



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

**Producción de Toxina *Killer K1* de *Saccharomyces cerevisiae* y su relación
en la regulación de volumen.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Microbiología

Presenta:

Amairani Chávez Vega

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Presidente

Dra. Verónica Morales Tlalpan

Secretario

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Dr. Joel Edmundo López Meza

Vocal

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Julio 2023
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Producción de Toxina Killer K1 de *Saccharomyces cerevisiae* y su relación en la regulación de volumen

por

Amairani Chávez Vega

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: CNLIC-267495

Resumen

El fenotipo *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae* se caracteriza por la producción de una toxina capaz de inhibir el crecimiento de cepas sensibles no productoras de la misma. Este sistema simbiótico entre dos virus ARNdc y la levadura se ha conocido durante las últimas décadas, en las cuales se ha generado conocimiento sobre su origen, mecanismos de acción y las diferentes variables que afectan al sistema, entre las que destacan: el tipo de proteína *Killer*, pH, temperatura, relación entre la cepa productora y la cepa sensible, así como los medios de cultivo e inductores. En este estudio, se evaluó la producción de la toxina *Killer K1* bajo el efecto de un choque osmótico (KCl 1 M) y la capacidad de regulación del volumen celular ante éste, utilizando un nuevo medio inductor con una alta concentración de Fe^{+3} . Los resultados indican que durante el evento de choque osmótico y altas concentraciones de Fe^{+3} , la producción de la toxina *Killer* se ve potenciada al mismo tiempo que se provoca un cambio en la edición del ARNm codificante para la toxina *K1*. Tomando todo esto en cuenta, se ha podido obtener una mayor producción de la toxina *Killer* en distintos momentos del estudio.

Palabras clave: *Killer*, choque osmótico, regulación de volumen, hierro.

Summary

The *Killer* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* is characterized by the production of a toxin capable of inhibiting the growth of sensitive strains that do not produce it. This symbiotic system between two dsRNA viruses and yeast has been known for the last decades, in which knowledge has been generated about its origin, mechanisms of action and the different variables that affect the system, among which stand out: type of protein *Killer*, pH, temperature, relation between the producing strain and the sensitive strain, as well as culture media and inducing media. In this study, the production of *Killer K1* toxin was evaluated under the effect of osmotic shock with 1 M KCl and the volume regulation capacity during it, using a new inducing medium with a high concentration of Fe^{+3} . The results indicate that during the osmotic shock event and high Fe^{+3} concentrations, the production of the *Killer* toxin is enhanced while a change in the edition of the mRNA encoding the *K1* toxin is caused. Taking all this into account, it has been possible to obtain a greater production of the *Killer* toxin at different times of the study.

Key words: *Killer, osmotic shock, volume regulation, iron.*

Dedicatorias

A la Amy de 10 años,

que después de recibir su primer microscopio estuvo segura de que este era el camino que quería seguir, e hizo lo posible por lograrlo.

A la Amy de tercer semestre,

que un día despertó con una pregunta biológica y supo de inmediato que la contestaría con esta tesis.

Gracias, chicas, lo logramos.

Agradecimientos

Financiamiento del proyecto:

- Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ).
- Laboratorios Nacionales-CONACyT 2021.
- FONDEC 2022.
- SEP-CONACyT A1-S-26966.

Gracias por el apoyo de la beca para realizar mi tesis de Licenciatura y por el apoyo al proyecto en general.

Agradecimientos personales:

Primeramente, a mi familia: gracias a mis padres, que me dieron su apoyo incondicional siempre y toda la vida, las herramientas, las palabras de aliento y los abrazos para continuar haciendo lo que me apasiona a pesar de estar tan lejos de casa; a mi abuela, que me enseñó a ser curiosa; a mi hermano y mi tío Chava, por siempre creer en mí más de lo que yo lo hacía. Los amo.

Gracias al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez, por abrirme las puertas de su laboratorio, escucharme, guiarlo y acompañarme en este proceso y durante la carrera. Nunca le voy a agradecer lo suficiente por brindarme la oportunidad de la maravillosa experiencia que es trabajar en su laboratorio.

Gracias a la Dra. Verónica Morales Tlalpan, por su ayuda, su enorme paciencia y sus consejos, sin lo anterior este trabajo no existiría. Fue y será siempre, un honor aprender de usted.

Gracias a la M. en C. Adriana González Gallardo del INB, UNAM, por siempre recibirme con gusto en su laboratorio y proveernos de material y espacio.

Gracias a Jenny, por formar un gran equipo de laboratorio una última vez.

Gracias a mis *roommates* Zazil y Melina, por ser la familia que no sabía que iba a necesitar y amar tanto, por aguantar mis cambios de humor, los platos sucios y escucharme e impulsarme cada que sentía que este proceso era interminable.

Gracias a Iliana y Paola, por secar mis lágrimas repetidamente y aconsejar siempre de manera acertada todas y cada una de las veces que tenía dudas sobre este proyecto y sobre mí. Las quiero infinitamente.

Gracias a Beto, por brindarme compañía, muchas risas y dejarme robar café de su oficina, cada que tenía que esperar la PCR y electroforesis.

Y, por último, gracias a un zorro que durante un rato proporcionó los abrazos para calmar las tormentas que hacía en un vaso de agua y de quien aprendí que la noche es larga, el café barato y siempre se puede tomar un momento para perder el tiempo.

Gracias...

Tabla de contenido

Resumen	2
Summary	3
Dedicatorias	4
Agradecimientos.....	5
Tabla de contenido.....	6
Índice de cuadros	8
Índice de figuras	8
1. Introducción.....	9
2. Antecedentes	10
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	10
2.2 Las toxinas <i>Killer</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.3 Mecanismos de acción de la toxina <i>Killer K1</i>	11
2.4 Importancia de las toxinas <i>Killer</i>	12
2.5 Choque osmótico y vía HOG	13
2.6 Fe^{+3} y su papel biológico en levaduras	15
3. Justificación.....	16
4. Objetivos	16
4.1 General	16
4.2 Particulares	16
5. Metodología.....	16
5.1 Almacenamiento de cepas	17
5.2 Choque osmótico	17
5.3 Producción de la toxina control	17
5.3.1 Condiciones de cultivo	17
5.3.2 Halos de inhibición.....	18
5.4 Solución osmótica en céspedes de 5x47	18
5.5 Producción de la toxina posterior al choque osmótico	18
5.6 RT-PCR para ARNm de <i>K1</i>	19
5.6.1 Extracción de ARN.....	19
5.6.2 ADNc	20
5.6.3 PCR	21
5.7 Secuenciación del producto de PCR.....	21

