



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN FARMACIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BUAP
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS

*Análisis del efecto de una proteína viral con
actividad antiapoptótica en el envejecimiento de
Schizosaccharomyces pombe*

Presenta

Guadalupe Rojas Sánchez

Para obtener el título de
Licenciada en Farmacia

Directores de tesis:

**Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta
M.C Juan Carlos Benítez Serrano**

14 de Noviembre de 2014



BUAP
C.P. JOSÉ JUAN MORALES RODRIGUEZ
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 29 de Octubre de 2014, signado por el Coordinador del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de FARMACIA que sustentará:

ROJAS SANCHEZ GUADALUPE

JURADO

MC. LAURA MARTÍNEZ PÉREZ
MSP. CLAUDY LORENA VILLAGRAN PADILLA
QFB. OSCAR PEREZ TORIZ

Examen que se realizará el día 14 de Noviembre de 2014, a las 14:00 horas en Salón de Usos Múltiples.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 29 de Octubre de dos mil catorce

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA
DIRECTOR



C.c.p. Archivo



BUAP

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
PRESENTE

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de FARMACIA

ROJAS SANCHEZ GUADALUPE

realizada en el area de Microbiología, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

ANÁLISIS DEL EFECTO DE UNA PROTEÍNA VIRAL CON ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA EN EL ENVEJECIMIENTO DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 23 días del mes de Octubre de 2014

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

MC. LAURA MARTÍNEZ PÉREZ

MSP. CLAUDY LORENA VILLAGRAN PADILLA

QFB. OSCAR PEREZ TORIZ



C.c.p. Archivo

Agradecimientos



**“Esta investigación fue realizada con el apoyo del Consejo de
Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”**

Agradecimientos

PROYECTO VIEP:

ROMN-NAT-14-G

PROYECTO RED PROMEP BUAP-CA-147

APOYO PIFI 2013

Agradecemos al Dr. César Feliciano Pastelín Rojas y a la Dra. Carolina Moran Raya del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto de Ciencias por las facilidades para el uso del microscopio de fluorescencia.

Dedicatoria

Los párrafos más difíciles de escribir no fueron acerca de las vías de señalización o de la regulación genética, fueron los siguientes, ya que mi familia y seres queridos han sido pilares en mi vida.

Mamá

No hay palabras con las cuales pueda agradecerte el inmenso amor, sacrificios, enseñanzas, desvelos, cuidados, apoyo y comprensión que has hecho en cada etapa de mi vida, para convertirme en una persona de provecho. Nada de esto sería posible sin ti, este es tu logro, todo lo que hago es gracias a ti. Te amo.

Hermano

Gracias por ser mi papá, mi guía y amigo, por cuidarme y aconsejarme desde que era pequeña; por enseñarme que la vida es más que un laboratorio, es disfrutar un y mil cosas más, te amo.

Hermana

Gracias hermanita por estar siempre conmigo, por tu apoyo y comprensión incondicional, por tus enseñanzas y consejos, por las risas y por las lágrimas en cada charla, te amo hoy y siempre. Gracias por inculcarme el amor hacia el estudio desde pequeña, fuiste mi primer acercamiento a las aulas de esta universidad.

Beto y Chelis

Gracias pequeños sobrinos por su amor, por comprenderme cuando estaba estudiando y no podía jugar, gracias por brindarme la alegría que ilumina mi día, los amo y siempre estaré con ustedes. Recuerden que nunca es suficiente, tienen que estudiar y superarse, pero la escuela no lo es todo en la vida, hagan lo que les apasiona pero nunca descuiden a la familia.

Fer, Checo y Max

Pequeños, son una parte muy importante en mi vida y siempre que lo necesiten los apoyaré. Les pido estudien, encuentren lo que más les apasiona hacer y se superen, es esencial para que puedan ser felices y compartir esa felicidad con sus seres queridos.

Jani

Gracias por tu apoyo incondicional, por amarme y cuidarme, por soportar mi mal humor y siempre tener una sonrisa para mí. Desde que te conocí el café cambió su aroma, te amo.

Beto Calva

Gracias por hacerme sonreír cuando estaba triste, por animarme porque ya va a ser navidad. Eres un gran farmacéutico y una gran persona, gracias por todo.

Agradecimientos

Dra. Nora mi directora de tesis

Gracias por su apoyo incondicional, porque a pesar de no conocerme me aceptó en su laboratorio y me permitió trabajar. Gracias por su paciencia, por el impulso que le da a mi formación profesional, por sus enseñanzas, por inspirar el amor a la célula y por ser mi científica favorita.

MC Juan Carlos mi director de tesis

Le agradezco el tiempo que dedicó a este proyecto, por su disposición para trabajar, así como por sus consejos académicos y de formación personal, son invaluable.

MC. Laura Martínez Pérez, M.S.P. Claudy Lorena Villagrán Padilla y al M.C Óscar Pérez Toriz, mi comisión revisora

Gracias por su comprensión y apoyo desde la presentación del protocolo hasta el examen profesional, por el tiempo invertido en la lectura de cada uno de los escritos y por la paciencia en la corrección de cada uno de mis errores.

A mis amigos y colegas del laboratorio

Paty, gracias porque desde que entré al laboratorio siempre me has enseñado y corregido, por esas charlas interminables de ciencia y de problemas superfluos de la vida jaja, por acompañarme y colaborar en la elaboración de este proyecto. Mary, gracias por tus abrazos matutinos y por apoyarme en cada momento. Diana, gracias por tu apoyo en los experimentos y por ser una gran compañera. Mario, gracias por ser un gran compañero. A Rafa, gracias por tus chinos y sonrisas que siempre nos sacas.

A mis profesores

Gracias por sus enseñanzas dentro y fuera del aula, por las exigencias y el empeño que dieron en cada una de sus clases, porque siempre demostraron interés por apoyarme, por su inmensa paciencia a mi inquietud por aprender y preguntar, gracias al Dr. Saúl Merino, MC. Benjamín Sandoval, MC. Victoria Palafox, QFB. Gabriel Ramírez, MC. Araceli Ugarte, Dr. Laura Ortega, MC. Eleazar.

Este libro es una tentativa para ir hasta el fondo de un largo camino de negación de la realidad cotidiana y de admisión de otras posibles realidades, de otras posibles aperturas.
Julio Cortázar

Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas, ahora sabemos que está en nuestros genes.
Watson y Crick

El mejor antibiótico es la educación.
Ruy Pérez Tamayo

No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.
Johann Wolfgang Goethe

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESÚMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. ENVEJECIMIENTO	9
2.2. MODELOS DE ENVEJECIMIENTO	13
2.3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO	16
2.4. APOPTOSIS	22
2.5. AUTOFAGIA	30
3. MARCO DE REFERENCIA	33
3.1. PROTEÍNA V	33
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
5. JUSTIFICACIÓN	38
6. HIPÓTESIS	38
7. OBJETIVOS	39
7.1. OBJETIVO GENERAL	39
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES	39
8. DIAGRAMA DE TRABAJO	40
9. METODOLOGÍA	41
9.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS ADN RECOMBINANTES	41
9.1.1. DISEÑO DE PRIMERS PARA EL ORF DE LA PROTEÍNA V	42
9.1.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF DE LA PROTEÍNA V	42
9.1.3. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN EL VECTOR pJET1.2/blunt EN <i>E. coli</i>	43
9.1.4. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS TRANSFORMADAS Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	45
9.1.5. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DEL ORF Y EL VECTOR pRSP2	46
9.1.6. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pRSP2+V ^{AluI} y pRSP2+V ^{NotI} _{XmaI}	46

9.1.7. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS TRANSFORMADAS Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	47
9.1.8. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN DE INTERÉS DEL PLÁSMIDO pRSP2+V ^{NotI} _{XmaI}	47
9.2. TRANSFORMACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN <i>S. pombe</i>	48
9.2.1. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. pombe</i>	49
9.2.2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA V EN <i>S. pombe</i>	50
9.2.3. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE <i>S. pombe</i>	50
9.2.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	51
9.2.5. EVALUACIÓN DE LA APOPTÓISIS Y AUTOFAGIA POR RT-PCR	51
9.2.6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR CON LA TINCIÓN CON CALCOFLÚOR	52
9.3. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LAS PROTEÍNAS V Y Pcal	52
9.3.1. ANÁLISIS DE MOTIVOS DE LA PROTEÍNA V Y LA Pcal CON MOTIFSCAN	52
9.3.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEÍNA V Y Pcal CON GENO3D Y YASARA	53
9.3.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE LA PROTEÍNA V Y Pcal CON PATCHDOCK Y YASARA	53
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
10.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS ADN RECOMBINANTES	54
10.1.1. PRIMERS PARA EL ORF DE LA PROTEÍNA V	54
10.1.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF DE LA PROTEÍNA V	55
10.1.3. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN EL VECTOR pJET1.2/blunt	56
10.1.4. SÍNTESIS DEL ADN RECOMBINANTE	57
10.1.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN DE INTERÉS DEL PLÁSMIDO pRSP2+V ^{NotI} _{XmaI}	61
10.2. TRANSFORMACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN <i>S. pombe</i>	64
10.2.1. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. pombe</i>	64
10.2.2. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR DE <i>S. pombe</i>	65

10.2.3.	EXTRACCIÓN DEL ARNm AL DÍA 5 DE CLS	67
10.2.4.	EVALUACIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA V, APOPTOSIS Y AUTOFAGIA POR RT-PCR	67
10.3.	ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LAS PROTEÍNAS V Y Pcal	68
10.3.1.	ANÁLISIS DE MOTIVOS DE LA PROTEÍNA V Y LA Pcal CON MOTIF SCAN	69
10.3.2.	ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y TERCIARIA DE LA PROTEÍNA V Y Pcal	72
10.3.3.	ANÁLISIS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE LA PROTEÍNA V Y Pcal CON YASARA	77
11.	CONCLUSIONES	79
12.	PERSPECTIVAS	79
13.	ANEXO 1 REACTIVOS	80
14.	ANEXO 2 TRANSFORMACIÓN	82
14.1.	VECTOR DE CLONACIÓN pJET1.2/blunt	82
14.2.	PLÁSMIDO pGLO	84
14.3.	VECTOR DE EXPRESIÓN pRSP2	85
15.	BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Teorías del envejecimiento.	10
Tabla 2. Atributos y desventajas de los organismos modelo para el estudio del envejecimiento.	13
Tabla 3. Clasificación de caspasas de acuerdo a su función.	24
Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación del ORF de la proteína V por PCR.	42
Tabla 5. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de la proteína V por PCR.	42
Tabla 6. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de ligación del vector pRSP2 y el inserto de cada una de las secuencias amplificadas	47
Tabla 7. Condiciones del termociclador para la amplificación de los genes de V, Pcal, Atg 5 y 8 de <i>S. pombe</i>	52
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para el gen de la proteína V	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proyecciones demográficas de la población en México.	13
Figura 2. Vía de señalización asociada al envejecimiento en levaduras, gusanos, moscas y ratón.	16
Figura 3. Micrografía de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	17
Figura 4. Paradigmas de estudio del envejecimiento en levaduras.	18
Figura 5. Vías de señalización asociadas al envejecimiento en <i>S. pombe</i> .	20
Figura 6. Procesos implicados en el CLS.	22
Figura 7. Apoptosis en eucariotas superiores.	26
Figura 8. Clasificación de las proteínas Bcl2.	26
Figura 9. Expresión de la proteína humana Bak en la levadura de visión <i>S. pombe</i> induce apoptosis.	29
Figura 10. Autofagia en levadura.	31
Figura 11. Clasificación de las proteínas Atg.	31
Figura 12. Sistemas tipo ubiquitina de la maquinaria de autofagia.	33
Figura 13. Características estructurales de la proteína V.	35
Figura 14. Disminución de los niveles de caspasa 8 (a), 9 (b) y 3/7 (c).	37
Figura 15. Amplificación por PCR del ORF de la proteína V.	56
Figura 16. Transformación y verificación del inserto pJET2.1/blunt+V en <i>E. coli</i> .	57
Figura 17. Reacciones de digestión para generar extremos cohesivos del gen de la proteína V.	58
Figura 18. Reacciones de digestión para generar extremos cohesivos en el vector pRSP2.	59
Figura 19. Subclonación del ORF de la proteína V en el vector pRSP2.	60
Figura 20. Purificación del ADN _R .	60
Figura 21. Electroferograma de la construcción pRSP2+ V ^{NotI} _{XmaI} .	61
Figura 22. Secuencia nucleotídica obtenida del fragmento clonado del vector pRSP2+V ^{NotI} _{XmaI} .	62
Figura 23. Alineamiento múltiple del ORF del ADN _R pRSP2+V ^{NotI} _{XmaI} .	63

Figura 24. Transformación de <i>S. pombe</i> con el vector pRSP2+ V^{NotI}_{XmaI}.	65
Figura 25. Evaluación de la integridad de la pared celular de <i>S. pombe</i> en los días 1 y 5 de CLS.	66
Figura 26. Extracción de ARN total de <i>S. pombe</i> y <i>S. pombe</i> ΔV^{myc}.	67
Figura 27. Evaluación por RT-PCR del gen de la proteína V, Pcal, Atg 5 y 8.	67
Figura 28. Análisis de motivos estructurales de la proteína V y Pcal.	69
Figura 29. Análisis de motivos estructurales de fosforilación de la proteína Pcal.	71
Figura 30. Selección de la estructura 3D plantilla.	73
Figura 31. Identidad del templado.	74
Figura 32. Modelos de las estructuras terciarias de las proteínas V y Pcal generadas con el programa Geno3D.	76
Figura 33. Resultados arrojados por el programa PatchDock de interacciones de la proteína Pcal y la proteína V.	77
Figura 34. Análisis de interacciones moleculares de la proteína V y Pcal.	78
Figura 35. Esquema del plásmido pJET2.1/blunt.	83
Figura 36. Esquema del plásmido pGLO.	84
Figura 37. Esquema del vector pRSP2.	86

RESÚMEN

El envejecimiento celular es un declive de las funciones fisiológicas dependiente de la edad y se encuentra relacionado al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, siendo los principales factores de disminución de la calidad de vida y muerte de personas seniles. Todo esto se traduce en un gasto público cuantioso debido a que el tratamiento de este tipo de es costoso; lo cual exige el estudio molecular a detalle de los procesos relacionados con el envejecimiento en células eucariotas.

Una de las principales causas del envejecimiento es la desregulación en la muerte celular, específicamente del proceso de apoptosis. Estudios previos realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular-ICUAP han mostrado que la proteína V del virus de parotiditis es un modulador de la apoptosis. Se desconoce si la proteína V podría ser un estimulador negativo de la cascada apoptótica en un modelo de envejecimiento. En este trabajo se estudió la relación de la proteína V con los procesos de apoptosis y autofagia en células envejecidas, encontrando que la expresión de esta proteína en *Schizosaccharomyces pombe* sugiere que regula de forma negativa la apoptosis al día 5 de envejecimiento, encontrando que las células muestran un mantenimiento en la integridad de su pared celular en comparación a células que no expresan dicha proteína, así como, expresión del ARNm de la Pcal disminuye en células que expresan a V. También se sugiere que puede regular de forma positiva la expresión de genes que codifican a proteínas que participan en la autofagia.

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es el declive de las funciones bioquímicas y fisiológicas dependiente de la edad de los organismos. En humanos este proceso deriva en enfermedades crónico-degenerativas que disminuyen la calidad de vida y además implican un tratamiento costoso. El estudio de las bases moleculares del envejecimiento ha permitido dilucidar algunos de los procesos implicados, como desregulación de apoptosis, especies reactivas de oxígeno, entre otros. El envejecimiento se ha estudiado en diversos organismos, tal es el caso de la levadura *S. pombe* que posee una maquinaria celular ortóloga a eucariotas superiores, su corto tiempo de vida y el ser de fácil manipulación genética lo hace un modelo válido de envejecimiento. Por otra parte en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP se ha estudiado a la proteína viral V, la cual ha mostrado ser un modulador en el proceso de apoptosis en otros modelos celulares. Es por ello que en este trabajo se propuso el análisis del efecto de la proteína viral V sobre la apoptosis en el envejecimiento de *S. pombe*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es el declive de las funciones moleculares y bioquímicas celulares, debido a la influencia de; la carga genética, el medio ambiente, procesos inherentes y estocásticos, que derivan en la acumulación progresiva de daño molecular en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (toxicidad celular), involucrando a los diferentes niveles de organización biológica: genes, células, tejidos, sistemas y el organismo como una unidad funcional, este fenómeno es conocido como envejecimiento (Rattan S., 2006; Bondy S., 2010; Das U., 2011; Holliday R., 2007; Campisi J., 2013; Alberts B., 2007).

El envejecimiento ha sido un proceso intrigante para el hombre y desde tiempos remotos se ha tratado de entender cómo y por qué ocurre, es por ello que se ha investigado desde diferentes perspectivas y se han planteado diversas teorías (**Tabla 1**). Sin embargo, a pesar de ser un fenómeno extensamente estudiado no se ha descubierto cuál es el mecanismo detonante, ya que ninguno de los factores mencionados en la tabla 1 es la causa del envejecimiento, pero sí contribuyen al deterioro homeostático y funcional del organismo. En organismos envejecidos, el conjunto de estas alteraciones, deriva en la expresión de un fenotipo citogenético con las siguientes características: arresto celular, tamaño celular aumentado o heterogéneo y alteraciones cromosómicas (López-Otín C., 2013; Rattan S., 2006; Fernandez-García E., 2005).

Tabla 1. Teorías del envejecimiento.

Teoría	Descripción
Inestabilidad genómica	La estabilidad del ADN es continuamente amenazada por agentes físicos, químicos, biológicos, así como por procesos endógenos, como la replicación del ADN, errores espontáneos, reacciones hidrolíticas y ROS. Estas lesiones son diversas y entre ellas se incluyen mutaciones puntuales, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosomales y disrupción genética; lo que deriva en defectos en la arquitectura nuclear (laminopatías) que son la causa de síndromes prematuros de envejecimiento. (López-Otín C., 2013; Rattan S., 2006a, Rattan S., 2006b, Burhans W., 2003).
Acortamiento de telómeros	Los telómeros son estructuras localizadas al final de los cromosomas; se ha demostrado experimentalmente que su acorte o desgaste es proporcional al número de divisiones celulares. Los telómeros cortos evitan posteriores divisiones de la célula; en eucariotas superiores la disminución en la división celular impide que células dañadas sean renovadas, lo que se traduce en la disfunción de órganos y sistemas (Das U., 2011; López-Otín C., 2013).
Alteraciones epigenéticas	Los cambios en los patrones de metilación del ADN, así como modificaciones postraduccionales de histonas cambian la arquitectura de la cromatina, pudiendo derivar en pérdida de heterocromatina y redistribución del material genético, disminuyendo o aumentando la expresión genética, que induce disfuncionalidad del organismo (López-Otín C., 2013; Nikolettou V., 2014; Tollefsbol T., 2009).
Pérdida de proteostasis	La proteostasis tiene como función la estabilización y el correcto plegado de proteínas, estos procesos se orquestan por las proteínas de choque térmico y los mecanismos de degradación, ya sea a través del proteosoma o lisosoma, sin embargo, el daño en esta maquinaria celular induce la expresión de proteínas no plegadas o plegadas de forma incorrecta, y de agregados proteicos, debido a la disminución del <i>clearance</i> proteico, induciendo patologías crónico- degenerativas (Kundu M., 2008; Calderwood S., 2009; López-Otín C., 2013; Rattan S., 2006).
Sensado de nutrientes desregulado	Las vías de sensado de nutrientes están mediadas por proteínas tipo cinasas serina treonina (PKA, PKB y TOR), en las cuales su sobreactivación induce la disminución de factores de transcripción de respuesta al estrés, lo que incrementa las ROS y por lo tanto, el daño genómico, proteómico y lipídico; además se inhiben los mecanismos de reparación y mantenimiento celular. (Rattan S., 2006).
Comunicación intracelular alterada	Las disfunciones en las vías de crecimiento, mantenimiento y muerte, ya sea por la exposición a agentes externos o alteraciones genéticas, inducen la disfunción de órganos y sistemas. (Rattan S., 2006).

**Disfunción
mitocondrial y ROS**

La mitocondria es la fuente de energía de la célula, en donde se sintetiza el ATP a través de reacciones endergónicas, sin embargo, en el envejecimiento hay una alteración de los estados de óxido reducción en la cadena de transferencia de electrones, generando un desbalance en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidante. La superóxido dismutasa es la encargada de la generación de O₂·, dicha molécula puede interactuar con el NO formando al ONOO⁻, el cual a pH fisiológico protona a ONOOH, dichas especies son altamente reactivas, capaces de oxidar y nitrar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, que induce cambios en la dinámica y permeabilidad en el sistema de membranas, modificaciones en los patrones de expresión genética, así como, la formación de compuestos tóxicos por ejemplo: 4-hidroxinonenal y malonildialdehído. Además, las ROS, la disminución de factores de crecimiento, la exposición a radiación, defectos en los patrones de glicosilación y el daño al ADN inducen un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial, activando el programa de muerte celular a través de la vía intrínseca. (Rattan S., 2006a; Calabrese V., 2008; Rattan S., 2006b; Das U., 2011).

Abreviaturas: ROS: especies reactivas de oxígeno. PKA: proteína cinasa A. PKB: proteína cinasa B. TOR: blanco de rapamicina. O₂·: anión superóxido. NO: óxido nítrico. ONOO⁻: peroxinitrito. ONOOH: ácido peroxinitroso.

En humanos el envejecimiento se clasifica como exitoso o patológico; en el primero en los individuos disminuye el volumen de tejido muscular y hay un aumento de tejido adiposo y conectivo, por ejemplo, en el riñón hay una disminución de nefronas, o en el cerebro hay una pérdida de neuronas. En el envejecimiento patológico hay un cambio en la composición de los tejidos conectivos, haciendolos rígidos y al mismo tiempo a los vasos sanguíneos y las vías aéreas; también la composición de la membrana celular cambia, por lo tanto, muchos tejidos son menos eficientes en el intercambio de bióxido de carbono y desechos, entre oxígeno y nutrientes. Otra característica es la disminución de sus ritmos biológicos y capacidades funcionales, traduciéndose fenotípicamente en calvicie, disminución en tiempos de reacción, fluctuación de peso, pérdida de la capacidad visual, hipoacusia, alteración de los patrones de sueño, arrugas, entre otros. Por otra parte, se considera que los individuos padecen envejecimiento patológico cuando además de las disfuncionalidades anteriores, padecen una o

más enfermedades crónico degenerativas, como diabetes, arterioesclerosis, neurodegeneración, osteoporosis, cáncer, defectos cardiovasculares e inmunológicos, las cuales disminuyen la calidad de vida e incrementan la probabilidad de muerte (Bondy S., 2010; Holliday R., 2007; Campisi J., 2013; Bernis C., 2004; López M., 2012; Rattan S., 2006a).

Estudios demográficos del Consejo Nacional de Población (CONAPO) muestran que la distribución demográfica de la población mexicana cambiará paulatinamente, estimando que en el año 2005 las gráficas poblacionales mostraban una forma piramidal característica de una población joven (**Fig.1a**) las predicciones para el año 2050 (**Fig. 1b**) muestran que esta forma se perderá para adquirir un perfil rectangular voluminoso en la cúspide, propio de poblaciones seniles; este comportamiento se predice por la disminución de la natalidad, así como, por el aumento de la esperanza de vida (Aguila E., 2011; Partida B., 2008). Esto implica que la mayor parte de la población será senil y que debido a las enfermedades crónico-degenerativas asociadas al envejecimiento la calidad de vida poblacional disminuirá, a su vez, el gasto público incrementará, siendo necesario el estudio de las bases moleculares de este proceso, así como, de nuevas terapéuticas.

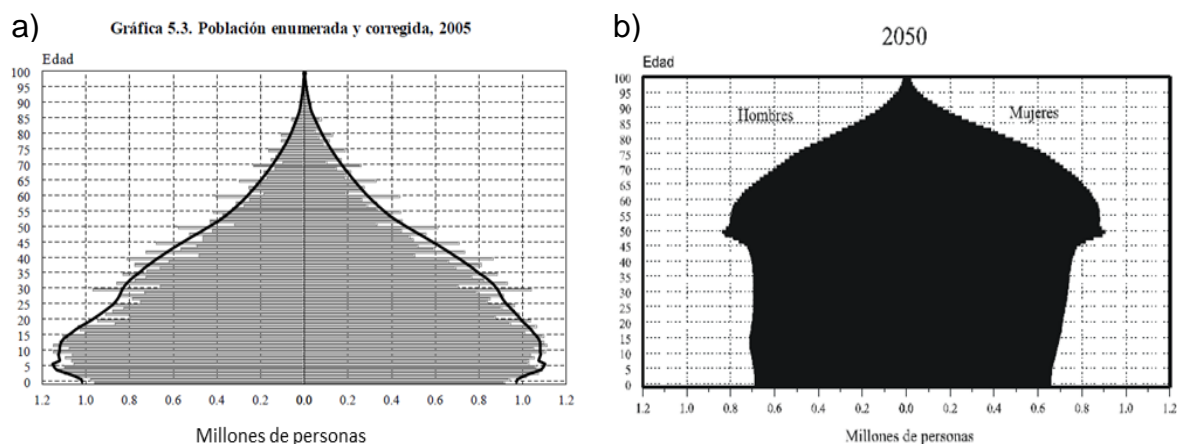


Figura 1. Proyecciones demográficas de la población en México. a) Gráfica de la población del año 2005. b) Gráfica de la estimación poblacional para el año 2050. (Tomado de Partida B., 2008).

2.2. MODELOS DE ENVEJECIMIENTO

El estudio del envejecimiento no puede realizarse en humanos por motivos éticos y prácticos, por lo que se han propuesto y caracterizado diversos modelos celulares: las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*, el gusano *Caenorhabditis elegans*, la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*, ya que poseen características tales como una fácil manipulación genética (**Tabla 2**), mantenimiento de bajo costo, un tiempo de vida relativamente corto respecto al humano y además tienen una alta trazabilidad con el envejecimiento humano.

Tabla 2. Atributos y desventajas de los organismos modelo para el estudio del envejecimiento.

Especie	Levadura	Gusano	Mosca	Roedor	Primate
Tiempo de vida	División/ RLS/ CLS	Semanas	Semanas	Años	Décadas
Manipulación genética fácil	***	***	***	*	--
Costo	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Muy alto
Trazabilidad	*	*	*	**	***

Abreviaturas: RLS: Envejecimiento replicativo, CLS: envejecimiento cronológico. (Tomado y modificado de Wolf N., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el envejecimiento es un proceso conservado que ocurre en todos los organismos; sin embargo, en los últimos veinte años, se ha dilucidado la existencia de genes y vías de señalización ortólogas asociadas a este proceso entre las especies. Los pioneros en este campo fueron Friedman en 1988, Jazwinski en 1996 y 2000, con sus estudios en *C. elegans* y en levaduras, respectivamente, donde demostraron que una sola mutación en un gen podía aumentar la longevidad en dichas especies. Estos experimentos permitieron la identificación y caracterización de las vías de señalización y de los mecanismos genéticos responsables del envejecimiento **(Fig. 2)** (Wolf N., 2009).

