAPK pathway was validated by PCR; the oligonucleotides used in these experiments are shown in **Table 3**.

### FUN1 Viability Assay

Microbial probes for the LIVE/DEAD Yeast Viability Kit (Invitrogen, United States) were used. Cells were grown in 4 mL minimal synthetic media [for every 100 mL of media, we added 0.67 g of yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 0.1 g of potassium phosphate monobasic (J.T. Baker), 2.0 g of glucose (Sigma), and 0.079 g of mixture of amino acids (Formedium)] for 16 h. The cells were diluted to a final optical density of 0.12 at 600 nm. To determine the number of live/dead cells in any condition, 20  $\mu$ L of these cultured cells were recovered and centrifuged at 13,000 rpm for 10 s, then washed twice with distilled water and finally diluted in 20  $\mu$ L glucose-HEPES media [2% D-(+)-glucose and 10 mM Na-HEPES, final pH adjusted at 7.2]. The samples were treated with 5  $\mu$ M FUN1 for 30 min at 30°C and 250 rpm in constant agitation. Fifteen microliters of the stained cultures were analyzed in an Amnis® imaging flow cytometer (ImageStream X Mark II).

**TABLE 3 |** Oligonucleotides used in this study to verify the proper insertion of the *KanMX4* cassette to generate null mutants.

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')
KanC Fwd	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
NatC Fwd	TACCAACAAATACAAGCCTACA
Ste11D Rvs	ATCTTACTTGTATTTATCCAGGGG
Ste50D Rvs	CATTATCCAACATGAAAATAAGGC
Ste7D Rvs	TGGTTGTGGCATAAAAATAAAGAAT
Ste5D Rvs	GAATGAAAAGCAATATACGCAAGAT
Fus3D Rvs	AATCACTACTTTGGTATTTGAGCG
Kss1D Rvs	GTGTTGATATCGCCTCTTTGATTAC
Far1D Rvs	TGCTACAACCATGTTGGTATAATTG
Fig1D Rvs	AAATTTCTGGAGCTTTGTACATTG
Bem1D Rvs	CATGCATTATGATTGAGTGGAATA
Tec1D Rvs	GATGTGATTGGCTGGTTACTTCT
Flo1D Rvs	CCAATACTACCGTACTTGTCTTGT
Phd1D Rvs	ATGTTTCAAAAAGGCATCATATTGT

Oligonucleotide sequences used to verify the proper insertion of the corresponding antibiotic resistance cassette in the deletion mutant strains. *KanC Fwd* oligonucleotide was the forward primer used to verify the presence of the *KanMX4* cassette while *NatC Fwd* oligonucleotide was used for the *NatMX4* cassette. These were used in conjunction with a reverse primer (Rvs) homologous to a region downstream of the deleted gene.

### Cell Cycle Arrest of *MAT $\alpha$ :hog1 $\Delta$ ::KanMX* Cells by Hyperosmotic Shock

An early stationary phase inoculum was obtained from a single colony growing overnight at 30°C in YPD medium, cells were diluted to an optical density of 0.12 at 600 nm and culture was incubated in a total volume of 100  $\mu$ L supplemented with YPD medium and 0.6 M sodium chloride for 36 h. IP-1 was added to this culture at a final concentration of 10  $\mu$ M. As control, cells were treated with the equivalent volume of distilled water.

### Effect of IP-1 on Cells in Different Cell Cycle Stages

BY4741 and BY4742 strains were grown overnight in YPD; the cell density of these cultures was adjusted to  $OD_{600} = 0.8$ – $1.3$  in a photometer (Kinetik). G<sub>1</sub> (petit) cells were separated from the other cell cycle phases (G<sub>2</sub>, S, M) by elutriation with a Beckman Coulter JE-5.0 elutriation system. Cells were centrifuged and resuspended in PBS to stop cell growth. After elutriation, cells were kept on ice and the cell number was determined (CasyCounter). Next, the YPD was inoculated with  $2 \times 10^6$  cells/mL and these cells were exposed to  $\alpha$ -pheromone, IP-1, or water as a control. These cultures were grown for 20 h at 30°C and the optical density was recorded every hour at 600 nm in a FLUOstar OPTIMA plate reader (BMG Labtech).

### Chemically Induced Cell Cycle Arrest

Cells were grown in 4 mL YPD at 30°C at 250 rpm in constant agitation for 16 h; they were then diluted with YPD to an optical density of 0.12 at 600 nm. The culture was grown to an optical density of 0.4 and then treated with 15  $\mu$ g/mL nocodazole for 2 h. Cells treated with nocodazole were arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase using 5  $\mu$ M TBT (tributyltin) for 2 h; it has been reported that under such conditions over 90% of the population was in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase (Sekito et al., 2014). Samples were taken for analysis of cell cycle and viability as described in Sections “FUN1 Viability Assay” and “Cell Cycle Analysis.”

### Cell Cycle Analysis

Cells with different treatments were diluted to a final optical density of 0.4 at 600 nm, washed and fixed in 70% EtOH/30% distilled water overnight. These fixed cells were then treated with 0.1 mg/mL RNase A (Sigma-Aldrich) at 37°C for 45 min; to stain their DNA, fixed cells were exposed to 5 nM propidium iodide (PI; Molecular Probes, Eugene) and analyzed within the following 6–12 h at 493 nm excitation and 632 nm emission. Samples were analyzed by an ImageStream imaging flow cytometer (Amnis Corporation, Seattle, WA, United States) using INSPIRE acquisition software; 15,000 cells per sample were recorded in bright field and the corresponding fluorescence channel. PI fluorescence and the corresponding bright field images were collected in Channel 4 (595–660 nm) and Channel 1 (420–480 nm), respectively. Images were analyzed using IDEAS v3.0 image analysis software to identify in-focus images (RMS value >50). The measurements generated from the images (aspect ratio vs. area of the bright field channel) were

plotted to select single and double cells; single cells had an aspect ratio of 1 and double cells of 0.5. Three regions were selected for further analysis. Cells in G<sub>1</sub>, S, or G<sub>2</sub>/M were visually identified using three morphological criteria: single nuclei and no bud (G<sub>1</sub>), single round nuclei and a visible bud (S-phase), or elongated or divided nuclei and a large bud (G<sub>2</sub>/M).

### Generation of $\rho$ 0 Strains of *Saccharomyces cerevisiae*

A colony of MAT $\alpha$  *S. cerevisiae* was grown in 2 mL of Complete Supplement Mix (CSM) medium with 5  $\mu$ L of ethidium bromide (stock solution: 10 mg/mL, sterilized by filtration) at 30°C for 2 days. After this treatment, a sample of 10  $\mu$ L of this cell solution was added to 2 mL of new CSM medium with 5  $\mu$ L of ethidium bromide and incubated at 30°C for 2 days. Ten microliters of the cell solution was streaked on a YPD plate and incubated at 30°C for 36 h. A colony was streaked in a new YPD plate and incubated at 30°C for 36 h. To verify the lack of the mitochondrial genome, several colonies from this plate were replicated in YPD and YPEG (3% glycerol, 3% ethanol) plates.

### Effect of IP-1 on Cell Growth in Respiratory and Fermenting Media

From all strains of interest a single colony was grown overnight in YPD medium (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) or YPLac (yeast extract 1%, peptone 2%, lactic acid 2%, ammonium sulfate 0.12%, potassium phosphate monobasic 0.1%) pH 5.5. These cultures were used to inoculate fresh YPD or YPLac media to reach 0.4 optical density (600 nm) and then diluted to 0.03 O.D. in a total volume of 200  $\mu$ L. BY4741 and W303 strains were tested against IP-1 in a 96-well plate, each containing 200  $\mu$ L, incubated at 30°C and agitated using a Synergy MX (BioTek Instruments, Inc.). Cell growth was estimated by measuring optical density at 600 nm every hour for 24 h.

### Pheromone Signaling in the Presence of IP-1-CO-NH<sub>2</sub> in *S. cerevisiae*

Strain BY4741 expressing the *FUS1-GFP* fusion was grown in 5 mL of synthetic complete media lacking histidine (SC-his) (yeast nitrogen base w/o amino acids 0.67%, potassium phosphate monobasic 0.1%, glucose 2%) containing 0.077% Complete Supplement Mixture (CSM-His) for 16 h at 30°C and agitation at 250 rpm. These cells were diluted with fresh medium to a final optical density of 0.4 at 600 nm and then 200  $\mu$ L of cells was treated with either 10  $\mu$ M  $\alpha$ -pheromone for 2 h, 10  $\mu$ M IP-1 for 2 h, or 40  $\mu$ M IP-1-CO-NH<sub>2</sub> for 8 h. The cells were then recovered and washed three times with sterile distilled water. Pellets were diluted in 20  $\mu$ L of fresh medium and placed on a slide with 10  $\mu$ L low melting point agarose and observed with a multiphotonic microscope (Olympus FluoView FV1000) at 60 $\times$  magnification and an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 510 nm. The images were reconstructed using the FV viewer software provided by the manufacturer of the microscope.

## RESULTS

### Is Cell Cycle Arrest Associated With IP-1 Cytotoxicity in MATa Cells?

In a previous study, we showed that IP-1 alters mitochondrial function in isolated mitochondria, but we also noted that such activity alone or in combination with pheromone activity did not explain the cytotoxicity of IP-1 in MATa cells (Rodríguez Plaza et al., 2012). Here we have extended those observations and also measured the effect that IP-1 produces on MATa cell growth in respiratory and/or fermenting media. IP-1 inhibits the growth of cells in both respiratory and fermenting media (BY4741 cells grown in YPD media), yet cells grown in respiratory media are more resistant to IP-1 cytotoxicity (W303 cells grown in YPLac media) than those grown in fermenting media (BY4741 $\rho$ 0 cells grown in YPD media) (see Supplementary Figure S1). Yeast cells grown in rich media in batch conditions tend to switch from respiratory to fermenting metabolism as a result of oxygen deprivation; hence, these cells are under conditions similar to those of cells grown in fermenting media. How are cells growing in fermenting media more susceptible to the cytotoxicity of IP-1? One possibility is that fermenting cells are prompted to enter into a state similar to that induced by nutrient deprivation, which leads to cell cycle arrest (Broach, 2012). This possibility is consistent with our previous results regarding the requirement of the STE2 receptor for IP-1 to inhibit cell growth (Rodríguez Plaza et al., 2012). That is, Ste2p signaling induces multiple responses in the cell, but relevant to this study is the arrest of the cell cycle in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, which is ultimately required for cells to mate (Torres et al., 2011). We will explore the possibility that IP-1 requires a cell cycle arrest to kill cells, but first we established a procedure to quantify cell death and cell cycle stage using cell cytometry coupled to fluorescence microscopy. First, to quantify the cell death achieved by IP-1 on MATa cells, we performed a viability assay using the FUN1 fluorophore (see Supplementary Figure S2). We observed that cells exposed to distilled water (the diluent for all peptides tested in this study) displayed defined red vacuolar structures, indicating that FUN1 was being metabolized and that consequently the cells were living. However, FUN1 was not metabolized in cells treated with IP-1 and a diffuse orange fluorescence was observed in the cytoplasm, indicating that these were dead cells. We observed a significant difference in the number of viable cells after 1 h of treatment with IP-1 compared to cells not exposed to this peptide (Figure 1); notably, the number of dead cells treated with IP-1 was similar to the number of dead cells when the cells were boiled (positive control for dead cells) confirming the effectiveness of IP-1 in the induction of cell death in MATa cells. Furthermore, we determined the cell cycle phase of the MATa cells treated with IP-1 at different times, and observed that these cells tended to accumulate in G<sub>1</sub> phase (see Figure 2).

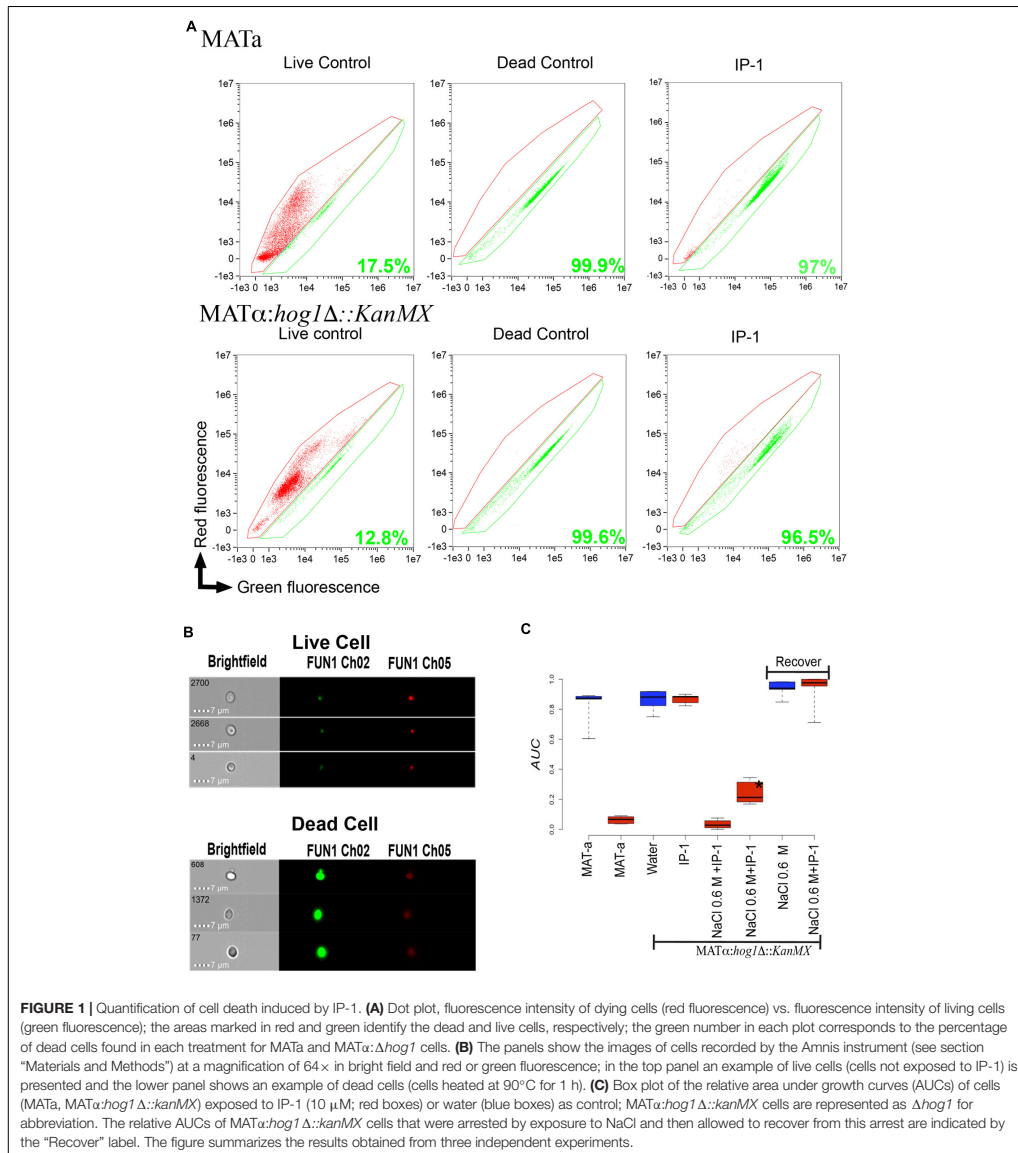
### Which Cellular Responses Activated by Pheromone Signaling Are Required for IP-1 to Kill MATa Cells?