5.7.1 Ligación a vector de clonación y transformación de células competentes	21
5.7.2 MIDIpreps	21
5.8 Toma de fotografías, análisis de imagen y análisis estadísticos	22
5.9 Análisis de secuencias de producto de PCR	22
6. Resultados	22
6.1 Choque osmótico	22
6.2 Producción de la toxina control	24
6.3 Solución osmótica en céspedes de 5x47	25
6.4 Producción de la toxina posterior al choque osmótico	26
6.4.1 Células en Medio MI	26
6.4.2 ARNm de K1 en medio MI	26
6.4.3 Células en Medio MIF	29
6.4.4 ARNm de K1 en medio MIF	29
6.4.5 Análisis de la secuencia de ARNm de K1	31
7. Discusión	35
7.1 Choque osmótico	35
7.2 Producción de la toxina control	36
7.3 Producción de la toxina posterior al choque osmótico: medio MI	37
7.4 Producción de la toxina posterior al choque osmótico: medio MIF	39
7.5 Secuencias de producto de PCR	40
8. Conclusión y perspectivas	42
9. Referencias bibliográficas	44
10. ANEXO 1: medios de cultivo	55
11. ANEXO 2: material suplementario	57
11.1 Choque osmótico a diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> : diagrama de caja y bigotes	57
11.2 Choque osmótico a diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con sorbitol 1 M	58
11.3 Choque osmótico con $FeCl_3$ 1 M y 15 mM a cepa productora de toxina K1 (42300)	59
11.4 Producción de Toxina por diferentes cepas <i>Killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> (K1 y Klus) en medio inductor MI y MIF	60
11.5 Secuencias de aminoácidos: análisis de alineamiento múltiple	62
11.6 Árbol filogenético de las secuencias	63

11.7 Listado de genes de la cepa 42300 de <i>S. cerevisiae</i>	64
--	----

Índice de cuadros

Tabla 1 Reactivos para reacción ADNc.	20
Tabla 2. Reactivos para reacción de PCR.	21
Tabla 3. Reactivos para digestión de vector de clonación.	21
Tabla 4. Reactivos para ligación de producto de PCR a vector de clonación.....	21
Tabla 5. Características de los productos de PCR obtenidos (nt).....	33
Tabla 6. Características en los péptidos de productos de PCR (aa).....	34

Índice de figuras

Figura 1 Producción de la toxina posterior al choque osmótico, representación esquemática.....	19
Figura 2. Choque osmótico en diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	23
Figura 3. Halos de inhibición obtenidos de la cepa productora de la toxina <i>K1</i>	24
Figura 4. Solución osmótica sobre céspedes de cepa sensible.	25
Figura 5. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medio inductor MI.	28
Figura 6. ARNm de <i>K1</i> en medio MI.....	28
Figura 7. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medio inductor MIF.....	31
Figura 8. ARNm de <i>K1</i> en medio MIF.....	32
Figura 9. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medios MI, MIF y condiciones con valores significativos.	33
Figura 10. Representación esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo.	42

1. Introducción

Los organismos que son considerados modelo cumplen con diferentes características: fácil manipulación en el laboratorio, ciclo de vida corto, bajo costo de mantenimiento, así como la posibilidad de manipulación genética, entre otros. *Saccharomyces cerevisiae* además de cumplir con muchas de estas características, es atractiva ya que se cuenta con la secuencia completa de su genoma, que conserva una alta homología con el genoma humano; por lo cual, a pesar de no contar con intrones ni ácido ribonucleico interferente (ARNi), es considerado un organismo modelo para el estudio de muchos procesos celulares eucariotas, así como procesos de producción en fermentaciones alcohólicas (Eldarov et al., 2016; Nielsen, 2019; Vanderwaeren et al., 2022).

Actualmente, una de las ramas de estudio de *S. cerevisiae* es el fenotipo *Killer*, en el cual una célula produce una toxina capaz de inhibir el crecimiento de células que son sensibles a dicha toxina. Esto es posible gracias a la simbiosis que existe entre la levadura y dos virus citoplasmáticos de ARN de doble cadena (ARNdc): M y LA (Magliani et al., 1997). Se han realizado diversos esfuerzos para determinar el mecanismo de acción de la toxina, así como su procesamiento, secreción y los procesos celulares que puedan estar implicados. El fenotipo *Killer* de *S. cerevisiae* es un sistema complejo que involucra mecanismos de acción en la pared y membrana celular, la salida descontrolada de potasio a través el canal TOK1 (Two pore domains Outwarly Potassium channel), muerte celular programada e inmunidad de las cepas productoras (Ahmed et al., 1999; Bussey et al., 1990; Reiter et al., 2005; Sesti et al., 2001).

El sistema *Killer* tiene una gran importancia en el ámbito clínico e industrial, en los cuales se busca inhibir el crecimiento de microorganismos de importancia médica (Bajaj et al., 2013; Bracesco et al., 2006), así como inhibir el crecimiento de microrganismos no deseables que afecten las características físico-químicas del producto obtenido de la fermentación (Fernández de Ullivarri et al., 2014), respectivamente; de manera que, se han podido determinar distintas variables que afectan al sistema, como lo son el medio de cultivo y la concentración de nutrientes, la proporción de levadura *Killer* con respecto de levadura sensible, microorganismos presentes, temperatura, entre muchas otras (Maturano et al., 2012; Pérez et al., 2001). Esto indica que para estudiar la producción de la toxina *Killer*, así como su efectividad, se tienen que tomar en cuenta cada vez más variables que no se consideraban relevantes.