Se ha demostrado que las vías de señalización de nutrientes, que son orquestadas por las cinasas serina-treonina; blanco de rapamicina (TOR), proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa B (PKB), tienen un efecto pro envejecimiento y poseen ortólogos en gusanos, moscas, levaduras y mamíferos. Específicamente PKB, regula el tiempo de vida como parte de la vía de señalización insulina/PI3K, que tiene un impacto principalmente en organismos multicelulares: al acoplarse la insulina o el IGF-1 al receptor, PI3K es activada, creando río abajo segundos mensajeros que activan a la cinasa PKB; la disminución de la señalización de la vía Insulina/IGF-1 incrementa el tiempo de vida en gusanos, moscas, levaduras y ratón. La mosca *D. melanogaster* con mutaciones en el receptor de tipo insulina es estéril, mientras que los ratones *knock out* a este receptor muestran alteraciones deficiencias en la reproducción, alteraciones en el crecimiento y en el comportamiento; en *C. elegans* la extensión en el periodo de vida se induce a través de mutaciones en el receptor DAF-2 y en PI3K, lo cual tiene un efecto positivo sobre el factor de transcripción DAF-16, que es un homólogo del factor de transcripción de mamífero, FOXO. Además, la actividad de factores de transcripción que controlan la respuesta al estrés, la supervivencia celular y el metabolismo se encuentran involucrados en la longevidad, encontrándose

altamente conservados entre las especies, en *D. melanogaster*. Por otra parte, la vía PKA, que regula el tamaño celular y la resistencia al estrés oxidante, parece tener una función que se puede sobrelaparse a PKB, ya que también es una cinasa serina-treonina cuya activación es dependiente de glucosa, y análogamente a PKB, la delección de alguno de sus componentes aumenta el período de vida. En levaduras (*S. cerevisiae* y *S. pombe*) el receptor Insulina/IGF-1 se encuentra ausente; sin embargo, poseen receptores acoplados a proteínas G (Gpr1), así como, proteínas G pequeñas (Ras2) que inducen la activación de la vía PKA. En modelos de delección de alguno de estos componentes el período de vida aumenta, de forma contraria a la supresión de estas vías, el aumento de la concentración de glucosa incide en la sobreactivación de éstas; lo que tiene como resultado una disminución en la expresión de factores de respuesta al estrés, así como de proteínas de resistencia al estrés como la super óxido dismutasa (SOD) y las catalasas (que son parte de la maquinaria antioxidante de la célula), así como, de la disminución de proteínas de choque térmico (Hsps) que regulan el plegamiento proteico y la acumulación de glucógeno, incidiendo de forma negativa en el período de vida (**Fig. 2**). (Breitenbach M., 2012; Roux A., 2010). Teniendo como base la alta conservación de los procesos biológicos entre las especies, principalmente de las cinasas de tipo serina-treonina y su papel modulador en la expresión del fenotipo de envejecimiento.

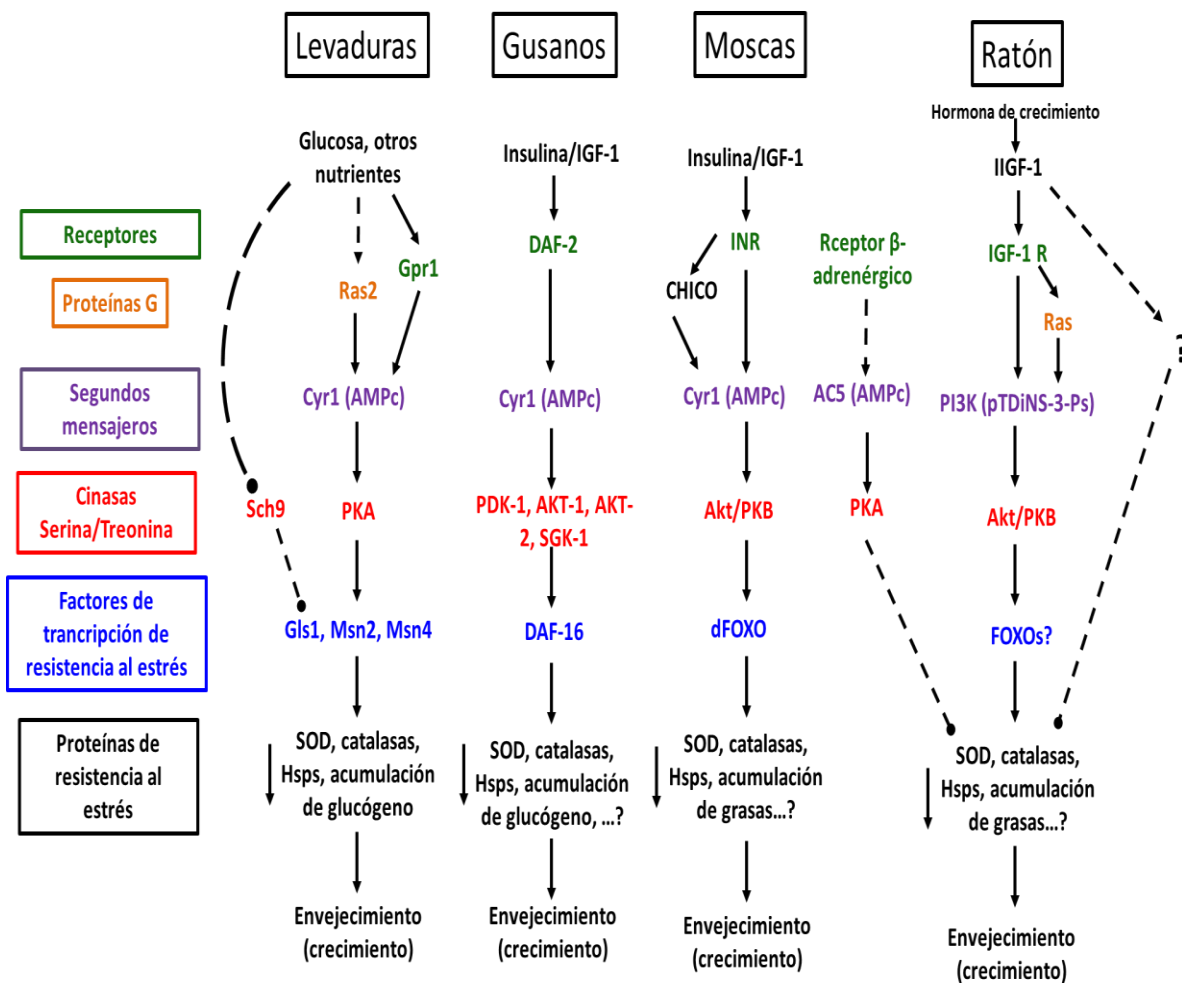


Figura 2. Vía de señalización asociada al envejecimiento en levaduras, gusanos, moscas y ratón. En las levaduras, gusanos y moscas la activación del sensado de nutrientes y crecimiento inhibe la actividad de los factores de transcripción de resistencia al estrés (Gls 1, Msn2/4, DAF-16, dFOXO) y reduce la protección celular y la acumulación de grasa y glucógeno, lo que promueve el envejecimiento. (Tomado y modificado de Breitenbach M., 2012).

2.3. *Schizosaccharomyces pombe* COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO

Por razones históricas la levadura *S. cerevisiae* ha sido el modelo de estudio preferido; sin embargo, después de la secuenciación genómica completa de *S. pombe* en 2001, esta levadura de fisión binaria cobró gran importancia como modelo de estudio de envejecimiento, ya que esto permitió dilucidar sus principales características genéticas y moleculares. Se encontró que tiene un tamaño genómico de 18.8 Mb, 3 cromosomas, centrómeros y maquinaria de ARN de interferencia, los cuales son centrales en procesos de transcripción, traducción,

regulación genética, *splicing* y baja redundancia de proteínas (se infiere por el número ínfimo de genes duplicados), lo anterior explica su alta similitud con eucariotas superiores (Sunnerhagen P., 2006; Mitsuhiro Y., 2003). Debido a que los resultados de la investigación en *S. pombe* son complementarios y brindan mayor información a los obtenidos con *S. cerevisiae* en este trabajo el modelo de estudio seleccionado fue esta levadura de fisión.

S. pombe es un ascomiceto de forma cilíndrica, mide 3-4 μm de diámetro y 7-15 μm de longitud (**Fig. 3**), posee un ciclo eucariota típico con fases discretas G_1 , S, G_2 y M, se divide por fisión binaria con un tiempo de generación de 2-4 h en un medio rico de nutrientes como el extracto de levadura (YE), dichas características permiten equiparar su ciclo de división a la mitosis de las células somáticas de eucariotas superiores (Richard E., 2004; Jan A., 2010; Sunnerhagen P., 2006; Mitsuhiro Y., 2003; Lin S., 2014).

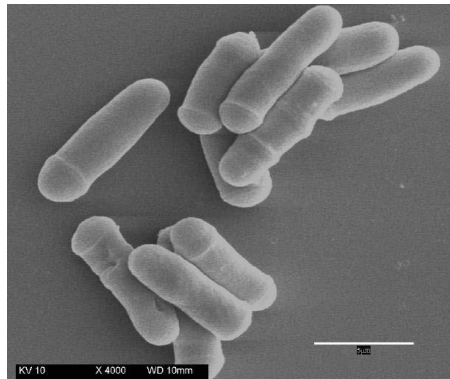


Figura 3. Micrografía de *Schizosaccharomyces pombe*. (Tomado de Aliqué R., 2011).

El envejecimiento en levaduras puede estudiarse a través de dos paradigmas, uno de ellos es el envejecimiento replicativo (RLS), en el cual se cuantifica al número de células hijas que puede tener una célula hasta antes de su muerte y cuyos resultados se equiparan a las células germinales (**Fig. 4a**). El segundo modelo es el envejecimiento cronológico (CLS), en el cual se cultiva a *S. pombe* en el medio YE hasta alcanzar una densidad óptica de 1 (DO medida a 600 nm), momento en el que la población celular entra a una fase estacionaria y se cambia a un medio bajo en glucosa (restricción calórica) o agua (restricción

calórica extrema), a partir de este tiempo (T_1) se cuantifica el tiempo en el que la población sobrevive en esta fase (T_4) (**Fig. 4b**). Los cambios bioquímicos y celulares de la levadura son similares al fenotipo de envejecimiento de las células somáticas de eucariotas superiores como arresto celular, tamaño celular aumentado o heterogéneo, alteraciones cromosómicas, así como una disminución en la dinámica de la actina que se ve reflejada en la pérdida de la integridad de la pared celular (Kaeberlein M., 2007; Roux A., 2010; Roux A., 2006; Santos J., 2012; Zuin A., 2010).

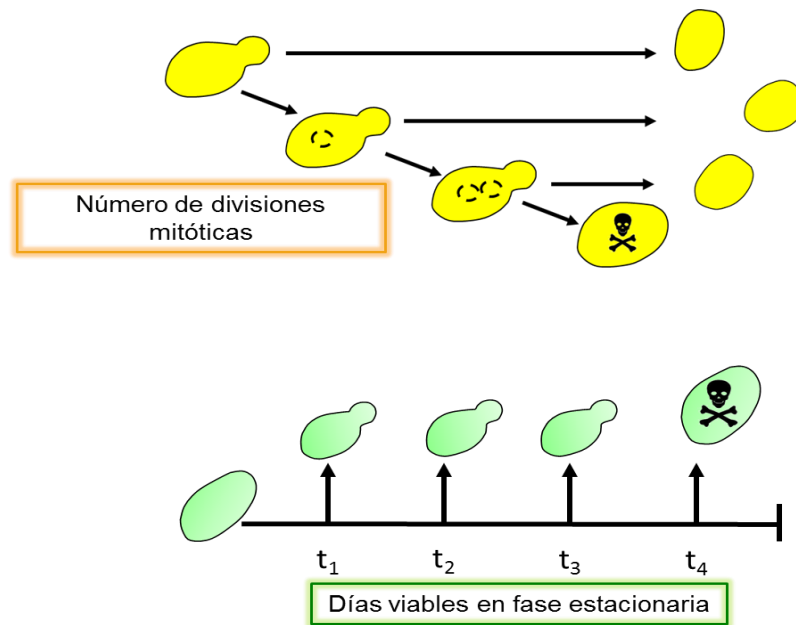


Figura 4. Paradigmas de estudio del envejecimiento en levaduras. a) Tiempo de vida replicativo, cuantifica el número de divisiones mitóticas que puede tener una célula hasta antes de su muerte, comparable con células germinales. b) Envejecimiento cronológico, se cuantifica el número de días viables de una célula en fase estacionaria hasta su muerte, equiparable a células somáticas. (Tomado y modificado de Kaeberlein M., 2007).

Uno de los hallazgos más importantes en el estudio del CLS es que concentraciones altas de glucosa (2%) en el medio de cultivo, sobre activan la vía AMPc/PKA, la cual está directamente relacionada con el control del crecimiento, proliferación, metabolismo, resistencia al estrés y con la longevidad (**Fig. 5**); para la activación de esta vía se necesita el sensado de las concentraciones de glucosa por medio de los receptores Gir3 y su subsecuente activación de Cyr1 homólogo a AMP_c, aunado a la estimulación de las proteínas Ras que promueve la disociación

de las subunidades regulatorias de PKA de sus subunidades catalíticas y con ello la inducción de factores de transcripción como Msn2/4 que regulan la expresión de la SOD, que tiene actividad en la mitocondria que cataliza la conversión del anión superóxido (O_2^-) en oxígeno (O_2) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por lo tanto, al disminuir su expresión y por ello su actividad, hay un aumento de ROS. Las ROS modifican el potencial de la membrana mitocondrial, lo que conlleva a la liberación tanto del citocromo C como de las mismas ROS, desencadenando la apoptosis y la oxidación de proteínas y material genético, lipoperoxidación y la inducción de especies reactivas de nitrógeno, induciendo posteriormente nitración de proteínas (Roux A., 2006; Roux A., 2009., Roux A., 2010; Santos J., 2012; Su-Ju L., 2013; Nikolettou V., 2014; Kaeberlein M. 2007; Fabrizio P., 2008)

Sck2 regula la supervivencia y el crecimiento celular a través de la fosforilación de diversas proteínas, por ejemplo, en eucariotas superiores la proteína Bad cuando es fosforilada por PKB es inactivada, inhibiendo con esto la muerte y promoviendo el crecimiento (Roux A., 2006; Nikolettou V., 2014)(**Fig. 5**). En levaduras esta vía se encuentra relacionada con la resistencia de la célula al estrés oxidante, donde su sobreactivación disminuye la vía Cek1/Gis1, que a su vez regula a la super óxido dismutasa (SOD) (Roux A., 2006; Roux A., 2010; Santos J., 2012; Su-Ju L., 2013; Nikolettou V., 2014; Kaeberlein M. 2007; Fabrizio P., 2008).

TOR es otra vía de señalización ortóloga a mamíferos, la cual se encuentra compuesta del complejo TOR1 y TOR2, el primero promueve el crecimiento y supervivencia celular a través de la estimulación del metabolismo, otra es la represión de la autofagia a través de la fosforilación de Atg13, con lo que inhibe el reclutamiento de las cinasas del complejo Atg1. La inhibición de TOR por disminución de nutrientes permite la activación de este complejo para dar lugar al sitio pre-autofagosomal (PAS) (**Fig. 5**). Además, TOR también se encuentra implicado en el balance antioxidante ya que modula a Gis1. Por otra parte, el complejo TOR2 regula el citoesqueleto a través de la modulación de las GTPasas

Rho (Roux A., 2006; Roux A., 2010; Santos J., 2012; Su-Ju L., 2013; Nikolettou V., 2014; Kaeberlein M. 2007; Fabrizio P., 2008).

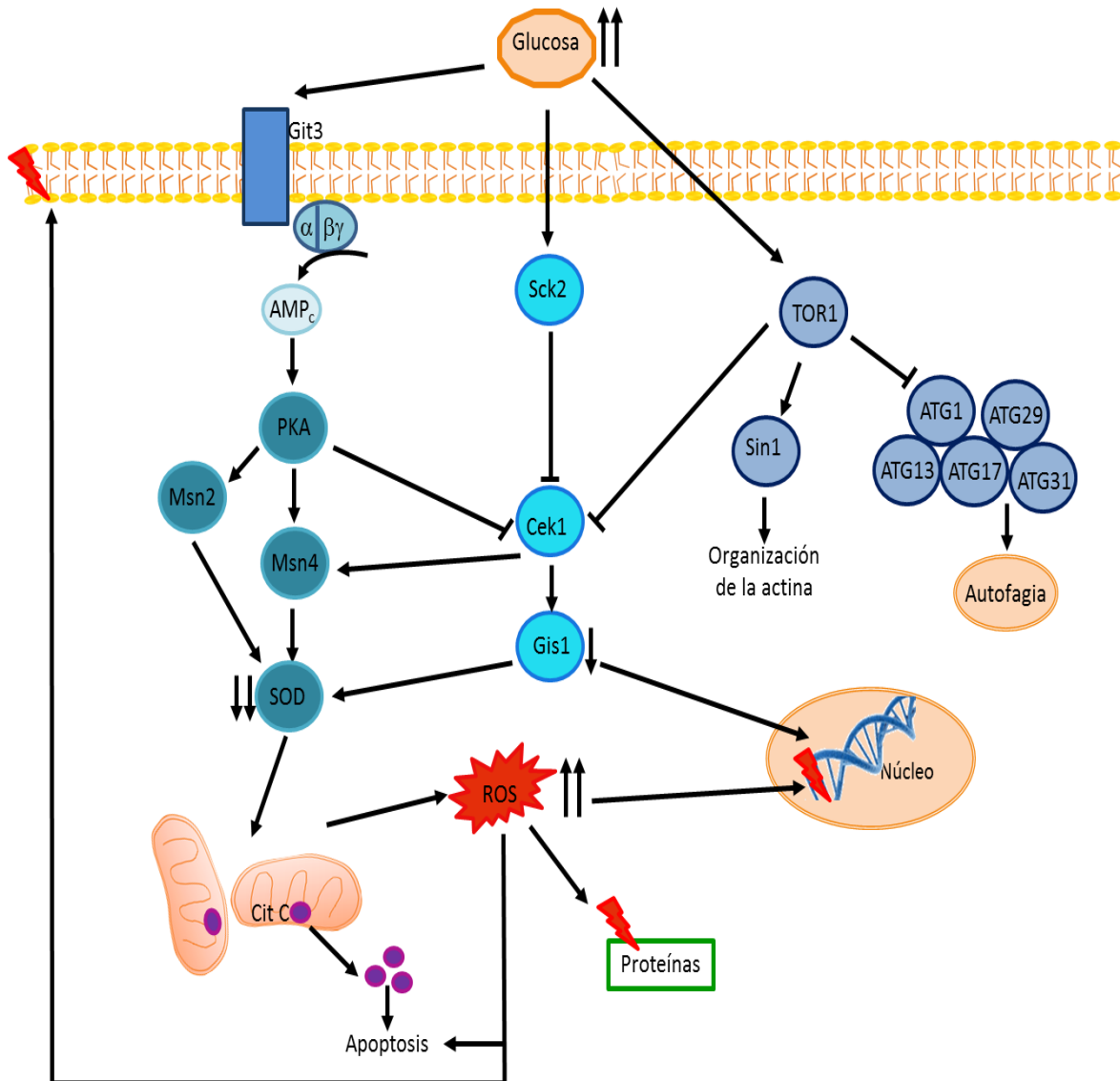


Figura 5. Vías de señalización asociadas al envejecimiento en *S. pombe*. PKA, Sck2 y TOR son vías de sensado de nutrientes tipo cinasas serina-treonina, su sobreactivación induce la disminución de factores de transcripción de respuesta al estrés, lo que inhibe los mecanismos de reparación y mantenimiento celular como la SOD, esta disminución al estrés incrementa las ROS y por lo tanto se induce daño genómico, proteómico y lipídico, derivando en apoptosis.

Debido a la sobreactivación de las vías antes mencionadas hay una acumulación de ROS que es proporcional al tiempo en que las células se

encuentran en fase estacionaria; al cuantificar las ROS se ha encontrado que al día 6^o ±1 del CLS, al menos el 30% de la población celular es positiva al fluoróforo de radicales libres CDHR123 (**Figura 6a**), lo cual indica su acumulación durante la fase estacionaria, este porcentaje al 10^o día se encuentra en el 50% de las células y al día 28 toda la población es positiva a este proceso. A la par se ha encontrado que la disminución de la viabilidad celular tiene un comportamiento similar, es decir, entre más tiempo lleve el cultivo en la fase estacionaria hay una disminución en el porcentaje de células vivas (**Figura 6b**), la viabilidad se ha evaluado a través de la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) y a través de la cuantificación de las células negativas al colorante Floxina B, pudiéndose observar que las levaduras positivas a dicho colorante fluorescente ya no son viables (**Figura 6c**), ya que este es tomado pasivamente por las células, metabolizado y desechado por las células viables, y no así por las no viables. Teniendo en cuenta las curvas de ROS y viabilidad, en este trabajo se analizará el CLS al 5^o día de envejecimiento. (Roux A., 2006; Santos J., 2012; Lin, S., 2014; Breitenbach M., 2012; Johnson B., 1999; Roux A., 2009; Fabrizio P., 2008). Además de la anterior evidencia, la sobreactivación de las vías de sensado de nutrientes: Pka1, Sck2 y TOR disminuye los procesos de supervivencia y reparación celular como la autofagia, así como la disminución de la biogénesis de ribosomas y la iniciación de la traducción, daño en el ADN; la implicación de estas vías se ha demostrado a través de la aplicación del CLS a *knock outs* y dobles *knock out* de éstas, demostrándose que la ausencia de su señalización incrementa la longevidad de *S. pombe*, así como el fenotipo de envejecimiento es retrasado o disminuído. Todos los procesos antes mencionados, además de las vías río arriba, convergen en una vía río abajo, la apoptosis, la cual se describirá a detalle en la siguiente sección y es el punto final en el proceso de envejecimiento (Lu B., 2012)

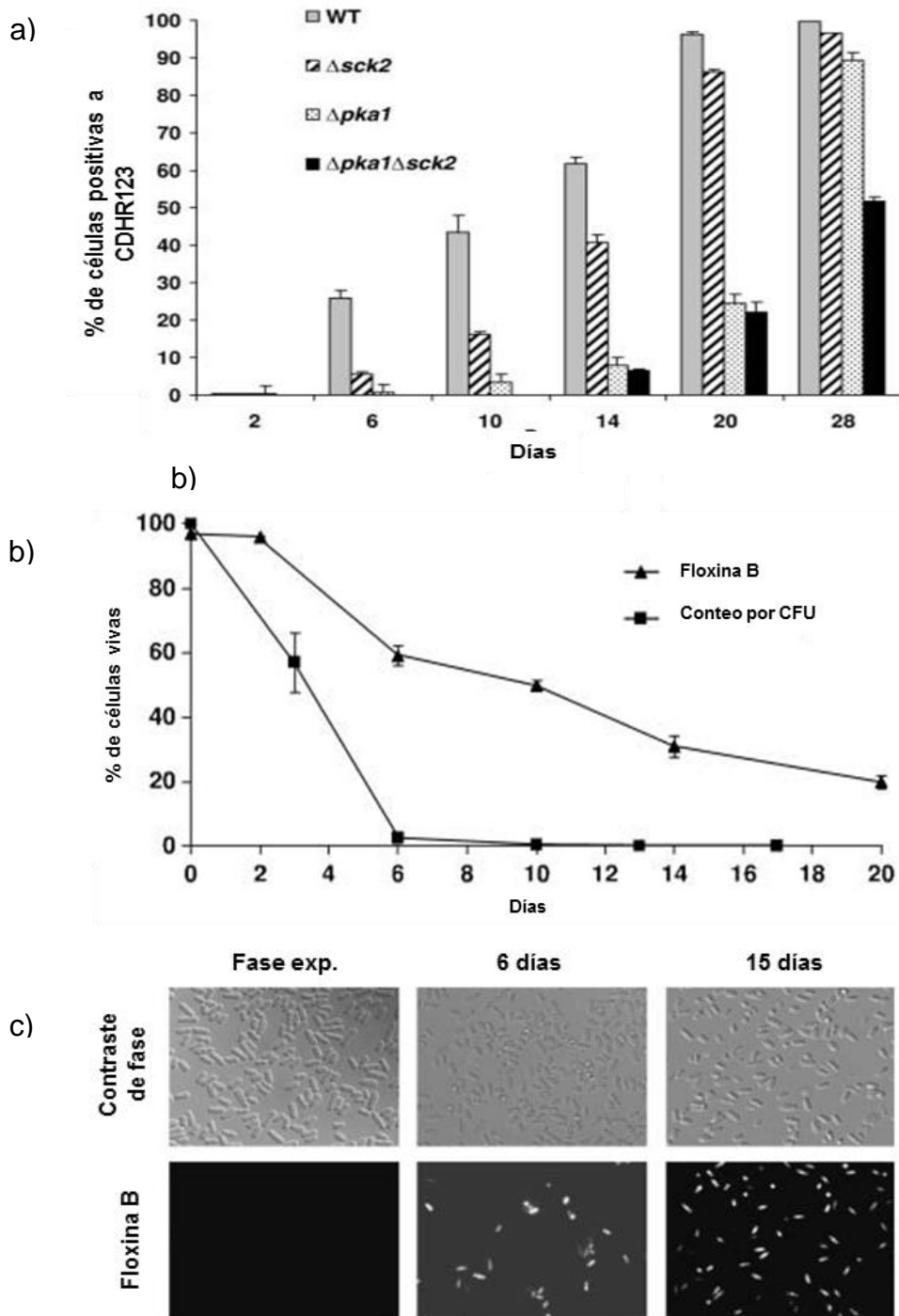


Figura 6. Procesos implicados en el CLS. a) Gráfica del porcentaje de células vivas utilizando el método de Floxina B y UFC para determinar el porcentaje de células vivas. b) Fotomicrografías de células positivas a Floxina B. c) Gráfica del porcentaje de células positivas a DHR123 para determinar el porcentaje de células positivas a ROS, donde WT es la cepa silvestre de *S. pombe*, $\Delta sck2$ knock out a la vía sk2 ortóloga a Pkb en mamíferos, $\Delta pka1$ knock out a la vía Pka ortóloga a Pka en mamíferos, $\Delta sck2 \Delta pka1$ doble knock out..(Tomado y modificado de Roux A., 2006).

tejido o en una colonia, así como la eliminación de células dañadas. En 1963, Lockshin introdujo el término Muerte Celular Programada para definir el proceso de autodestrucción celular en forma programada y controlada. Cabe destacar que hay muchas formas en que la muerte celular puede llevarse a cabo, pero como se observa en la **(Fig. 5)** en el proceso de envejecimiento la muerte celular por apoptosis es la que se desencadena por el desbalance de las vías de sensado de nutrientes.

La palabra apoptosis fue propuesta por Kerr en 1972, la cual se define como un programa de suicidio celular orquestado por zimógenos (caspasas y metacaspasas), proteínas de la familia Bcl-2 y la mitocondria. Las células en apoptosis presentan marcadores morfológicos y bioquímicos característicos de este proceso, los cuales son: formación de cuerpos apoptóticos, contracción celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación de ADN (cariorraxis), disminución del potencial de la membrana interna de la mitocondria, anclaje selectivo a proteínas para el desmantelamiento celular y la translocación de fosfatidilserina de la membrana intracelular hacia la membrana extracelular (Lamkanfi M., 2010; Frohlich K., 2007; Fleury C., 2002).

La maquinaria celular apoptótica de eucariotas superiores depende de una familia de proteasas llamada caspasas, que tiene una cisteína en su sitio activo y se ancla a sus proteínas objetivo a través de ácidos aspárticos específicos. Estas proteínas son sintetizadas como zimógenos, es decir, como precursores inactivos o procaspasas, las cuales son activadas por anclajes proteolíticos; estos ocurren en uno o dos ácidos aspárticos específicos y esta reacción es catalizada por otra caspasa (previamente activada), este proceso sucede debido a que las procaspasas forman un heterodímero, para posteriormente formar un tetrámero, una vez activas (caspasas iniciadoras) activan a otras procaspasas (caspasas ejecutoras) **(Tabla 3)**, las cuales se anclan a sustratos específicos clave para el desmantelamiento celular, tales como proteínas cinasas, proteínas de trasducción de señales, proteínas del citoesqueleto y la matriz nuclear, enzimas modificadoras

de cromatina, proteínas de reparación de ADN y las subunidades inhibitorias de ciertas endonucleasas; esta cascada proteolítica amplificada es irreversible. Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio CARD, que les permite su ensamblaje a través de proteínas adaptadoras, formando complejos de activación después del sensado de estímulos internos o externos desencadenantes de la PCD, derivando en la activación de las caspasas ejecutoras. Sin embargo, a pesar de que las caspasas son parte fundamental en la apoptosis, existen otros reguladores cruciales en este proceso (Alberts B., 2007; Mazzoni C., 2008; Elmore S., 2007; Rastogi R., 2009).