As noted above, Ste2 signaling involves multiple cellular responses. To discard the participation of cellular processes not

involved in cell cycle arrest in the cell death induced by IP-1 on MATa cells, we analyzed the effect on cell growth that IP-1 has on MATa strains carrying a null mutant of genes involved in different cellular processes activated by pheromone signaling (e.g., autophagy, filamentous growth, calcium influx) and we found that none was relevant to IP-1-induced cell death (see Supplementary Figure S3). On the contrary, the null mutants of every gene involved in the MAPK pathway activated by Ste2p prevented IP-1-induced cell death (see Figure 3); this signaling pathway leads cells to a cell cycle arrest. Our results show that the strains carrying null mutants of genes *STE5*, *STE7*, *STE11*, or *STE50* are fully protected against the cytotoxicity of IP-1 and the cell growth arrest induced by the pheromone. The *FUS3* null mutant, which is downstream of the previous MAPKs, showed moderate resistance against IP-1 cytotoxicity and was resistant to the pheromone-induced arrest. The *FAR1* null mutant, a kinase downstream of Fus3p, was also resistant to both the IP-1 cytotoxicity and the growth arrest induced by the pheromone; hence, genes affecting the cell cycle arrest mediated by the MAPK became resistant to the cytotoxicity of IP-1. Other kinases associated with the MAPK pathway (*FIG1*, *BEM1*, *KSS1*) were tested and only *BEM1* protected against the cell growth inhibition induced by either IP-1 or  $\alpha$ -pheromone, indicating that the lack of *BEM1* protects against IP-1 cytotoxicity by preventing the cell cycle arrest. Alternatively, the *FIG1* null mutant did show protection against IP-1 growth inhibition similar to that observed by the *FUS3* null mutant; however, the *FIG1* null mutant did not protect against the growth arrest induced by  $\alpha$ -pheromone. Thus, *FIG1* is the only gene that protects against the cytotoxicity of IP-1 by a mechanism not related to the prevention of cell cycle arrest.

### Is Entry Into the G<sub>1</sub> Cell Cycle Phase Sufficient for IP-1 Cytotoxicity?

To test whether or not entry into the G<sub>1</sub> cell cycle phase (as opposed to arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) is relevant in IP-1 cytotoxicity, we separated MAT $\alpha$  cells in G<sub>1</sub> phase from those in any other cell cycle phase (G<sub>2</sub>/M/S) by elutriation, and each fraction was tested against IP-1; MATa cells used as a positive control for IP-1 cytotoxicity did not grow when exposed to IP-1 independently of the cell cycle phase (see Figure 4). MAT $\alpha$  cells (cells not expressing Ste2p) at different cell cycle phases treated with IP-1 were resistant to the IP-1-induced cell growth inhibition, hence showing that is not the G<sub>1</sub> cell cycle phase, but the arrest on G<sub>1</sub> (G<sub>0</sub>) the one relevant for IP-1 cytotoxicity when cells activate the pheromone pathway. It should also be noted that the pheromone inhibited the growth of MATa cells in G<sub>1</sub>, but to a lesser extent than IP-1. Since the MAP kinases that protected against IP-1 cytotoxicity were kinases that act before the cell cycle arrest, we tested if kinases after the cell cycle arrest (*FAR3*, *FAR7*, *FAR8*, *FAR9*, *FAR11*; Kemp and Sprague, 2003) were also relevant for IP-1 cytotoxicity. All the strains carrying a null mutant on these genes showed cell growth arrest induced by the pheromone and cell growth inhibition induced by IP-1 (see Figure 5). Hence, induction of pheromone response leading to cell cycle arrest seems to be relevant in IP-1 cytotoxicity during the pheromone response.

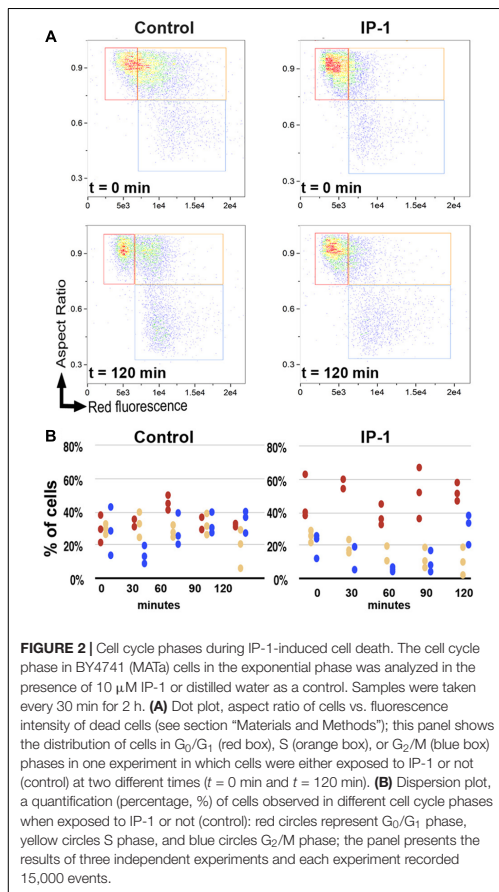


**FIGURE 1 |** Quantification of cell death induced by IP-1. **(A)** Dot plot, fluorescence intensity of dying cells (red fluorescence) vs. fluorescence intensity of living cells (green fluorescence); the areas marked in red and green identify the dead and live cells, respectively; the green number in each plot corresponds to the percentage of dead cells found in each treatment for MATα and MATα:Δ*hog1* cells. **(B)** The panels show the images of cells recorded by the Amnis instrument (see section "Materials and Methods") at a magnification of 64× in bright field and red or green fluorescence; in the top panel an example of live cells (cells not exposed to IP-1) is presented and the lower panel shows an example of dead cells (cells heated at 90°C for 1 h). **(C)** Box plot of the relative area under growth curves (AUCs) of cells (MATα, MATα:*hog1* Δ::*kanMX*) exposed to IP-1 (10 μM; red boxes) or water (blue boxes) as control; MATα:*hog1* Δ::*kanMX* cells are represented as Δ*hog1* for abbreviation. The relative AUCs of MATα:*hog1* Δ::*kanMX* cells that were arrested by exposure to NaCl and then allowed to recover from this arrest are indicated by the "Recover" label. The figure summarizes the results obtained from three independent experiments.

### Can IP-1 Kill MATα Cells Arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Independently of STE2?

We previously reported that the pheromone receptor Ste2p is required for cell death induced by IP-1 in MATα cells, but our current results suggest that only cell cycle arrest induced by

α-pheromone through Ste2p is relevant in IP-1-induced cell death. To determine whether cell death induced by IP-1 can be achieved independently of Ste2 activity, MATα cells (naturally not expressing STE2) carrying a null mutation on the gene coding for the kinase Hog1p (MATα:*hog1* Δ::*KanMX* which is hereafter



referred to as MAT $\alpha$ : $\Delta$ *hog1*) were used to induce cell cycle arrest independently of Ste2p. To arrest the cell cycle of MAT $\alpha$ : $\Delta$ *hog1* cells, sodium chloride (NaCl) was added to the medium (see section “Materials and Methods”). After 30 h in YPD with 0.6 M NaCl, the MAT $\alpha$ : $\Delta$ *hog1* cells did not grow (see Supplementary Figure S4) and were in G<sub>1</sub> phase (see Supplementary Figure S5). Cells were stained with FUN1 for the live/dead assay; we observed that 97% of the MAT $\alpha$ : $\Delta$ *hog1* cells treated with IP-1 were dead (see Figure 1). Furthermore, to test for the relevance of arresting the cell cycle in the IP-1-induced cell death, NaCl was washed away from the media and these cells were grown for 2 h in NaCl-free media. Then, the cells were exposed to IP-1 and no inhibition of growth was observed (see Figure 1). These results indicate that the cell cycle arrest independent of the Ste2p receptor was sufficient to kill cells in the presence of IP-1. Nevertheless, it has been reported that crosstalk exists between the stress

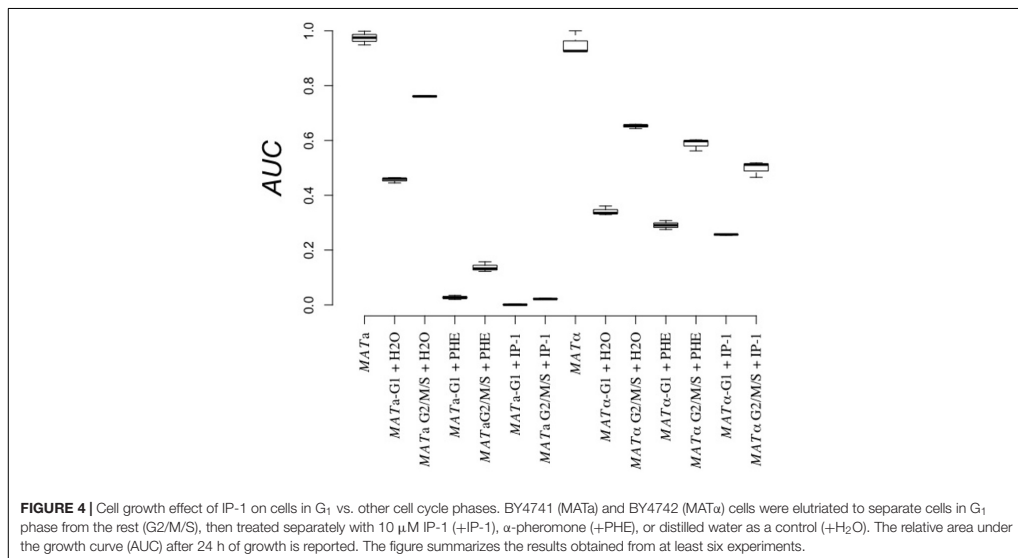
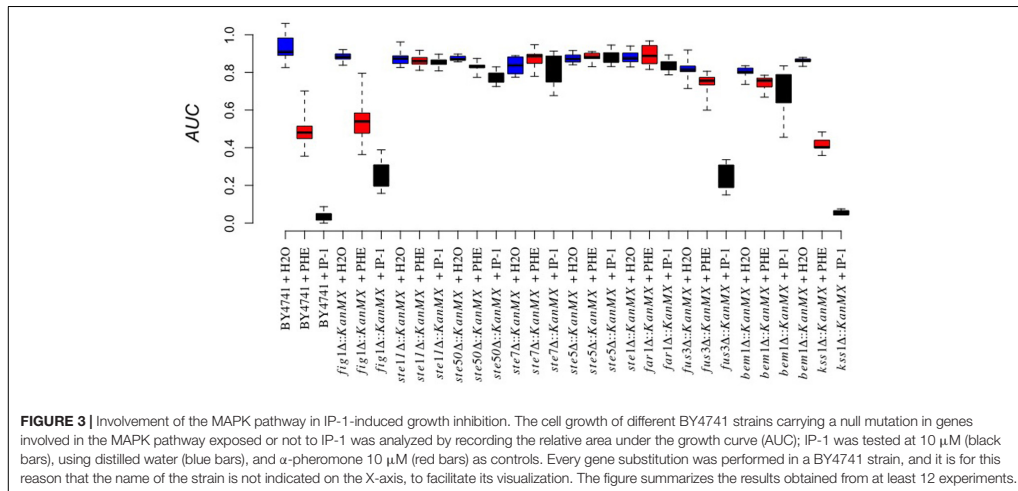
response and the  $\alpha$ -pheromone response at the MAPK pathway at the Ste11 and Ste50 kinases (Babazadeh et al., 2014), so these experiments did not rule out the participation of these MAP kinases in IP-1-induced cell death.