Uno de los procesos celulares mejor estudiados en *S. cerevisiae* es la adaptación a cambios osmóticos y su regulación del volumen celular mediante la activación de la vía HOG (*High osmolarity Glycerol*, por sus siglas en inglés, que tiene su homólogo en mamíferos, p38) (Hohmann et al., 2007). Esta vía de señalización bien caracterizada se conoce por generar la respuesta celular ante un estrés hiperosmótico, activando la transcripción de genes asociados, arresto del ciclo celular, cambios conformacionales en la cromatina y, en general, diferentes pasos

del proceso transcripcional (De Nadal & Posas, 2022). Podrían ser este tipo de alteraciones ambientales una variable más a agregar dentro de todas aquellas que afectan o modifican la efectividad del sistema *Killer*. En este trabajo, se evaluó la producción de la toxina *Killer* bajo el efecto del choque osmótico con cloruro de potasio (KCl) 1 M en la levadura *S. cerevisiae*.

2. Antecedentes

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Desde hace aproximadamente 10, 000 años a. C. las levaduras han estado presentes en actividades humanas como la producción de pan y bebidas alcohólicas (McGovern et al., 2017). Hoy en día, después de un arduo trabajo en su domesticación, la levadura sigue formando parte esencial en la producción de pan, vino y cerveza, siendo *S. cerevisiae* de las primeras especies aisladas y la más estudiada actualmente (Nielsen, 2019); sin embargo, su utilización por el humano se ha extendido a campos diferentes al de producción.

S. cerevisiae es un organismo eucariota unicelular (~5μm) que puede ser cultivado relativamente fácil en condiciones de laboratorio usando un medio no complejo y temperatura cercana a los 28°C. Su rápida división (aproximadamente 90 minutos), en la cual se obtiene una célula hija genéticamente idéntica por mitosis, y el hecho de que existe en forma diploide y haploide, lo hacen muy atractivo para su uso en investigaciones científicas (Salari & Salari, 2017).

Por si fuera poco, en 1978 se publicó la transformación exitosa de la levadura con un plásmido replicado en la bacteria *Escherichia coli* (Hinnen et al., 1978) y, para 1996, la cepa de laboratorio S288c fue el primer eucariota del que se secuenció el genoma completo, obteniendo como resultados que una célula haploide contiene ~12 000 kilobases de ADN genómico con aproximadamente 6 000 genes divididos en 16 cromosomas (Goffeau et al., 1996).

Con lo anterior, se pudo conocer que un tercio del genoma de la levadura tiene su parte homóloga en humanos (O'Brien et al., 2005); por lo cual, una gran cantidad de genes esenciales en la levadura pueden ser reemplazados por su homólogo humano, se conserva un 32% de identidad de aminoácidos entre ambos (Kachroo et al., 2015) y casi el 30% de genes que se conoce están implicados en enfermedades humanas, tienen homólogos en levaduras (Foury, 1997).

S. cerevisiae es, entonces, uno de los principales organismos modelo para estudiar procesos celulares; un mayor y mejor entendimiento de éstos en la levadura, dejará un precedente y permitirá obtener conocimiento en otros eucariotas.

2.2 Las toxinas *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae*

Otra característica que resulta muy atractiva de *S. cerevisiae*, es la existencia del fenotipo *Killer*, el cual se conoce desde 1963 (Bevan & Makower, 1963). Este fenómeno es llamado así debido a la capacidad que poseen algunas cepas de producir una proteína que resulta letal para cepas sensibles.

Esto es posible debido a la simbiosis que existe entre la levadura y dos virus citoplasmáticos de ARNdc, pertenecientes a la familia *Totiviridae*: el primero, un virus llamado M (1.8 kilo pares de bases (kbp)) y el segundo, un virus auxiliar o ayudador, llamado L-A (4.5 kpb) (Bruenn, 1980); los cuales se encuentran encapsulados por separado en partículas similares a virus. Es necesaria la presencia de ambos para poder conferir el fenotipo *Killer* a la cepa infectada, ya que el virus ayudador L-A contiene el material genético para Gag, proteína necesaria para la encapsidación y el material genético para codificar la ARN polimerasa (Fujimura et al., 1992; Ichō & Wickner, 1989); mientras que el material genético del virus M codifica para una preprotoxina inmadura que dará lugar a la toxina *Killer* y proporcionará inmunidad (Bostian et al., 1980; Hanes et al., 1986).

A la fecha, se han descrito diferentes virus ScV-M (*Saccharomyces cerevisiae* viruses): ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28 y ScV-Mlus, que darán lugar a las toxinas *Killer K1, K2, K28* y *Klus*, respectivamente (Hanes et al., 1986; Hannig & Leibowitz, 1985; Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Schmitt & Tipper, 1990). Es importante mencionar que no se encuentra homología entre los virus M (Schmitt & Tipper, 1995); sin embargo, la compatibilidad entre los virus M y L-A, en la que cada virus L-A se relaciona con un solo virus M, siendo L-A1 compatible con ScV-M1, L-A2 compatible con ScV-M2 y así sucesivamente con cada virus M descrito, sigue siendo un objeto de estudio (Aitmanaité et al., 2021; Lukša et al., 2017).

2.3 Mecanismos de acción de la toxina *Killer K1*

El gen que codifica para la preprotoxina o proteína inmadura está conformado por 1 010 pares de bases y una vez traducido, conforma un polipéptido de 316 aminoácidos con un peso molecular de 34 787 Da, divididos en 4 subunidades: δ (44 aminoácidos), α (103 aminoácidos), γ (83 aminoácidos) y β (83 aminoácidos), en ese orden (Bostian et al., 1984).

Para obtener la proteína madura es necesario que la preprotoxina pase por la vía secretora procesándose enzimáticamente: primero, ingresa al retículo endoplásmico gracias al N-terminal de la subunidad δ , que funciona como secuencia señal; posteriormente, la subunidad γ es glicosilada y toda la proteína entra al aparato de Golgi tardío, donde la endopeptidasa similar a la furina, Kex2p, elimina dicha secuencia N-glucosilada y el extremo C-terminal de la secuencia β es recortado por la carboxipeptidasa Kex1p, para finalizar obteniendo un heterodímero conformado por α/β unido por enlaces disulfuro (Bostian et al., 1984; Marquina et al., 2002; Schmitt & Breinig, 2006). Este producto es secretado al medio de cultivo como la toxina *Killer* madura (20 kDa) (Bostian et al., 1984; Palfree & Bussey, 1979).