Tabla 3. Clasificación de caspasas de acuerdo a su función.

Tipo de caspasas	Número designado
Iniciadoras	2, 8, 9 y 10
Ejecutoras	3, 6 y 7

La apoptosis puede ser activada por estímulos internos o externos, dependiendo de estos se activa la vía intrínseca o extrínseca, respectivamente. En la vía extrínseca (**Fig. 7**) proteínas extracelulares se unen a receptores de muerte de membrana, desencadenando la apoptosis, los ligandos pueden ser Fas/TNF los cuales se unen e inducen un cambio conformacional en el receptor Fas, produciendo que los dominios de muerte en las colas citosólicas de los receptores Fas recluten proteínas adaptadoras intracelulares, que a su vez, reclutan a las procaspasas 8, 10 o ambas, formando al complejo de señalización inductor de muerte (DISC), posteriormente activando por las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 (Alberts B., 2007; Mazzoni C., 2008; Elmore S., 2007; Rastogi R., 2009).

Por otra parte la vía intrínseca de muerte celular (**Fig. 7**), a su vez conocida como muerte mitocondrial, es un programa activado intracelularmente debido al daño irreversible de ADN, falta de oxígeno o de nutrientes, así como exposición a estrés. La activación de esta vía, deriva en la liberación de proteínas intra mitocondriales al citoplasma celular, siendo el citocromo C la proteína principal. El

citocromo C es un componente soluble de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que al ser liberado al citosol se une a Apaf1, con ello Apaf1 se oligomeriza en un reclutador de la procaspasa 9 que es activada por proximidad en el apoptosoma (Alberts B., 2007; Mazzoni C., 2008; Elmore S., 2007; Rastogi R., 2009).

La activación proteolítica de caspasas es irreversible, por lo tanto debe ser finamente regulada para asegurar que las células no mueran cuando aún son viables; uno de los componentes de dicha regulación se lleva a cabo por las proteínas Bcl-2; además en algunas células, el programa de muerte extrínseco debe reclutar a la maquinaria de la vía intrínseca para amplificar la señal apoptótica y es realizado a través de estas. Las proteínas Bcl2 (**Fig. 8**) regulan la vía intrínseca controlando la liberación de citocromo C y otras proteínas mitocondriales, debido a que algunas de ellas tienen funciones pro apoptóticas promoviendo la liberación de los componentes mencionados, y otras inhiben el proceso (Alberts B., 2007; Mazzoni C., 2008; Elmore S., 2007; Rastogi R., 2009).

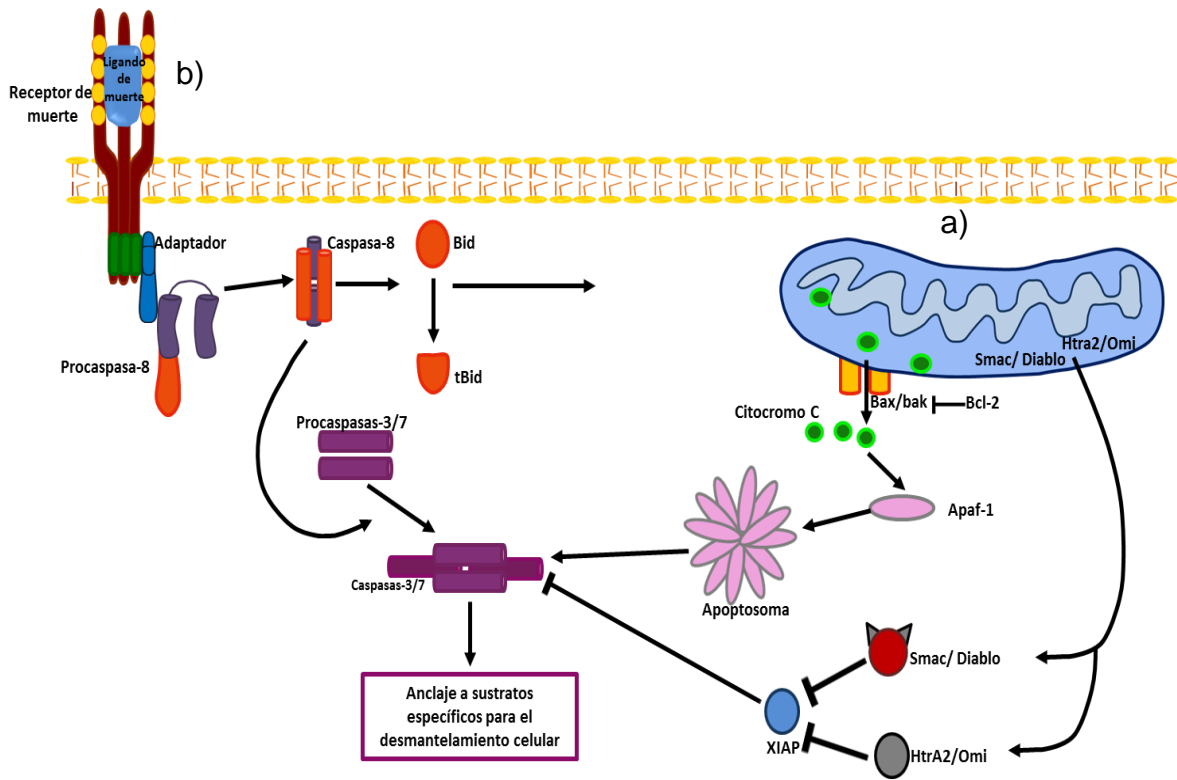


Figura 7. Apoptosis en eucariotas superiores. a) Vía intrínseca. b) Vía extrínseca. (Tomado y modificado de Lamkanfi M., 2010)

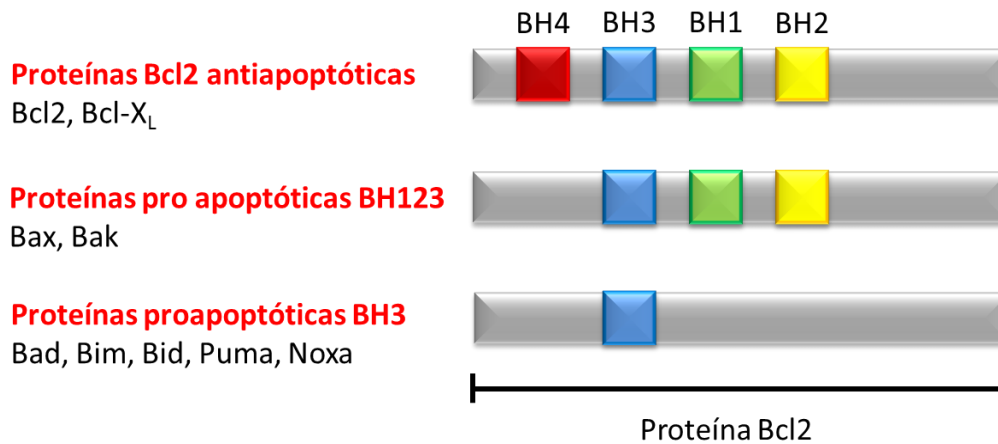


Figura 8. Clasificación de las proteínas Bcl2. Los tres tipos de Bcl2 comparten el dominio BH3, el cual media todas las interacciones entre las proteínas pro y anti apoptóticas, estas interacciones son de suma importancia ya que todos los miembros de las proteínas Bcl2 pueden interactuar formando heterodímeros inhibiendo sus funciones. (Tomado y modificado de Alberts, 2009)

Las proteínas anti apoptóticas Bcl2 y Bcl-X_L se encuentran localizadas en la superficie citosólica de la membrana externa mitocondrial, en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear, donde su función es preservar la integridad de la membrana, previniendo la liberación indebida de proteínas intermembranales, como el citocromo c o Smac/Diablo. El mecanismo por el cual esta inhibición ocurre, se debe a su dominio BH3, que les permite interactuar con las proteínas Bak, inhibiendo su oligomerización con Bax y la formación de poros en la mitocondria. Por otra parte, las proteínas BH123 son activadas por estímulos internos y forman poros mitocondriales, en mamíferos Bak se encuentra fuertemente unida a la membrana mitocondrial, inclusive en la ausencia de una señal apoptótica, mientras que Bax se encuentra principalmente localizada en el citosol y se transloca a la mitocondria después de la señal de muerte. Las proteínas BH3 estimulan la apoptosis inhibiendo a las proteínas de tipo Bcl2, permitiendo la actividad de las BH123 (Fleury C., 2002; Cooper D., 2012; Váchoá L, 2006).

Otras de las proteínas reguladoras de la vía apoptótica son las IAP las cuales fueron identificadas en ciertos virus de insectos (Baculovirus), y actúan inhibiendo la activación de la apoptosis de una célula hospedera infectada. Las IAP poseen uno o más dominios BIR, que les permite unirse e inhibir caspasas activas, aunque también algunas IAP tienen como función poliubiquitinar a las caspasas. En mamíferos hay dos genes que inhiben a las IAP, llamados Smac/Diablo y Omi (Alberts B., 2007; Mazzoni C., 2008; Elmore S., 2007; Rastogi R., 2009).

El estudio de la apoptosis en humanos es difícil debido a la complejidad de los componentes del programa de muerte, es por ello que en 1997 Ink B. desarrolló el sistema de doble híbrido para el estudio de la cascada apoptótica, ya que se pensaba que los organismos unicelulares no podían poseer la maquinaria de PCD, porque significaría que el organismo orquestaría su suicidio. Sin embargo, se encontró que en la levadura de fisión *S. pombe* la expresión de las

proteínas Bax y Bak inducía la condensación de la cromatina así como el anclaje al ADN (**Fig. 9**). Otro estudio con *S. cerevisiae* por Xu en 1999 mostró que al expresar a la proteína Bax se induce la condensación de la cromatina. Estos estudios demostraron que las levaduras, así como los mamíferos, pueden pasar por este proceso, otras investigaciones mostraron que las levaduras poseen una maquinaria apoptótica ortóloga de mamíferos. Sin embargo, los zimógenos principales en la apoptosis son las caspasas, las cuales no se encuentran en levaduras, pero, poseen un ortólogo, la metacaspasa Pcal, en *S. pombe*. Actualmente, existe evidencia que sugiere que Pcal puede activarse, pero se desconoce si Pcal posee un sustrato río abajo; sin embargo, se ha demostrado que juega un papel importante en la apoptosis, ya que su inducción se encuentra relacionada con los estímulos intrínsecos y externos que estimulan la muerte celular, tales como bajas dosis de H₂O₂ (0.12-180mM), ácido acético, amiodarona, aspirina, NaCl, ácido linoléico (0.05-0,2 mM) y glucosa (>2%) en el medio, así como radiación UV, envejecimiento, alta concentración de feromonas, defectos en los patrones de glicosilación de proteínas, dinámica reducida de la actina, estrés hiperosmótico (60% glucosa, 30% sorbitol), y de temperatura. Como en los mamíferos, en las levaduras, la disminución del potencial de la membrana interna de la mitocondria deriva en la liberación de citocromo C el cual se ha correlacionado con la inducción de Pcal y con el aumento de ROS, pero en levaduras la vía intrínseca no se encuentra caracterizada, aunque se ha demostrado que el nivel de proteínas oxidadas incrementa de forma proporcional con la presencia de la metacaspasa. (Fleury C., 2002; Lamkanfi M., 2010; Munoz A., 2012; Cooper D., 2012, Ryser S., 1999; Low C., 2008; Frohlich K., 2007; Mazzoni C., 2008; Buttner S., 2006).



Figura 9. Expresión de la proteína humana Bak en la levadura de visión *S. pombe* induce apoptosis. Las células que expresan a la proteína Bak tienen una pérdida de la integridad de la pared celular que se denota en la intensidad de color azul que se tiñe la pared celular a través de la tinción con calcofluor, se observan cambios en la estructura nuclear a través del cambio de morfología que se hace evidente con el fluoróforo 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) respecto a las levaduras Wildtype (WT) (Tomado y modificado de Ink B., 1997)

A pesar de que un vasto número de estímulos activan la PCD, las células al monitorear alguna(s) señal(es) potencialmente apoptóticas, evitan desencadenar de forma prematura o innecesaria el proceso de apoptosis, logrando esto a través del balance de la maquinaria pro y anti-apoptótica, es decir, la célula sensa que se encuentra bajo estrés (ya sea glucosa 2%, H₂O₂, proteotoxicidad, etc), pero si la dosis se encuentra por debajo de la DL₅₀ se incrementan los niveles de los genes de proteínas anti apoptóticas (por ejemplo SOD). Uno de los procesos activados para el rescate celular es la autofagia, que es una vía de deshecho y reciclamiento de material dañado; sin embargo, tiene un papel dual ya que también es clasificada como el segundo tipo de PCD. Por otro lado, si la célula sensa una dosis \geq DL₅₀, entonces se disminuyen los niveles de los genes anti apoptóticos y se incrementan los pro-apoptóticos. (Portt L., 2011; Carmona D., 2010; Munoz A., 2012; Carmona D., 2014; Buttner S, 2006). Dado que la inducción de la autofagia puede relacionarse con la muerte o supervivencia de la célula, es motivo de nuestra investigación estudiarla, por lo tanto, se describirá brevemente en la siguiente sección.

2.5. AUTOFAGIA

El proceso de autofagia fue definido hace más de cincuenta años en células de mamíferos como un sistema que secuestra componentes citoplasmáticos a través de la formación de una membrana lipídica *de novo* (**Fig. 10**), que posteriormente es trasladada al lisosoma, fusionándose a este, liberando el material secuestrado y degradándolo a través de la maquinaria lisosomal, para después reciclar algunos de los componentes celulares (Nakatogawa H., 2009; Cebollero E., 2009). Existen dos vías de degradación de proteínas: el sistema ubiquitin-proteasoma y la autofagia; mientras que el sistema proteosomal es un fino regulador de los tiempos de vida media de las proteínas, basándose en secuencias señales específicas (por ejemplo el residuo amino terminal), el proceso de autofagia se induce drásticamente en ausencia de nutrientes (TOR), se regula por señales fisiológicas como hormonas, factores de crecimiento e infección, donde los componentes internos de la célula son reorganizados, aunque también ocurre a nivel basal (Takeda K., 2010). La autofagia se ha relacionado con el envejecimiento porque la expresión de las proteínas relacionadas a la autofagia y su actividad disminuye conforme a la edad, por ejemplo en humanos una característica de las células senescentes o envejecidas es la acumulación de proteínas anormales en el citosol como en la enfermedad de Alzheimer y el cáncer (Li-qiang H., 2013; Gelino S., 2012, Kundu M., 2009).

La autofagia es un proceso altamente conservado de degradación y reciclado de proteínas y organelos dañados, dependiendo de la ruta de liberación del cargo se clasifica la autofagia en tres tipos: macroautofagia (a la cual nos referiremos a partir de ahora como autofagia), microautofagia y el transporte del material secuestrado desde citoplasma a vacuola (CVT). La maquinaria celular de este proceso es codificada por la familia de genes relacionados a la Atg (**Fig. 11**), los cuales se encuentran clasificados en cuatro subgrupos, cuyos productos pueden tener funciones en la autofagia, y así como para la vía CVT o la pexofagia (Nakatogawa H., 2009; Kraft C., 2009; Lionaki E., 2013; Mukaiyama H., 2010).

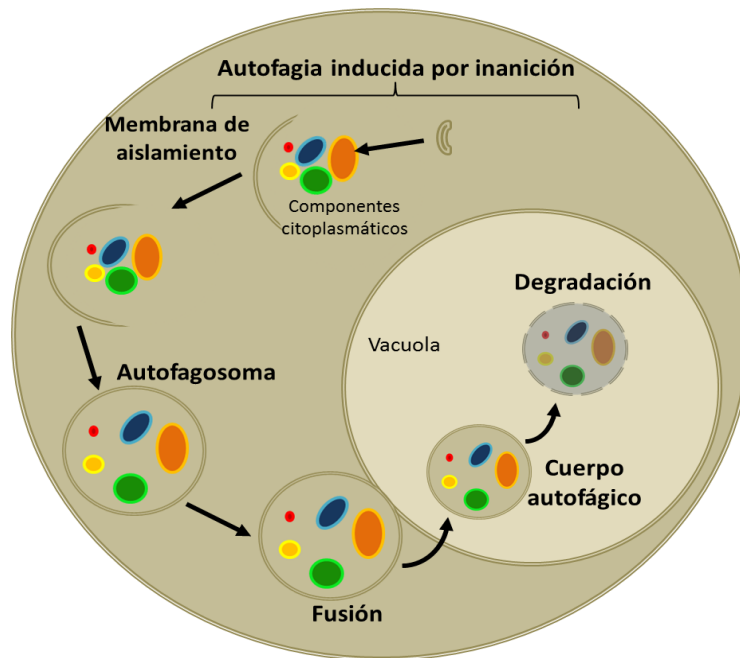


Figura 10. Autofagia en levadura. Primero ocurre el reconocimiento y secuestro de los componentes a degradar, se sintetiza *de novo* de una membrana lipídica (autofagosoma), después se traslada a la vacuola, donde se libera el contenido para su degradación. (Tomado y modificado de Mukaiyama H., 2010).

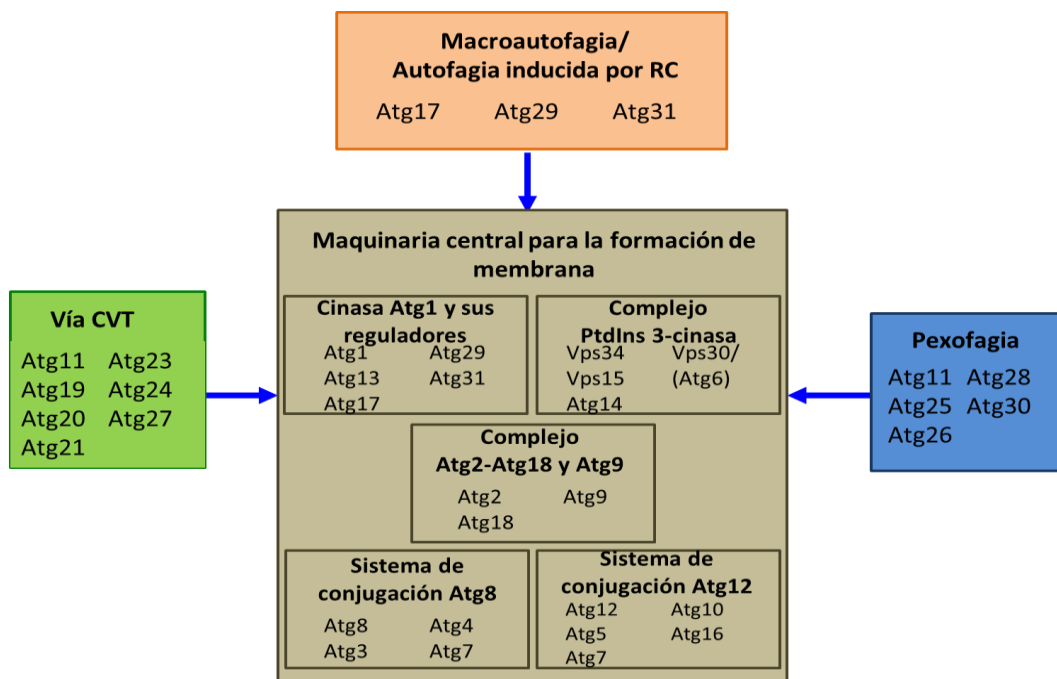
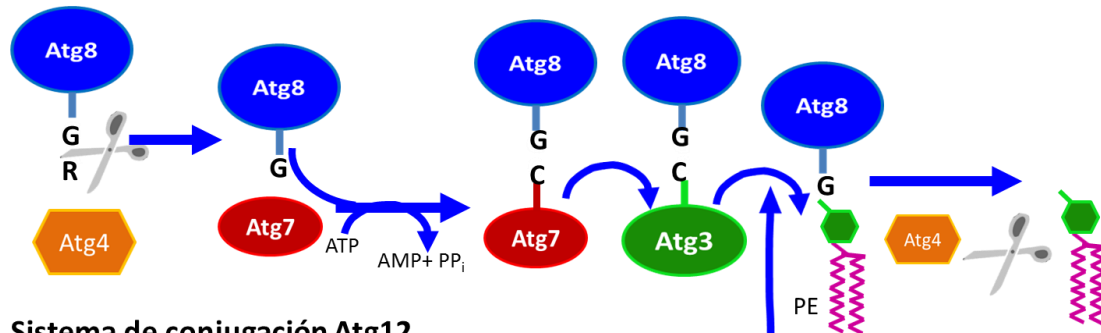


Figura 11. Clasificación de las proteínas Atg. (Tomado y modificado de Mukaiyama H., 2010).

Las proteínas Atg inducidas en respuesta a la restricción calórica (RC) poseen una localización jerárquica, en el primer grupo, la cinasa 1 y sus reguladores especifican el sitio en el cual comenzará la formación *de novo* del autofagosoma, se ha mostrado que *knock outs* a alguna de ellas en levaduras son incapaces de formar el PAS y por lo tanto de eliminar las proteínas de desecho. La vía de regulación de la autofagia es TOR, mantiene hiperfosforilada a la proteína Atg13 y, por lo tanto, impide el reclutamiento de las proteínas iniciadoras del PAS, y consecuentemente la síntesis *de novo* del autofagosoma; sin embargo, en condiciones de RC Atg13 es desfosforilado y el reclutamiento de Atg1 y del complejo Atg29-17-31 es inducido. El grupo de cinasas del complejo fosfoinositol-3-fosfato son necesarias para la producción de fosfatil-dinositol-3-fosfato, del cual se ha sugerido que sirve como molécula reclutadora del complejo Atg18-2. Entre la maquinaria autofagosómica existen dos sistemas de conjugación de proteínas, tipo ubiquitina (Atg8 y Atg12) (**Fig. 12**). Atg8 se conjuga a fosfatidiletanolamina (FE), el cual es el mayor componente de las membranas, esto sugiere que estos sistemas se encuentran relacionados con la síntesis de la membrana del autofagosoma, sin embargo para que la proteína de tipo ubiquitina Atg8 pueda ser conjugada necesita ser activada, para lo cual la proteína Atg4 expone su residuo de glicina, favoreciendo energéticamente como estéricamente las siguientes reacciones. Por otra parte, la proteína Atg12, perteneciente al segundo sistema, no necesita exhibir su residuo de glicina, las proteínas Atg7 y Atg10 forman al complejo Atg12-5, el cual conforma al multicomplejo proteico Atg12-5-16, que es la enzima catabolizadora de la reacción del enlace entre Atg8 y FE. La formación de los complejos At8 y Atg12 juegan parte primordial en la síntesis de la membrana lipídica, ya que modulan el tamaño, la estabilidad y la capacidad de fusión del autofagosoma (Mukaiyama H., 2010; Nakatogawa H., 2009).

Sistema de conjugación Atg8



Sistema de conjugación Atg12

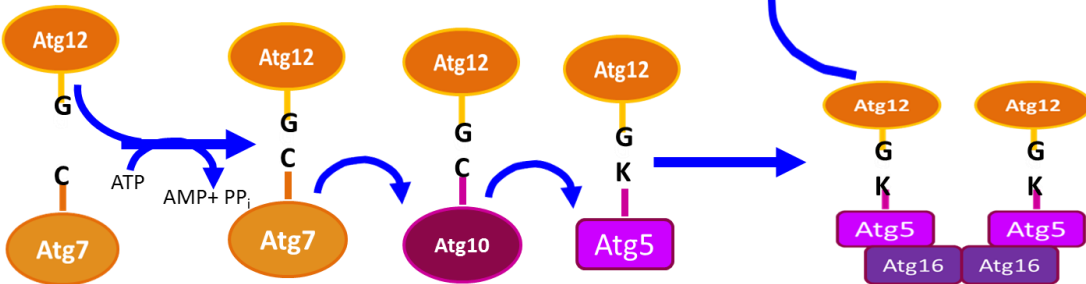


Figura 12. Sistemas tipo ubiquitina de la maquinaria de autofagia. (Tomado y modificado de Mukaiyama H., 2010).

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1. PROTEÍNA V

Una de las más grandes interrogativas para el tratamiento de las enfermedades crónico degenerativas es si existen moléculas capaces de modular las vías de traducción de señales para regular de forma negativa el envejecimiento, ya sea a través de la interferencia de las cinasas serina-treonina, o de la modulación de la apoptosis y la autofagia; sorprendentemente los virus y bacterias tienen como función principal modificar la PCD de su hospedero para facilitar el proceso infecto-contagioso. La apoptosis promueve el desarrollo de una respuesta inmune eficiente contra antígenos virales, debido a que las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas, es por ello que varios virus han

evolucionado para evitar o modular este proceso (Rosas N., 2011; Kaminsky V., 2010; Hay S., 2002).

En el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del ICUAP se ha estudiado el virus de parotiditis (MuV) y se ha mostrado que puede modular la vía del interferón ($IFN\alpha$) y apoptosis, es por ello que el estudio de los componentes de este virus resulta de interés para nuestro grupo de trabajo.

El agente etiológico de la parotiditis es el virus de parotiditis, cuyos tejidos diana son el tracto respiratorio superior e inferior, el tejido linfoide, las glándulas salivares y en la minoría de los casos las meninges, cuyos síntomas son inflamación y dolor. Pertenece al orden de los Mononegavirales, a la familia Paramyxoviridae, subfamilia *Paramyxovirinae* y género *Rubulavirus*, al cual también pertenecen los virus de influenza humana, el virus 5 de simio (SV5), el rubulavirus porcino (LPVM); cuyos viriones tienen sus respectivas propiedades que han sido obtenidas por co-evolución pero a la vez comparten características como la estructura del genoma y la función de las proteínas codificantes, además de la capacidad de la fusión célula-célula (Enders G., 1996). Esencialmente, todos los *Rubulavirus* son virus envueltos con un ARN genómico no segmentado de sentido negativo, con un tamaño aproximado de 15 a 18 Kb, básicamente el material genético codifica para 6 proteínas: proteína de nucleocápside, glicoproteína de fusión, fosfoproteína, glicoproteína de unión o hemaglutinina, las fosfoproteínas P y L. Cabe destacar que el ARN polimerasa viral, no sólo puede expresar proteínas P, sino que también expresan proteínas accesorias como la C y la V, a través de un mecanismo conocido como edición de ARN. Las proteínas accesorias no son esenciales para la replicación viral; sin embargo, tienen la función de contrarrestar las defensas innatas de las células hospedero (Kubota T., 2005; Enders G., 1996)

Se ha demostrado que la proteína V de estos virus tiene como función principal la asociación con proteínas STAT (proteínas que se translocan al núcleo para activar la respuesta antiviral) y con ello evitar su actividad en la vía del $IFN\alpha$, impidiendo que la célula infectada desarrolle un estado celular antiviral mediante el

marcaje con ubiquitina de las STAT para favorecer su degradación por el proteosoma. Las proteínas V de los paramixovirus son identificadas por un dominio C-terminal (CTD) derivado de una sobreposición del marco de lectura que codifica para un dominio rico en cisteína. Este CTD es aproximadamente 50% idéntico en la mayoría de las proteínas V de los paramixovirus (**Fig. 13a**) y contiene siete residuos de cisteínas invariables capaces de unir dos átomos de zinc, los residuos de cisteínas del CTD no son consistentes con dominios de unión a zinc conocidos y no hay homólogos. Específicamente, se ha encontrado que la proteína V de MuV promueve la evasión de la señalización del $INF\alpha$, la inhibición de la apoptosis, altera el ciclo celular y previene la biosíntesis de IFN (Kubota T., 2005; Enders G., 1996; Nishio M., 2005; Li T., 2006; Nishio M., 2002; Ulane C., 2005; Ramachandran A., 2009; Kubota T., 2001, Rosas-Murrieta, 2010).