### Can IP-1 Induce Cell Death in Cells Arrested in Their Cell Cycle Independently of the Pheromone's Pathway?

To further study the dependence of the MAPK pathway on IP-1-induced cell death, we induced cell cycle arrest of MAT $\alpha$  cells using cell cycle inhibitors that do not target the pheromone pathway, but do activate the MAPK pathway. Specifically, we used nocodazole to synchronize cells in the M phase and activate the MAPK pathway (Hayne et al., 2000) and tributyltin (TBT) to shift the cell cycle arrest induced by nocodazole to G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Sekito et al., 2014) in MAT $\alpha$  cells, which do not express the pheromone receptor (see section “Materials and Methods”). We validated the inhibition of growth of MAT $\alpha$  cells treated with each cell cycle inhibitor and we included MAT $\alpha$  cells in these experiments as positive controls for IP-1 cytotoxicity (see Supplementary Figure S6). The cell cycle phase was determined by flow cytometry coupled to fluorescence microscopy (see Figure 6A). MAT $\alpha$  cells treated exclusively with nocodazole were not killed by IP-1 (see Supplementary Figure S6); only cells treated with nocodazole and TBT were susceptible to the toxic activity of IP-1 (see Figure 6B). These results suggest that arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> is relevant in IP-1 cytotoxicity and that the MAPK pathway is only relevant in IP-1-induced cell death due to its participation in cell cycle arrest. Additionally, these experiments provided an explanation for the dependence of *STE2* on IP-1 cytotoxicity; that is, the pheromone pathway activated by *STE2* only seems to be relevant in IP-1-induced cell death due to its ability to arrest cells in their cell cycle.

### Is the Arrest of the Cell Cycle Without Signaling Sufficient for IP-1 to Induce Cell Death?

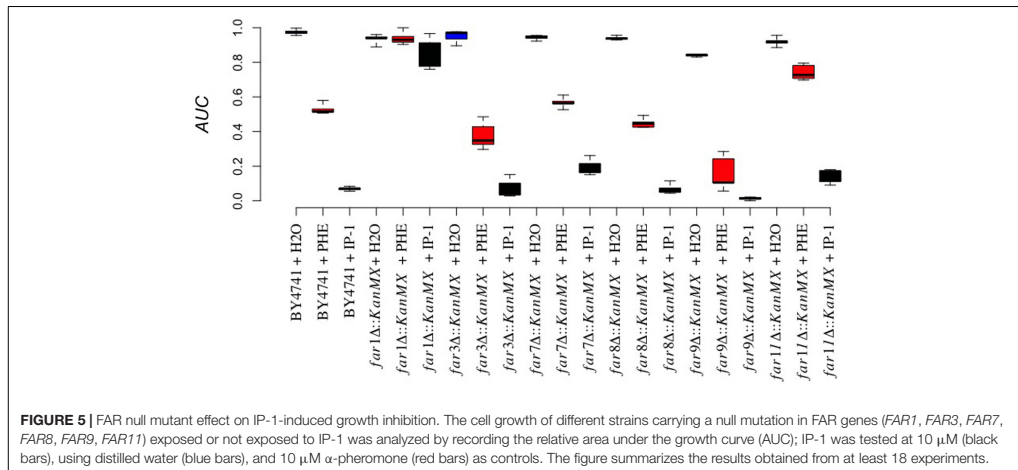
To test the idea that pheromone signaling is only relevant for death by IP-1 because of the arrest of the cell cycle, a variant of IP-1 was synthesized. It has been previously observed that the modification of the C-terminal end of  $\alpha$ -pheromone significantly reduces its activity (Naider and Becker, 2004). To reproduce this effect in IP-1, a version of IP-1 modified at the C-terminus was synthesized: an amide group was incorporated into its C-terminus; we refer to this peptide as IP-1-CO-NH<sub>2</sub> (see Table 2). We expected that the pheromone activity would be reduced or absent in this variant of the IP-1 peptide. Indeed, MAT $\alpha$  cells exposed to 10  $\mu$ M of IP-1-CO-NH<sub>2</sub> grew normally, while the same cells treated with  $\alpha$ -pheromone showed the typical delay in growth corresponding to a transitory arrest in their cell cycle. However, IP-1-CO-NH<sub>2</sub> induced partial inhibition of growth of MAT $\alpha$  cells at 40  $\mu$ M (see Figure 7). Such inhibition of growth is not mediated by the activation of the pheromone pathway, as inferred from the expression and localization of *FUS1-GFP*, a marker of the pheromone's pathway (see



Supplementary Figure S7). Thus, we have generated a derivative of IP-1 that does not inhibit MAT $\alpha$  cell growth at 10  $\mu$ M as a result of its pheromone activity deficiency. Furthermore, combining IP-1-CO-NH<sub>2</sub> with  $\alpha$ -pheromone inhibited the growth of MAT $\alpha$  cells to an extent similar to that seen with IP-1 (see Figure 7). This result confirms that IP-1-CO-NH<sub>2</sub> fails to inhibit the growth of MAT $\alpha$  cells due to its lack of pheromone activity and consequently its failure to induce cell cycle arrest. The requirement of cell cycle arrest to kill MAT $\alpha$  cells was tested using

IP-1-CO-NH<sub>2</sub> in two different approaches. First, cell cycle arrest was induced with nocodazole and TBT, as previously described above, and we observed that IP-1-CO-NH<sub>2</sub> killed MAT $\alpha$  cells to a similar extent as IP-1 only when cells were arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase (see Figure 6). Second, cell cycle arrest was induced in MAT $\alpha$ :CDC28-as1 cells using a CDC28p kinase inhibitor, 1-NM-PP1 (Shokat et al., 2000); yeast cells are permeable to 1-NM-PP1, which inhibits CDC28p-as1, a variant of the catalytic subunit of the cyclin-dependent kinase (CDK) that controls the cell cycle





in yeast. Thus, the use of 1-NM-PP1 should lead to an arrest in the cell cycle independently of any signaling. In this study, 1-NM-PP1 alone (10  $\mu$ M) inhibited cell growth (see Supplementary Figure S8), but did not kill cells (see Figures 8A,C). Combining this CDC28p-as1 inhibitor with IP-1-CO-NH<sub>2</sub> peptide killed as many cells as treatment with IP-1 (see Figures 8B,D). The present experiments indicate that cell cycle arrest is sufficient to induce MAT $\alpha$  cell death by the pheromone-activity-deficient peptide IP-1-CO-NH<sub>2</sub>.

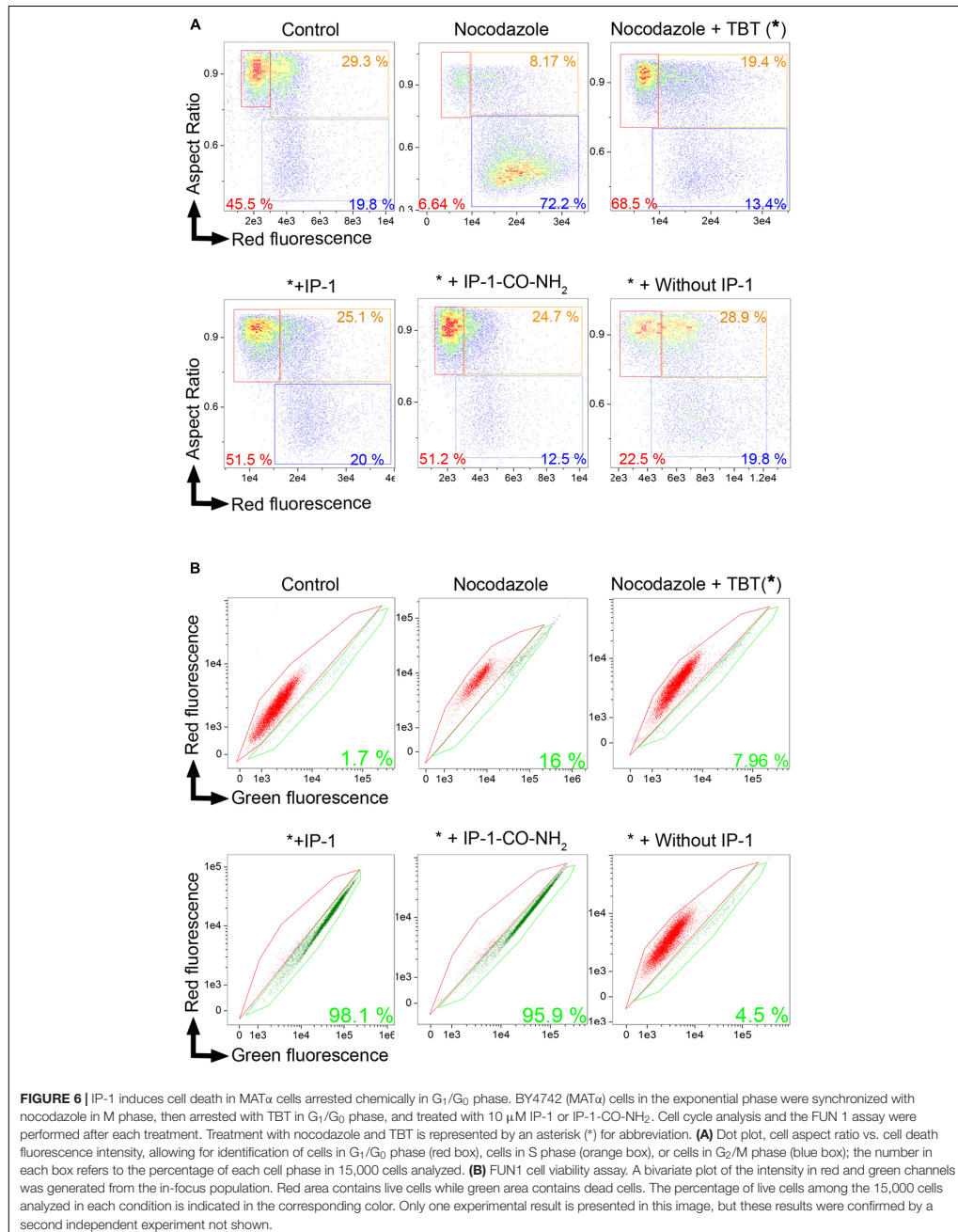
## DISCUSSION

We previously described a new class of targeted antimicrobial peptides, IPs, for which a peptide ligand ( $\alpha$ -pheromone) inserted into the antimicrobial peptide sequence provides specificity to the antimicrobial activity of these peptides (Rodríguez Plaza et al., 2012). Our initial studies showed that IP-1 completely prevented cell growth of MAT $\alpha$  cells. Here, using a FUN1 assay, we showed that IP-1 induces cell death in MAT $\alpha$  cells (see Figure 1). The proportion of cell death achieved by IP-1 (97%) was larger than that reported for cell death induced by the pheromone at physiological concentrations (6%). Live cells metabolize FUN1, but it has been observed that some quiescent cells metabolize this compound even when the colony-forming capacity has been clearly reduced (Allen et al., 2006). In contrast, our results with IP-1-treated MAT $\alpha$  cells stained by FUN1 showed a direct correlation with cell viability (measured by the colony-forming assay; Rodríguez Plaza et al., 2012), indicating that FUN1 is an indicator of cell viability and not of quiescent cells in our experiments. The relevance of the cell cycle to this cell death is analyzed here using a combination of genetic and pharmacological approaches.

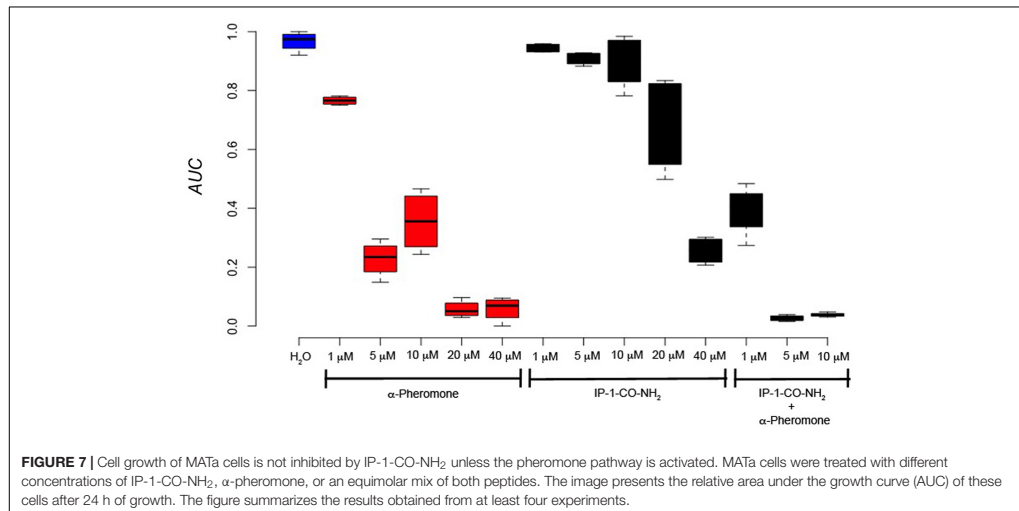
We previously observed that IP-1 can inhibit oxygen consumption in intact yeast cells as well in isolated mitochondria,

but we argued that the anti-mitochondrial activity of IP-1 could not explain its anti-fungal activity since yeast cells are fermentative (Rodríguez Plaza et al., 2012). Here we provide evidence that IP-1 inhibits cell growth more efficiently in cells growing under fermentative conditions, a metabolic condition that facilitates cell cycle arrest (see Supplementary Figure S1). In this regard, the CDK *PHO85*, which regulates cell cycle progression in G<sub>1</sub> in response to levels of nutrients (Huang et al., 2007), phosphorylates the cell cycle inhibitor Sic1p, contributing to Sic1p degradation and exit from G<sub>1</sub> (Nishizawa et al., 1998). Sic1p inhibits only cyclin-CDK complexes containing B-type cyclins, which are relevant in the S phase of the cell cycle (Weinreich et al., 2001); thus, Sic1p activity prevents progression to the S phase of the cell cycle and contributes to arrest in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Sic1p is also the target of Hog1p (Escoté et al., 2004), which is activated by different forms of stress. These previous observations indicate that the lack of nutrients (e.g., fermentation conditions) may inhibit Pho85p activity and consequently favor G<sub>1</sub> cell cycle arrest if a proper external stimulus is present. In the absence of such stimuli, cells may remain in G<sub>1</sub> by a mechanism other than cell cycle arrest induced by  $\alpha$ -pheromone. Our previous results showed that cells lacking the receptor for  $\alpha$ -pheromone (MAT $\alpha$  cells) are not killed by IP-1 under fermentation conditions (Rodríguez Plaza et al., 2012), suggesting that induction of cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> is relevant to IP-1-induced cell death.