A pesar de que la toxina *Killer K1* es la más estudiada de su grupo, aún no se tiene un panorama completamente claro sobre cuál es su mecanismo de acción en las cepas sensibles. Uno de los primeros mecanismos propuestos describe cómo la toxina *Killer* se une a su receptor 1-6- b-D glucano en la pared de la célula sensible (Hutchins & Bussey, 1983) y posteriormente desregula el flujo de protones y ATP a

través de la membrana celular (Bussey & Sherman, 1973; De La Peña et al., 1981); sin embargo, es importante mencionar que la toxina *Killer* tiene efecto no solo en células completas, sino también en células carentes de pared celular (esferoplastos) (Bussey et al., 1973), de manera que su mecanismo de acción se encuentra ligado directamente con la membrana celular, por lo cual, en 1990 se evidenció que la toxina podría funcionar de manera similar a un ionóforo, provocando la salida descontrolada de iones, como K^+ (Martinac et al., 1990).

En la actualidad, dos vías de acción han sido las más aceptadas. En la primera, que se conoce como la vía canónica, la toxina *Killer* se une a su receptor en la pared celular mediante la subunidad β (Gier et al., 2019) para posteriormente, unirse al canal de potasio rectificador saliente con dos dominios de poro, Tok1p (Ahmed et al., 1999; Ketchum et al., 1995), que se encuentra en la membrana plasmática de las levaduras (Bertl et al., 2003), activándolo. Esto desencadena la muerte celular por la salida desmedida de potasio (Ahmed et al., 1999). La segunda vía de acción se basa en la muerte celular programada. Este proceso es desencadenado por la interacción de bajas concentraciones de la toxina con las células sensibles, acompañado con la fragmentación de ADN, condensación de la cromatina y mediado por la caspasa Yca1p y la generación de ROS (Mazzoni & Falcone, 2008; Reiter et al., 2005).

Otro de los mecanismos más estudiados de las toxinas *Killer* es la inmunidad de las cepas productoras a su propia toxina. Uno de los más aceptados describe que la preprotoxina inmadura interactúa, de igual manera, con el canal Tok1p por el lado interno de la membrana, bloqueando su actividad e impidiendo que la toxina madura pueda ejercer efecto por el lado externo (Sesti et al., 2001).

2.4 Importancia de las toxinas *Killer*

Al conocer los mecanismos por los cuales las toxinas *Killer* inhiben el crecimiento de levaduras sensibles, se ha abierto la pregunta si estas toxinas son capaces de inhibir a otros microorganismos, por lo cual, este sistema ha tomado relevancia al extender sus aplicaciones al campo clínico e industrial.

Diversos esfuerzos se han realizado para poner a prueba la capacidad antifúngica de la toxina *Killer* de *S. cerevisiae*, ya sea con la toxina purificada del medio o con la interacción de ambos microorganismos en cuestión; a la fecha, se ha descubierto que la toxina tiene un efecto inhibidor en otras levaduras de importancia médica como *Candida glabrata* (Fredericks et al., 2021) y *Candida albicans* (Bracesco et al., 2006). De igual manera, este efecto inhibidor se ha observado en hongos patógenos de plantas como *Ophiostoma ulmi*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Botrytis fabae*, así como el oomiceto *Phytophthora infestans* (Walker et al., 1995). Por otro lado, la actividad antibacteriana de las toxinas *Killer* de *S. cerevisiae* ha sido pobremente estudiada. Existen estudios en los que la toxina *Killer* producida por la levadura *Pichia kudriavzevii* tiene un efecto inhibidor *in vitro* sobre bacterias de importancia médica como *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*,

Staphylococcus aureus y *Pseudomonas aeruginosa* (Bajaj et al., 2013). Además, estudios reportan que la toxina producida por *Wickerhamomyces anomalus* muestra un efecto inhibidor y cambios conformacionales en *Plasmodium berghei* en etapas esporogónicas (Valzano et al., 2016), en nuestro grupo de trabajo se ha observado, de igual manera *in vitro*, un efecto inhibidor de la toxina *Killer K1* sobre *Klebsiella pneumoniae* (Ramírez Villarreal, 2018), *Bacillus subtilis* (Trujillo Barrientos, 2022) y *Pseudomonas aureginosa* (actualmente en estudio).

En el ámbito industrial, no obstante, debido a que *S. cerevisiae* es un microorganismo de gran importancia dentro de los procesos de vinificación, la utilización del fenotipo *Killer* ha sido ampliamente estudiado con el propósito de inhibir microorganismos no deseables que afectan las características fisicoquímicas del producto (Fernández de Ullivarri et al., 2014); sin embargo, su utilización dentro del proceso de producción es más compleja de lo que se podría imaginar, debido a que la capacidad *Killer* depende de múltiples factores, como el medio utilizado, la concentración de levadura *Killer* vs. levadura sensible, los microorganismos presentes como cultivos iniciadores del proceso de fermentación, temperatura, entre muchas otras (da Silva, 1996; Maturano et al., 2012; Pérez et al., 2001; Sangorrín et al., 2001). Las toxinas *Killer* son, entonces, un área de investigación amplia que puede ser aprovechada en los diferentes ámbitos científico, clínico e industrial.

2.5 Choque osmótico y vía HOG

Los organismos tienen la capacidad de respuesta y adaptación a diferentes estímulos ambientales. Cuando se habla de organismos unicelulares, dichos estímulos influyen en el metabolismo, crecimiento y división celular. Uno de los más comunes, es el estrés osmótico, el cual, induce un gradiente termodinámico entre los medios intra y extracelular, causando la primer respuesta de la célula que será la salida o entrada de agua, acompañada de cambios en el volumen celular, para regular dicho sistema y mantener un equilibrio homeostático (Fanjul de Moles et al., 2008); sin embargo, este cambio repentino en las concentraciones de los compuestos presentes en la célula puede ser perjudicial para su funcionamiento general.

Cuando se trata de un choque hiperosmótico, en el que el medio extracelular se encuentra más concentrado que el medio intracelular, la célula pierde agua en respuesta y, por lo tanto, su volumen se reduce considerablemente (Martínez De Marañón et al., 1996; Saldaña et al., 2021). De esta manera, se necesita un segundo sistema de defensa activo, que pueda reducir los efectos negativos que ha causado la reducción del volumen celular. Particularmente en la levadura, estos procesos han sido ampliamente estudiados.