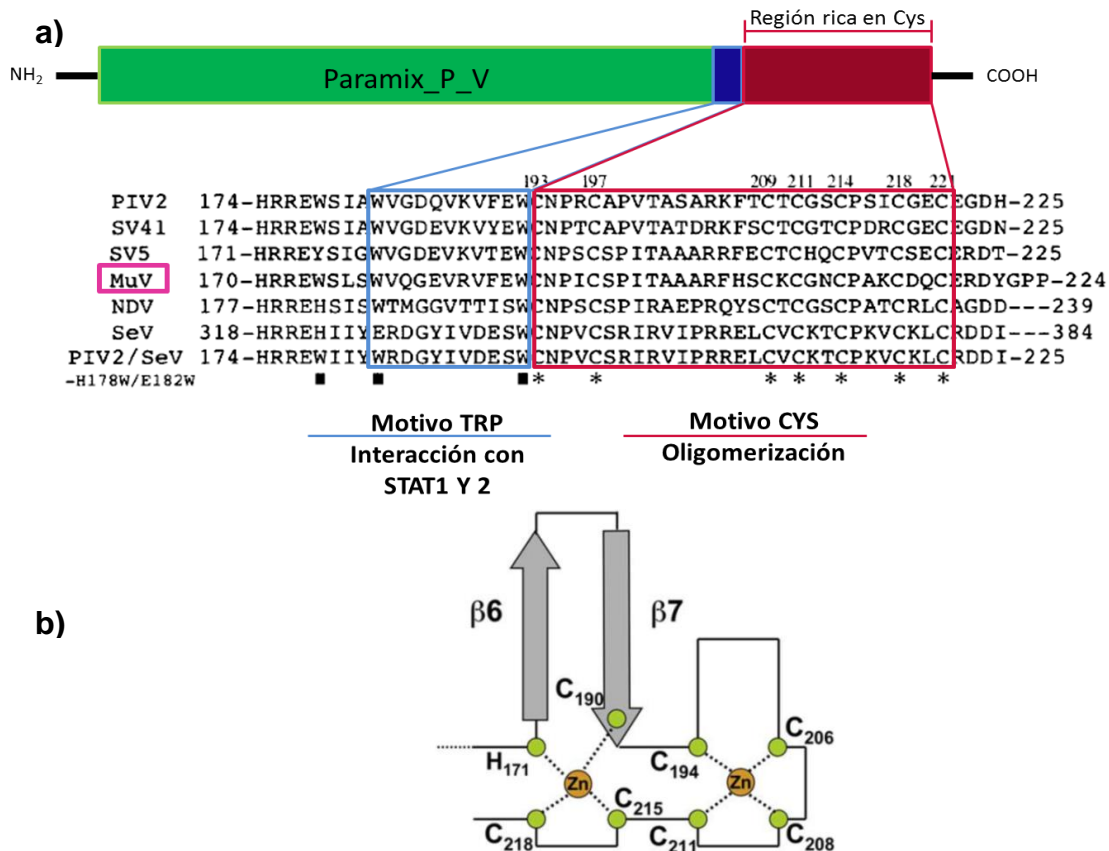


Figura 13. Características estructurales de la proteína V. a) Homología del CTD de las proteínas V de los paramixovirus, está conformado por dos motivos: Trp y Cys b) Plegamiento tipo RING FINGER ZINC de la proteína V de SV5. (Tomado y modificado de Nishio M., 2005; Li T., 2006).

La proteína no estructural V de MuV posee 224 residuos aminoacídicos, donde se distingue un dominio N-terminal de 162 aminoácidos, así como un dominio C-terminal de 62 aminoácidos. El dominio C-terminal contiene dos motivos proteicos (Cys y Trp), los cuales al igual que las otras proteínas V, determinan la actividad anti-IFN, favoreciendo la replicación viral. El motivo Cys (CX₃CX₁₁CXCX₂CX₃CX₂C) contiene 7 residuos de cisteína y una histidina dispuestos en un plegamiento RING FINGER ZINC, dicha disposición puede equipararse a la estructura del motivo Cys de SV5 (**Fig. 13**), guardando una relación estequiométrica 1:2 con el zinc; el plegamiento de este motivo es esencial para el autoensamble del oligómero de la proteína V ya que actúa como sitio de nucleación (conformado por ocho unidades de la proteína V) para la formación de complejos de degradación dependiente de V (VCD), necesarios para la poliubiquitinación y degradación de las STAT; la formación del VCD está incluida en el ensamblaje de la enzima ubiquitin ligasa E3, Roc1, Cul4A y DDB1 (Li T., 2014). La función de su asociación con proteínas STAT es evitar su actividad en la vía del IFN, con ello se impide que la célula infectada desarrolle un estado celular antiviral mediante el marcado de estas proteínas con ubiquitina para favorecer su degradación por el proteosoma. Por otra parte, el segundo motivo (Trp) del dominio C-terminal se encuentra río arriba del motivo Cys y tiene como función determinar la actividad anti-INF de la proteína V, su estructura es (W₅W_{9/19}WCNP₂₂) (**Fig. 13a**), de los cuales los triptófanos W₁₇₄, W₁₇₈ y W₁₈₈ son los que interactúan con STAT1 y STAT2 (Kubota T., 2005; Enders G., 1996; Nishio M., 2005; Li T., 2006; Nishio M., 2002; Ulane C., 2005; Ramachandran A., 2009; Kubota T., 2001).

Rosas-Murrieta en 2011 estudió la relación entre la proteína V y la apoptosis inducida por IFN. Donde en células de adenocarcinoma se expresó a la proteína V y 36 h después de la transfección, se trataron con INF. Se evaluó el efecto de la proteína V sobre la actividad de la caspasa 8 (**Fig. 14a**), donde se detectó una actividad ínfima, en un sistema sin transfección ni INF, mientras que en un sistema con IFN la actividad enzimática incrementa en 2400% y en células

transfectadas más IFN la actividad es de un 73%, lo cual sugiere que la proteína V tiene un efecto inhibitorio en la actividad enzimática de la caspasa 8. La caspasa 9 (**Fig. 14b**), junto con la caspasa 8, activan a las caspasas efectoras 3 y 7, por lo cual, también se cuantificó su actividad; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con IFN e IFN transfectado. Por otra parte, al realizar la cuantificación de la actividad enzimática de las caspasas 3 y 7, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 14c**), pero sí una inhibición parcial de éstas. A pesar de que los niveles de actividad de las caspasas efectoras no fueron abatidos como con caspasa 8, al analizar uno de los marcadores de apoptosis (fragmentación de ADN) a través de la técnica de marcación de extremos rotos de ADN por la transferasa terminal y dUTP (TUNEL), se encontró que las células que expresaban la proteína V tenían una disminución del 85-87% en la fragmentación de ADN, respecto a las células sin transfectar con IFN. Esta evidencia sugiere la proteína V de MuV puede modular tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis, por ello se evaluará su efecto sobre la apoptosis en un modelo de envejecimiento en *S. pombe*.

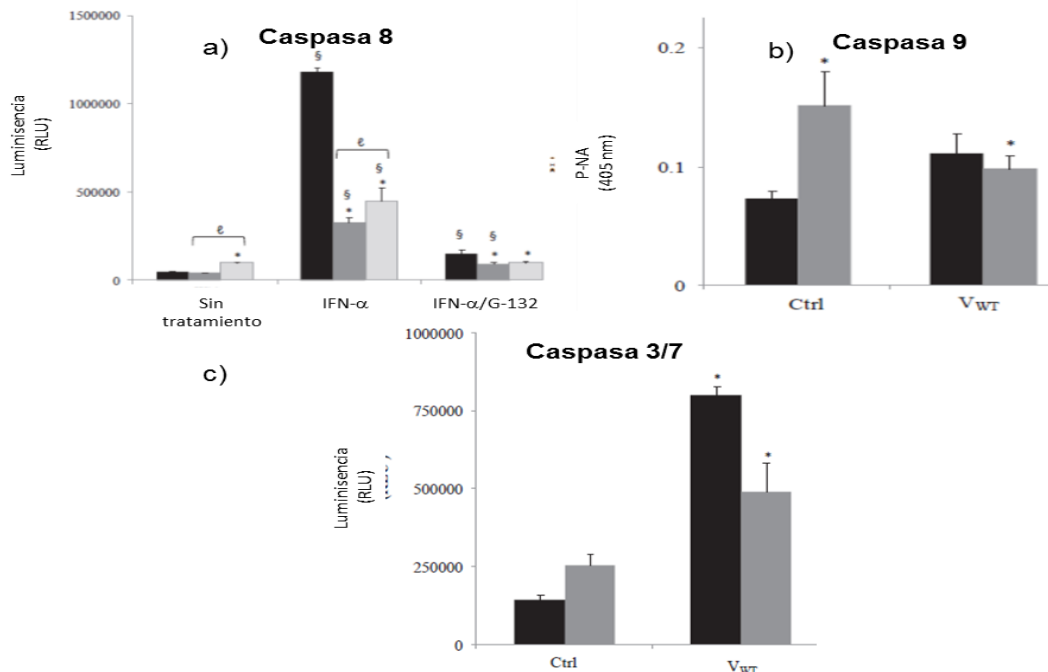


Figura 14. Disminución de los niveles de caspasa 8 (a), 9 (b) y 3/7 (c). Células de adenocarcinoma sin transfectar (Sin tratamiento y Ctrl), transfectadas con la proteína V y transfectadas con IFN. (Tomado y modificado de Rosas-Murrieta N., 2011).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce si la proteína V podría ser un estimulador negativo de la cascada apoptótica y de la maquinaria de autofagia en el CLS de *S. pombe*.

5. JUSTIFICACIÓN

Para el año 2050 la mayor parte de la población en México será senil debido a enfermedades crónico- degenerativas asociadas al envejecimiento, por lo que su calidad de vida disminuirá y a su vez el gasto público incrementará, haciéndose necesario el estudio de las bases moleculares de este proceso y la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, tales como moléculas que regulen a dicho proceso constituyendo un ejemplo de ellas la proteína V de MuV cuya actividad moduladora sobre la vía apoptótica activada por IFN ha sido demostrada en un sistema de células de adenocarcinoma de cérvix, pero se desconoce el potencial efecto que tendría sobre la muerte celular por apoptosis y las vías de rescate celular, como la autofagia, en el modelo de envejecimiento cronológico de *S. pombe*. La información derivada del presente proyecto podría ser extrapolada a organismos eucariotas superiores, como el humano, como posible adyuvante en el tratamiento en enfermedades crónico-degenerativas asociadas al envejecimiento.

6. HIPÓTESIS

La expresión de la proteína V durante el envejecimiento cronológico en *S. pombe*, tiene un efecto negativo en la cascada apoptótica y la autofagia.

6.1. HIPÓTESIS NULA

La expresión de la proteína V durante el envejecimiento cronológico en *S. pombe*, tiene un efecto positivo en la cascada apoptótica y la autofagia.

7. OBJETIVOS

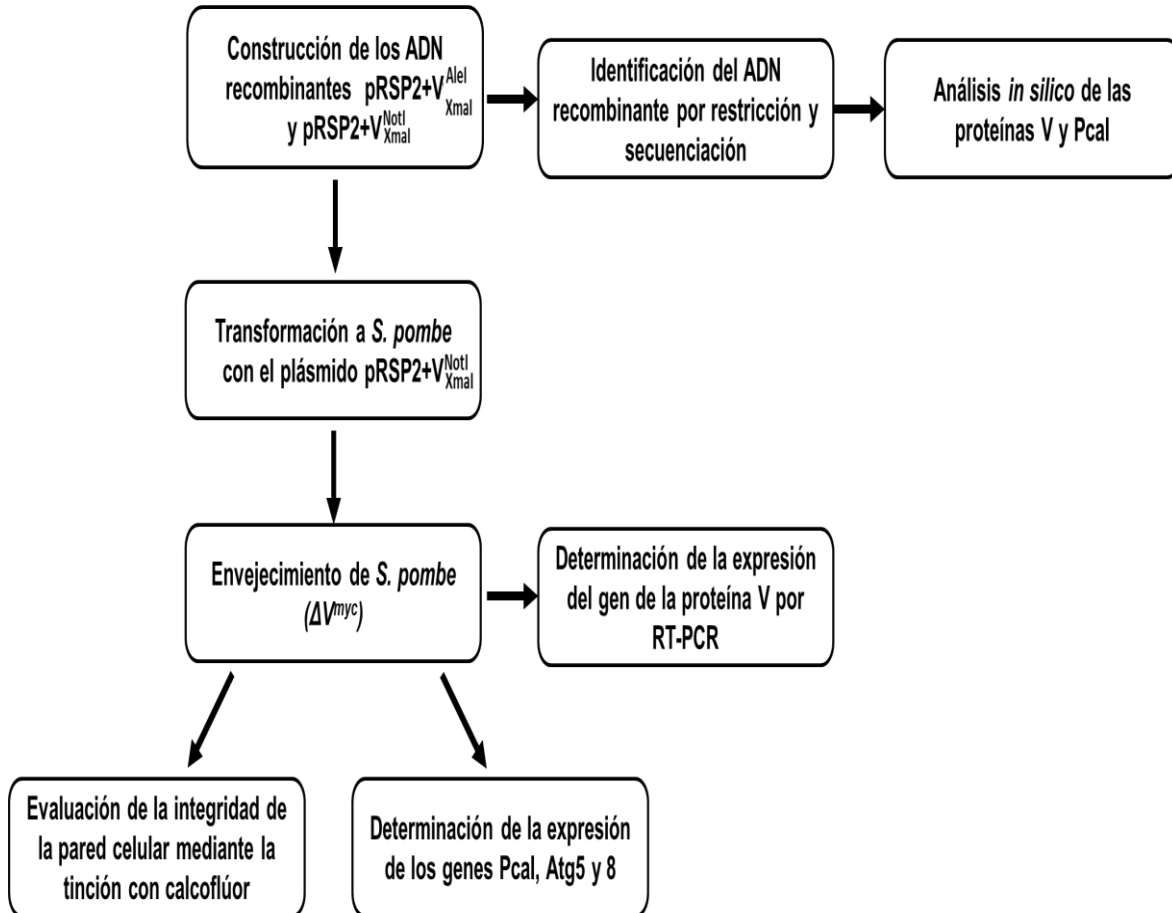
7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar un sistema de expresión de la proteína V con actividad antiapoptótica en un modelo de envejecimiento con *S. pombe*.

7.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción de dos vectores recombinantes que expresen el gen de la proteína V con un motivo de 6 histidinas y la etiqueta c-myc en el extremo N-terminal.
2. Verificar la obtención del ADN recombinante por restricción y secuenciación.
3. Transformar a *S. pombe* con los vectores recombinantes y verificar la expresión de ARNm de la proteína V.
4. Evaluar el efecto antiapoptótico de la proteína V en cultivos envejecidos de 5 días de *S. pombe* a través de la integridad de la pared celular.
5. Evaluar el efecto antiapoptótico de la proteína V en cultivos envejecidos de 5 días de *S. pombe* por medio de la amplificación de ARNm por RT-PCR de Pcal.
6. Evaluar el efecto sobre la autofagia de la proteína V en cultivos envejecidos de 5 días de *S. pombe* por medio de la amplificación de ARNm por RT-PCR de los genes de autofagia, Atg5 y Atg8.
7. Análisis *in silico* de la estructura terciaria del ORF del ADN recombinante.
8. Análisis de interacciones moleculares de la Pcal y la proteína V.

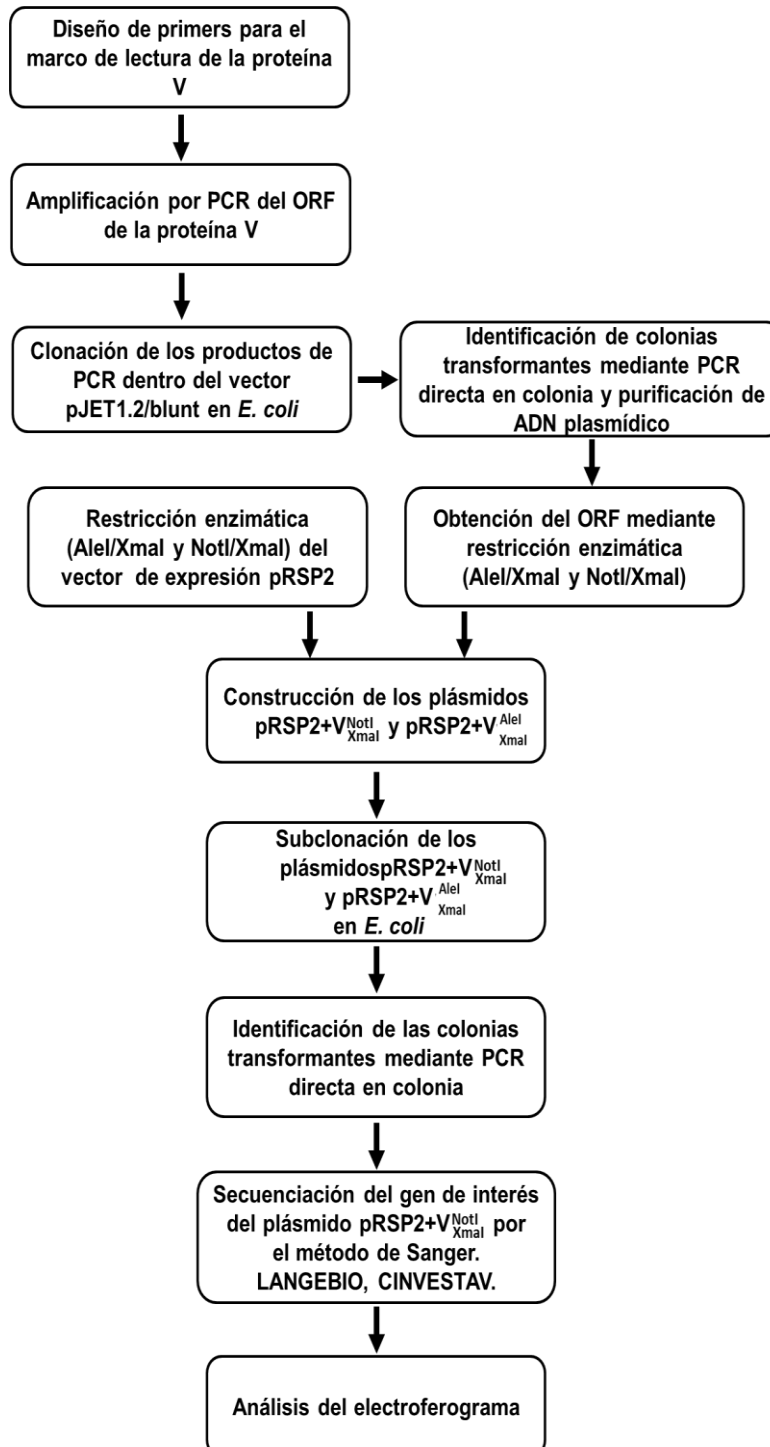
8. DIAGRAMA DE TRABAJO



9. METODOLOGÍA

9.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS ADN RECOMBINANTES

Para la construcción de los ADN recombinantes se siguió el siguiente esquema de trabajo.



9.1.1. DISEÑO DE PRIMERS PARA EL ORF DE LA PROTEÍNA V

Para el diseño de los primers se utilizó la herramienta OligoAnalyzer3 (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), se diseñaron dos primers sentido y un antisentido para la amplificación del gen de la proteína V. Los primers sentido se marcaron con la secuencia nucleotídica de las etiquetas, 6 histidinas y c-myc (las cuales se utilizarán para la detección de la proteína por medio de Western Blot), así como, con sitios de restricción para enzimas AleI y NotI, respectivamente. El primer antisentido se diseñó con una secuencia de restricción para la enzima XmaI.

9.1.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF DE LA PROTEÍNA V

La amplificación por PCR de la secuencia nucleotídica del gen que codifica a la proteína V se realizó a partir del vector pCMV-Mat-FLAG, se utilizaron los reactivos de la tabla 4 y se siguieron las condiciones de reacción de la tabla 5.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación del ORF de la proteína V por PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 5x Phusion HF	2
DMSO	0.2
dNTPs 10 mM	0.2
Mg ²⁺	0.2
ADN _{pol}	0.1
Vector pCMV-Mat-FLAG	0.8
H ₂ O	4.4
Primer sentido (AleI/ NotI)	1
Primer antisentido (XmaI)	1

Tabla 5. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de la proteína V por PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
98	45 seg	1
98	10 seg	30
58	30 seg	
72	45 seg	
72	5 min	1

Posteriormente el producto de PCR se sometió a una electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V durante 30 minutos. Las bandas de interés fueron purificadas con el kit Silica Bead DNA Gel Extraction (Thermo, Scientific), bajo las siguientes condiciones:

- Se cortaron las bandas de interés del gel de agarosa, exponiendo de manera ínfima a luz UV.
- Se agregaron 300 μL de Binding buffer, incubando a 55 °C hasta que se disolviera el gel por completo.
- Se agregaron 14 μL de sílica, se incubó 5 min a 55 °C, después se centrifugó a 12000 g por 1 min.
- Se removió el sobrenadante y se agregaron 500 μL de buffer de lavado frío, se resuspendió el paquete celular y se centrifugó a 12000 g por 1 min, después se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó tres veces.
- Se dejó secar la muestra y se resuspendió en 12.5 μL de H_2O a 55°C durante 5 min. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, etiquetado como tubo 2.
- Se adicionaron 12.5 μL de H_2O en el tubo uno, se resuspendió y se centrifugó a 12000 g por 1 min, pasando el sobrenadante al tubo 2.
- Se centrifugó el tubo 2 a 12000 g por 1 minuto y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo. El producto purificado se guardó a -20°C.

Se verificó la obtención del producto mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V durante 30 minutos.

9.1.3. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN EL VECTOR

pJET1.2/blunt EN *E. coli*

Se clonaron los productos de PCR, es decir, la secuencia nucleotídica de la proteína V (V_{Xmal}^{AleI} y V_{Xmal}^{NotI}) utilizando el kit CloneJet.PCR 2.1 blunt (Thermo Scientific) (ver Anexo 2 Transformación), siguiendo las siguientes especificaciones:

- Se realizó una mezcla de reacción para generar extremos romos, utilizando: Buffer de reacción 2x 10 µL, producto de PCR (150 ng) 3 µL, enzima ADN blutting 1 µL y H₂O 4 µL.
- Se incubó la mezcla a 70 °C por 5 min, después se colocó en hielo durante 30 s, para después agregar el vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng) 1 µL y ligasa ADN T4 1 µL.
- Se incubó la mezcla de ligación a temperatura ambiente por 120 min y se colocó la muestra a 4°C toda la noche, utilizándola directamente para hacer la transformación bacteriana.

El producto de la ligación del punto anterior se usó directamente para la transformación bacteriana, la cual se realizó con la técnica de cloruro de calcio, de acuerdo al siguiente protocolo:

- ∞ Se cultivó *E. coli* (**ver Anexo 2 Transformación**), en medio LB a 37 °C, un día antes de la transformación. Tres horas antes de la transformación se tomaron 100 µL del cultivo y se sembraron en 2 mL de medio LB, bajo las condiciones antes descritas.
- ∞ Se tomó 1 mL de cultivo, para cada transformación y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- ∞ A partir de este punto las células se colocaron en hielo y se re suspendieron en 100 µL de CaCl₂ 100 mM frío (-20 °C).
- ∞ Se dejó en hielo la muestra durante 2 min.
- ∞ Se añadieron 4 µL de la reacción de ligación, mezclando por rotación con la micropipeta, procesando de igual forma al control positivo pGLO (**ver Anexo 2 Transformación**). Se dejó en hielo por 30 min a -80 °C.
- ∞ Se realizó un choque térmico, colocando las células a 39 °C durante 90 seg e inmediatamente después se metieron a hielo 3 min.
- ∞ Se agregaron 600 µL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C, centrifugando durante 3 min a 5000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

- ∞ Se resuspendió el paquete celular en 50 µL de medio LB y se sembró de forma masiva en placas con agar LB con Amp (150 µg/ mL), se incubó 12 h a 37 °C.

9.1.4. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS TRANSFORMADAS

YPURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Después del período de incubación se seleccionaron e incubaron a 37 °C clonas transformantes (pJET+V_{XmaI}^{AlcI} y pJET+V_{XmaI}^{NotI}) en caldo LB con Amp (100 µg/ml) durante dos horas. Para la verificación de la transformación de *E. coli* con el vector pJET1.2/blunt colonia utilizando las condiciones de la **Tabla 4** modificando el volumen de muestra a 2 µL y el de H₂O a 2.5 µL; el termociclador fue programado con las condiciones de la **Tabla 5**, modificando el tiempo del primer ciclo a 10 min. El producto de PCR se sometió a una electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V durante 30 minutos.

Por último, se realizó la extracción del ADN plasmídico de las clonas positivas transformadas con el kit Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), utilizando el siguiente procedimiento:

- Se centrifugaron las células a 12000 rpm durante 5 min.
- Se re suspendió cuidadosamente el pellet con 250 µL de la solución de re-suspensión.
- Se agregaron 250 µL de la solución de lisis celular y se mezcló.
- Se agregaron 10 µL de solución de proteasas alcalina, se mezcló e incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a temperatura ambiente.
- Se ensambló una columna de sílica en un tubo colector, donde se decantó el lisado. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 min a temperatura ambiente. Se eliminó el filtrado.

Se agregaron 750 μL de la solución de lavado y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min a temperatura ambiente, se eliminó el filtrado. Se repitió este paso utilizando 250 μL de la solución de lavado.

- Se cambió la columna de sílica a un tubo nuevo y se agregaron 50 μL de H_2O libre de nucleasas a 55 $^\circ\text{C}$, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se repitió el paso y se guardó la muestra a -20 $^\circ\text{C}$.

La muestra se verificó a través de una electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V durante 30 minutos.

9.1.5. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DEL ORF Y EL VECTOR pRSP2

Para la obtención del ORF se realizaron reacciones de digestión a los vectores $\text{pJET}+\text{V}_{\text{XmaI}}^{\text{AleI}}$ y $\text{pJET}+\text{V}_{\text{XmaI}}^{\text{NotI}}$ con las enzimas de restricción Ale/NotI y XmaI para la generación de extremos cohesivos, se siguió el mismo procedimiento de restricción con el vector pRSP2 (**ver Anexo 2 Transformación**). A las muestras (10 μL , 600 ng) se les agregó la enzima XmaI 1 μL , buffer 1.2 μL y H_2O 3 μL , dejándose incubar durante una hora y media a 37 $^\circ\text{C}$, después se adicionó la enzima Ale/NotI 1 μL , así como su buffer 3.7 μL y H_2O 2 μL , incubando con las condiciones antes descritas. Posteriormente a los productos se les realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 100 V durante 30 minutos, se seleccionaron las bandas de interés correspondientes de 735 y 748 pb, sometiéndolas a una mínima exposición a luz UV y purificándolas con el kit Silica Bead DNA Gel Extraction (Thermo, Scientific), como se mencionó con anterioridad.

9.1.6. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS $\text{pRSP2}+\text{V}_{\text{XmaI}}^{\text{AleI}}$ y $\text{pRSP2}+\text{V}_{\text{XmaI}}^{\text{NotI}}$

Se realizaron las reacciones de ligación, utilizando como vector al producto digerido pRSP2 y como inserto cada una de las secuencias amplificadas; para la

mezcla de reacción se utilizaron los reactivos de la **Tabla 6** y las siguientes condiciones:

Tabla 6. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de ligación del vector pRSP2 y el inserto de cada una de las secuencias amplificadas.