In line with this idea, we also observed that *STE2*-deficient MAT $\alpha$ : $\Delta$ *hog1* cells arrested in their cell cycle by salt stress were killed by IP-1 (see Figure 1). It has been observed that the pheromone pathway is repressed by salt stress in three different ways: it delays the expression of the pheromone-induced genes, it inhibits protein translation by Hog1p-dependent phosphorylation of Rck2p, and it dampens MAPK signaling by Hog1p-dependent phosphorylation of Ste50p (Nagiec and Dohlman, 2012). Since the phosphorylation





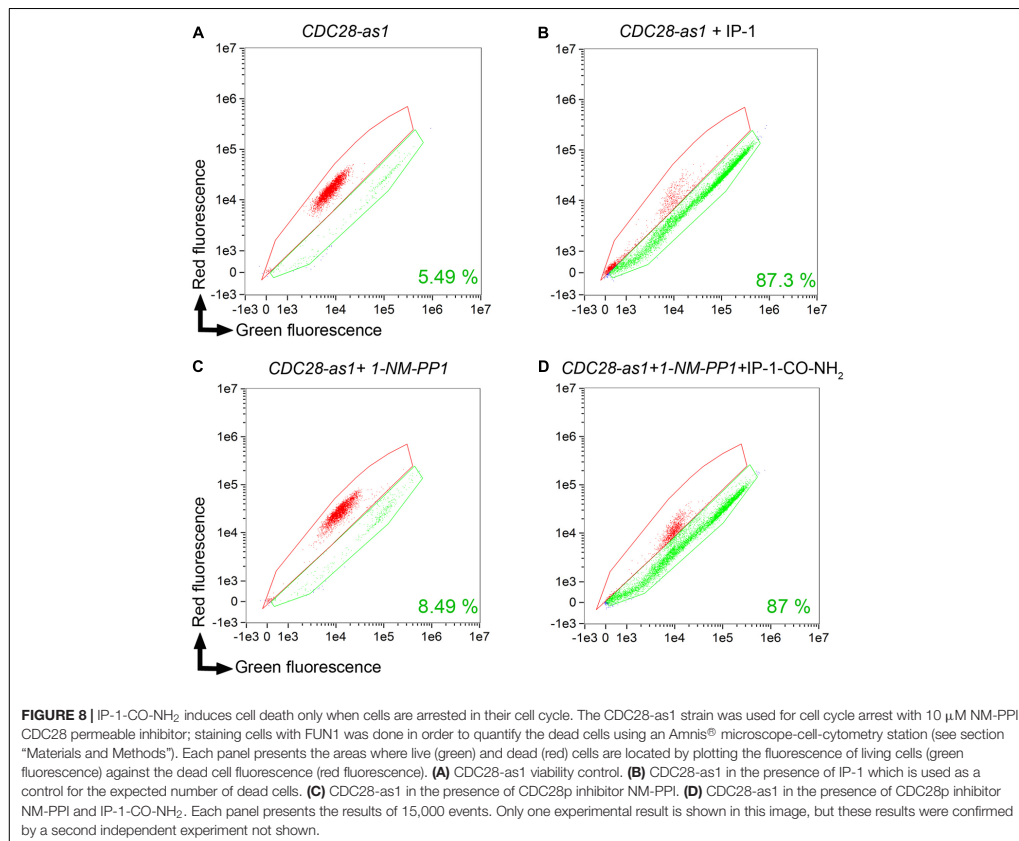


of Rck2p and Ste50p is mediated by Hog1p, it is likely that in a MATα:Δ*hog1* strain, salt stress would activate the MAPK signaling induced by the pheromone. Thus, MATα:Δ*hog1* cells exposed to IP-1 under salt stress would die as a consequence of the activation of the MAPK pathway, which would lead to cell cycle arrest. In agreement with the relevance of the MAPK pathway in IP-1-induced cell death, it is our observation that the lack of *BEM1* protects against IP-1 activity. Bem1p is required for shmoo formation and connects the mating signals (interacts with Ste5p and Ste20p) to the machinery involved in promoting actin cytoskeleton changes by interacting with Cdc24p and Cdc42p (Leeuw et al., 1995). Furthermore, the lack of *BEM1* causes cells to lose their sensitivity to the pheromone-induced growth arrest (see Figure 3), which supports the notion that cell cycle arrest mediated by the MAPK pathway is relevant to IP-1-induced cell death in yeast cells. In contrast with these results, we observed that cells arrested using nocodazole, which activates the MAPK pathway, were not sensitive to the toxic activity of IP-1 (see Supplementary Figure S6); the shifting of the cell cycle arrest to G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> using TBT after treatment with nocodazole made cells susceptible to IP-1-induced cell death (see Figure 6). These results suggest that the MAPK pathway is relevant in IP-1-induced cell death only because it induces the arrest of the cell cycle.

We describe a variant of IP-1 that is defective in pheromone signaling activity (IP-1-CO-NH<sub>2</sub>); this peptide was able to kill MATα cells that were induced into cell cycle arrest independently of the MAPK pathway using an inhibitor of a Cdc28p variant (see Figure 8). Furthermore, IP-1 did not affect cell growth in MATα cells that were induced to cell cycle arrest using nocodazole, further discarding the relevance of the MAPK pathway in IP-1-induced cell death. Intriguingly, MATα or MATα cells that were induced to cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> using nocodazole followed

by TBT were killed by IP-1 or IP-1-CO-NH<sub>2</sub>, respectively. This cell cycle arrest does not depend on the pheromone pathway (because it was not induced by the pheromone), yet we cannot rule out the participation of some of the molecular machinery involved in the pheromone response.

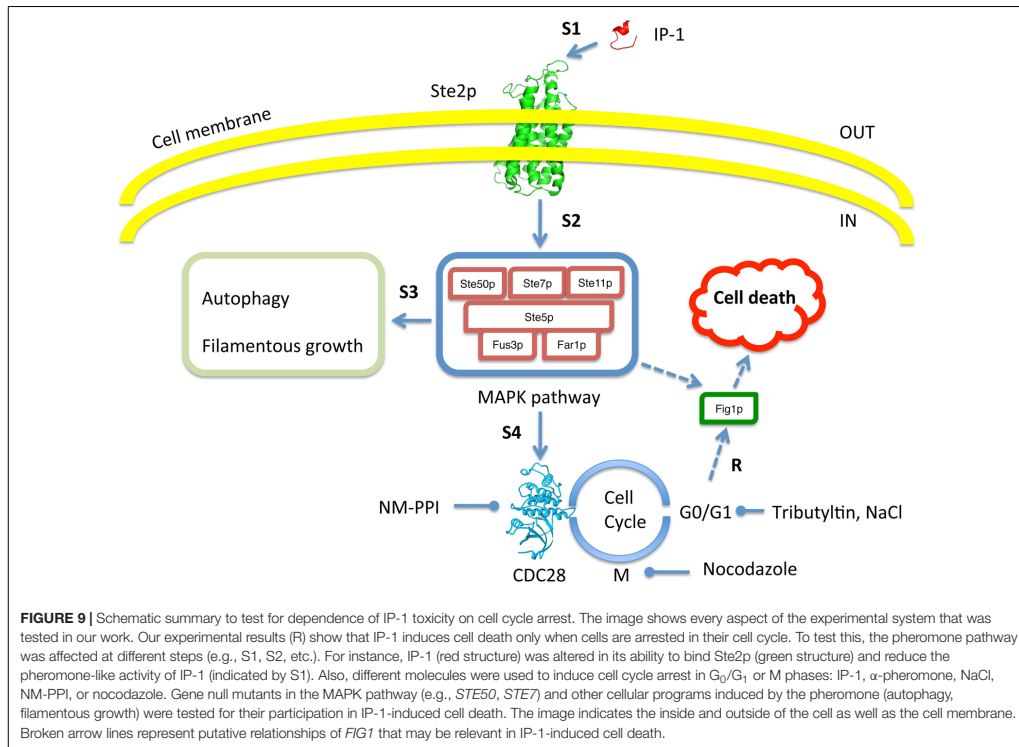
Our previous results showed the non-apoptotic nature of IP-1-induced cell death and correspondingly we argued that IP-1 kills cells through a mechanism different from the apoptotic-like mechanism induced by the pheromone at physiological concentrations (Rodriguez Plaza et al., 2012). In the present study we provide further evidence for this difference by showing that IP-1-induced cell death in MATα cells does not depend on respiratory activity (see Supplementary Figure S1), which contrasts with the respiratory dependency reported for the slow cell death induced by the pheromone at non-physiological concentrations; however, we did observe some protection against the cell growth inhibition induced by IP-1 resulting from the lack of *FIG1* (see Figure 3), which also protected against the fast cell growth inhibition induced by the pheromone at non-physiological concentrations (Zhang et al., 2006). The calcium influx activity of *FIG1* is not required for the fast cell death induced by the pheromone and *FIG1* does not participate in the activation of the MAPK pathway; these results have led to the idea that Fig1p and Mpk1p are two independent branches of the pheromone response that are regulated by Fus3p, Far1p, Bni1p, Spa2p, Pea2p, Rvs161p, Fus2p, and Fus1p (Muller et al., 2003). Hence, under the physiological response to the pheromone, the lack of *FUS3* may prevent cell cycle arrest and consequently it would be expected to protect against the toxic activity of IP-1. However, our observation that the lack of *FUS3* protects against IP-1-induced cell death to the same degree as the lack of *FIG1* (see Figure 3) suggests that the protection achieved by *FUS3* is relevant for its role in activating *FIG1* and not for its role in



promoting cell cycle arrest. The failure to protect against IP-1-induced cell death by the null mutants of genes relevant in the calcium influx activity of *FIG1* (see Supplementary Figure S3) that do not affect cell cycle arrest (*PEA2*, *RVS161*, *BNII*) indicates that the role of *FIG1* in IP-1-induced cell death is not related to its activity on calcium influx. Furthermore, it has been argued that fast cell death mediated by *FIG1* occurs in less than 40% of the cell population exposed to the pheromone because *FIG1* is regulated by mechanisms that control cell wall integrity (Zhang et al., 2006), and consequently that this cell death may reflect the outcome of attempting late steps of the mating process in the absence of a mating partner. Our results show that 70% of cells exposed to the killing activity of IP-1 are rescued by the lack of *FIG1*, suggesting that IP-1 may be inducing cell death through a mechanism that escapes the regulation of the cell wall integrity, and consequently of the mating process. These results further confirm that IP-1 induces a cell death different from that mediated by the pheromone at physiological concentrations, and consequently *FIG1* may have a different activity during this

cell death than the observed during the pheromone-induced cell death.

In short, we analyzed yeast cell death in response to the presence of IP-1 after altering different steps of the pheromone response pathway and of the cell cycle (see Figure 9). Figure 9 places *FIG1* as part of IP-1-induced cell death. *FIG1* codes for a protein with four transmembrane regions that shares a similar motif with the PMP-22/EMP/MP20/Claudin superfamily. The cell death activity of *FIG1* has been functionally related to a member of this superfamily, p53 apoptosis effector related to PMP-22 (PERP), which, like many other PMP-22 tetraspan proteins, upon its over-expression in mammalian cells induces apoptosis (Ihrie and Attardi, 2004); this may explain the loss of PERP in the more aggressive sparsely granulated pituitary adenomas (Kiseljak-Vassiliades et al., 2017) and its transcriptional activation by p53 during apoptosis in mammalian cells (Davies et al., 2009); more recently PERP has been observed to participate in cellular inflammation during *Salmonella* infection (Hallstrom and McCormick, 2016).



*FIG1* overexpression also leads to a reduction in cell growth in yeast (Yoshikawa et al., 2011). Further studies would be useful in the elucidation of the role of *FIG1* in cell death induced in cell cycle arrest and the possible conservation of the mechanism for cell death induction in yeast and mammalian cells.