La respuesta celular en la levadura ante un estrés hiperosmótico se centra en producir y acumular osmolitos como aminoácidos, iones y, más importantemente, glicerol, para mantener un equilibrio y poder restablecer el volumen celular

eventualmente (Babazadeh et al., 2014; De Nadal & Posas, 2022b). La vía HOG, incluye proteínas quinasas activadas en respuesta a estrés, por lo que la activación de esta vía repercutirá en la concentración de glicerol intracelular, transportadores de iones, metabolismo celular y traducción de ARNm (Hohmann et al., 2007). De manera general, la célula detecta un estrés hiperosmótico mediante las proteínas Sln1 y Sho1 (Maeda et al., 1995).

La histidina quinasa transmembranal Sln1, mediante un sistema de fosforelevo, activará las proteínas Ypd1 y Ssk1, que a su vez activarán la MAP cinasa 3 (MAPK3) Ssk2/22 y por consiguiente activará la MAPK2 Pbs2 (Maeda et al., 1995; Posas & Wurgler-Murphy, 1996). Por otro lado, Sho1 en conjunto con las proteínas transmembranales Msb2, Hkr1 y Opy2 activarán a la GTPasa Cdc42 en respuesta al estrés hiperosmótico (Tatebayashi et al., 2007). Ésta última activará la quinasa Ste20, quien activará la MAPK3 Ste11 para convergir en la vía de las MAPKs con Pbs2 (Raitt et al., 2000). Siguiendo la línea río abajo de activación, esto logrará que Hog1p sea fosforilada y translocada al núcleo, donde se unirá a la cromatina en regiones codificantes de los genes asociados en respuesta a estrés (De Nadal & Posas, 2015; Rep et al., 2000), arresto del ciclo celular (Escoté et al., 2004) y producción de glicerol (Babazadeh et al., 2014), reclutando el complejo ARN polimerasa II (Alepuz et al., 2003) y la histona desacetilasa Rpd3 (De Nadal et al., 2004). Hog1 también se encuentra asociado a la biogénesis del ARNm, su estabilidad y exportación del núcleo, tomando un papel importante en varios pasos del proceso transcripcional (Molin et al., 2009; Regot et al., 2013; Romero-Santacreu et al., 2009; Warringer et al., 2010).

La vía HOG se considera una respuesta secundaria o pasiva ante el choque osmótico, comenzando desde los primeros minutos y alcanzando su activación máxima a los 45 minutos del choque (Babazadeh et al., 2013); sin embargo, esfuerzos de diversos estudios han funcionado para comprender, que la vía HOG no es un sistema de “encendido/apagado”, sino más bien, una vía que se encuentra de manera constitutivamente encendida en la célula, con una retroalimentación negativa, lo que destaca en un gran umbral de activación (Babazadeh et al., 2013; Macia et al., 2009).

Aunque esta vía ha sido ampliamente estudiada en levaduras por su relevancia en los diferentes procesos celulares mencionados anteriormente, otros autores han realizado esfuerzos para caracterizar la respuesta primaria o rápida ante un estrés osmótico de poca duración. Los resultados indican que, al menos *S. cerevisiae*, posee una alta capacidad de regulación del volumen celular ante choques osmóticos de alta molaridad (1-1.5M de KCl, NaCl, sorbitol o glicerol) en los que es capaz de reducir su volumen hasta en un 60% en menos de 10 segundos manteniendo la viabilidad celular (Martínez De Marañón et al., 1997; Martínez De Marañón et al., 1996; Morris et al., 1983; Petelenz-Kurdziel et al., 2011; Saldaña et al., 2021); de igual manera al ser regresada a un ambiente hipotónico, es capaz de

recuperar su volumen por completo en el doble de tiempo (Morris et al., 1983; Saldaña et al., 2021).

Como podría esperarse, estos cambios en el volumen celular están acompañados de cambios morfológicos de la superficie de la célula, en los que se comprometen los organelos y espacios celulares (Morris et al., 1983; Petelenz-Kurdziel et al., 2011; Saldaña et al., 2021), sin embargo, *S. cerevisiae* puede mantenerse viable el tiempo suficiente para adaptarse a dichas condiciones adversas.

2.6 Fe^{+3} y su papel biológico en levaduras

Dentro de los múltiples nutrientes esenciales para las células eucariotas se encuentran a los micronutrientes. Uno de ellos es el Hierro (Fe^{+3}), que se encuentra funcionando como cofactor en procesos celulares como la respiración, biosíntesis de lípidos y aminoácidos, traducción, replicación y reparación de ADN, entre otros (Galaris et al., 2019; Romero et al., 2021). Por esta razón y debido a su potencial redox, las células cuentan con diferentes mecanismos para captar, aprovechar y desintoxicarse de este metal, ya que en grandes cantidades causa daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

En levaduras, de manera general, se conocen dos vías para la captación de Fe^{+3} : cuando se encuentra en escasez y cuando existe un exceso de Fe^{+3} citosólico. En la primera, los factores de transcripción Aft1/2, que se encuentran expresados constitutivamente, se translocarán al núcleo para activar un grupo de genes (~30) conocido como el “regulón de hierro”, que incluye genes relacionados con adquisición de hierro del ambiente (metaloproteasas, transportadores), movilización de hierro intracelular (hacia la mitocondria y vacuolas), síntesis de grupos Fe-S, así como la adaptación a un metabolismo deficiente de hierro (Cyert & Philpott, 2013; L. Li & Ward, 2018; Martínez-Pastor et al., 2017; Philpott et al., 2012). Por otro lado, cuando la célula contiene un exceso de hierro en el citosol, la unión de dos grupos 2Fe-2S al dominio de activación rico en cisteínas de Yap5, inducirá un cambio conformacional que activará la transcripción de CCC1, una proteína transportadora de iones encargada de importar el exceso de Fe^{+3} hacia la vacuola, así como la transcripción de Grx4 y Tyw1, que ayudarán a la formación de grupos Fe-S que se unirán a proteínas, disminuyendo el Fe citosólico (A. Li et al., 2011; L. Li & Ward, 2018; Martínez-Pastor et al., 2017; Outten & Albetel, 2013).