Reactivo	Volumen (μ L)	
	AleI y XmaI	NotI y XmaI
pRSP2 (100 ng)	6	4
Secuencia nucleotídica de la proteína V digerida (17 ng)	5	9
Buffer de Ligasa	1.5	1.5
Ligasa T4 ADN	1	1
H ₂ O	1.5	---

9.1.7. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS TRANSFORMADAS Y PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

La mezcla de reacción se incubó a 15 °C durante 18 h y después se siguió el protocolo de transformación bacteriana antes descrito, así como la PCR en colonia para la verificación de la transformación y por otro lado se llevó a cabo la purificación del plásmido.

Se determinó el patrón de restricción del ADN plasmídico resultante con las enzimas de restricción NotI y XmaI, así como AleI y XmaI, como se describió anteriormente.

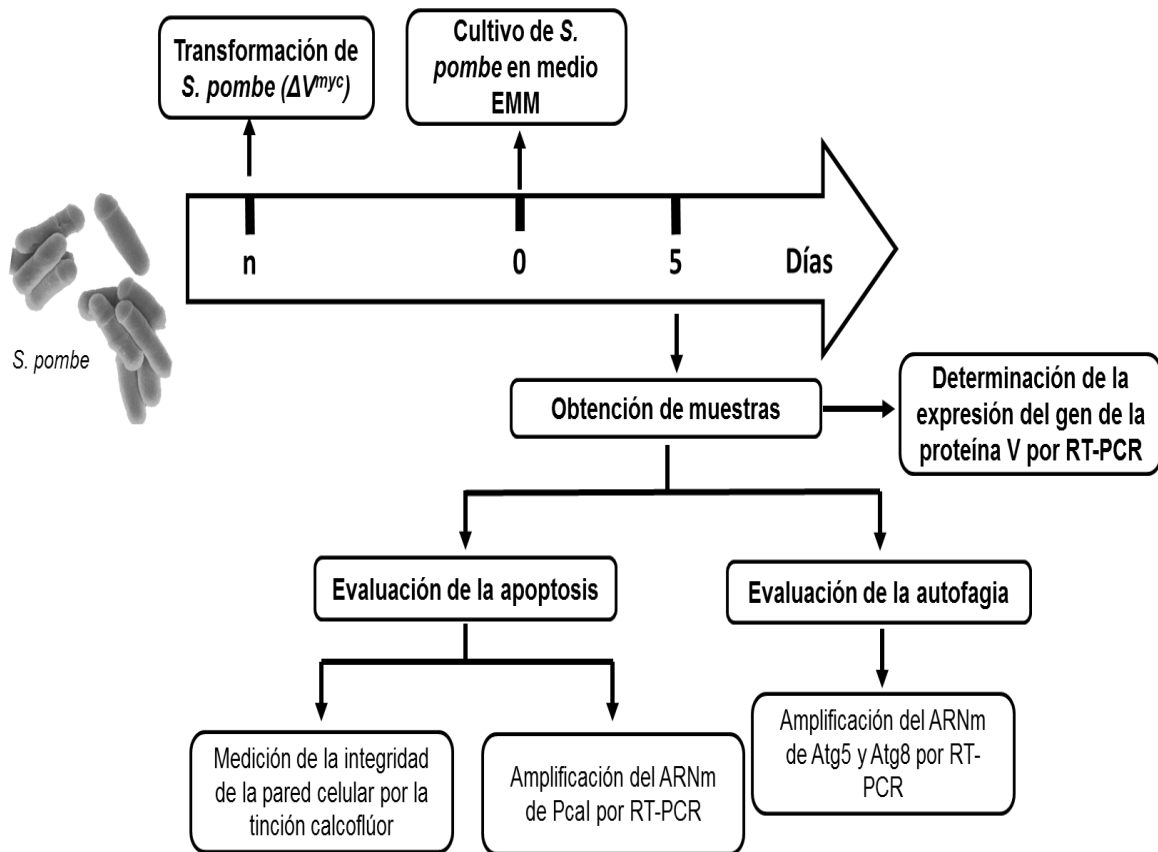
9.1.8. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN DE INTERÉS DEL PLÁSMIDO pRSP2+V^{NotI/XmaI}

Se mandó a secuenciar por el método de Sanger la construcción pRSP2+V^{NotI/XmaI} en el laboratorio de servicios genómicos LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad), CINVESTAV- Campus Guanajuato. El

análisis del electroferograma y de la secuencia obtenida se analizó con el programa Bioedit.

9.2. TRANSFORMACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN *S. pombe*

Para los procedimientos de transformación, envejecimiento y evaluación de los marcadores de apoptosis y autofagia, así como, la verificación de la presencia del ARNm del gen de la proteína V se llevó a cabo el siguiente esquema de trabajo.



9.2.1. TRANSFORMACIÓN DE *S. pombe*

El siguiente protocolo de trabajo fue llevado a cabo para la transformación de *S. pombe*:

- ∞ Se cultivó a *S. pombe* en 10 mL en medio YE a 30 °C en agitación hasta obtener una $DO_{600} = 1$.
- ∞ Se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min
- ∞ Se lavó el pellet con 1 mL de LiSorb. Se incubó en agitación a 30 °C durante 60 min.
- ∞ Se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min.
- ∞ Se agregaron 200 μ L de LiSorb, y 8 μ L de ADN_p (vector pRSP2 +V^{NotI}_{Xmal}), incubándose en agitación a 30 °C durante 10 min.
- ∞ Se añadió 1mL de 40% PEG/LiAc/TE, se homogenizó por inversión repetida, incubándose a 30 °C en agitación durante 60 min.
- ∞ Se hizo un choque térmico a 42 °C durante 5 min.
- ∞ Se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min, se resuspendió el pellet con 25 μ L de LiSorb y se hizo un sembrado masivo en una placa de medio YNB con los requerimientos autotróficos correspondientes (adenina y uracilo). Las colonias fueron visibles de 5-7 días de incubación a 30 °C.
- ∞ Se seleccionaron e incubaron a 28 °C clonas transformantes en medio líquido YNB con los requerimientos autotróficos (adenina y uracilo) a 30 °C en agitación durante 2 días. Para la verificación de la transformación se realizó una PCR directo de colonia utilizando las condiciones de la **Tabla 4** modificando el volumen de muestra a 2 μ L y el de H₂O 2.5 μ L, el termociclador fue programado con las condiciones de la **Tabla 5.**, modificando el tiempo del primer ciclo a 17 min. Los productos de PCR se corrieron en una electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V durante 30 minutos.

9.2.2. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA V EN *S. pombe*

Debido a que el plásmido utilizado contenía el promotor negativo a tiamina, su activación es esencial para la inducción de la expresión del inserto, para ello se realizó el siguiente protocolo.

- Se seleccionaron 3 colonias positivas al inserto de la proteína V de la PCR en colonia, se empaquetaron a 12000 rpm durante 2 min y se sembraron en 5 mL de medio YNB con adenina, uracilo y timina durante un día.
- Se tomó una alícuota de 100 μ L y se le adicionó 900 μ L de H₂O, su absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una λ 600 nm y utilizando la **ecuación 1** se tomó el volumen necesario para hacer 3 cultivos de 10 mL de cada colonia. Las muestras se incubaron 2 días en agitación a 30 °C.

Ecuación 1. Para la obtención del volumen necesario del cultivo de *S. pombe*

$$\frac{[(10 \text{ mL})(0.4)]/2}{\lambda * fd}$$

. Donde λ es la absorbancia y fd el factor de dilución.

9.2.3. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE *S. pombe*

A las muestras del apartado **9.2.2** se les realizó el siguiente procedimiento:

- Las células se empaquetaron por centrifugación a 12000 rpm durante 2 min y posteriormente se lavaron y centrifugaron (bajo las mismas condiciones) en dos ocasiones con H₂O
- Se hicieron 3 cultivos de 10 mL de medio YNB con adenina y uracilo durante un día para cada colonia positiva al inserto, bajo las condiciones de la **Tabla 8** y se siguió el diagrama de trabajo del apartado **8.2**.

9.2.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

- ∞ Se empaquetaron 3 mL de los grupos de trabajo de *S. pombe* y se realizó una disrupción enzimática con 0.2 mg de zimoliasa 20 T, solubilizada en 60 µL de buffer de zimoliasa, a 37 °C durante 45 min. Antes de proceder a la extracción se tomó una alícuota de 5 µL y se observó al microscopio para verificar la morfología celular. Se centrifugó a 12000 rpm por 2 min.
- ∞ Se agregaron 350 µL de TRIzol y se resuspendió cuidadosamente hasta observar un cambio de color en el homogeneizado. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min.
- ∞ Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio donde se le agregaron 80 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 30 seg, posteriormente se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 min.
- ∞ Se tomó la fase acuosa y pasó a un tubo limpio, teniendo cuidado de no tomar residuos de las otras dos fases. Se agregó un volumen de isopropanol frío por cada volumen de fase acuosa y se mezcló cuidadosamente, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y centrifugándose a 12000 g por 10 min.
- ∞ Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 350 µL de etanol frío al 75%, centrifugándose a 7000 g durante 10 min.
- ∞ Se eliminó el etanol y se permitió la evaporación de residuos del mismo, para posteriormente agregar 50 µL de H₂O libre de nucleasas.

9.2.5. EVALUACIÓN DE LA APOPTÓISIS Y AUTOFAGIA POR RT- PCR

Para la amplificación de los genes Pcal, Atg5, Atg8 y gen que codifica para la proteína V, se realizó una PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR). Se utilizaron 2 µL de ARN de *S. pombe* como molde inicial para la producción de una cadena complementaria de ADN a través del uso de la transcriptasa reversa. El segundo paso fue la amplificación de la primera hebra de ADNc y después se

realizó el procedimiento estándar de PCR. Los reactivos utilizados para este procedimiento fueron del kit AMV/RT de Promega, utilizando 2 μ L de buffer AMV/RT 5x μ L, 0.5 μ L de dNTPs, AMV RT 0.25 μ L, Tfg Pol 0.25 μ L, MgSO₄ 25 mM, H₂O 2.8 μ L, así como 1 μ L de los oligos sentido y antisentido, teniendo como volumen final de reacción 10 μ L. Se siguieron las condiciones descritas en la **Tabla 7** para las RT-PCR.

Tabla 7. Condiciones del termociclador para la amplificación de los genes de V, Pcal, Atg 5 y 8 de *S. pombe*.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
48	45 min	1
94	45 seg	1
94	45 seg	35
59	45 seg	
68	45 seg	
68	5 min	1

9.2.6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR CON LA TINCIÓN CON CALCOFLÚOR

- De grupos de trabajo se tomó una alícuota de 6 μ L y se colocó en un portaobjetos gelatinizado.
- Posteriormente se agregó 2 μ L del reactivo calcoflúor white (CFW-Sigma-Aldrich) e inmediatamente después 2 μ L de hidróxido de sodio al 10%.
- La muestra se observó al microscopio confocal a 100X.

9.3. ANÁLISIS *in silico* DE LAS PROTEÍNAS V Y Pcal

9.3.1. ANÁLISIS DE MOTIVOS DE LA PROTEÍNA V Y LA Pcal CON MOTIF SCAN

Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) es una herramienta que permite encontrar todos los motivos conocidos en una secuencia. Se ingresa al servidor y se proporciona la secuencia proteica y se seleccionan los motivos a buscar. Proporciona un documento con la interpretación de las evaluaciones y

para obtener información adicional nos refiere a Prosite, Pfam e InterPro, que son bases de datos que almacenan información sobre estructuras y funciones proteicas.

9.3.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEÍNA V Y PCAI CON GENO3D Y YASARA

Geno3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr>) que es un servidor automático para el modelamiento. El modelaje se hace en seis pasos, el primero es la entrada de la secuencia aminoacídica a modelar y se realiza un BLAST, para buscar proteínas homólogas con estructuras 3D conocidas. Después el programa proporciona todos los templados para la elección del más parecido a nuestra estructura, tras la selección del templado se hace un alineamiento múltiple entre la secuencia problema (query) y la que se encuentra en la base de datos (subject), luego se procede a evaluar el impedimento estérico (ángulos y distancias) correspondientes a cada átomo entre las secuencias y construye la estructura 3D de la proteína utilizando la distancia geométrica aproximada. Los resultados se envían al usuario por correo electrónico.

9.3.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE LA PROTEÍNA V Y PCAI CON PATCHDOCK Y YASARA

PatchDock es un software libre que analiza moléculas (ligando y receptor), modelados previamente en 3D y que a través de algoritmos predice el docking molecular entre ellas. YASARA es un programa de simulación, modelado y visualización de gráficos moleculares para Windows, Linux y Mac OS X. Está desarrollado en el lenguaje PVL (lenguaje vector portable), que permite visualizar proteínas grandes y realizar simulaciones interactivas-en tiempo real con una alta precisión en los campos de fuerza moleculares, permitiendo detectar posibles interacciones moleculares.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS ADN RECOMBINANTES

10.1.1. PRIMERS PARA EL ORF DE LA PROTEÍNA V

Para cumplir los objetivos planeados en este trabajo de tesis el primer punto a realizar fue la construcción de oligonucleótidos que permitiesen la clonación del ORF de la proteína V (**Tabla 8**). Se diseñó el oligo VNotI-S que hibrida en la región 5' del gen, contiene el sitio de restricción de la enzima de restricción NotI (G C↓GGC CGC) así como de la etiqueta c-myc (GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT); el oligo sentido VAle-S contiene la secuencia de la enzima AleI (CAC NN↓N NGT G) y una etiqueta de 6 histidinas (CAT CAT CAC CAC CAC CAT), se siguió esta estrategia para la posterior obtención de dos ADNs plasmídicos con diferentes etiquetas para su posterior identificación por Western Blot. El oligo antisentido, que hibrida en la región 3' del gen, se diseñó con el sitio de restricción para la enzima XmaI (C ↓CCG GG) y se utilizó como par de los oligos anteriores. Además se diseñó un par de primers sin la adición de sitios de restricción (V-S y V-AS).

Como se aprecia en la **Tabla 8** se diseñaron los oligonucleótidos de tal forma que la temperatura de fusión (T_m) fuese similar entre ellos, ya que está directamente relacionada con la eficiencia de la amplificación, a T_ms muy altas o bajas la hibridación puede ser inespecífica; sin embargo, como se puede observar hay una diferencia de 4.5 °C entre los oligos VNotI-S y XmaI-As, por lo que se procedió a hacer la estandarización del programa de temperaturas, realizándose a diferentes temperaturas de alineación desde 56-61 °C, encontrándose que la temperatura óptima es de 59 °C, es por ello que para las reacciones de PCR y RT-PCR se utilizó esta temperatura. Por otra parte, también fue necesario tener cuidado en el porcentaje de guanina y citosina (GC) así como en su distribución, ya que para PCR de punto final se recomienda que existan residuos de G/C en el extremo 3'-OH para que el triple enlace del hidrógeno proporcione estabilidad,

para que en las reacciones de alineación y extensión el primer no se desacople de la plantilla.

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para el gen de la proteína V.

Oligo	Secuencia	Tm (°C)	GC (%)	PM (g/mol)
VNotI-S	5'- CTC GAG GCG GCC GCC ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG GAC CAA TTT ATA AAA CAA GAT -3'	70.0	44.9	21296.9
VAle-S	5' CAC GCT GGTG CA CGG ATG CAT CAT CAC CAC CAC CAT CTG GAC CAA TTT ATA AAA CAA GAT -3'	65	43.1	13572.9
VXmal-As	5'- TAG ATA CC CGG GCT AAG GAG GTC CAT AAT CTC GTT C -3'	65.5	51.3	11349.4
V-S	5'- GAA CAT TCA GTA CCC CAC CAC -3'	55.6	52.3	6304.2
V-As	5'- CAG GAG TGG AAT CTT GCT GTG -3'	55.8	52.3	6517.3

Se presentan sus secuencias nucleotídicas así como sus propiedades físico-químicas. El oligo VNot-S tiene en letras moradas la secuencia de flanqueo de la enzima NotI, después en rojo el codón de inicio de la transcripción, en anaranjado se observa la secuencia nucleotídica de la etiqueta c-myc y en negro remarcado la secuencia nucleotídica del gen de la proteína V, al inicio de la secuencia negro se observan las bases nucleotídicas que se adicionaron para modificar el valor de Tm y GC. El oligo VAle-S muestra en verde la secuencia de restricción de la enzima AleI, en rojo el codón de inicio de la transcripción, en azul la secuencia de la etiqueta de 6 histidinas y en negro remarcado la secuencia nucleotídica del gen de V. El oligo antisentido VXmal contiene remarcado en negritas la secuencia del gen V, en azul la secuencia de restricción del a enzima Xmal y en negro los nucleótidos adicionados para obtener valores de Tm y GC parecidos a los oligos sentido.

10.1.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF DE LA PROTEÍNA V

Se realizó la amplificación y purificación del ORF del gen *P* de la proteína V partiendo del vector pCMV-Mat-FLAG, utilizando los oligos AleI-S y Xmal-As, así como VNotI-S y Xmal-As, los cuales contenían las secuencias de las etiquetas de histidina y c-myc, correspondientes, además de los sitios de corte AleI/NotI y Xmal, obteniéndose amplicones de 735 y 748 pb, los cuales se sometieron a un corrimiento electroforético en gel de agarosa (**Fig. 15**) respectivamente para después purificarlos.

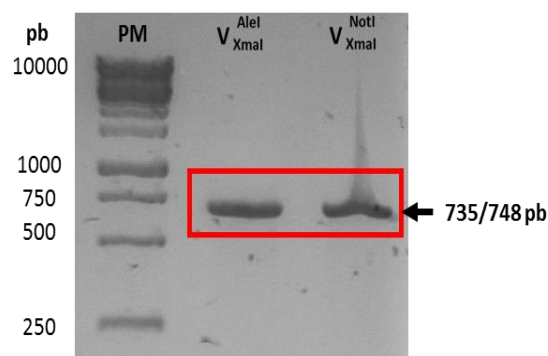


Figura 15. Amplificación por PCR del ORF de la proteína V. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular (PM), en el segundo el ORF amplificado con los oligos VAle-S y VXmal-As (735 pb) y en el tercer carril se observa el producto amplificado con los oligos VNotI-S y VXma-AS (748 pb)

10.1.3. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN EL VECTOR pJET1.2/blunt

Antes de realizar la reacción de ligación entre el producto de PCR de la sección 10.1.2 y el vector pJET2.1 (**ver Anexo 2 Plásmidos**), se repararon los extremos incompatibles de los productos de PCR para generar extremos como utilizando la enzima Taq DNA polimerasa que posee una actividad de exonucleasa y actúa hidrolizando enlaces fosfodiéster. Después se ligó el producto de PCR reparado con el vector pJET abierto linearizado, obteniendo un vector circularizado que se utilizó para transformación en *E. coli*. Se realizó esta clonación porque las reacciones de restricción posteriores tienen una mayor eficiencia cuando el gen de interés se encuentra en un plásmido, ya que las enzimas de restricción pueden posicionarse adecuadamente para realizar las reacciones correspondientes, esto en comparación a realizar las digestiones directamente sobre el producto de PCR.

Con el producto de ligación se procedió a transformar a la bacteria *E. coli*. Las colonias que crecieron en el medio de selección (**Fig. 16a**) (LB + Amp), se les realizó PCR directo de colonia para la verificación de inserto (**Fig. 16c**). Posteriormente se procedió a hacer la purificación de ADN plasmídico de las colonias positivas.

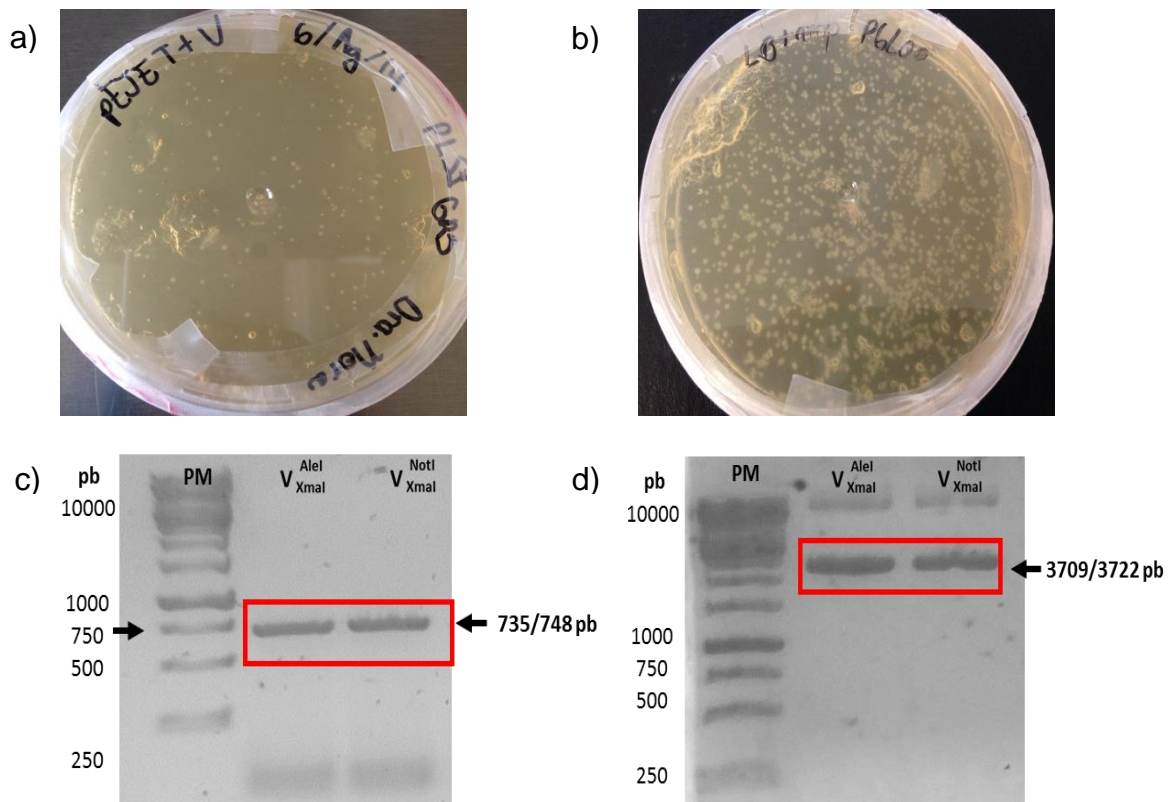


Figura 16. Transformación y verificación del inserto pJET2.1/blunt+V en *E. coli*. a) Crecimiento de colonias *E. coli* 12 h después de la transformación en placa de medio LB con Amp (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), para el inserto y V_{XmaI}^{NotI} , la placa con el inserto V_{XmaI}^{AleI} mostró un patrón similar de crecimiento (datos no mostrados). b) Control positivo a la transformación con el plásmido pGLO. c) Verificación del inserto pJET2.1/blunt+V en *E. coli* con una PCR en colonia, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%. En el carril número uno se observa el patrón característico del PM de 1 Kb, en los carriles 2 y 3, se encuentra el producto de PCR correspondiente a las construcciones V_{XmaI}^{AleI} (735 pb) y V_{XmaI}^{NotI} (748 pb), respectivamente. d) Purificación del ADN plasmídico, en el carril uno se encuentra el PM (1 Kb), en los carriles 2 y 3 los plásmidos pJET+ V_{XmaI}^{AleI} (3709 pb) y pJET+ V_{XmaI}^{NotI} (3722 pb).

10.1.4. SÍNTESIS DEL ADN RECOMBINANTE

Para poder obtener los ADN recombinantes fue necesario realizar la reacción de ligación de los productos de la sección 10.1.3 con el vector pRSP2, se hizo una doble digestión con las enzimas AleI y XmaI de forma simultánea, ya que la actividad enzimática de ambas es ideal en un buffer con 50 mM de acetato de potasio, 20 mM de Tris acetato, 10 mM de acetato de magnesio y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA a un pH 7.9, después de la incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 90 min

y de la inactivación enzimática a 80 °C por 10 min, se realizó el corrimiento electroforético correspondiente (**Fig 17a**), se observó el resultado rápidamente en el transiluminador para evitar daño al ADN por la sobreexposición a la luz UV, para después purificar la banda de interés de 725 pb por el procedimiento antes descrito. Para la doble digestión de la construcción pJET2.1/blunt+V NotI/XmaI no se pudo seguir el procedimiento estándar, ya que la actividad enzimática de NotI y XmaI se ve afectada porque dichas enzimas difieren en el buffer de reacción, NotI posee una eficiencia de corte con un buffer de 100 mM de cloruro de sodio, 50 mM tris ácido clorhídrico, 10 mM de cloruro de magnesio y 100 µg/ml BSA, el cual difiere notablemente en fuerza iónica del buffer de XmaI, dicha incompatibilidad se refleja en la presentación de un efecto estrella por parte de las dos enzimas y por ende las primeras reacciones de estandarización que se realizaron daban como resultado un rendimiento ineficiente; por ello se procedió a seleccionar la enzima con el buffer de menor fuerza iónica, XmaI, se digirió bajo las condiciones descritas y para no dañar a los extremos cohesivos obtenidos por la temperatura de inactivación enzimática se eliminó este punto, luego de la incubación se adicionó los volúmenes de enzima, buffer y agua descritos, se incubó la mezcla de reacción y el producto final se le realizó una electroforesis por agarosa con las condiciones antes descritas (**Fig. 17b**), se aprecian las bandas del vector pJET2.1/blunt (2972 pb) y al gen de la proteína V con la etiqueta c-myc (737 pb).

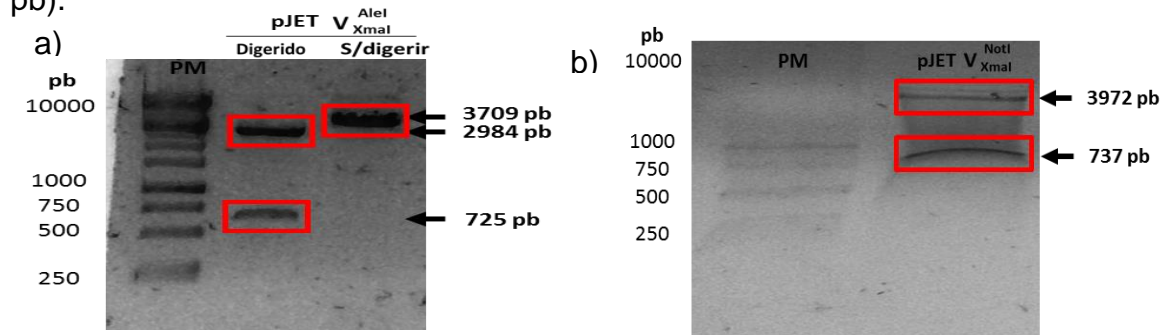


Figura 17. Reacciones de digestión para generar extremos cohesivos del gen de la proteína V. a) En el carril uno PM (1 Kb), en el carril dos la digestión del plásmido pJET2.1/blunt (2984 pb) y la del inserto V AleI/XmaI (725 pb) digerido con sus respectivas enzimas, en el carril tres el plásmido sin digerir (3709 pb). b) En el primer carril se encuentra el PM (1 Kb) y en el carril dos la digestión del plásmido pJET2.1/blunt (3972 pb) y la banda del inserto V NotI/XmaI (737 pb).

Para la obtención de ADN recombinantes (ADNs_R) que pudiesen ser utilizados para transformar a *S. pombe* se eligió al vector de expresión pRSP2 (ver Anexo 2 Transformación) (López-Osorno J., 2010).