The relationship between cell death and cell cycle arrest has been described elsewhere (Wiman and Zhivotovsky, 2017) and in yeast it has been proposed that there must be cellular programs to induce cell death (Severin and Hyman, 2002), yet it is not clear how cells commit to a cell death program, especially when they are in an arrested stage of the cell cycle that is intended to protect them (Gray et al., 2004; Valcourt et al., 2012). The effectiveness of IP-1 in killing MATa cells (compared to that observed with  $\alpha$ -pheromone, for instance), the genetic mutants, and the IP-1 variant described in this work makes this experimental system useful in the study of the mechanisms at play in the communication between cell cycle arrest and cell death. The relevance of this relationship between cell cycle arrest and cell death in yeast may have an impact on other organisms, considering the conservation of the cell cycle mechanism. For instance, cytotoxic molecules targeting cell cycle regulation have been recognized as potential therapeutics for treatment of different cancers (Waldman et al., 1997). A more

recent controversy regarding the mechanism leading to the recurrence of cancer highlighted the need for development of new pharmaceuticals targeting dormant (arrested) cells as a method for treating resilient cancers (Wells et al., 2013). In this sense, molecules capable of inducing death of cells in cell cycle arrest show promise in cancer therapy (Gupta et al., 2009; Ehrhardt et al., 2013). Thus, polypharmacological compounds combining both cell cycle arrest and cell death activities may be desirable. Hunter-killer peptides, composed of a ligand peptide (hunter) fused to an antibacterial/antimitochondrial peptide (killer), represent one class of polypharmacological compounds useful in cancer treatment (Arap et al., 1998; Ruoslahti et al., 1999; Ellerby et al., 2008). In this regard, IP-1 is a special type of hunter-killer peptide that combines (1) a hunter peptide sequence that specifically binds to a receptor on the target cells to induce cell cycle arrest, and (2) a killer peptide sequence that is internalized through the receptor of the hunter peptide (Rodriguez Plaza et al., 2014). Our current results show that the signaling of the hunter peptide (pheromone) leading to cell cycle arrest is relevant in the killing induced by the killer peptide. Recognizing that resilient cancer cells (also referred to as metastatic dormant cells) may require the use of drugs that target cell cycle control, it would be convenient to add an activity related to cell cycle

control to the design of hunter-killer peptides, as in the case of IP-1.

In summary, we have described peptides capable of killing yeast cells only when the latter enter cell cycle arrest. Such peptides may be useful in the study of the mechanisms relevant to yeast cell death when the yeast cells undergo cell cycle arrest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VA, PMG, JRP, MLO, GS, EK, and GDR conceived and designed the experiments. VA, PMG, JRP, MLO, and GS performed the experiments. VA, PMG, JRP, and GDR analyzed the data. GDR, RV, and EK contributed reagents, materials, and analysis tools. VA, PMG, JRP, GS, RV, EK, and GDR wrote the paper.

## FUNDING

This work was supported in part by grants from CONACYT (FOINS-219, CB-82308, and CB-252316), PAPIIT (IN208817), the UNAM Institute of Cellular Physiology, and the Alexander von Humboldt Foundation (31102732) to GDR. PMG and VA

were students in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas at UNAM and received support from CONACYT and VA also from PAPIIT. JRP was supported in part by CONACYT (FOINS-219) as a postdoctoral fellow. Microscopy equipment was provided through CONACYT grants 123007, 232708, 260541, and 280487.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada at the Instituto de Biotecnología UNAM and especially Andrés Saralegui and Christopher Wood for their technical assistance with the Amnis® instrument and multiphotonic microscopy. We also wish to recognize Patrick Weill for his guidance with regard to the English language.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01240/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., et al. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J. Cell Biol.* 174, 89–100. doi: 10.1083/jcb.2006.04072
- Andersen, J. L., and Kornbluth, S. (2013). The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Mol. Cell* 49, 399–410. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.026
- Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279, 377–380. doi: 10.1126/science.279.5349.377
- Babazadeh, R., Furukawa, T., Hohmann, S., and Furukawa, K. (2014). Rewiring yeast osmolarity signaling through the MAPK network reveals essential and non-essential roles of Hog1 in osmoadaptation. *Sci. Rep.* 4:4697. doi: 10.1038/srep04697
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192, 73–105. doi: 10.1534/genetics.111.135731
- Davies, L., Gray, D., Spiller, D., White, M. R. H., Damato, B., Grierson, I., et al. (2009). P53 apoptosis mediator PERP: localization, function and caspase activation in uveal melanoma. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1995–2007. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00590.x
- Dohlman, H. G., and Thorner, J. W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 703–754. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.703
- Dolan, J. W. (1996). Novel aspects of pheromone-induced cell-cycle arrest in yeast. *Curr. Genet.* 30, 469–475. doi: 10.1007/s002940050158
- Ehrhardt, H., Wachter, F., Grunert, M., and Jeremias, I. (2013). Cell cycle-arrested tumor cells exhibit increased sensitivity towards TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 4:e661. doi: 10.1038/cddis.2013.179
- Ellerby, H. M., Bredesen, D. E., Fujimura, S., and John, V. (2008). Hunter-Killer peptide (HKP) for targeted therapy. *J. Med. Chem.* 51, 5887–5892. doi: 10.1021/jm800495u
- Errington, J. (2010). From spores to antibiotics via the cell cycle. *Microbiology* 156, 1–13. doi: 10.1099/mic.0.035634-0
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., and Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat. Cell Biol.* 6, 997–1002. doi: 10.1038/ncb1174
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., and Werner-Washburne, M. (2004). “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 187–206. doi: 10.1128/MMBR.68.2.187-206.2004
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., et al. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645–659. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.034
- Hallstrom, K. N., and McCormick, B. A. (2016). The type three secreted effector SipC regulates the trafficking of PERP during *Salmonella* infection. *Gut Microbes* 7, 136–145. doi: 10.1080/19490976.2015.1128626
- Hayne, C., Tzivion, G., and Luo, Z. (2000). Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by Nocodazole. *J. Biol. Chem.* 275, 31876–31882. doi: 10.1074/jbc.M002766200
- Huang, D., Friesen, H., and Andrews, B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 66, 303–314. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05914.x
- Ihrle, R. A., and Attardi, L. D. (2004). Perp-etrating p53-dependent apoptosis. *Cell Cycle* 3, 267–269. doi: 10.4161/cc.3.3.722
- Kemp, H. A., and Sprague, G. F. (2003). Far3 and five interacting proteins prevent premature recovery from pheromone arrest in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1750–1763. doi: 10.1128/MCB.23.5.1750-1763.2003
- Kiseljak-Vassiliades, K., Mills, T. S., Zhang, Y., Xu, M., Lillehei, K. O., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., et al. (2017). Elucidating the role of the desmosome protein p53 apoptosis effector related to PMP-22 in growth hormone tumors. *Endocrinology* 158, 1450–1460. doi: 10.1210/en.2016-1841
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., et al. (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* 270, 1210–1213. doi: 10.1126/science.270.5239.1210
- Muller, E. M., Mackin, N. A., Erdman, S. E., and Cunningham, K. W. (2003). Fig1p Facilitates Ca<sup>2+</sup> influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 38461–38469. doi: 10.1074/jbc.M304089200
- Munoz, A. J., Wanichthanarak, K., Meza, E., and Petranovic, D. (2012). Systems biology of yeast cell death. *FEMS Yeast Res.* 12, 249–265. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00781.x
- Nagiec, M. J., and Dohlman, H. G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet.* 8:e1002437. doi: 10.1371/journal.pgen.1002437
- Naider, F., and Becker, J. M. (2004). The  $\alpha$ -factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of

- peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides* 25, 1441–1463. doi: 10.1016/j.peptides.2003.11.028
- Nishizawa, M., Kawasumi, M., Fujino, M., and Toh-e, A. (1998). Phosphorylation of sic1, a cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor, by Cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation. *Mol. Biol. Cell* 9, 2393–2405. doi: 10.1091/mbc.9.9.2393
- Rodriguez Plaza, J. G., Morales-Nava, R., Diener, C., Schreiber, G., Gonzalez, Z. D., Lara Ortiz, M. T., et al. (2014). Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 289, 14448–14457. doi: 10.1074/jbc.M113.515023
- Rodriguez Plaza, J. G., Villalon Rojas, A., Herrera, S., Garza-Ramos, G., Torres Larios, A., Amero, C., et al. (2012). Moonlighting Peptides with Emerging Function. *PLoS One* 7:e40125. doi: 10.1371/journal.pone.0040125
- Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., Pasqualini, R., Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., et al. (1999). Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* 5, 1032–1038. doi: 10.1038/12469
- Sass, P., and Brötz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 522–530. doi: 10.1016/j.mib.2013.07.006
- Sekito, T., Sugimoto, N., Ishimoto, M., Kawano-Kawada, M., Akiyama, K., Nishimoto, S., et al. (2014). Tributyltin induces cell cycle arrest at G1 phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.* 39, 311–317. doi: 10.2131/jts.39.311
- Senese, S., Lo, Y. C., Huang, D., Zangle, T. A., Gholkar, A. A., Robert, L., et al. (2014). Chemical dissection of the cell cycle: probes for cell biology and anti-cancer drug development. *Cell Death Dis.* 5:e1462. doi: 10.1038/cddis.2014.420
- Severin, F. F., and Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, R233–R235. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00776-5
- Shapiro, G. I., and Harper, J. W. (1999). Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J. Clin. Invest.* 104, 1645–1653. doi: 10.1172/JCI9054
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A., et al. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114, 111–123. doi: 10.1083/jcb.114.1.111
- Shokat, K. M., Bishop, A. C., Ubersax, J. A., Petsch, D. T., Matheos, D. P., Gray, N. S., et al. (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407, 395–401. doi: 10.1038/35030148
- Torres, M. P., Clement, S. T., Cappell, S. D., and Dohlman, H. G. (2011). Cell cycle-dependent phosphorylation and ubiquitination of a G protein alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 286, 20208–20216. doi: 10.1074/jbc.M111.239343
- Valcourt, J. R., Lemons, J. M. S., Haley, E. M., Kojima, M., Demuren, O. O., and Collier, H. A. (2012). Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* 11, 1680–1696. doi: 10.4161/cc.19879
- Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B., et al. (1997). Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat. Med.* 3, 1034–1036. doi: 10.1038/nm0997-1034
- Weinreich, M., Liang, C., Chen, H.-H., and Stillman, B. (2001). Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11211–11217. doi: 10.1073/pnas.201387198
- Wells, A., Griffith, L., Wells, J. Z., and Taylor, D. P. (2013). The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation. *Cancer Res.* 73, 3811–3816. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0356
- Wiman, K. G., and Zhivotovskiy, B. (2017). Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J. Intern. Med.* 281, 483–495. doi: 10.1111/joim.12609
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., and Shimizu, H. (2011). Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 28, 349–361. doi: 10.1002/yea.1843
- Zhang, N.-N., Dudgeon, D. D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K. W. (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol. Biol. Cell* 17, 3409–3422. doi: 10.1091/mbc.E06-03-0177

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Arellano, Martinell García, Rodriguez Plaza, Lara Ortiz, Schreiber, Volkmer, Klipp and Del Rio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



*Supplementary Material*

**An antimicrobial peptide induces cell death dependent on cell-cycle arrest in yeast**

*Vladimir Juarez Arellano, Paula Martinell García, Jonathan G. Rodriguez Plaza, Maria Teresa Lara Ortiz, Gabriele Schreiber, Rudolf Volkmer, Edda Klipp, Gabriel Del Rio I\**

\* **Correspondence:** Corresponding Author: [gdelrio@ifc.unam.mx](mailto:gdelrio@ifc.unam.mx)

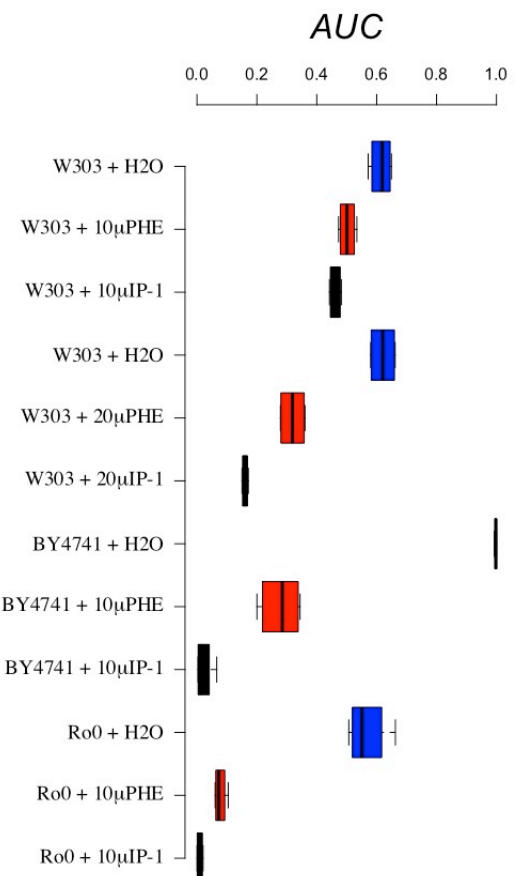
**1 Supplementary Data**

Supplementary Material should be uploaded separately on submission. Please include any supplementary data, figures and/or tables.

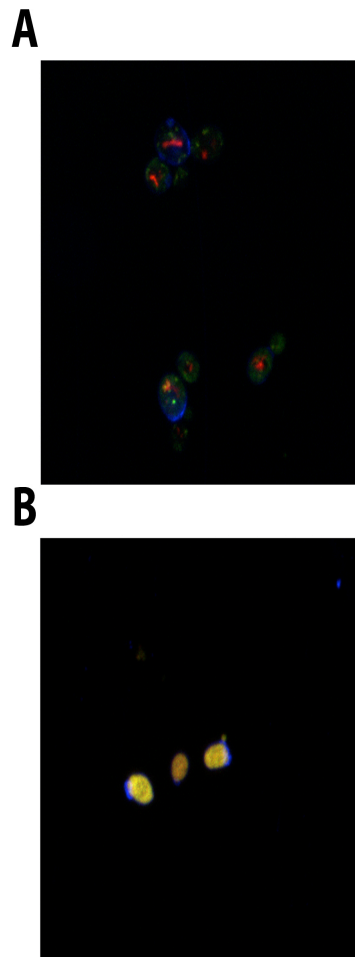
Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article.