Estas vías de señalización son sumamente complejas debido a que participan más proteínas desde diferentes organelos de la célula para garantizar la respuesta correcta ante el estímulo y la sobrevivencia de ésta. Para las levaduras, cuándo se tiene un exceso o una deficiencia de hierro el efecto dependerá de cada cepa y lugar de origen; mientras que existen cepas de *S. cerevisiae* que pueden crecer en un medio “suficiente” de Fe^{+3} con concentraciones de 5-40 μM (Holmes-Hampton et al., 2013; Martínez-Garay et al., 2016), cepas de diferentes orígenes pueden crecer en medios con concentraciones elevadas de 5-10 mM (Sorribes-Dauden et al., 2022), así como cepas conocidas como “resistentes” a Fe^{+3} , pues crecen en medios

con concentraciones de hasta 20 mM (Čanadi Jurešić et al., 2021). Esta diversidad provee de una gran ventaja para el estudio de la importancia de Fe^{+3} en distintos procesos celulares.

3. Justificación

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema *Killer* en *Saccharomyces cerevisiae* tiene un gran potencial de aplicación para los diferentes campos científico, clínico e industrial; sin embargo, la efectividad y estabilidad de este sistema depende no solo de la interacción de múltiples factores ambientales, sino también del campo de aplicación y, por consiguiente, la necesidad a cubrir.

La producción de la toxina en grandes cantidades, interacción e inhibición de otros microorganismos, duración y efecto a corto o largo plazo, son todos resultados que vendrán de una combinación de factores diferentes al tratarse de un sistema complejo.

La generación de conocimiento sobre las variables que afectan de manera positiva o negativa la efectividad del sistema es de suma importancia para comprender cada vez más cómo es que funciona la producción de la toxina bajo diferentes condiciones. Los resultados obtenidos en este proyecto aportarán un nuevo enfoque sobre la producción de la toxina *Killer* en *S. cerevisiae*, así como herramientas que ayuden a comprender desde una nueva perspectiva las variables que afectan al sistema, para ser consideradas en los distintos campos de aplicación en las que sean requeridas.

4. Objetivos

4.1 General

Determinar la producción de la toxina *K1* durante la regulación del volumen celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 Particulares

1. Determinar la capacidad de regulación de volumen celular de *S. cerevisiae* *Killer* ante cambios osmóticos.
2. Determinar la producción de la toxina *Killer K1* de *S. cerevisiae* en diferentes condiciones mediante ensayos de inhibición en placa.
3. Inducir la producción de la toxina *Killer K1* de *S. cerevisiae* mediante choque osmótico KCl 1 M.
4. Evaluar la expresión del gen de la toxina *Killer K1* posterior a un choque osmótico con KCl 1 M.

5. Metodología

Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biofísica de membranas de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ campus Juriquilla. El proyecto fue aprobado por el comité de Bioética en marzo de 2022 (07FCN2022).

5.1 Almacenamiento de cepas

Las cepas BY4742 (MAT α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0), W303 (MAT α /MAT α {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi+]), 42300 (MAT α ade2 thr1 ski2-1 [K1L-k1]; productora de K1) y 5x47 (MAT α /MAT α his1/+ trp1/+ ura3 [K1L-o]; sensible) fueron sembradas en agar YPD a 28°C durante 24 a 48 h y almacenadas a 4°C.

5.2 Choque osmótico

En condiciones de esterilidad, se sembraron cada uno de los cultivos anteriores en 50 ml de medio YPD por separado, a 28°C durante 24 a 36 h en agitación constante a 120 rpm.

Para la colecta de células, el cultivo fue transferido a un tubo cónico marca Falcon previamente pesado y etiquetado, para centrifugar a 3 000 rpm durante 10 minutos y desechar el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 10 mL de agua destilada y se homogenizó el botón de células para nuevamente centrifugar y desechar el sobrenadante. Este lavado fue repetido dos veces. Finalmente, se obtuvo el peso húmedo de las células colectadas y se resuspendieron en relación peso-volumen (g/mL) con agua destilada.

En tubos de microcentrífuga previamente pesados y etiquetados, se agregaron 400 μ L del homogenizado anterior (un tubo por cada cepa) y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1:30 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante con una pipeta evitando tomar células del botón y se registró el peso obtenido. Para realizar el choque osmótico se agregó la solución osmótica de KCl 1 M en relación peso-volumen mg/ μ L, se homogenizó perfectamente en vortex y se centrifugó con las mismas condiciones anteriores. Por último, se retiró el sobrenadante y se registró el peso obtenido. Para poner a prueba la regulación del volumen celular en medio hipotónico, se agregaron 500 μ L de agua destilada y se repitió el proceso para registrar nuevamente el peso de las células. Con cada muestra obtenida en los tubos de microcentrífuga se obtuvieron 3 pseudoréplicas (3 choques osmóticos a cada muestra).

5.3 Producción de la toxina control

5.3.1 Condiciones de cultivo

La cepa productora de la toxina K1 (42300), así como la cepa sensible (5x47) de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en 25 y 10 mL de medio YPD, respectivamente, durante 24 h a 28°C y 120 rpm. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se tomó 1 mL de la cepa productora en un tubo de microcentrífuga estéril previamente pesado y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1:30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se registró el peso obtenido de las células.

Para conocer la cantidad de medio inductor a agregar, se utilizó la siguiente relación base:

100 mg de células ~ 1 000 μ L de medio inductor.

Las células fueron cultivadas en su cantidad correspondiente de cada medio inductor a utilizar (MI y MIF, ver anexo 1: medios de cultivo) durante 16 h, a 28°C y 120 rpm en un tubo Falcon de 50 ml estéril previamente pesado.

5.3.2 *Halos de inhibición.*

Posterior a la incubación de 16 h, las células se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1:30 minutos para separar el sobrenadante y colocarlo en un tubo estéril diferente, mientras que las células restantes fueron pesadas nuevamente.

La evaluación de halos inhibición se realizó en cajas con agar YPD pH 4.7, en las cuales, se sembró un césped de 3 mg de la cepa sensible 5x47. Posteriormente, se colocaron botones de 2 mg de células de la cepa inducida y su cantidad correspondiente de sobrenadante, esto con el objetivo de evaluar el halo de inhibición producido por las células y el sobrenadante obtenido del medio inductor.

Para conocer la cantidad de sobrenadante correspondiente a 2 mg de células se mantuvo la siguiente relación:

Suponiendo que se recuperaron 100 mg de células posterior a las 16 h de inducción:

100 mg de células ~ 1 000 µL de medio inductor

2 mg de células a colocar ~ 20 µL de sobrenadante a colocar.