Para cumplir el objetivo de la subclonación del gen de la proteína V en un vector de expresión de *S. pombe*, era necesario que el vector pRSP2 fuese digerido bajo las condiciones descritas para las construcciones del punto 10.3. Los productos se corrieron en una electroforesis con gel de agarosa, para ambas digestiones se obtuvieron dos bandas (**Fig. 18**), una correspondiente al vector linearizado (8794 pb) y otra al segmento del MCS (933 pb) que se cortó para que en las posiciones 1249/1216 pb y 2165 pb se pudiesen ligar los genes de la proteína V digeridos anteriormente.

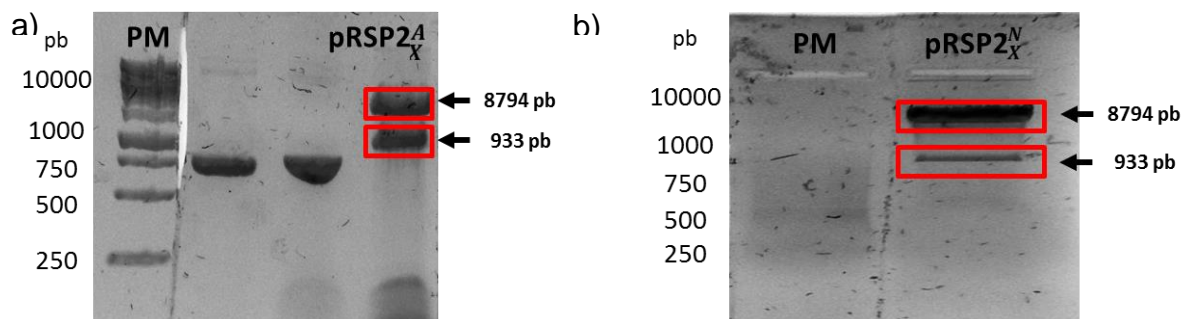


Figura 18. Reacciones de digestión para generar extremos cohesivos en el vector pRSP2. a) En el carril uno se observa el PM (1 Kb), en el cuarto carril se encuentran los productos de la digestión del vector pRSP2 tras la digestión con AelI y XmaI. b) En el carril uno está el PM y en el carril dos los productos de la doble digestión de pRSP2 con las enzimas NotI y XmaI. Para ambas reacciones se seleccionó, cortó y purificó la banda de 8794 pb.

Se realizó la reacción de ligación con el protocolo descrito en la sección 9.4 y se procedió a realizar la transformación de *E. coli* con el producto ligado. Después se hizo un sembrado masivo de la bacteria en el medio de selección LB+ Amp (100 µg/ µL) y 12 h después de su incubación a 37 °C se observó la presencia de colonias transformantes (**Fig. 19a**), las cuales se seleccionaron al azar para cultivar en 1 mL de medio LB + Amp (100 µg/ µL) durante 3 h para posteriormente verificar la presencia del inserto por PCR directo de colonia (**Fig. 19b**), acorde a lo descrito en la metodología (sección 9.3).

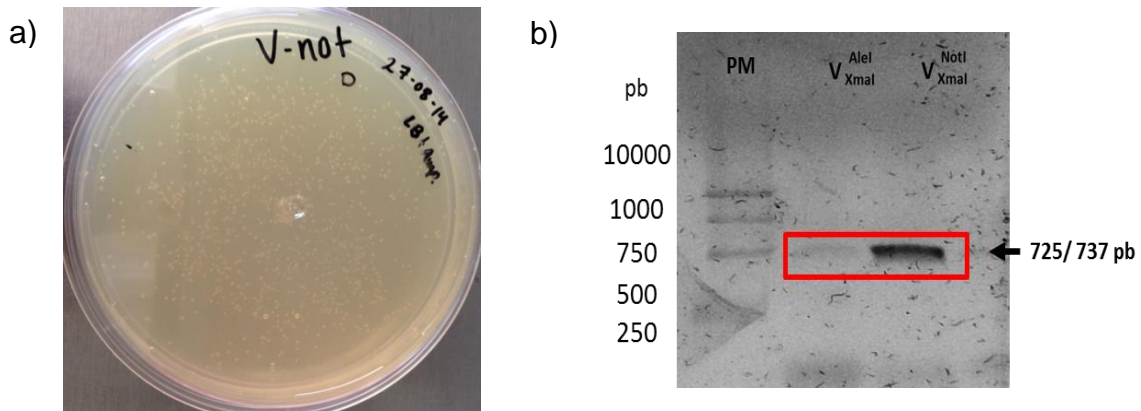


Figura 19. Subclonación del ORF de la proteína V en el vector pRSP2. a) Colonias transformadas de *E. coli* con la construcción pRSP2+gen de la proteína V con la etiqueta c-myc en los sitios de restricción NotI y XmaI, se observó el mismo patrón para la transformación con la construcción de la etiqueta de 6 histidinas y los sitios AclI y XmaI (datos no mostrados). b) Verificación del inserto por PCR en colonia.

Las clonas positivas al inserto fueron resembradas en 10 mL de medio LB con Amp (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 12 h y por la técnica descrita en la sección 9.3 se purificó el ADN_R.

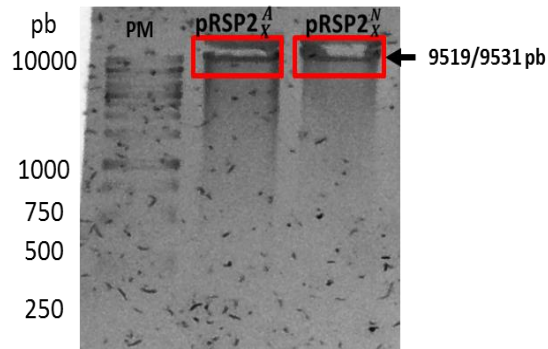


Figura 20. Purificación del ADN_R. Se observa en el carril 1 el PM y en los carriles 2 y 3 las diferentes construcciones del vector pRSP2.


```
CATGCATGGAACAAAACTCATCTCTCAAGAGGATCTGGACCAATTT
ATAAAACAAGATGAGACTGAAGATTTAATTGAGACAGGAATGAACGT
TGCAAATCTTTTCTATCCGCCCCATT CAGGGAACCAACTCGTTGA
GCTGGGCCACAATCATCCCTGGCGTTGCACCAATACTCATTGGCAAT
CCATAACAAAAGAACATTCACTACCCACACATCACGTCATGGGTC
CAAGTTGGGGGCAGAGGCTCAGGGGCCAGGCCCATCATAGTCTCATC
CTCCGAAGGAGGTCCTGGAGGGACTCACATTCCTGAGCCCCTTTTCC
CACAAACAGGACCAGGTGGAATGGTCACCACCGTTTATCAGGATCCA
ACTATCCAACCAACAGGTTCCATATCCAATGGTGGAATTGGTGAACAT
AGGAAAAGATAGAATGATTAACAATTTGTTGAAAACCAAGAACCT
CAACGCCGGTTACAGAATTTAATAGGGGGGGGGCCGGTGGTGGCTGC
TCGAGGACTGACCATCTGAGAAGAGGCACTACACAGAAGTGGAGTCT
CACCTGGGACCAAAGAGATGTCCGGGTCTGTGAGTGTGGCAACCCCA
TATGCTCACCTATCACTGCCACATATGGATTGCCCTGCTGCATATGT
GAGAAGTGTTCGCATAGTGCATCGCTGCAAACGAAATTATGGACC
TCCTTAG
```

Figura 22. Secuencia nucleotídica obtenida del fragmento clonado del vector pRSP2+ V^{NotI}_{XmaI}. Del electroferograma obtenido (**Fig. 21**) en el programa Bioedit se obtuvo el ORF de interés, se observa en color rojo el codón de inicio y de paro, respectivamente.

Al ORF del fragmento clonado de la construcción pRSP2+ V^{NotI}_{XmaI} (**Fig. 22**) se le realizó un alineamiento múltiple en Clustal Omega (**Fig. 23**), para comparar las secuencias nucleotídicas tanto de la etiqueta c-myc y de la proteína V. Se observa que hay concordancia de pares de bases en las tres secuencias, con ello se tiene la confiabilidad de que la proteína que se expresará será la misma que la reportada en *GenBank* (la correspondiente a la proteína V de MuV) y los resultados obtenidos serán válidos, por lo cual concluimos que el gen de interés con su respectiva etiqueta fueron subclonados en el vector pRSP2 con éxito.

Análisis del efecto de una proteína viral con actividad antiapoptótica en el envejecimiento de Schizosaccharomyces pombe

```

Mumps      -----atggaccaatttataaaacaagatga
c-myc      -----GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGAT-----
pRSP2+VNotXma  ATGCATGGAACAAAAACTCATCTCTCAAGAGGATCTGGACCAATTTATAAAACAAGATGA

Mumps      gactggtgatttaattgagacaggaatgaacggttgcaaatcatttcctatccgcccccat
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  GACTGAAGATTTAATTGAGACAGGAATGAACGTTGCAAAATCTTTTCCTATCCGCCCCCAT

Mumps      tcaggaaccaactcgttgagcaaggccacaatcatccctggcgttgaccagtactcat
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  TCAGGGAACCAACTCGTTGAGCTGGGCCACAATCATCCCTGGCGTTGCACCAATACTCAT

Mumps      tggcaatccagagcaaaaagaacattcagtagccaccacatcacatcaggggtccaagtc
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  TGGCAATCCATAACAAAAGAACATTCACTACCCACCACATCAGTCATGGGTCCAAGTT

Mumps      aaagggcagaggctcaggggccaggcccatcatagtctcatcctccgaaggaggcactgg
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  G-GGGGCAGAGGCTCAGGGGCCAGGCCATCATAGTCTCATCCTCCGAAGGAGGTCCTGG

Mumps      agggactcagattcctgagcccccttttcgcacaaacaggacaaggtggcattgtcaccac
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  AGGGACTCACATTCTGAGCCCCTTTCCACAAACAGGACCAGGTGGAATGGTCACCAC

Mumps      cgtttatcaggatccaactatccaaccaacaggttcatatcgaagtgtgaattggctaa
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  CGTTTATCAGGATCCAACATCCAACCAACAGGTTTCATATCCAATGGTGAATTGGTGAA

Mumps      gatagaaaagagagaatgattaatcgatttgttgaaaaaccaagaacctcaacgccggt
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  CATAGGAAAAGATAGAATGATTAACAATTTGTTGAAAACCAAGAACCTCAACGCCGGT

Mumps      gatagaaaagagagaatgattaatcgatttgttgaaaaaccaagaacctcaacgccggt
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  CATAGGAAAAGATAGAATGATTAACAATTTGTTGAAAACCAAGAACCTCAACGCCGGT

Mumps      aacagaatttaagagggggg---ccgggagcggctgctcaaggccagacaatccaagagg
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  TACAGAATTTAATAGGGGGGGGGCCGGTGGTGGCTGCTCGAGGACTGACCATCTGAGAAG

Mumps      agggcatagacgggaatggagcctcagctgggtccaaggagaggtccgggtccttgagtg
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  AGGCACTACACAGAAGTGGAGTCTCACCTGGGACCAAGAGATGTCCGGGTCTGTGAGTG

Mumps      gtgcaaccccatatgctcacctatcactgccacagcaagattccactcctgcaaatgtgg
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  TGGCAACCCCATATGCTCACCTATCACTGCCACATATGGATTGCCCTGCTGCATATGTGA

Mumps      gaattgccccgcaaagtgcgatcagtgcgaaacagagattatggacctccttag
c-myc      -----
pRSP2+VNotXma  GAACTGTTCCGCATAGTGCATCGCTGCAAACGAAATTATGGACCTCCTTAG

```

Figura 23. Alineamiento múltiple del ORF del ADN_R pRSP2+ V_{XmaI}^{NotI}. En la primera línea está la secuencia nucleotídica de la proteína V (Mumps) obtenida del *GeneBank Nucleotide*, en la segunda línea está la secuencia de la etiqueta c-myc y en la tercera la secuencia obtenida de la secuenciación.

10.2. TRANSFORMACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN *S. pombe*

10.2.1. TRANSFORMACIÓN DE *S. pombe*

Se realizó la transformación de la levadura de fisión con el plásmido pRSP2+V^{NotI}_{XmaI} en diversas ocasiones y no se obtuvieron las transformantes, por lo que se buscaron nuevas estrategias de transformación y se hicieron dos procedimientos diferentes al propuesto, se encontró que ambos transformaban al hongo pero diferían en la eficiencia de transformación. Se realizó la transformación de *S. pombe* de acuerdo a la metodología descrita en la sección 9.2.1, después se procedió a hacer una siembra masiva en placa de la levadura transformada en medio YNB con los requerimientos autotróficos correspondientes, es decir, no se adicionó leucina. También se encontró que aunque la temperatura y el tiempo reportado de incubación para el crecimiento de las transformadas es de 30 °C durante 3 días, bajo las condiciones experimentales del laboratorio, el crecimiento óptimo de la levadura es a 28 °C durante una semana, estas diferencias tanto en la temperatura como en el tiempo de incubación sugieren que las levaduras transformadas modifican sus parámetros de replicación, lo cual podría explicarse por el estrés al que fueron sometidas (medio con agentes caotrópicos y choque térmico). Las colonias transformadas (**Fig. 24a**) se seleccionaron y se crecieron en 1 mL de medio YNB con los medios autotróficos correspondientes durante 2 días, hasta alcanzar una $DO_{600} = 1$, después se tomaron 2 μ L de 7 clonas al azar para su análisis por PCR directo de colonia con las modificaciones pertinentes (para asegurar el rompimiento de la pared celular y la liberación del contenido citoplásmico), los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (**Fig. 24b**), se observa que todas las colonias seleccionadas para la verificación de inserto fueron positivas.

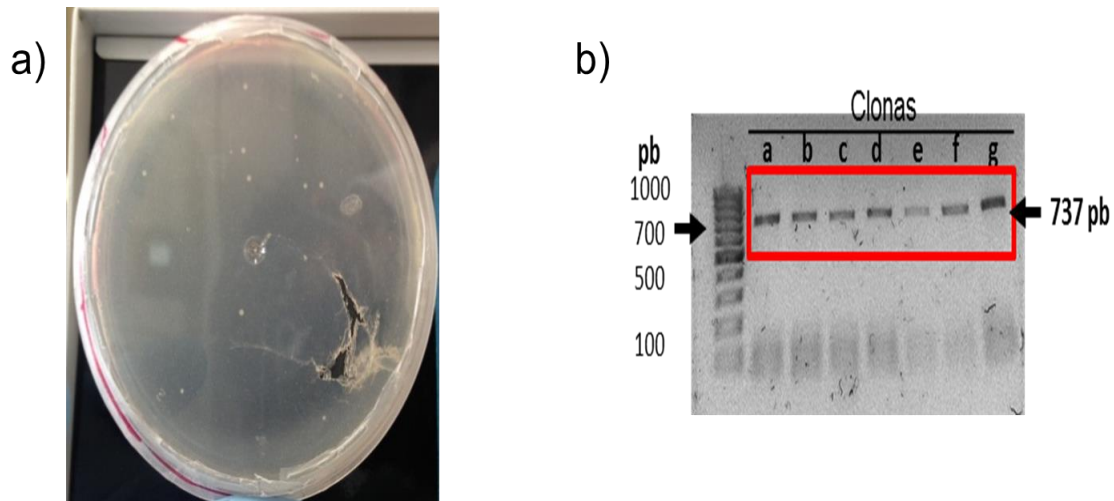


Figura 24. Transformación de *S. pombe* con el vector pRSP2+ V^{NotI}_{XmaI}. a) Placa de medio YNB con los requerimientos autotróficos correspondientes con las colonias transformadas de *S. pombe*. B) Verificación de las colonias positivas del inserto a través de PCR directa en colonia.

10.2.2. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR DE *S. pombe*

El calcoflúor se une de forma no específica a la quitina y a la celulosa en la pared de los hongos y fluoresce en un tono azul, lo que permite evaluar la integridad de la membrana celular. En las microfotografías (**Fig. 25**) se puede observar a *S. pombe* teñido de color gris intenso en el primer día de cultivo y tiene morfología bacilar como se describe en la literatura, en el día 5 de envejecimiento *S. pombe* se tiñe de color gris menos intenso que en el día uno, lo cual es un indicador del comienzo de la pérdida de integridad de su pared, la mayoría de las células observadas conserva su forma bacilar, aunque algunas van perdiendo su forma característica para presentar abultamientos acorde a células envejecidas; se debe a que la maquinaria de mantenimiento celular disminuye su actividad. En las fotografías de *S. pombe* que codifica para la proteína V.

Envejecimiento cronológico

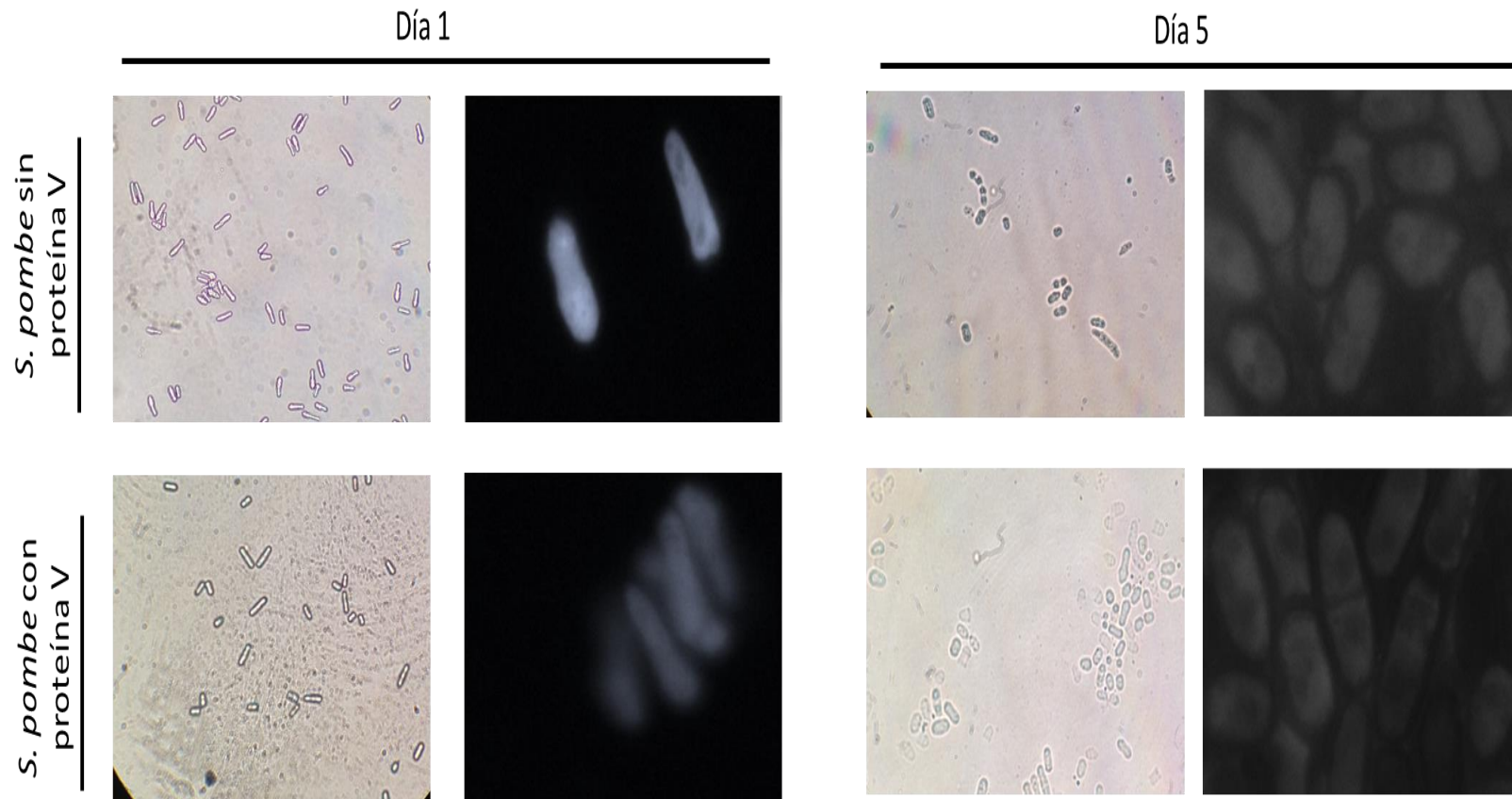


Figura 25. . Evaluación de la integridad de la pared celular de *S. pombe* en los días 1 y 5 de CLS. Se observa que en el día 1 de cultivo *S. pombe* presenta una morfología homogénea bacilar, conforme a lo descrito en la literatura (microscopía óptica) primera fila, a la vez se observa la integridad de la pared celular a través de la técnica de calcoflúor que se denota en gris (segunda fila) (microscopía de fluorescencia), esto se sabe por la intensidad del color gris y de la estructura de la pared bien definida.

10.2.3. EXTRACCIÓN DEL ARNm AL DÍA 5 DE CLS

Se realizó la extracción del ARNm de *S. pombe* con y sin la inducción de la proteína V a los 5^o día de CLS (**Fig. 26**) se observa que el ARN de todas las muestras sin degradación ya que no hay barridos en la parte superior de los carriles, pero sí uno ligero en la parte inferior, lo que corresponde de acuerdo a la literatura a los ARN pequeños.

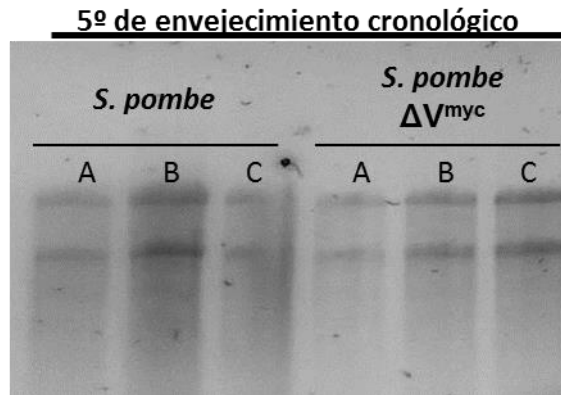


Figura 26. Extracción de ARN total de *S. pombe* y *S. pombe* ΔV^{myc} . Se llevó a cabo la extracción con el método de TRIzol para muestras de *S. pombe* (que no expresa a la proteína V) y a *S. pombe* ΔV^{myc} .

10.2.4. EVALUACIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA V, APOPTOSIS Y AUTOFAGIA POR RT-PCR

Con las muestras de ARNm obtenidas en el punto 9.2.4 se procedió a realizar RT-PCR para analizar el prendido y apagado de genes de la proteína V, Pcal, Atg5 y Atg8, así como del gen constitutivo actina (**Figura 27**).

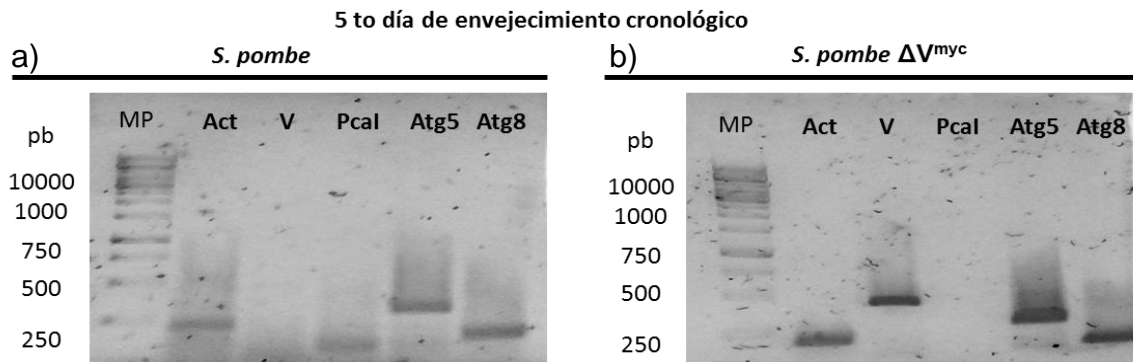


Figura 27. Evaluación por RT-PCR del gen de la proteína V, Pcal, Atg 5 y 8. a) Se observan los productos de RT-PCR correspondientes a *S. pombe* sin expresar a la proteína V. b) Productos de RT-PCR correspondientes a *S. pombe* ΔV^{myc} .

Se observa que en **(Fig. 27a)** que en las muestras de *S. pombe* la presencia del gen constitutivo actina, en el segundo correspondiente al gen de la proteína V no hay amplificación de su ARNm lo cual indica que estas células no expresan a la proteína de interés. Por otra parte, se observa la activación del gen Pcal lo cual corresponde a la literatura, que al quinto día de CLS el programa de muerte celular por apoptosis se encuentra encendido y también se encuentran presentes los genes de autofagia Atg5 y 8, lo cual indica que los programas de rescate celular se encuentran activos. Cuando se analizan las muestras de *S. pombe* ΔV^{myc} **(Fig. 27b)** se observa la disminución de la expresión del gen Pcal, lo cual podría estar relacionado con la presencia del gen de la proteína V, esto podría sugerir que esta proteína regula negativamente a la cascada apoptótica, sin embargo estudios *in silico* y experimentales de cómo pueden interaccionar estas proteínas es necesario para corroborar esta hipótesis; para esto en la siguiente sección se presentan los resultados de un análisis básico *in silico* entre estas proteínas. También se demuestra que en *S. pombe* ΔV^{myc} se encuentran activos los genes de autofagia Atg5 y 8.

Sin embargo, a pesar de demostrar la presencia de estos mensajeros por RT-PCR, es necesario cuantificar la expresión de estos por qPCR, así como de sus proteínas a través de Western Blot para conocer cuánto influye esta proteína en los procesos de apoptosis y la autofagia en el CLS de *S. pombe*.

10.3. ANÁLISIS *in silico* DE LAS PROTEÍNAS V Y Pcal

Debido a que el objetivo de este proyecto era analizar el efecto de la proteína V en el modelo de envejecimiento de *S. pombe* y su impacto en los procesos de apoptosis y autofagia que se encuentran relacionados a éste, se realizó un análisis de interacciones moleculares *in silico* entre la proteína V y Pcal, para determinar si era posible que estas proteínas interactuasen y por lo tanto entender de qué forma esto puede ser posible.

10.3.1. ANÁLISIS DE MOTIVOS DE LA PROTEÍNA V Y LA Pcal CON MOTIF SCAN

Un análisis primordial fue el de motivos de las proteínas de interés, cabe recordar que los motivos son secuencias consenso que confieren una característica específica a una biomolécula, en este caso este resultado brinda información para conocer si podrían interactuar entre sí y por lo tanto si la proteína V podría regular de forma negativa a la cascada apoptótica, para ello se utilizó el programa MotifScan (**Fig. 28a y b**).