**2 Supplementary Figures and Tables**

**2.1 Supplementary Figures**

**Supplemental Figure S1. IP-1 effect on cell growth in respiratory/fermenting media.**

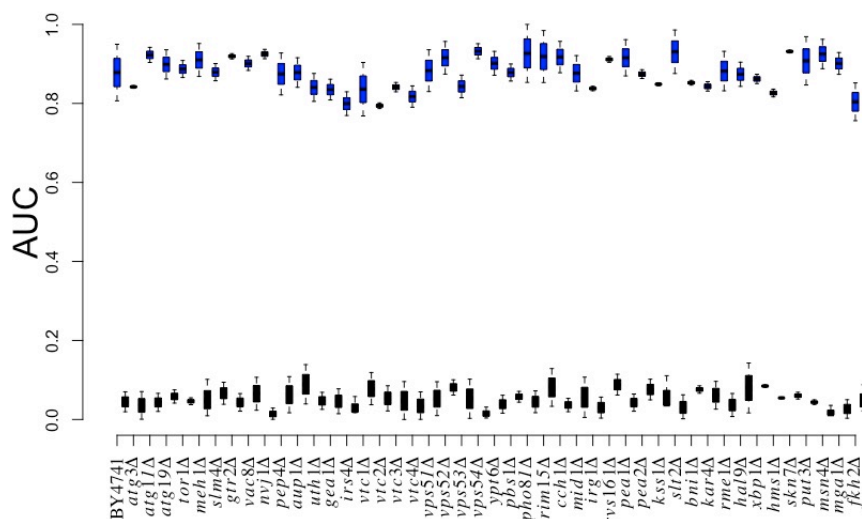
The relative area under the growth curve (AUC) of W303 cells grown in YPLac (respiratory metabolism mainly; BY4741 cells did not grow well in this media), BY4741 grown in YPD (fermenting and respiratory metabolism) and BY4741 $\rho$ 0 (Ro0) cells grown in YPD (fermenting mainly) exposed to the pheromone (PHE) or the IP-1 are presented; cells not exposed to any peptide but supplemented with equal volume of water (H2O) are presented as controls. The figure summarizes the results obtained from at least 4 experiments.



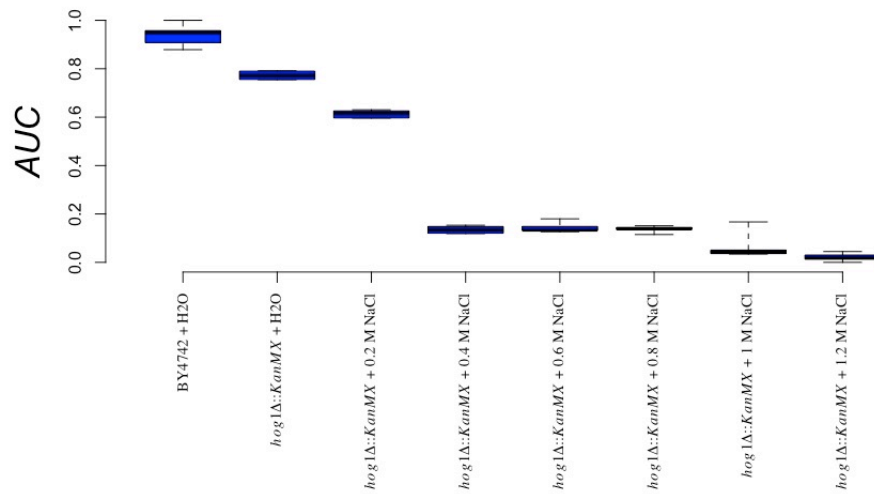
**Supplemental Figure S2. FUN-1 staining of BY4741 treated with IP-1.** BY4741 strain (MATa) cells were observed through fluorescence microscopy following staining with FUN1 (5 $\mu$ M) and Calcofluor White™ (7.5 $\mu$ M) for 30 minutes at 30°C. (**A**) Alive cells are identified by the red fluorescent intravacuolar structures (**B**) Dead cells that were tested at concentration 10 $\mu$ M of IP-1 exhibit extremely bright, diffuse, green-yellow fluorescence. Images were generated using a confocal inverted microscope 3I Marianas with spinning disk using a magnification of 63X/1.4.



Supplementary Material

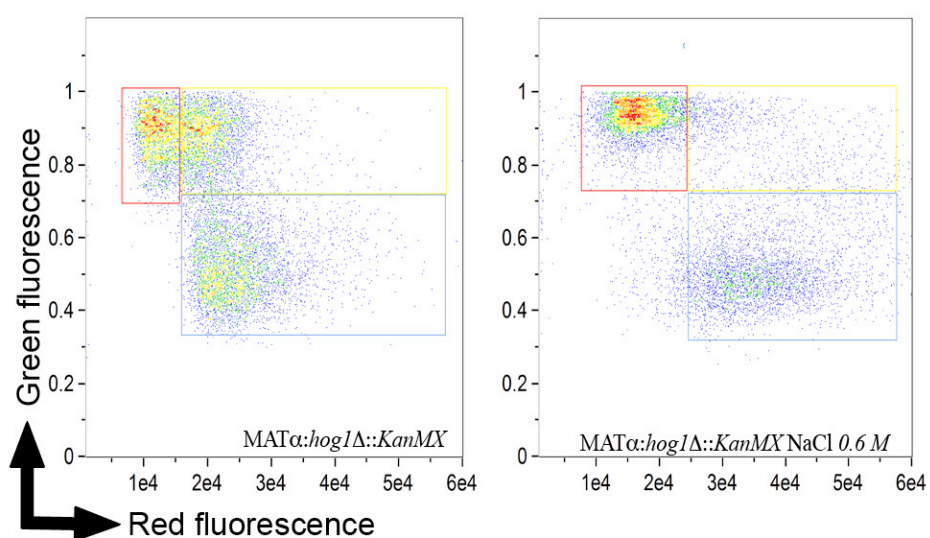


**Supplemental Figure S3. Testing for the dependence of cellular processes activated by the pheromone pathway in the cell growth inhibition induced by IP-1.** The relative area under the growth curve (AUC) of strains exposed to 10  $\mu\text{M}$  of IP-1 (blue box) or not (black box) carrying a null mutant (the gene locus was substituted by *KanMX*) of genes involved in autophagy (*ATG3*, *ATG11*, *ATG19*, *TOR1*, *MEH1*, *SLM4*, *GTR2*, *VAC8*, *NVJ1*, *PEP4*, *AUP1*, *UTH1*, *GEA1*, *IRS4*, *VTC1-VTC4*, *VPS51-VPS54*, *YPT6*, *SLT2*), filamentous growth (*PBS1*, *PHO81*, *RIM15*, *CCH1*, *IRG1*, *RVS161*, *PEA1*, *PEA2*, *KSS1*, *BNI1*, *KAR4*, *RME1*, *XBP1*, *HMS1*, *SKN7*, *MGA1*), calcium flux control (*MIDI*, *HAL9*) or other related to cell cycle control (*PUT3*, *MSN4*, *FKH2*); for brevity, gene substitutions in X axis are represented with a delta symbol (e.g., *atg3Δ*). The AUCs are shown for 24h. The figure summarizes the results obtained from at least 12 experiments.

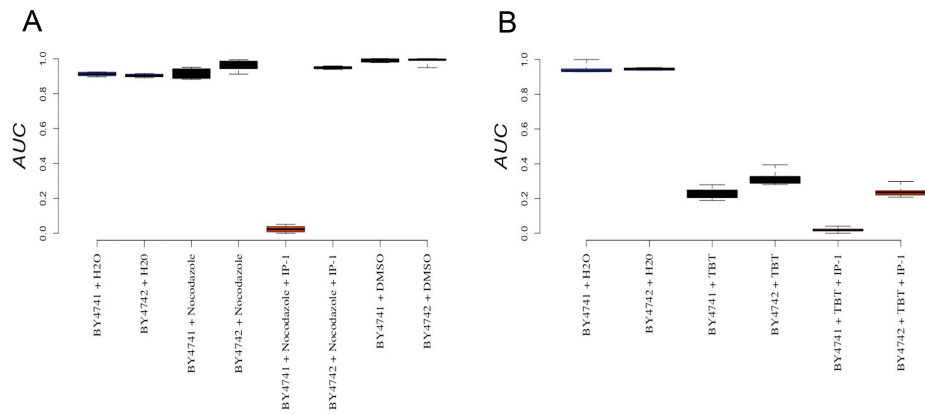


**Supplemental Figure S4. Growth of MAT $\alpha$ :*hog1*Δ::*KanMX* treated with different NaCl concentrations.** The relative area under the growth curve (AUC) of  $\Delta$ *hog1* (MAT $\alpha$ :*hog1*Δ::*kanMX* are represented as  $\Delta$ *hog1* to abbreviate) exposed to different concentrations of NaCl (0 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.8 M, 1 M, 1.2M) is reported. BY4742 (WT) was used as control. The label H<sub>2</sub>O is presented to indicate the absence of NaCl in the media. The figure summarizes the results obtained from at least 6 experiments.

Supplementary Material

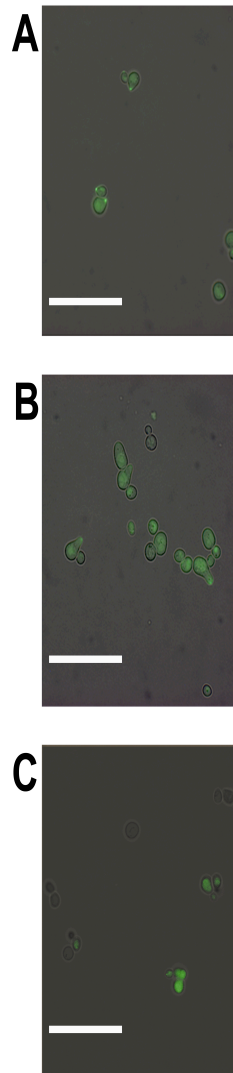


**Supplemental Figure S5. Cell cycle assay in *Mata:hog1Δ::KanMX* arrest in hyperosmotic stress.** Cells were exposed to 0.6 M NaCl (right panel) or not (left panel) and grown for 36 hours in YPD; afterwards, these cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by fluorescent microscopy coupled to a flow cytometer (AMNIS) to determine the cell cycle stage for 15,000 cells. A bivariate plot of the aspect ratio and fluorescence intensity from the PI fluorescence was generated from the in-focus population. From the gathered images, G1, S or G2/M cells were visually identified. Cells treated with NaCl 0.6 M (left panel) were more frequently found in G0/G1 stage of cell cycle.



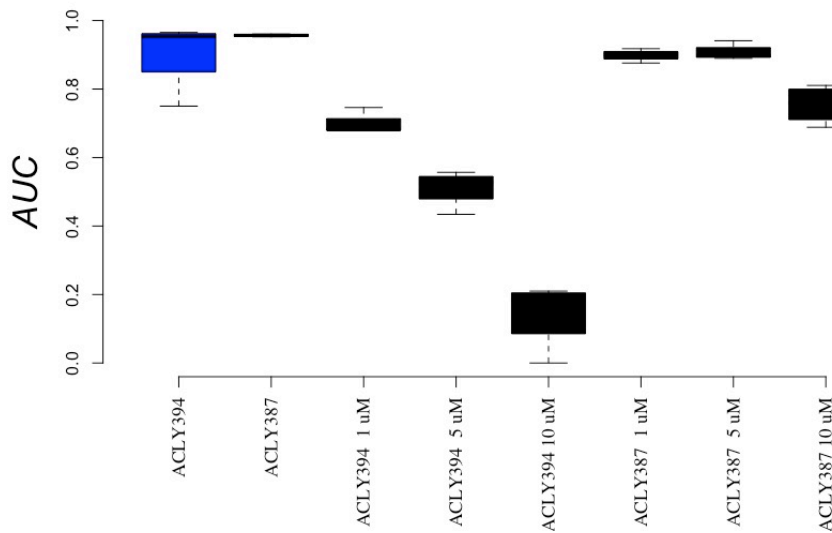
**Supplemental Figure S6. Growth inhibition by IP-1 in cell-cycle arrested cells.** BY4741 (MAT $\alpha$ ) and BY4742 (MAT $\alpha$ ) cells in exponential phase were treated with : **A**) nocodazole or **B**) TBT; both cases are represented as black boxes. In any case, cells were then treated with IP-1 (red bars); as controls cell were exposed to distilled water (H<sub>2</sub>O, blue bars) or DMSO (blue bars) the diluents for IP-1 or nocodazole, respectively. These cultures were grown in rich media (YPD) for 24 h and the relative area under the growth curve (AUC) is presented. For details on the preparation of these samples please review the Methods section.

Supplementary Material



**Supplemental Figure S7. IP-1-CO-NH<sub>2</sub> does not induce the pheromone pathway.** The activation of the pheromone pathway was detected by the expression of FUS1p; to detect in vivo the expression of FUS1p, its gene was fused to GFP, so that cells activating the pheromone pathway will display a distinct green fluorescence at the budding tip. **A)** MATa cells treated with 10 $\mu$ M  $\alpha$ -pheromone show bud formation with FUS1p-GFP at its tip. **B)** MATa cells treated with 10 $\mu$ M IP-1 show budding and

FUS1p-GFP fluorescence at their tip. Due to the cell death induced by IP-1, fewer cells present fluorescence at their tip; their anomalous shapes in the image identify death cells. C) MATa cells treated with 10  $\mu$ M IP-1-CO-NH<sub>2</sub> do not bud nor present the FUS1p-GFP characteristic fluorescence at the bud's tip even after 8 hours of treatment; the few cells displaying fluorescence in this panel most likely are dead cells as inferred from the anomalous shapes of these cells. The white bar's length is 50  $\mu$ m.