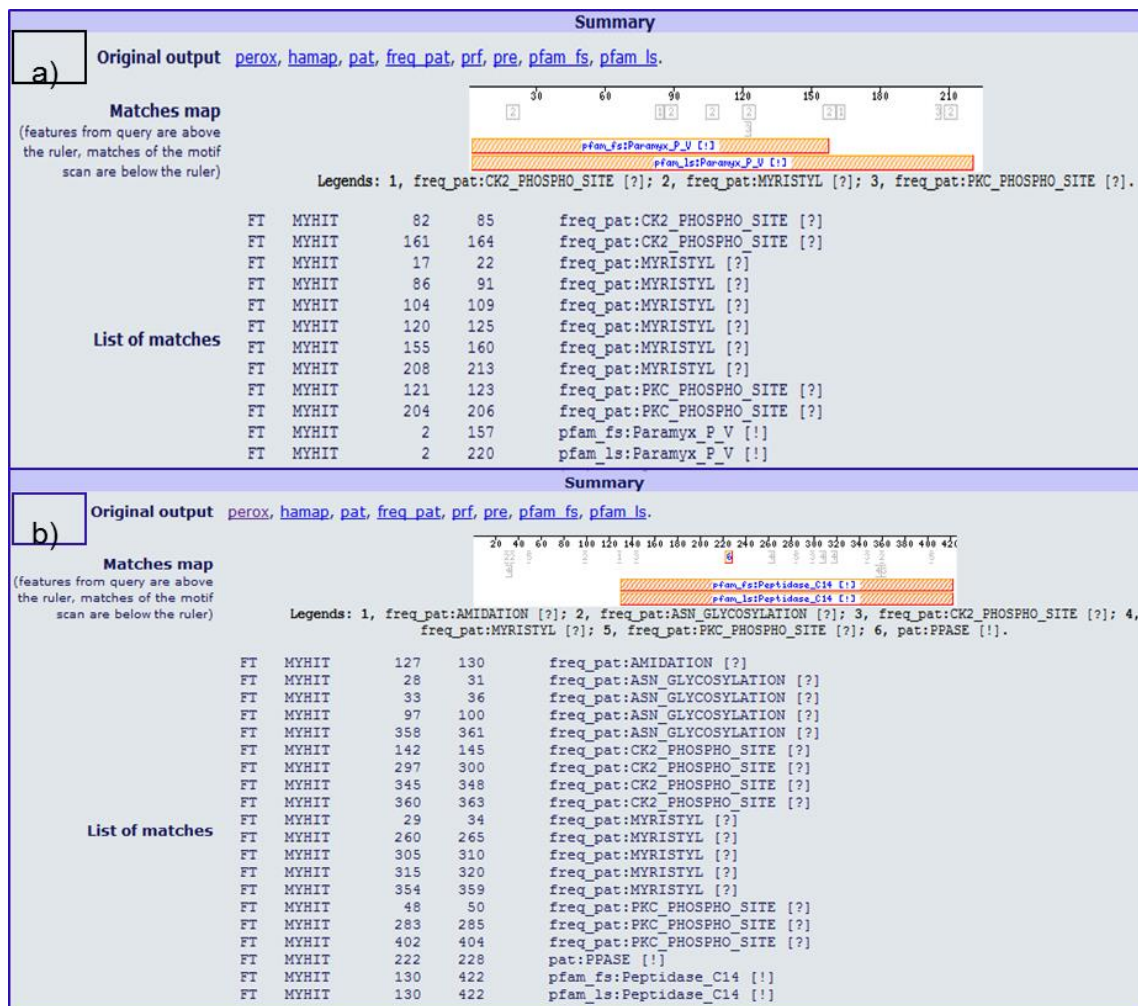


Figura 28. Análisis de motivos estructurales de la proteína V y Pcal. Se observa tanto en a como en b que en la parte superior del análisis existen la familia a la que pertenecen los dominios estructurales. En la parte inferior se encuentra la lista de motivos encontrados de acuerdo a su similitud encontrada en las bases de datos perox, hamap, pat, freq_pat, prf, pre, pfam_fs y pfam_ls.

En la proteína V y en la Pcal se encuentran motivos de fosforilación que son esenciales para la inducción/ inhibición de la actividad de las proteínas. Como se comentó en la sección 3.1 la proteína V posee un dominio de Trp (Sudol M, 2005), el cual le permite asociarse con las proteínas STAT (Kubota T., 2005; Enders G., 1996; Nishio M., 2005; Li T., 2006; Nishio M., 2002; Ulane C., 2005; Ramachandran A., 2009; Kubota T., 2001) lo que induce la poliubiquitinación de estas, ello es posible debido a que las STAT poseen motivos ricos en prolina o sitios fosforilados en serina-treonina-prolina. Por lo tanto, se realizó una segunda búsqueda de motivos estructurales en una base de datos especializada (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/predict.php>) en sitios fosforilados de este tipo, encontrando que la Pcal tiene 15 motivos de fosforilación (**Fig. 29**). En este segundo análisis se puede observar que hay una columna de análisis de expectación, donde entre más pequeño sea el valor hay más probabilidad de similitud o de que este sitio tenga una función en esta proteína, por lo cual los residuos tanto en la localización 8, 78 y 390 son motivos que biológicamente puedan ser regulatorios en la activación o desactivación de la Pcal, con análisis de la estructura secundaria, terciaria y mediante cálculos de energías libres se puede conocer si estos sitios tienen una disposición y una energía libre de Gibbs negativa ($-\Delta G$) que les permitan interaccionar con otros ligandos y por ende, si pudiese existir tal regulación.

Otro motivo encontrado en ambas proteínas es el de miristoilación (Patwardhan P., 2010), el cual su característica principal es la unión de un ácido graso de 14 carbonos (miristato) en el residuo terminal glicina de las proteínas objetivo, que se encuentra catalizado por la N-miristoiltransferasa (NMT), que es un regulador de la vía extrínseca de la apoptosis. Se ha reportado que la caspasa 3 (activada por el DISC), se ancla a diferentes proteínas que son subsecuentemente miristoiladas por la NMT; la proteína Bid, que una vez miristoilada se trasloca a la mitocondria donde induce la liberación de citocromo C, activando la vía intrínseca. Conociendo esto, podríamos suponer que si la proteína V induce la miristoilación de Pcal podría haber una disminución del anclaje de ésta

a sustratos como la actina y la gelsoina y con ello disminuyendo el desmantelamiento celular.

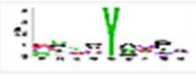



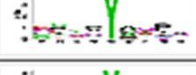







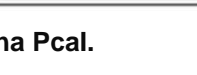
Locations (AA)	Phosphorylated Sites	HMM Bit Score	E-value	Catalytic Kinases	Predictive Models	
					HMMs	Logo
8	NSNPYNGGQ	0.9	5.1	Abl	HMM	
24	TRPNYSPNN	-1.7	68	INSR	HMM	
53	TRPQTDGNS	-5.1	30	MAPK	HMM	
78	NSHAYAPPS	1.7	21	INSR	HMM	
78	NSHAYAPPS	3.7	0.68	Abl	HMM	
78	NSHAYAPPS	-1.1	13	Syk	HMM	
92	TGANSYGNP	-3.9	29	PKG	HMM	
93	GANSYGNPN	-1.9	69	INSR	HMM	
98	GNPNYSGPQ	-0.1	46	INSR	HMM	
229	EVDGYDETI	-1.2	15	EGFR	HMM	
229	EVDGYDETI	-4.5	84	INSR	HMM	
345	QVRFSPADV	-1.6	25	cdc2	HMM	
390	PQLSYLQLL	1.4	1.7	Jak	HMM	
406	SNRYSQLPQ	-4.7	39	PKG	HMM	
414	QLSCSHPLD	-3.3	32	ATM	HMM	

Figura 29. Análisis de motivos estructurales de fosforilación de la proteína Pcal.

Sin embargo, la existencia de los motivos de fosforilación y mistirilación deben analizarse con la estructura terciaria de las proteínas, ya que con ello se conocerían sus disposiciones espaciales y con esto, si pudiesen interaccionar.

10.3.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y TERCIARIA DE LA PROTEÍNA V Y PCAI

Los avances en el campo de la bioinformática permiten la caracterización estructural *in silico* de una proteína lo cual es fundamental para predecir sus propiedades fisicoquímicas y con ello inferir su estructura, esto permite predecir la estructura- actividad con ligandos no caracterizados. Es por ello que el análisis *in silico* de la proteína V y de la Pcal brinda información importante para caracterizar su posible interacción a través de los dominios de triptófano, que es el sitio de interacción propuesto, basándonos en los dominios de interacción reportados para la proteína V.

La estructura tridimensional de una proteína puede determinarse a través de cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear, pero cuando las estructuras experimentales no se encuentran disponibles se puede hacer la representación del modelado por homología, es decir se busca en la base de datos PDB si existe el reporte de una estructura cristalográfica que tenga relación estructural con nuestra proteína de interés y se toman como plantilla las interacciones fisicoquímicas de sus residuos aminoacídicos. En este trabajo se realizó un modelaje por homología para las proteínas V y Pcal, con las estructuras plantilla 2hyeB (proteína V del virus 5 de simio) y pdb4f6oA (Ycal, metacaspasa de *S. cerevisiae*) alojadas en la base de datos (<http://www.rcsb.org/pdb/>), se realizó dicha elección tomando en cuenta los valores más pequeños de expectación para las proteínas (**Fig. 30**), el porcentaje de identidad (**Fig. 31**) para el caso de la proteína V la identidad fue de un 45%, mientras que para la metacaspasa, Pcal, de *S. pombe* fue del 44%, además se tomó en cuenta la resolución de la

estructura cristalográfica los cuales tenían valores de 3.10 y 1.68 Å y se encuentran dentro del rango recomendado para obtener un modelaje refinado.

a)
PSI-BLAST run 3 for Protена_0 V

TEMPLATE	E	FIRST	LAST	ID	ALIGNEMENT	COMMENT
<input checked="" type="checkbox"/> pdb2hyeB-0	7.000000e-71	8	220	45.000000	see alignment	PROTEIN BINDING 05-AUG-06 2HYE CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb2b5ID-0	2.000000e-69	12	220	44.000000	see alignment	PROTEIN BINDING/VIRAL PROTEIN 28-SEP-05 2B5L CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb2b5IC-0	8.000000e-69	13	220	45.000000	see alignment	PROTEIN BINDING/VIRAL PROTEIN 28-SEP-05 2B5L CROSS_PDB

b)
PSI-BLAST run 3 for Metacaspasa_0

TEMPLATE	E	FIRST	LAST	ID	ALIGNEMENT	COMMENT
<input checked="" type="checkbox"/> pdb4f6oA-0	1.000000e-78	75	425	44.000000	see alignment	HYDROLASE 15-MAY-12 4F6O CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb4afra-0	2.000000e-57	116	425	33.000000	see alignment	HYDROLASE 23-JAN-12 4AFR CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb4afvA-0	4.000000e-57	116	425	33.000000	see alignment	HYDROLASE 23-JAN-12 4AFV CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb4afpA-0	3.000000e-56	116	425	32.000000	see alignment	HYDROLASE 23-JAN-12 4AFP CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb4af8A-0	6.000000e-55	116	425	33.000000	see alignment	HYDROLASE 18-JAN-12 4AF8 CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb3bijA-0	5.000000e-32	128	418	24.000000	see alignment	STRUCTURAL GENOMICS, UNKNOWN FUNCTION 30-NOV-07 3BIJ CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb3bijB-0	5.000000e-32	128	418	24.000000	see alignment	STRUCTURAL GENOMICS, UNKNOWN FUNCTION 30-NOV-07 3BIJ CROSS_PDB
<input type="checkbox"/> pdb3bijC-0	5.000000e-32	128	418	24.000000	see alignment	STRUCTURAL GENOMICS, UNKNOWN FUNCTION 30-NOV-07 3BIJ CROSS_PDB

Figura 30. Selección de la estructura 3D plantilla. Se realizó la elección del templado de las estructuras en 3D de las proteínas SV5 y Yca1, teniendo en cuenta los valores más pequeños de expectación.

```

> NPSA gnl|3dseq|pdb2hyeB PROTEIN BINDING 05-AUG-06
a)
    =
    Length = 213

Score = 269 bits (689), Expect = 7e-71, Method: Composition-based stats.
Identities = 99/219 (45%), Positives = 120/219 (54%), Gaps = 14/219 (6%)

Query: 8  DETGDLIETGMNVANHFLSAPIQGTSSLGKATIIPGVAPVLIIGNPDQKNIQYPTASHQXX 67
        DE LIETG+N +F S + GTSSLGK TI PGV +L
Sbjct: 2  DEINKLIETGLNTVEYFTSQQVTGTSSLGKNTIPPVGTGLLTNAXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 61

Query: 68  XXXXXXXXXXXXP--IIVSSSEGGTGGTQIPEPLFAQTGGGIVTTVYQDPTIQPTGSYRSV 125
        P IV ++ G IP PL T + P+GSY+ V
Sbjct: 62  XXXXXXXXXXXPKIAIVPADDKTVPGKPIPNLLGLDSTPSTQIVLDLSGKTLPSGSYKGV 121

Query: 126 ELAKIGKERMNRVFEKPRTS----TPVTEFKRGAGSGCSRPNDRGGHREWSLSWVQG 181
        +LAK GKE ++ RF+E+PR + +FKRG +G G HRRE+S+ WV
Sbjct: 122 KLAKFGKENLMTRFIEEPRENPNXXXXXXXXDFKRGRTDG-----GFHRRREYSIGWVGD 173

Query: 182 EVRVFEWCNPICSPITAAARFHSCKCGNCPAKCDQCERD 220
        EV+V EWCNP CSPITAAAR C C CP C +CERD
Sbjct: 174 EVKVTEWCNPSCSPITAAARRFECTCHQCQPVTCSECERD 212

> NPSA gnl|3dseq|pdb4f6oA HYDROLASE 15-MAY-12
b)
    =
    Length = 343

Score = 297 bits (760), Expect = 1e-78, Method: Composition-based stats.
Identities = 156/352 (44%), Positives = 198/352 (56%), Gaps = 10/352 (2%)

Query: 75  SHAYAPPSGPPFPNTGANSYGNPNYSGPQLPNTQTQSYNLAGGGNFQYQYSTCQGRKALL 134
        S+ Y P +N YG P P TQT G + YQYS C G+RKAL+
Sbjct: 1  SNGY----NNPNVNASNMYGPPQNMSLPPPQTQTIQ----GTDQPYQYSQCTGRKALI 51

Query: 135  IGINYLNTQNELQGCINDVMSMSQLLIQRYGKQEDMVMIMTDTASNQRAIPTRQNMLDAM 194
        IGINY+ ++N+L+GCIND ++ L YGY +D+VI+TD ++ +PTR NM+ AM
Sbjct: 52  IGINYIGSKNQLRGCINDAHNIFNFLTNGYGYSSDDIVILTDDQNDLVRVPTRANMIRAM 111

Query: 195  RWLVSDAQPNDAFFHYSGHGGQTKDLGDDEVVDGYDETIYPLDHQYAGQIIDDEMHEIMV 254
        +WLVD AQPNDA LF HYSGHGGQT D+ IYP+D + G IIDDEM+IMV
Sbjct: 112 QWLVKDAQPNDSLFLHYSGHGGQTXXXXXXXXXXXXXDVIYVPVDFETQGP IIDDEMHDIMV 171

Query: 255  KPLPAGCRLTALFDSCHSGGALDLPFTYSTKGVLKEPNM-LKESGMDVLHAGLSYASGDI 313
        KPL G RLTALFDSCHSG LDLP+TYSTKG++KEPN+
Sbjct: 172 KPLQQGVRLTALFDSCHSGTVLDLPYTYSTKGIIKEPNIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 231

Query: 314  MGAINNVKNIFTSATNGFNNNALQYSRQVKFSPADVISLSGCKDNQTSADTSVNGFATGA 373
        FS ADV+ LSG K TGA
Sbjct: 232 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFSAADVVMLSGSKXXXXXXXXXXXXXXXXX 291

Query: 374  LSYAFREVVTQNPQLSYLQLLRGIRQVLSNKYSQLPQLSCLSHPLDMNLAMVL 425
        +S+AF +V+T PQ SYL LL+ +R+ L+ KYSQ PQLS SHP+D+NL ++
Sbjct: 292 MSHAFIKVMTLQPQQSYLSLLQNMRELKAGKYSQKPLSSSHPIDVNLQFIM 343
    
```

Figura 31. Identidad del templado. a) Identidad de la plantilla 2hyeB y de la proteína V, con el programa Geno3D, se observa que la comparación por homología se inicia en el residuo 8 y se identifican sólo 213 residuos de la proteína V, utilizando este templado se obtuvo una identidad del 45%. b) Identidad de la plantilla pdb4f5oA y de la Pcal, la homología comienza en el residuo 75 y termina en el 374, se identifican 343 residuos de Pcal, obteniéndose un 44% de identidad.

Los resultados se obtuvieron en formato *.pdb, se visualizaron en el programa YASARA, en donde tomando la información obtenida en la sección 10.3.1 de motivos estructurales, se identificó el motivo de Trp reportado para la proteína V, esto es de vital importancia porque se propone que a través de este interacciona con Pcal a través de sus motivos de fosforilación. Se analizó la distribución espacial de los sitios de mistirilación y si se encontraban en la parte interna de la proteína se eliminaron como posibles sitios de interacción, ya que tanto estérica como energéticamente sería difícil acceder a estos ellos, los motivos que se encontraron en la parte externa de la proteína se marcaron como sitios posibles de fácil interacción (**Fig. 32a y b**). Para la Pcal se identificaron todos los posibles sitios de fosforilación y mistirilación, se analizó su distribución espacial y se realizó el mismo procedimiento de inclusión y exclusión (**Fig. 32c y d**). Se encontró que el sitio de fosforilación en tirosina 78 podría ser reconocido debido a su disposición espacial, esto se corroboró a través de una simulación de docking descrita en la sección 10.3.3.

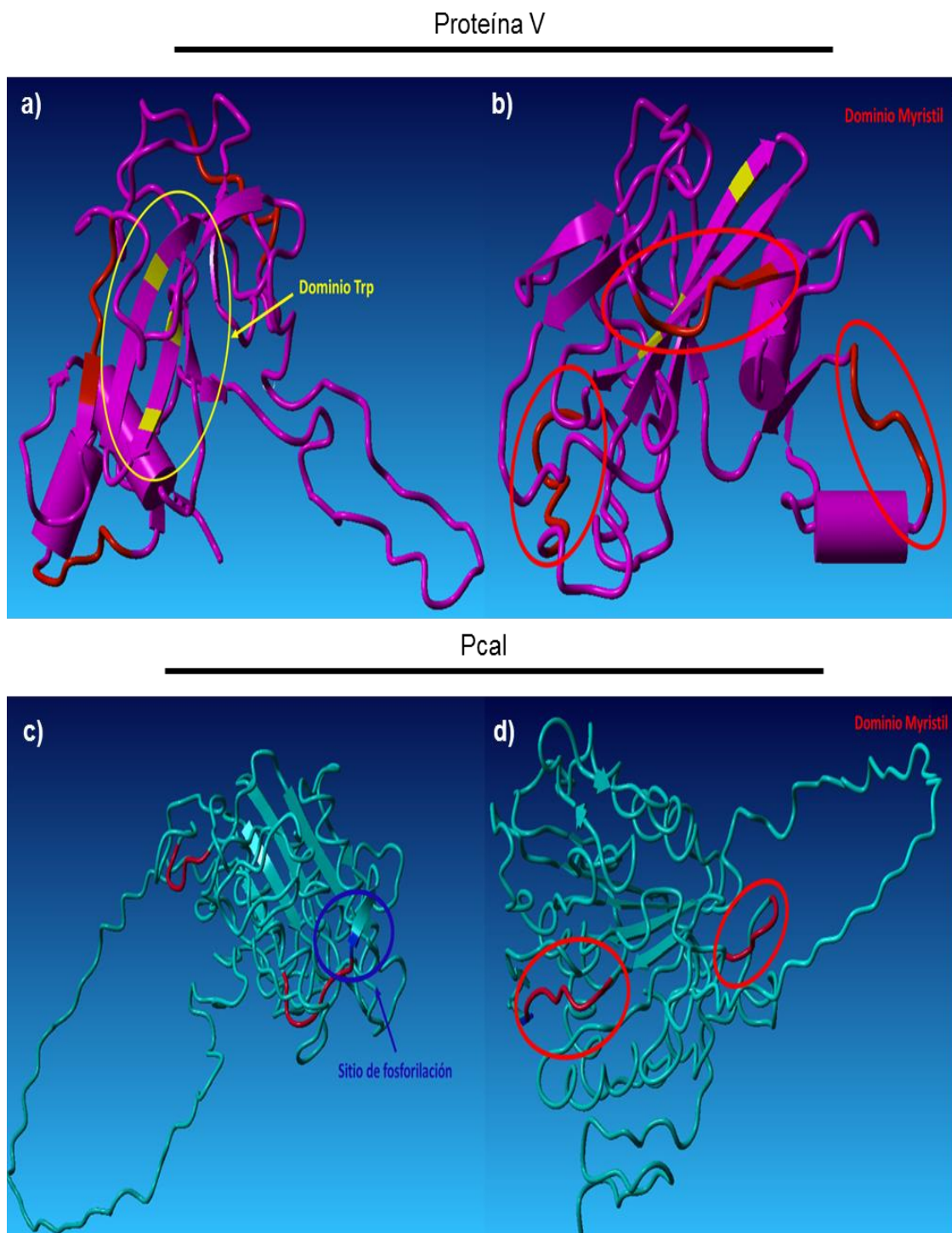


Figura 32. Modelos de las estructuras terciarias de las proteínas V y Pcal generadas con el programa Geno3D. Las estructuras se visualizan con el programa YASARA. a y b) Modelo tridimensional de la proteína V, en a) se observa en amarillo el dominio de triptófano y en b) con rojo los motivos de mistirilación. c y d) Modelo tridimensional de Pcal, en c) se denota en color azul el sitio de fosforilación y en d) de color rojo los sitios de mistirilación.

10.3.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE LA PROTEÍNA V Y Pcal CON YASARA

Con la información obtenida tras el análisis de motivos y de localización (**sección 10.3.1 y 10.3.2** se hizo un análisis de interacciones moleculares entre dichas proteínas en el programa PatchDock. (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). La entrada de datos en este programa está conformada por la estructura tridimensional de la molécula receptora (Pcal) y el ligando (proteína V) en formato *.pdb. Se obtuvieron los resultados de la (**Fig. 33**). Se proporciona número de soluciones al cual está asociado al orden de transformaciones realizadas, el valor del área es proporcional al área de interacción entre las moléculas y el valor de ACE el cual muestra la contribución de la energía de contacto atómico (ACE) a la energía global de unión (Duhovny D., 2002; Champ P., 2007).

Receptor	Ligand	Complex Type	Clustering RMSD	User e-mail	Receptor Site	Ligand Site	Distance Constraints
Metacaspase.pdb	V2_1.pdb	Default	4.0	grs.pharm@gmail.com	-	-	-

Solution No	Score	Area	ACE	Transformation	PDB file of the complex
1	17900	3082.40	-462.47	-1.74 0.60 -0.63 -29.37 63.05 90.59	result.1.pdb
2	17038	2506.40	5.67	1.15 0.63 2.67 -9.93 66.29 -39.64	result.2.pdb
3	16798	2327.40	65.21	-3.09 0.40 -0.56 14.29 70.61 28.79	result.3.pdb
4	16762	2719.00	19.85	1.40 0.07 2.88 22.51 52.46 -48.66	result.4.pdb
5	16556	2294.50	-428.75	-0.48 -0.01 0.59 17.27 -34.95 92.87	result.5.pdb
6	16488	2781.40	-319.45	-1.84 0.34 -0.63 -13.57 61.21 98.48	result.6.pdb
7	16324	2502.90	70.43	-1.10 0.11 2.12 37.11 19.59 107.46	result.7.pdb
8	16258	2805.50	-639.78	0.60 0.52 -1.41 -67.97 -1.57 10.86	result.8.pdb
9	16204	2218.80	-75.93	0.15 0.74 -1.98 -47.69 56.88 42.09	result.9.pdb
10	15988	2646.40	242.52	-1.22 -0.53 -1.16 -10.82 -12.72 108.47	result.10.pdb
11	15920	2555.40	-109.50	2.70 -0.47 -0.70 50.22 72.53 -29.22	result.11.pdb
12	15908	2405.50	130.21	-0.89 0.09 2.22 48.54 34.06 101.60	result.12.pdb
13	15752	3382.30	-315.06	-1.54 1.11 -1.13 -15.74 98.03 34.17	result.13.pdb
14	15708	2631.40	329.77	-1.33 -0.31 -1.16 -8.59 1.24 114.82	result.14.pdb
15	15684	2358.00	-352.31	-1.17 -0.26 2.92 -10.54 27.80 109.89	result.15.pdb
16	15490	2365.40	-251.55	0.09 0.61 -2.99 -1.37 83.43 39.44	result.16.pdb
17	15446	2497.90	-664.35	3.06 1.44 1.34 -77.27 45.24 3.45	result.17.pdb
18	15424	2474.80	-8.83	1.13 0.42 1.37 44.30 26.76 -3.94	result.18.pdb
19	15422	2393.30	-15.97	-0.68 1.09 0.05 -46.18 -24.87 58.29	result.19.pdb
20	15394	2247.10	-243.89	1.58 -0.67 -1.56 -10.81 87.53 -25.51	result.20.pdb

Figura 33. Resultados arrojados por el programa PatchDock de interacciones de la proteína Pcal y la proteína V.

Cabe destacar que los resultados de PatchDock se encuentran basados en un criterio geométrico (**Fig. 34**), es decir, sólo se toman en cuenta las áreas expuestas en el modelo tridimensional, pero se sabe que las moléculas pueden modificar sus conformaciones estéricas para encontrarse en un estado de energía menor y por lo tanto tener una mejor estabilidad, por lo tanto el incluir consideraciones energéticas en los criterios de interacción de proteína-proteína refinarían los resultados de interacción obtenidos, pero los resultados obtenidos en PatchDock no son despreciables, porque brindan evidencia de la existencia de posibles interacciones. Se encontró que el sitio de fosforilación en tirosina 78 es un sitio potencial de interacción entre dichas proteínas, sin embargo es necesario el refinamiento de este modelo en base a las energías de cada residuo, así como la energía global del sistema.

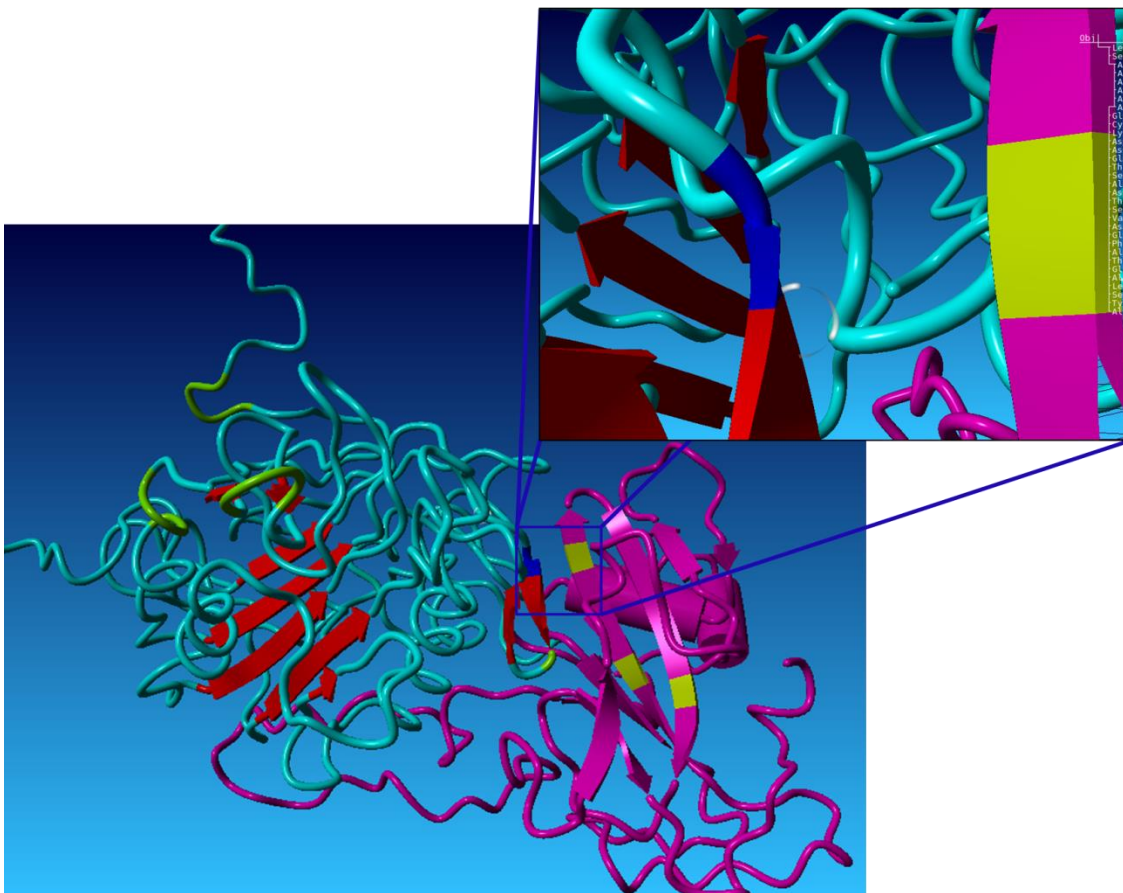


Figura 34. Análisis de interacciones moleculares de la proteína V y Pcal. La simulación se hizo en el programa PatchDock, el cual nos brinda información geométrica del docking entre las proteínas.

11. CONCLUSIONES

- Se construyeron dos vectores recombinantes que expresan el gen de la proteína V con un motivo de 6 histidinas y otro con la etiqueta c-myc en el extremo N-terminal.
- El ARNm de la proteína V se encuentra encendido en *S. pombe* ΔV^{myc} en el 5º día de CLS, su presencia se relaciona a la disminución de la expresión del mensajero de Pcal y a la conservación de la integridad de la pared celular, así como con la expresión de los genes de autofagia Atg5 y 8. Dichas evidencias sugieren que la proteína V regula de forma negativa a la apoptosis, mientras que procesos de rescate celular como la autofagia, se encuentran activos.
- Se realizó un análisis de motivos e interacciones moleculares de la proteína V y Pcal, encontrándose posibles sitios de interacción entre estas a través de los motivos Trp y de fosforilación en tirosina 78, respectivamente.

12. PERSPECTIVAS

- Cuantificar la expresión de los genes de la proteína V, Pcal, Atg1, 4, 5, 8 y 14 a través de qPCR y de sus proteínas por la técnica de Western Blot para determinar si la expresión de ésta influye en los procesos de apoptosis y la autofagia en el CLS de *S. pombe*.
- Hacer un sistema de doble híbrido para determinar si la proteína V y Pcal pueden interaccionar.
- Refinar el modelo de docking de la proteína V y Pcal, tomando en cuenta parámetros energéticos y compararlo con el sistema doble híbrido.

13. ANEXO 1 REACTIVOS

EMM base

Reactivo	Concentración	
Ácido ftálico	3.3 g	
Na ₂ PO ₄	2.48 g	Aforado a 1 L, pH 5.0
NH ₄ Cl	5.5 g	Esterilizado a 15 lbs 20 minutos
Sales 50X	22.2 g	
Glucosa 20%	200 mL	

Complejo vitamínico 1000X

Reactivo	Concentración
Ácido pantoténico	10 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Inositol	100 mg
Biotina	100 mg

Complejo de Minerales 10 000X

Reactivo	Concentración
Ácido bórico	50 mg
MnSO ₄ H ₂ O	45 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	72 mg
Ácido molibdico	17 mg
KI	16 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	10 mg
Ácido cítrico	4 mg

Sales 50X

Reactivo	Concentración
MgCl ₂ 6 H ₂ O	5.35 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	75 mg
KCl	5 g
Na ₂ SO ₄	200 mg

Medio LB

Reactivo	Concentración	pH 7
Triptona	1%	Esterilizado a 15 lbs 20 minutos
NaCl	1%	
Extracto de levadura	0.5%	
Agar	3%	

Cloruro de Calcio

Composición	Concentración	Esterilizado a 10 lbs 10 minutos
CaCl * 2H ₂ O	100 mM	
H ₂ O	50 mL	

Medio YNB

Reactivo	Concentración	Esterilizado a 10 lbs 10 minutos
YNB	0.67 g	Para hacer placas de medio YNB se le agregó el 3% de agar y después se esterilizó bajo las mismas condiciones.
Glucosa	2 g	
Acetato de Na	1 g	
Cloruro de K	0.09 g	
Leucina	25 mg	

Acetato de Litio-Sorbitol

Reactivo	Concentración	Esterilizado a 10 lbs 10 minutos
Acetato de Litio	100 mM	
Tris	10 mM pH 8	
EDTA	1 mM	
Sorbitol	1M	

40% PEG/LiOAc/TE

Reactivo	Concentración	Esterilizado a 10 lbs 10 minutos
Acetato de Litio	100 mM	
Tris	10 mM pH 8	
EDTA	1 mM	
40% PEG 4000		

14. ANEXO 2 TRANSFORMACIÓN

14.1. VECTOR DE CLONACIÓN pJET1.2/blunt

Se realizó el primer protocolo de clonación de los productos de PCR en el vector pJET1.2/blunt para aumentar la tasa de eficiencia en las reacciones de restricción posteriores, ya que esto se encuentra relacionado con la eficiencia de la reacción de ligación del vector de expresión pRSP2 y el gen de interés, por ende de la tasa de éxito de la transformación de *S. pombe*, a pesar de que no se mide éste parámetro es importante para la obtención de transformantes.

El plásmido pJET1.2/blunt es un vector linearizado (**Fig. 35**) que acepta insertos de 6 bp a 10 Kb, contiene el gen AmpR que confiere resistencia a ampicilina (Amp), carbenicilina y antibióticos relacionados lo que permite la identificación de las clonas transformantes, posee un sitio ori que es el sitio de origen de replicación, así como el promotor T7 de la ARN polimerasa para la transcripción *in vitro* del inserto clonado (T7), también contiene un sitio polylinker o un sitio de múltiple clonación (MCS) en el cual se ligaron de forma independiente los dos productos de PCR. La ligación en este vector puede realizarse con productos de PCR con extremos romos o cohesivos, para este trabajo primero se repararon los extremos para que fuesen romos, ya purificado el ADN de la clona transformante se realizó la reacción de restricción para generar extremos cohesivos.

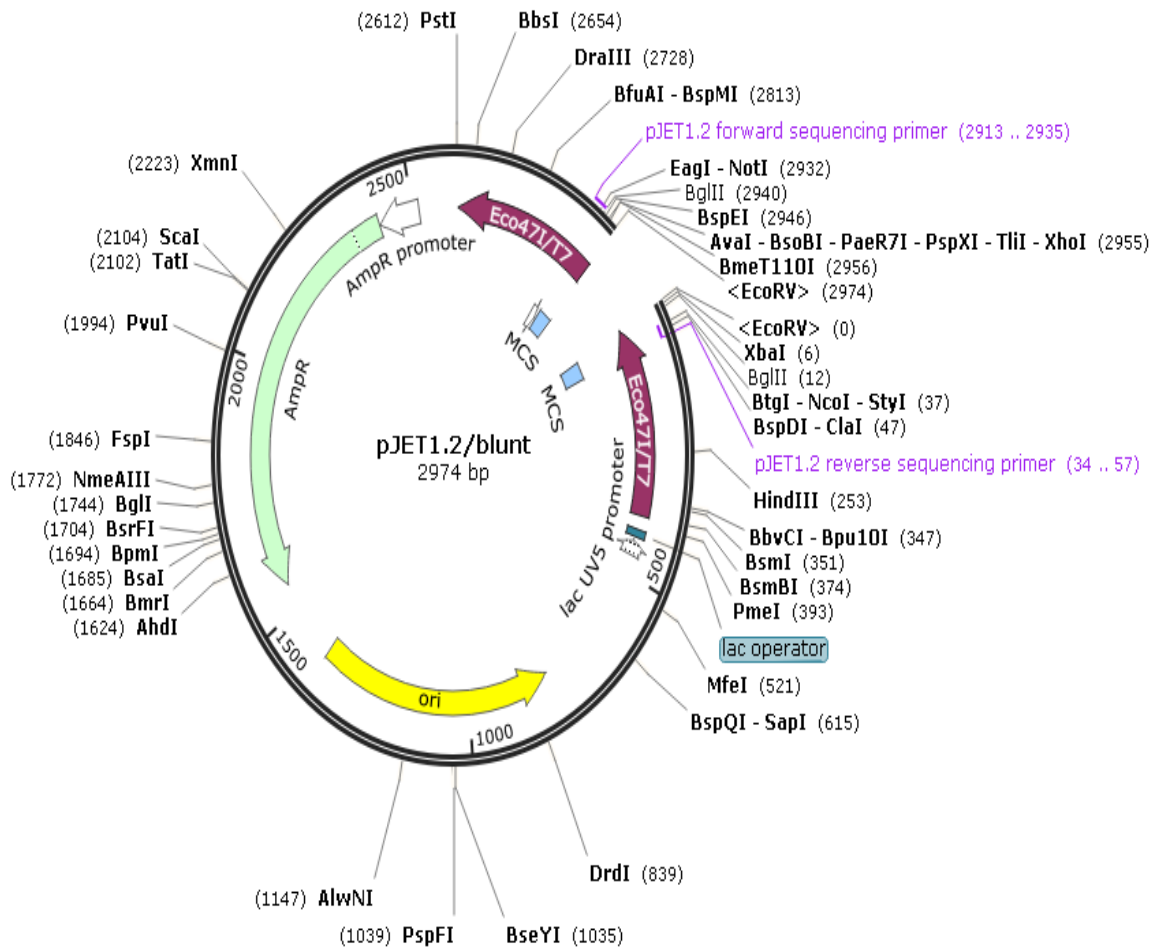


Figura 35. Esquema del plásmido pJET2.1/blunt.

14.2. PLÁSMIDO pGLO

Este plásmido es utilizado como un control positivo en las clonaciones con *E. coli*. Posee la característica que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), tiene un gen *araC* que permite el encendido y apagado del gen GFP, posee el gen de resistencia a antibióticos (AmpR), así como un sitio *ori* que es el sitio de origen de replicación (**Fig. 36**).

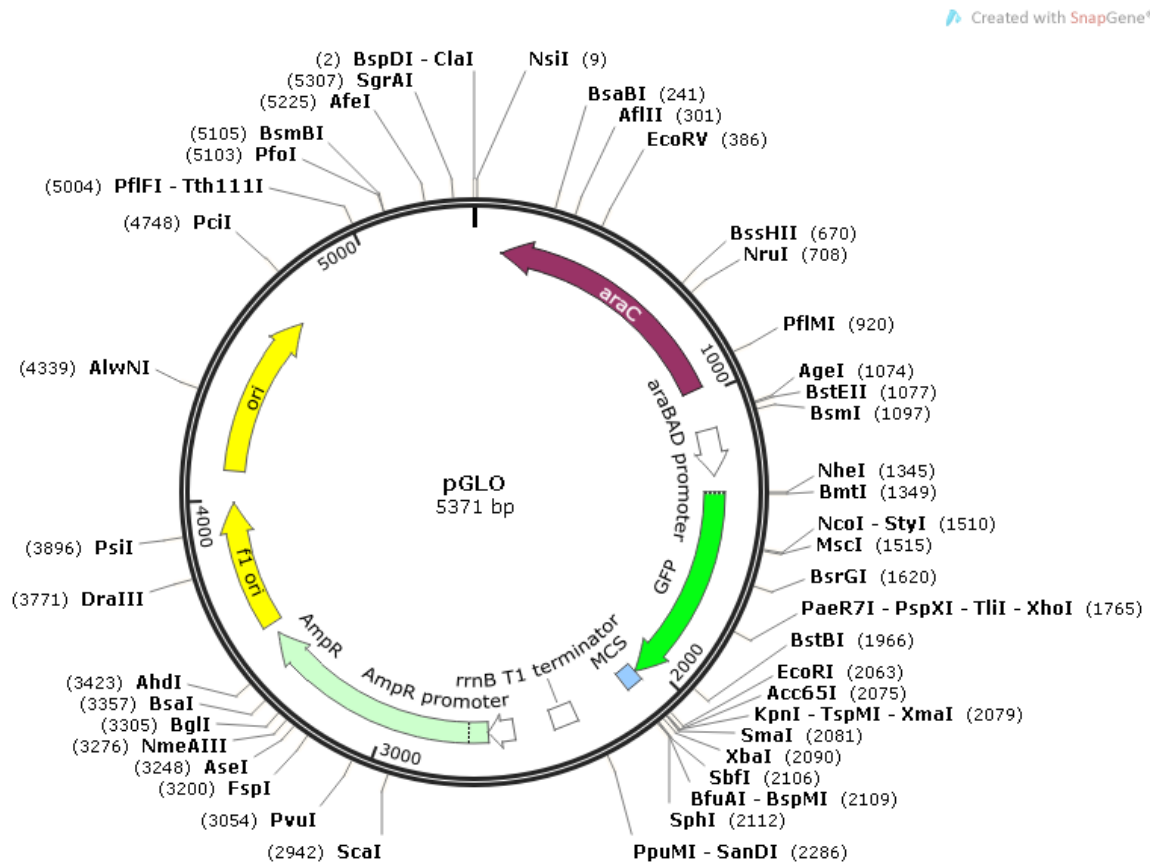


Figura 36. Esquema del plásmido pGLO.

14.3. VECTOR DE EXPRESIÓN pRSP2

En este vector se subclonó al gen de la proteína V con extremos cohesivos, flanqueado con las enzimas de restricción AclI/XmaI y NotI/XmaI, para con él transformar a la levadura *S. pombe* y así poder expresar a la proteína V en este modelo de envejecimiento. Contiene un MCS o polylinker, un sitio de origen de replicación para levaduras (*ars1*), promotor de tiamina (*nmt1*), promotor y gen de selección para levaduras de leucina (*LEU2*), así como un origen de replicación para bacterias y un promotor gen de ampicilina (*AmpR*).

Este vector posee la característica de tener genes de bacterias y levaduras (**Fig. 37**), con la finalidad de clonarlo en *E. coli*, ya identificado y purificado el ADN de las colonias transformantes se procede a la transformación de *S. pombe*, el medio de selección de las levaduras es a través del gen de leucina, las levaduras que acepten el inserto pueden crecer en un medio de selección (caldo YNB) sin leucina. Para promover la expresión de la proteína de interés se realizó el procedimiento descrito en la sección 9.2.2.

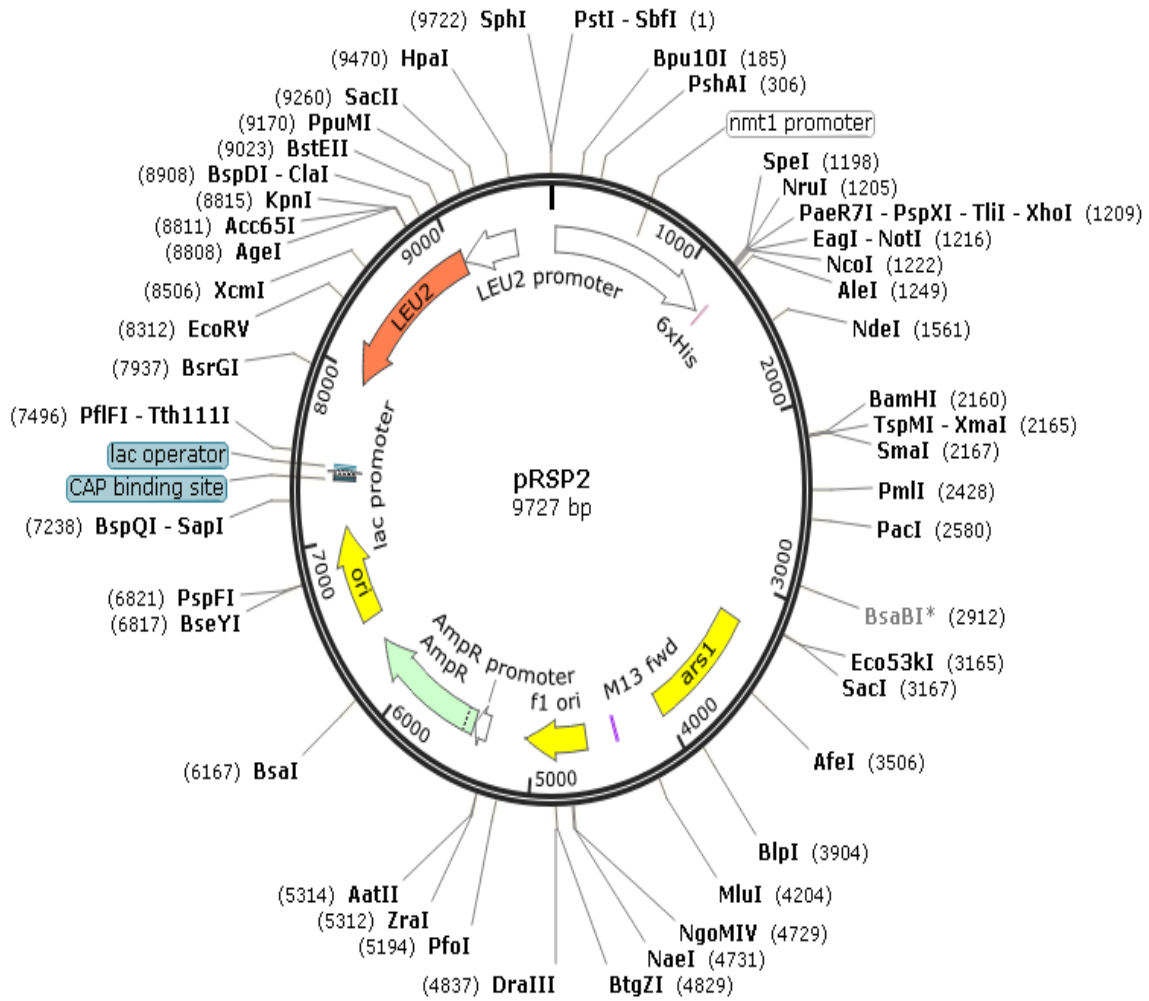


Figura 37. Esquema del vector pRSP2.

15. BIBLIOGRAFÍA

Águila E. & Kapteyn A. (2011). Envejecer en México: Condiciones de vida y salud. México: RAND Corporation.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2007). Molecular biology of the cell. Estados Unidos: Garland.

Aligué R. (2011). Cell signaling and cell cycle regulation. Septiembre 25, 2014, de Universitat de Barcelona Sitio web: http://www.ub.edu/bciap/en/research_groups/senyalitzacio-i-regulacio-de-la-divisio-cel%C2%B7lular/

Bernis C., (2004). Envejecimiento, poblaciones envejecidas y personas ancianas. Antropo, 6, 1-14.

Bondy S. & Maiese K. (2010). Aging and age-related disorders. Nueva York: Springer.

Breitenbach M, Jazwinski S & Laun P. (2012). Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. En Aging Research in Yeast(101-21). Londres: Springer.

Breitenbach, M. & Jazwinski, SM. (2012). Aging and the survival of quiescent and non-quiescent cells in yeast stationary-phase cultures. En Aging Research in Yeast(365). Nueva York: Springer.

Burhans WC., Weinberg M., Marchetti MA., Ramachandran L., D'Urso G. & Huberman JA. (2003). Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. Mutation Research, 532, 227-43.

Buttner S., Eisenberg T., Herker E., Carmona-Gutierrez D., Kroemer G., Madeo F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love and war. *The Journal of Cell Biology*, 175, 521-25.

Calabrese V., Butterfield D. & A. M. Stella H. (2008). Aging and Oxidative Stress Response in the CNS. En *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Development and aging changes in the nervous system*, (104-46). Estados Unidos: Springer.

Calderwood SK., Murshid A. & Prince T. (2009). The Shock of Aging: Molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging – A mini-review. *Gerontology*, 55, 550-8.

Campisi J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *The Annual Review of Physiology*, 75, 685–705.

Cebollero E. & Reggiori F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1413-21.

Champ P. & Camacho C. (2007). FastContact: a free energy scoring tool for protein–protein complex structures. *Nucleic Acids Research*, 35, 1-5.

Cooper D. (2012). The balance between life and death: Defining a role for apoptosis in aging. *Clinical & Experimental Pathology*, 21, 1-10.

Das U. (2011). *Molecular basis of health and disease*. Nueva York: Springer.

Duhovny D., Nussinov R. & Wolfson H. (2002). Efficient unbound docking of rigid molecules. *Springer*, 2452, 185-200.

Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.

Enders G. (1996). Paramyxoviruses. En *Medical Microbiology* (597-608). Galveston: Universidad de Texas.

Fabrizio P. & Longo VD. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1783, 1280-85.

Fernandez-García E. (2005). Teorías del envejecimiento: Etapas de la edad senil. *Revista digital: Investigación y educación*, 3, 1-8.

Fleury C., Pampin M., Tarze A. & Mignotte B. (2002). Yeast as a model to study apoptosis?. *Bioscience Reports*, 22, 59-81.

Friedman DB. and Johnson TE. (1988). A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* Jan 1; 118(1): 75–86.

Gelino S. & Hansen M. (2012). Autophagy- An emerging anti-aging mechanism. *Journal of Clinical Experimental Pathology*, 4, 1-24.

Guarente L (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* May 1; 14(9): 1021–1026

Hay S. & Kannourakis G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *Journal of General Virology*, 83, 1547-64.

Holliday R. (2007). *Aging: The paradox of life*. Países Bajos: Springer.

Ink B., Zorning M., Baum B., Hajibagheri N., James C., Chittenden T. & Evan G. (1997). Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 17, 2468-74.

Jan A. (Agosto 20, 2010). *Schizosaccharomyces pombe*. Septiembre 25, 2014, de Kenyon college Sitio web: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Schizosaccharomyces_pombe

Jazwinski S. (2000). Aging and longevity genes. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 269–79.

Jazwinski SM. (1996). Longevity, genes, and aging. *Science* 273(5271): 54–59.

Johnson B, Sinclair D & Guarente L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell*, 96, 291–302.

Kaeberlein M., Burtner C., & Kennedy B. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS Genetics*, 3, 655-60.

Kaminsky V. & Zhivotovsky B. (2010). To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery. *Journal of Internal Medicine*, 267, 473-82.

Kraft C., Reggiori F. & Peter M. (2009). Selective types of autophagy in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1404-12.

Kubota T., Yokosawa N., Yokota S. & Fuji N. (2001). C terminal CYS-RICH Region of mumps virus structural V protein correlates with lock of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283, 255-9.

Kubota T., Yokosawa N., Yokota S., et al. (2005). Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *American Society for Microbiology*, 79, 4451-59.

Kundu M. & Thompson CB. (2008). Autophagy: Basic principles and relevance to disease. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3, 427-55.

Lamkanfi M. & Dixit V. (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*, 8, 44-54.

Li T., Chen X., Garbutt KC., Zhou P. & Zheng N. (2006). Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: Viral Hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell*, 124, 105–17.

Lin SJ. & Austriaco, N. (2014). Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 14, 119–35.

Lionaki E., Markaki M. & Tavernarakis N. (2013). Autophagy and ageing: Insights from invertebrate model organisms. *Ageing Research Reviews*, 12, 413-28.

Li-qiang H., Jia-hong L.. & Zhen-yu Y. (2013). Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. *Acta Pharmacologia Sinica*, 34, 605-11.

López M. & Torres C. (2012). Aspectos moleculares del envejecimiento. México: Instituto de Geriatria.

López-Osorno J. (2010). Construcción de un vector recombinante que exprese la leucinaminopeptidasa yspII con un motivo de 6 histidinas en el extremo N-terminal (Tesis de Licenciatura). Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular-ICUAP. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

López-Otín C., Blasco A., Partridge L., Serrano M. & Kroemer G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-1217.

Lu B., Hong-Duo C. & Lu H.. (2012). The relationship between apoptosis and aging. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 705-711.

Mazzoni C. & Falcone C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1320-27.

Mitsuhiro Y. (2003). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology*, 3, 1-4.

Mukaiyama H., Nakase M., Nakamura T., Kakinuma Y. & Takegawa K. (2010). Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters*, 584, 1327-34.

Nakatogawa H., Suzuki K., Kamada Y. & Ohsumi Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanism: lessons from yeast. *Molecular Cell Biology*, 10, 458-68.

Nikoletopoulou V., Kyriakakis E. & Tavernarakis N. (2014). Cellular and molecular longevity pathways: the old and the new. *Cell*, 25, 212-23.

Nishio M., Garcin D., Simonet V. & Kolakofsky D. (2002). The carboxyl segment of the mumps virus v protein associates with Stat proteins in vitro via a tryptophan-rich motif. *Virology*, 300, 92-9.

Nishio M., Tsurudome M., Ito M., Garcin., Kolakofsky D. & Yasuhiko I. (2005). Identification of paramyxovirus V protein residues essential for STAT protein degradation and promotion of virus replication. *Journal of virology*, 79, 8590-601.

Partida B. (2008). Proyecciones de la población de México, de las entidades federativas, de los municipios y de las localidades, 2005-2050 (Documento Metodológico). Septiembre 21, 2014, de CONAPO Sitio web: <http://www.portal.conapo.gob.mx/00cifras/proyecta50/proyecciones.pdf>

Patwardhan P. & Resh M. (2010). Myristoylation and Membrane Binding Regulate c-Src Stability and Kinase Activity. *Molecular and Cell Biology*, 30, 4094-4107.

Ramachandran A. & Horvath CM. (2009). Paramyxovirus disruption of interferon signal transduction: STATs report. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29, 531-8.

Rastogi R., Rajeshwar P. & Sinha P. (2009). Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal*, 8, 155-181.

Rattan S. (2006a). Biological causes of aging and age-related diseases. En *Prevention and Treatment of Age-related Diseases(1-13)*. Nueva York: Springer.

Rattan S. (2006b). Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radical Research*, 40, 1230-38.

Richard E. (2004). *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe: Genetics, Genomics and Beyond*. Nueva York: Springer Science & Business Media.

Rosas-Murrieta NH., Herrera Camacho I., Palma-Ocampo H., Santos-López G. & Reyes-Leyva J. (2010). Interaction of mumps virus V protein variants with STAT1-STAT2 heterodimer: experimental and theoretical studies. *Virology Journal*, 7, 1-10.

Rosas-Murrieta NH., Santos-López G., Reyes-Leyva J., Sosa F. & Herrera-Camacho I. (2011). Modulation of apoptosis by V protein mumps virus. *Virology Journal*, 8, 1-7.

Roux A, Chartrand P, Ferbeyre G & Rokeach L. (2010). Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *Journal of Gerontology*, 65, 1-8.

Roux A., Quissac A., Chartrand P., Ferbeyre G. & Rokeach L. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, 5, 345-57.

Roux AE., Leroux A., Alaamery MA., Hoffman CS., Chartrand P., et al. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a g protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS Genetics*, 5, 1-17.

Santos J., Leao C. & Sousa J. (2012). Growth culture conditions and nutrient signaling modulating yeast chronological longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-10.

Sudol M, Recinos C., Abraczinskas J., Humbert J. & Amjad F. (2005). WW or WoW: The WW Domains in a Union of Bliss. *Taylor and Francis*, 57, 773-78.

Su-Ju L. & Austriaco N. (2013). Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 14, 119-35.

Sunnerhagen P & Piskur J. (2006). *Schizosaccharomyces pombe* comparative genomics; from sequence to systems. En *Comparative Genomics*(289). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.

Takeda K. & Yanagida M. (2010). In quiescence of fission yeast, autophagy and the proteasome collaborate for mitochondrial maintenance and longevity. *Landes Bioscience*, 6, 564-65.

Tollefsbol TO. (2009). *Epigenetics of aging*. Estados Unidos: Springer.

Ulane CM., Kentsis A., Cruz CD., et al. (2005). Composition and assembly of STAT-Targeting ubiquitin ligase complexes: paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. *Journal of Virology*, 79, 10180-9.

Váchoá L. & Palková Z. (2006). Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. *FEMS Yeast Research*, 7, 12-21.

Wolf N. (2009). *The Comparative biology of aging*. Dordrecht Heidelberg: Springer

Xu Q., Jürgensmeier M. & Reed J. (1999). Methods of assaying Bcl-2 and Bax family proteins in yeast. *Methods*, 4, 292-304.

Zuin A., Castellano-Esteve E., Ayté J., & Hidalgo E. (2010). Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. *Impact aging*, 4, 231-7.