**Supplemental Figure S8. MATa: CDC28-as1 cell growth inhibition induced by NM-PP1.** W303 MATa cells expressing a YFP (ACLY387) was the control strain that contained the wild type copy of CDC28; ACLY394 strain was substituted the CDC28 gene coding for the catalytic MAP kinase domain by a mutant (CDC28-as1) that is inhibited by a permeable chemical compound, NM-PP1, were grown in rich media (YPD) for 24 h and exposed to different concentrations of this inhibitor (1, 5, 10  $\mu$ M). The relative area under the growth curve (AUC) of these cells is presented as a measure to estimate the extent of cell growth inhibition. The figure summarizes the results of 4 independent experiments.

## APÉNDICE II

### Profacgen Raw Data *S. cerevisiae*

<b>Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] &gt;:</b>	1.30 (95.0%)
<b>Competitor Error Margin (ProtScore):</b>	2
<b>Software Version:</b>	ProteinPilot™ Software 5.0
<b>Revision Number:</b>	4769
<b>Paragon™ Algorithm:</b>	5.0.0.0, 4767
<b>Annotations Retrieved from UniProt:</b>	No
<b>Sample Type:</b>	Identification
<b>Cys. Alkylation:</b>	Iodoacetamide
<b>Digestion:</b>	Trypsin
<b>Instrument:</b>	TripleTOF 5600
<b>Special Factors:</b>	
<b>Species:</b>	
<b>ID Focus:</b>	Biological modifications
<b>Database:</b>	uniprot-saccharomyces+cerevisiae.fasta
<b>Search Effort:</b>	Thorough
<b>FDR Analysis:</b>	No
<b>User Modified Parameter Files:</b>	No

**Tabla His tagged peptide+S.cerevisiae**

Unused	Total	% Cov (95)	Accession #	Species	Peptides (95%)
8.21	8.21	12.9	tr S5S176 S5S176_YEASX	YEASX	4
4.48	4.48	4.6	tr H0GQZ8 H0GQZ8_SACCK	SACCK	2
3.79	3.79	6.3	tr N1P004 N1P004_YEASC	YEASC	2
3.26	3.26	7	tr N1P2T8 N1P2T8_YEASC	YEASC	1
2.94	2.94	2.4	sp P41752 EF1A_ASHGO	ASHGO	1
2.24	2.25	0.7	tr Q750B4 Q750B4_ASHGO	ASHGO	2
2.07	2.08	1.6	tr A0A0J9XAN2 A0A0J9XAN2_GEOCN	GEOCN	1
2.06	2.06	0.7	sp P36044 MNN4_YEAST	YEAST	1
2.06	2.06	7	tr A0A0J9XGY3 A0A0J9XGY3_GEOCN	GEOCN	1
2.02	2.02	3	tr A0A0J9XCH0 A0A0J9XCH0_GEOCN	GEOCN	1
2.01	2.01	1.5	tr Q75DR0 Q75DR0_ASHGO	ASHGO	1
2	2	2.6	tr Q75DF4 Q75DF4_ASHGO	ASHGO	1
2	2	3.4	tr G2WNR3 G2WNR3_YEASK	YEASK	1
1.97	1.97	1.3	tr A0A1X7R028 A0A1X7R028_9SACH	9SACH	1
1.82	1.85	3.9	tr A0A1X7R634 A0A1X7R634_9SACH	9SACH	1
1.76	1.76	4.2	tr H0H1G7 H0H1G7_SACCK	SACCK	1
1.76	1.76	1.8	tr N1NX86 N1NX86_YEASC	YEASC	1
1.72	1.75	1.1	tr Q75ED3 Q75ED3_ASHGO	ASHGO	1
1.72	1.74	1.3	tr H0GXT0 H0GXT0_SACCK	SACCK	1
1.71	1.73	3.2	tr H0H1B0 H0H1B0_SACCK	SACCK	1
1.68	8.97	15.7	tr A0A0J9X3M8 A0A0J9X3M8_GEOCN	GEOCN	5
1.66	1.68	3.9	sp Q753W9 SPC24_ASHGO	ASHGO	1
1.64	1.66	1.4	tr A0A1X7RAK6 A0A1X7RAK6_9SACH	9SACH	1
1.6	1.62	1.2	tr A0A1X7R9E6 A0A1X7R9E6_9SACH	9SACH	1
1.54	1.6	0.5	tr Q753M6 Q753M6_ASHGO	ASHGO	1
1.54	1.58	0.6	tr A0A1X7R5S5 A0A1X7R5S5_9SACH	9SACH	1



Unused	Total	% Cov (95)	Accession #	Species	Peptides (95%)
1.5	1.53	12.8	tr N1P7J0 N1P7J0_YEASC	YEAS C	2
1.49	1.52	0.9	tr A0A0J9X4Y9 A0A0J9X4Y9_GEOCN	GEOC N	1
1.48	1.51	3.2	tr N1P403 N1P403_YEASC	YEAS C	1
1.47	1.5	2.1	tr A0A1X7R212 A0A1X7R212_9SACH	9SACH	1
1.44	1.48	0.9	sp P28569 TRK1_SACUV	SACU V	1
1.43	1.46	0.8	tr A0A0J9XIF6 A0A0J9XIF6_GEOCN	GEOC N	1
1.43	1.46	7.1	tr B5VN44 B5VN44_YEAS6	YEAS6	1
1.4	1.44	0.9	tr H0GVD9 H0GVD9_SACCK	SACC K	1
1.4	1.42	3	tr A0A1X7R3C7 A0A1X7R3C7_9SACH	9SACH	1
1.39	1.42	1.1	tr A0A0J9XHH4 A0A0J9XHH4_GEOCN	GEOC N	1
1.38	1.41	0.6	tr A0A1X7R9V8 A0A1X7R9V8_9SACH	9SACH	1
1.35	1.39	1.5	tr H0GZA9 H0GZA9_SACCK	SACC K	1
1.34	1.38	1.2	tr A0A0J9X441 A0A0J9X441_GEOCN	GEOC N	1
1.33	1.36	1	tr G2HKD9 G2HKD9_YEASK	YEAS K	1
1.31	1.34	3.1	tr B5VI31 B5VI31_YEAS6	YEAS6	1

## Profacgen Raw Data HEK293

<b>Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] &gt;:</b>	1.30 (95.0%)
<b>Competitor Error Margin (ProtScore):</b>	2
<b>Software Version:</b>	ProteinPilot™ Software 5.0
<b>Revision Number:</b>	4769
<b>Paragon™ Algorithm:</b>	5.0.0.0, 4767
<b>Annotations Retrieved from UniProt:</b>	No
<b>Sample Type:</b>	Identification
<b>Cys. Alkylation:</b>	Iodoacetamide
<b>Digestion:</b>	Trypsin
<b>Instrument:</b>	TripleTOF 6600
<b>Special Factors:</b>	
<b>Species:</b>	
<b>ID Focus:</b>	Biological modifications
<b>Database:</b>	uniprot-saccharomyces+cerevisiae.fasta
<b>Search Effort:</b>	Thorough
<b>FDR Analysis:</b>	No
<b>User Modified Parameter Files:</b>	No

### His tagged peptide+HEK293

Unused	Total	% Cov (95)	Accession #	Species	Peptides (95%)
4.37	4.38	4.7	sp P11021 GRP78_HUMAN	HUMAN	2
4.15	6.25	6.5	sp P11142 HSP7C_HUMAN	HUMAN	3
4.04	4.04	4	sp Q00839 HNRPU_HUMAN	HUMAN	2
4.04	4.04	3.1	sp P14625 ENPL_HUMAN	HUMAN	2
4.01	4.02	21.4	sp P62805 H4_HUMAN	HUMAN	2
3.38	3.39	19.1	sp Q99880 H2B1L_HUMAN	HUMAN	2
3.22	3.23	2.9	sp P63261 ACTG_HUMAN	HUMAN	1
2.75	2.78	1.2	sp P12270 TPR_HUMAN	HUMAN	2
2.57	2.61	2.4	sp Q13263 TIF1B_HUMAN	HUMAN	1
2.54	2.55	2	sp Q92945 FUBP2_HUMAN	HUMAN	1
2.48	2.8	1.9	sp P07900 HS90A_HUMAN	HUMAN	1
2.02	2.03	3.9	sp P19971 TYPH_HUMAN	HUMAN	1
2	2.01	3	sp P26641 EF1G_HUMAN	HUMAN	1
2	2	1.6	sp P38646 GRP75_HUMAN	HUMAN	1
2	2	2.4	sp Q5VTE0 EF1A3_HUMAN	HUMAN	1
2	2	5.5	sp P30050 RL12_HUMAN	HUMAN	1
2	2	9.2	sp Q9GZT3 SLIRP_HUMAN	HUMAN	1
1.97	2.17	7.7	sp P14618 KPYM_HUMAN	HUMAN	2
1.75	1.91	6.9	sp P39019 RS19_HUMAN	HUMAN	1
1.71	1.81	1.9	sp Q13410 BT1A1_HUMAN	HUMAN	1
1.66	1.75	6.8	sp Q5VSP4 LC1L1_HUMAN	HUMAN	1
1.64	1.74	3	sp P00338 LDHA_HUMAN	HUMAN	1
1.54	1.71	8.3	sp P04792 HSPB1_HUMAN	HUMAN	1
1.53	1.62	1.8	sp P36957 ODO2_HUMAN	HUMAN	1

# ANEXO

Reporte Profacgen. Identificación de interacciones de proteína con PI-1, en células de levadura y humano



**Profacgen**<sup>®</sup>  
Profacgen, Perfect Protein!

A division of  
**Creative Biomart** Inc.

PROFACGEN

---

## PROJECT REPORT & CERTIFICATE OF ANALYSIS

Quote number: *PSG09041701*

**2018-04-11**

---

**To:**

**Gabriel Del Rio**

Associate Professor, UNAM

Mexico

Email: [gdelrio@ifc.unam.mx](mailto:gdelrio@ifc.unam.mx)

# Project Report

## 1. Project overview

The His-tagged peptide provided by the customer was tested with *Saccharomyces cerevisiae* (30 hours of growth) and HEK293 (5-6 days of growth) for pull-down, and the His tag was negative control.

The specific grouping of the experiments can be referred to as follows:

NO.	1	2	3	4
His tag	+	+	-	-
His-tagged peptide	-	-	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-
HEK293	-	+	-	+

## 2. Methods

### 2.1 Equilibrium resin

- (1) Mix Ni<sup>2+</sup>+IDA affinity chromatography gel and resuspend resin completely.
- (2) Transfer 100 uL 50% resin suspension to 4 tubes, centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant.
- (3) Resuspend resin with 500 uL PBS. Centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant. Repeat for 3 times.

### 2.2 Protein interaction

- (1) His tag and His-tagged peptide were added to the nickel column respectively. Rotate the mixture and incubate for 2 h at 4°C. Then add the *Saccharomyces cerevisiae* lysate or HEK293 lysate to the mixture. Incubate for 2 h at 4°C.
- (2) Centrifuge at 1250g for 5 min and discard supernatant.
- (3) Resuspend resin with 500 uL PBS. Centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant. Repeat for 3 times.

### 2.3 Elution of bait protein and target protein complex

- (1) Add 50 uL Elution Buffer to each tube.
- (2) Incubate for 30 min at 4°C.
- (3) Centrifuge at 1250g for 2 min
- (4) 20 ul sample was used to detect by SDS-PAGE.

### 3. Results

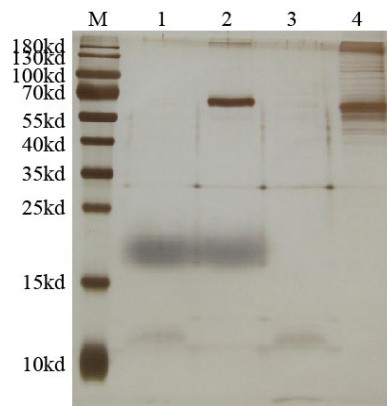


Fig. 1 SDS-PAGE profile of pull down assay

M: Marker

1: His tag + *Saccharomyces cerevisiae*

2: His tag + HEK293

3: His-tagged peptide + *Saccharomyces cerevisiae*

4: His-tagged peptide + HEK293

### 4. Conclusion

Based on the results, the following conclusions can be concluded:

- (1) There may be proteins associated with His-tagged peptide in the HEK293 lysate. Mass spectrometry analysis can be carried out.
- (2) There is almost no protein binding to the His-tagged peptide in the *Saccharomyces cerevisiae* lysate. We do not recommend mass spectrometry analysis.

### 5. Project overview-*Saccharomyces cerevisiae* repeat

The His-tagged peptide provided by the customer was tested with *Saccharomyces cerevisiae* (30 hours of growth) for pull-down, and the His tag was negative control.

The specific grouping of the experiments can be referred to as follows:

NO.	1	2	3	4
His tag	+	+	-	-
His-tagged peptide	-	-	+	+
Saccharomyces cerevisiae	+	-	+	-

## 6. Methods

### 6.1 Equilibrium resin

- (1) Mix Ni<sup>2+</sup>-IDA affinity chromatography gel and resuspend resin completely.
- (2) Transfer 100  $\mu$ L 50% resin suspension to 4 tubes, centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant.
- (3) Resuspend resin with 500  $\mu$ L PBS. Centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant. Repeat for 3 times.

### 6.2 Protein interaction

- (1) His tag and His-tagged peptide were added to the nickel column respectively. Rotate the mixture and incubate for 2 h at 4°C. Then add the *Saccharomyces cerevisiae* lysate (3 times more than last time) to the mixture. Incubate for 2 h at 4°C.
- (2) Centrifuge at 1250g for 5 min and discard supernatant.
- (3) Resuspend resin with 500  $\mu$ L PBS. Centrifuge at 1250g for 2 min and discard supernatant. Repeat for 3 times.

### 6.3 Elution of bait protein and target protein complex

- (1) Add 50  $\mu$ L Elution Buffer to each tube.
- (2) Incubate for 30 min at 4°C.
- (3) Centrifuge at 1250g for 2 min
- (4) 20  $\mu$ L sample was used to detect by SDS-PAGE.

## 7. Results

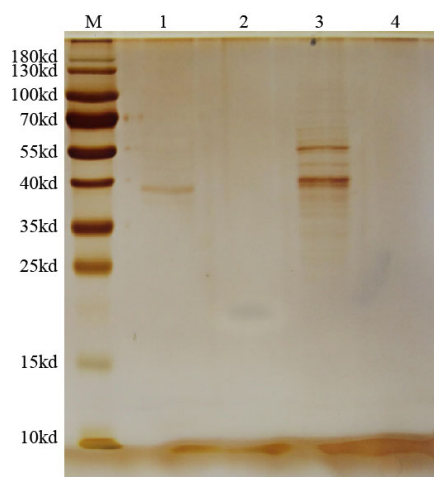


Fig. 2 SDS-PAGE profile of pull down assay

M: Marker

1: His tag + *Saccharomyces cerevisiae*

2: His tag

3: His-tagged peptide + *Saccharomyces cerevisiae*

4: His-tagged peptide

## 8. Conclusion

Based on the results, the following conclusions can be concluded:

There may be proteins associated with His-tagged peptide in the *Saccharomyces cerevisiae* lysate. Mass spectrometry analysis can be carried out.

## 9. Peptide mass fingerprinting

Peptide mass fingerprinting (PMF) (also known as protein fingerprinting) is an analytical technique for protein identification in which the unknown protein of interest is first cleaved into smaller peptides, whose absolute masses can be accurately measured with a mass spectrometer. Using protein identification software or according to protein molecular weight, isoelectric point and other parameters in protein database, PMF can identify the protein in the sample.

### 9.1 RPLC-MS analysis



Inject the sample into Eksigent 1D plus high performance liquid chromatography system with C18 capture column from an automatic injector at a speed of 3 L/min. The eluted peptides were transported by tandem electrospray ionization into tandem mass spectrometry TripleTOF 5600 (Applied Biosystem, USA). MS scan range (m/z) 350-1250, cumulative time 0.25s, MS/MS scanning range (m/z) 100-1500.

### 9.2 Data analysis

The files produced by mass spectrometry were identified by loading into ProteinPilot 5 software (AB SCIEX). The search parameters are as follows: Sample Type = Identification; Digestion = Trypsin; Instrument =TripleTOF 5600; the protein database established by the Database= target protein sequence or the protein database of the corresponding species downloaded from Uniprot. Protein reliability is Unused ProtScore> 1.3 E = 95%) as the trusted standard.

### 9.3 Results

See attached excel document.

Notes:

<b>N</b>	Number
<b>Unused</b>	A score given by Proteinpilot. If it is more than 1.3, it is regarded as high credibility.
<b>% Cov (95)</b>	The peptide with a reliability greater than 95% accounts for the coverage of the whole protein (coverage).
<b>Accession #</b>	Uniprot or NCBI #
<b>Name</b>	Protein name
<b>Species</b>	Species
<b>Peptides(95%)</b>	The number of peptide segments greater than 95% in the confidence interval

Keratin is natural pollution and can be ignored.



QA Manager

Apr 11, 2018  
Date

**FOR RESEARCH OR FURTHER MANUFACTURING USE ONLY**



**Profacgen**<sup>®</sup>  
Profacgen, Perfect Protein!

A division of  
**Creative Biomart Inc.**

45-1 Ramsey Road  
Shirley, NY 11967, USA  
Tel: 1-631-559-9269  
Fax: 1-631-938-8127  
Email: [technology@profacgen.com](mailto:technology@profacgen.com)  
<http://www.profacgen.com>

PROFACGEN

# REFERENCIAS

- Arap, W., W. Haedicke, M. Bernasconi, R. Kain, D. Rajotte, S. Krajewski, H. M. Ellerby, D. E. Bredesen, R. Pasqualini and E. Ruoslahti (2002). "Targeting the prostate for destruction through a vascular address." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1527-1531.
- Arap, W., R. Pasqualini and E. Ruoslahti (1998). "Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model." Science **279**(5349): 377-380.
- Bedkowska, G. E., S. Lawicki and M. Szmitkowski (2009). "[Molecular markers of carcinogenesis in the diagnostics of cervical cancer]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **63**: 99-105.
- Broach, J. R. (2012). "Nutritional Control of Growth and Development in Yeast." Genetics **192**(1): 73-105.
- Chen, Z., Z. Wang, W. Guo, Z. Zhang, F. Zhao, Y. Zhao, D. Jia, J. Ding, H. Wang, M. Yao and X. He (2015). "TRIM35 Interacts with pyruvate kinase isoform M2 to suppress the Warburg effect and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma." Oncogene **34**(30): 3946-3956.
- Diehn, M., R. W. Cho, N. A. Lobo, T. Kalisky, M. J. Dorie, A. N. Kulp, D. Qian, J. S. Lam, L. E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M. J. Kaplan, I. Wapnir, F. M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S. K. Lau, S. R. Quake, J. M. Brown, I. L. Weissman and M. F. Clarke (2009). "Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells." Nature **458**(7239): 780-783.
- Diehn, M. and M. F. Clarke (2006). "Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance." J Natl Cancer Inst **98**(24): 1755-1757.
- Ehrhardt, H., F. Wachter, M. Grunert and I. Jeremias (2013). "Cell cycle-arrested tumor cells exhibit increased sensitivity towards TRAIL-induced apoptosis." Cell Death Dis **4**: e661.
- Ellerby, H. M., W. Arap, L. M. Ellerby, R. Kain, R. Andrusiak, G. D. Rio, S. Krajewski, C. R. Lombardo, R. Rao, E. Ruoslahti, D. E. Bredesen and R. Pasqualini (1999). "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides." Nat Med **5**(9): 1032-1038.

Escote, X., M. Zapater, J. Clotet and F. Posas (2004). "Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1." Nat Cell Biol **6**(10): 997-1002.

Fillmore, C. M. and C. Kuperwasser (2008). "Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy." Breast Cancer Res **10**(2): R25.

Gardner, A. and B. Ruffell (2016). "Dendritic Cells and Cancer Immunity." Trends Immunol **37**(12): 855-865.

Gray, J. V., G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer and M. Werner-Washburne (2004). "'Sleeping beauty': quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 187-206.

Gupta, P. B., T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg and E. S. Lander (2009). "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening." Cell **138**(4): 645-659.

Hallstrom, K. N. and B. A. McCormick (2016). "The type three secreted effector SipC regulates the trafficking of PERP during *Salmonella* infection." Gut Microbes **7**(2): 136-145.

Huang, D., H. Friesen and B. Andrews (2007). "Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast." Mol Microbiol **66**(2): 303-314.

Ihrie, R. A. and L. D. Attardi (2004). "Perp-etrating p53-dependent apoptosis." Cell Cycle **3**(3): 267-269.

Kiseljak-Vassiliades, K., T. S. Mills, Y. Zhang, M. Xu, K. O. Lillehei, B. K. Kleinschmidt-DeMasters and M. E. Wierman (2017). "Elucidating the Role of the Desmosome Protein p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22 in Growth Hormone Tumors." Endocrinology **158**(5): 1450-1460.

Lee, J., H. K. Kim, Y. M. Han and J. Kim (2008). "Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription." Int J Biochem Cell Biol **40**(5): 1043-1054.

Luo, W., H. Hu, R. Chang, J. Zhong, M. Knabel, R. O'Meally, R. N. Cole, A. Pandey and G. L. Semenza (2011). "Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1." Cell **145**(5): 732-744.

Makio, T., S. Nishikawa, T. Nakayama, H. Nagai and T. Endo (2008). "Identification and characterization of a Jem1p ortholog of *Candida albicans*: dissection of Jem1p

functions in karyogamy and protein quality control in *Saccharomyces cerevisiae*."

Genes Cells **13**(10): 1015-1026.

Muller, E. M., N. A. Mackin, S. E. Erdman and K. W. Cunningham (2003). "Fig1p facilitates Ca<sup>2+</sup> influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **278**(40): 38461-38469.

Biol Chem **278**(40): 38461-38469.

Naider, F. and J. M. Becker (2004). "The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors." Peptides **25**(9): 1441-1463.

Nishizawa, M., M. Kawasumi, M. Fujino and A. Toh-e (1998). "Phosphorylation of sic1, a cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor, by Cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation." Mol Biol Cell **9**(9): 2393-2405.

Rodríguez Plaza, J. G. (2014). "Determinación del mecanismo de acción de los péptidos Iztli." México, UNAM.

Rodriguez Plaza, J. G., R. Morales-Nava, C. Diener, G. Schreiber, Z. D. Gonzalez, M. T. Lara Ortiz, I. Ortega Blake, O. Pantoja, R. Volkmer, E. Klipp, A. Herrmann and G. Del Rio (2014). "Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin." J Biol Chem **289**(21): 14448-14457.

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

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

Rogers, J. V. and M. D. Rose (2014). "Kar5p is required for multiple functions in both inner and outer nuclear envelope fusion in *Saccharomyces cerevisiae*." G3 (Bethesda) **5**(1): 111-121.

Severin, F. F. and A. A. Hyman (2002). "Pheromone induces programmed cell death in *S-cerevisiae*." Current Biology **12**(7): R233-R235.

Stetak, A., R. Veress, J. Ovadi, P. Csermely, G. Keri and A. Ullrich (2007). "Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death." Cancer Res **67**(4): 1602-1608.

Stingl, J. and C. Caldas (2007). "Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis." Nat Rev Cancer **7**(10): 791-799.

Tyers, M. and B. Futcher (1993). "Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes." Mol Cell Biol **13**(9): 5659-5669.

Uguz, A. C., M. Naziroglu, J. Espino, I. Bejarano, D. Gonzalez, A. B. Rodriguez and J. A. Pariente (2009). "Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities." J Membr Biol **232**(1-3): 15-23.

Valcourt, J. R., J. M. S. Lemons, E. M. Haley, M. Kojima, O. O. Demuren and H. A. Coller (2012). "Staying alive Metabolic adaptations to quiescence." Cell Cycle **11**(9): 1680-1696.

Waldman, T., Y. G. Zhang, L. Dillehay, J. Yu, K. Kinzler, B. Vogelstein and J. Williams (1997). "Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy." Nature Medicine **3**(9): 1034-1036.

Weinreich, M., C. Liang, H. H. Chen and B. Stillman (2001). "Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11211-11217.

Wells, A., L. Griffith, J. Z. Wells and D. P. Taylor (2013). "The Dormancy Dilemma: Quiescence versus Balanced Proliferation." Cancer Research **73**(13): 3811-3816.

Wiman, K. G. and B. Zhivotovsky (2017). "Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases." Journal of Internal Medicine **281**(5): 483-495.

Yaakov, G., A. Duch, M. Garcia-Rubio, J. Clotet, J. Jimenez, A. Aguilera and F. Posas (2009). "The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress." Mol Biol Cell **20**(15): 3572-3582.

Zhang, N. N., D. D. Dudgeon, S. Paliwal, A. Levchenko, E. Grote and K. W. Cunningham (2006). "Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones." Mol Biol Cell **17**(8): 3409-3422.



## Vladimir Juárez Arellano

Joven y prolífico científico especializado en péptidos antimicrobianos, células madre y legislación sanitaria. Doctor en Ciencias Bioquímicas por el Instituto de Fisiología Celular (UNAM), con el proyecto *Péptido asesino dirigido a células detenidas*. Maestro en Ciencias Bioquímicas por el Instituto de Investigación Biomédica (UNAM), con la tesis *Transferencia de genes humanos Oct., Sox 2, Nanog y Lin28 en células endoteliales del cordón umbilical*. Ha participado, como ponente y asistente, en diversos congresos a nivel nacional e internacional, y constantemente realiza labor académica y de docencia en diversas universidades del país.

Entre otras cosas, ha trabajado como consultor y en la implementación de programas enfocados a la legislación sanitaria; así como en el desarrollo y realización de propuestas de proyectos de investigación aplicada en el campo de la terapia con células madre. Como Gerente del banco de células madre en Pulpa Dental, INDEBIOC S.A. de C.V., realizó el diseño del laboratorio de cultivo celular, de procedimientos de expansión de cultivos celulares con fines terapéuticos, de procedimientos operativos en condiciones de la FDA y de protocolos clínicos en terapia celular, entre otras labores de gestión y administración del laboratorio.

Como Gerente del proyecto, fue el ejecutivo a cargo del desarrollo, diseño, planificación y construcción del primer laboratorio privado a nivel nacional en extracción, expansión y preservación de células madre derivadas de pulpa dental y obtuvo la tercera licencia sanitaria nacional otorgada por la COFEPRIS en "Disposición de órganos y células para trasplante. Modalidad de células progenitoras ". Sus intereses se centran en el desarrollo de terapias de nueva generación para la resistencia a los antimicrobianos y la quimioterapia bajo el enfoque de la medicina traslacional.