Las cajas fueron incubadas a 28°C y se evaluaron a las 16 y 24 h para la posterior medición del halo de inhibición.

5.4 Solución osmótica en céspedes de 5x47

Para evaluar el posible factor de confusión que suponía agregar la solución osmótica en el césped de 5x47 realizado en cajas YPD pH 4.7 y 7, se cultivó la cepa sensible en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para realizar céspedes de 3 mg.

Sobre cada césped se colocaron 12 círculos de papel filtro en filas de 4x3, con un filtro extra como control, de manera que se agregaron las cantidades 1, 7, 9 y 11 µL de la solución osmótica a evaluar, tres veces. En el filtro control se agregaron 9 µL de agua destilada estéril. Las cajas fueron observadas a las 8, 12, 24 y 48 h para evaluar la existencia de halos de inhibición en el césped. Este experimento fue repetido tres veces.

5.5 Producción de la toxina posterior al choque osmótico

Las células de la cepa productora 42300 fueron sembradas e inducidas en ambos medios inductores MI y MIF como se ha descrito anteriormente. Una vez transcurridas 16 h, las células fueron centrifugadas en tubos de microcentrifuga estériles, previamente pesados y se retiró el sobrenadante. Se trabajaron dos condiciones experimentales diferentes: células lavadas (L) y células sin lavar (SL). Las células L se lavaron dos veces con 1 000 µL de agua destilada, homogenizando,

centrifugando y desecharando el sobrenadante. Durante este proceso, las células SL permanecieron sin ninguna alteración.

Posteriormente, se obtuvo el peso de las células para agregar KCl 1 M en relación mg/ μ L. Se homogenizaron en vortex y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1:30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo estéril para su posterior uso, mientras que las células se mantuvieron en condición hiperosmótica agregando nuevamente KCl en la misma relación. Con este nuevo homogenizado, se sembraron 2 mg de cada una de las condiciones (L, SL) en cajas YPD pH 4.7 previamente sembradas con céspedes de 3 mg de la cepa sensible 5x47. Una vez realizado esto, las células fueron centrifugadas nuevamente para desechar el sobrenadante y agregar agua destilada en relación 1 mg/2 μ L. Se repitió todo el proceso anterior y se sembró la misma cantidad de células. De la misma manera, se sembraron en cajas YPD pH 4.7, 2 μ L de cada uno de los sobrenadantes obtenidos: sobrenadante L en KCl, sobrenadante L en agua destilada, sobrenadante SL en KCl y sobrenadante SL en agua destilada. Cada siembra se realizó por cuadruplicado y todas las cajas fueron incubadas durante 16 a 24 h a 28°C.

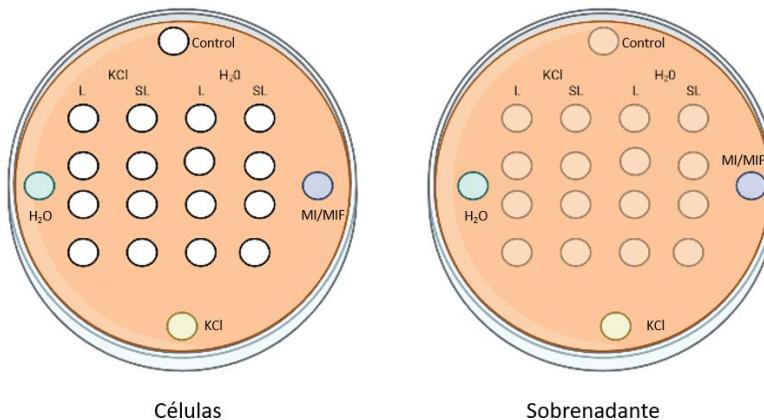


Figura 1 Producción de la toxina posterior al choque osmótico, representación esquemática.

Orden en el que fueron colocadas las células de diferentes condiciones (L, SL) y tratamientos (KCl, H₂O), así como el sobrenadante obtenido de cada uno de ellos y sus respectivos controles.

5.6 RT-PCR para ARNm de K1

5.6.1 Extracción de ARN

Las células de la cepa productora 42300 fueron cultivadas e inducidas en ambos medios inductores como se ha descrito anteriormente, cuidando que se mantuviera un cultivo de aproximadamente 100 mg de células por cada tratamiento a evaluar. La extracción del material genético se realizó con el método de Trizol (*Life Technology Invitrogen*). Inmediatamente después de obtener a las células de cada tratamiento correspondiente en tubos de microcentrífuga estériles (Control: sin

tratamiento; SL: sin lavar, sin tratamiento; SL+KCl: células sin lavar con choque osmótico con KCl 1 M; L+2L: células lavadas dos ocasiones con agua destilada estéril; L+2L+KCl: células lavadas en dos ocasiones con agua destilada estéril y posteriormente aplicando un choque osmótico con KCl 1 M; 5x47: células sensibles no productoras de la toxina), se les agregó 750 μ L de Trizol, así como 3 perlas de vidrio estériles y secas para mantenerlos en hielo seco durante 5 minutos. Posteriormente, fueron trasladados a un baño de agua a una temperatura de 80°C y agitados en vortex durante 30 segundos. Este proceso fue repetido 5 veces para lisar a las células por choque térmico.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos previo a agregar 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de Trizol utilizado y se agitaron vigorosamente con la mano. Se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos para después, ser centrifugados a 13 000 rpm durante 15 minutos. Se tomó la parte acuosa obtenida de cada tubo y se recuperó en un tubo de microcentrífuga nuevo, al cual se le agregó 0.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de Trizol utilizado. Se agitó suavemente con una micropipeta y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos para precipitar el material genético y se decantó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con 1 mL de etanol frío al 75%, se agitó con la mano y se centrifugó 5 minutos a 13 000 rpm. Por último, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar durante 5 minutos, para posteriormente resuspender el ARN en 20 μ L de agua libre de nucleasas.

5.6.2 ADNc

Para conocer la cantidad y pureza del ARN obtenido, se leyeron las muestras en un nanodrop, revisando que las relaciones 260/280 y 260/230 fueran adecuadas. Se realizaron las diluciones correspondientes para manejar 1 μ g/ μ L de ARN. Se realizó un tratamiento con DNAsa:

ARN	1 μ g
DNAsa	0.5 μ L (0.5 u)
Buffer	4 μ L (M-MLV RT 5X)
H ₂ O	12.5 μ L

Tabla 1 Reactivos para la reacción de síntesis de ADNc.

Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente a 70°C durante 5 minutos en el termociclador SimpliAmp (de Applied Biosystems).

Se añadió 0.5 μ L de oligonucleótido antisentido (5 μ M) y 0.5 μ L de dNTPs (10 μ M). Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para posteriormente agregar 0.5 μ L (20 u) de inhibidor de ARNasa e incubar a 42 °C durante 2 minutos. Pasado el tiempo, se añadió 0.5 μ L (100 u) de la enzima RT-superscript y en un termociclador se incubó a 42°C durante 50 minutos y posteriormente a 70°C durante 15 minutos.

El ADNc obtenido se guardó a -20°C para su posterior uso.

5.6.3 PCR

Para amplificar el gen que codifica para la toxina *K1* producida por la cepa 42300, se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) bajo las siguientes especificaciones:

MasterMix (Applied Biosystems)	10 μ L
Oligos (F y R)	1 μ L
ADNc	2 μ L
H_2O	7 μ L

Tabla 2. Reactivos para la reacción de PCR.

El control positivo para este experimento se trató de un amplicón de *K1* sin ningún tratamiento mientras que el control negativo fue una reacción sin molde (ADNc). Las condiciones de amplificación fueron 1 minuto a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 66°C y 1 minuto a 72°C para finalizar con 10 minutos a 72°C.

Los cebadores utilizados fueron:

oligo F 5'-GCAGGGATCCCGCGATGACGAAGCCAACCCAAGTATTAGTTAG-3'.

oligo R 5'-GCATCTAGACTAGTGGCCTGTGTACAGCCTTCAAAG-3'.

5.7 Secuenciación del producto de PCR

5.7.1 Ligación a vector de clonación y transformación de células competentes

Se realizó una clonación usando el vector pGEM-T easy con 5 μ L de cada producto de PCR obtenido.

10 μ L	Buffer T4 DNA Ligase
2 μ L	Plásmido
2 μ L	T4 ligasa
5 μ L	PCR
1 μ L	H_2O

Tabla 3. Reactivos para la ligación de producto de PCR en el vector de clonación.

Se realizó la transformación química de células competentes (*Escherichia coli* XL-BLUE) en agar LB+amp, con un crecimiento de 24 h, posterior al cual, se seleccionaron 5 colonias de cada tratamiento para ser resembradas en parches.

5.7.2 MIDpreps

Para asegurarse que las colonias seleccionadas fueran clonas con el producto de PCR, se realizó una purificación de plásmido mediante la técnica de *MIDpreps*, así como una digestión de éste para su posterior observación en un gel de electroforesis.

La digestión fue observada en un gel de agarosa 0.7% para asegurarse de definir correctamente los tamaños de las bandas obtenidas. Aquellas clonas que obtuvieran un tamaño correcto del vector y del producto de PCR fueron seleccionadas para su secuenciación mediante el método de sanger en la

1 μ L	ADN
1 μ L	Buffer Tango 10x
2 μ L	EcoR1
7.2 μ L	H_2O

Tabla 4. Reactivos para la digestión de vector de clonación.

unidad de servicios de secuenciación del LANGEBIO, Irapuato.

5.8 Toma de fotografías, análisis de imagen y análisis estadísticos

Todas las fotografías fueron tomadas con una cámara de 64 MP (celular) desde un trípode con una distancia de 25 cm. Las fotografías fueron analizadas en ImageJ versión 1.52a en las que se midió el diámetro (cm) de los halos de inhibición y se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el área de éstos (cm^2); los datos obtenidos fueron analizados en R studio versión 4.2.3. Se realizaron pruebas estadísticas de *t* student, *t* student pareado, ANOVA y pruebas *post hoc* de *Tukey*, para datos con homogeneidad de varianza y *Dunnett T3*, para datos con heterocedasticidad de varianza.

5.9 Análisis de secuencias de producto de PCR

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron traducidas a secuencias de aminoácidos, se buscaron probables sitios de restricción y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos mediante ClustalW para producir un árbol filogenético por Neighbour-joining. Todos los programas utilizados para llevar a cabo dichos análisis fueron obtenidos de la página de herramientas moleculares de Cinvestav (<https://genetica.cinvestav.mx/Información-PNPC/Herramientas>).

6. Resultados

6.1 Choque osmótico

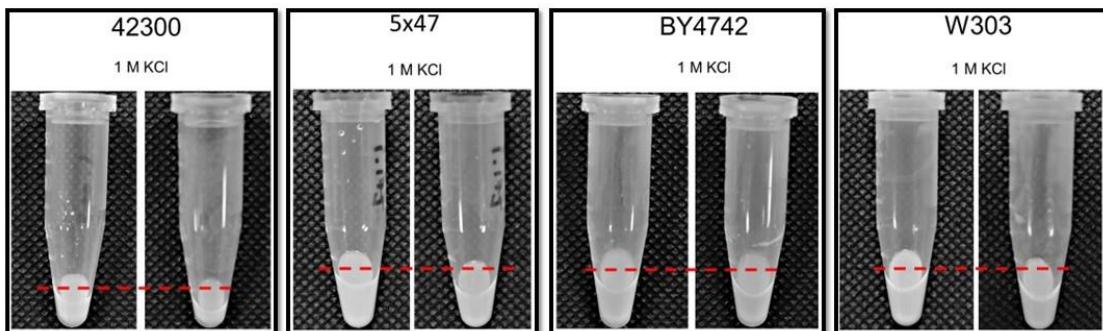
El primer experimento se realizó con el objetivo de evaluar si la cepa 42300, productora de la toxina *K1*, contaba con la capacidad de regular su volumen ante cambios osmóticos. Para lograr esto, se registró el peso de la muestra de células a trabajar antes de ser sometida a un choque osmótico con KCl, después del tratamiento y una vez más después de regresar a las células a una solución hipotónica, que en este caso fue agua destilada. Este experimento también fue realizado en la cepa sensible a la toxina, 5x47, la cepa BY4742 y la cepa W303 (**figura 2a**); siendo ésta última tomada como control debido a estudios previos (Saldaña et al., 2021).

Los resultados muestran que las células pierden peso al ser sometidas al choque osmótico (prueba de *t* student pareada $p < 0.0001$), mismo que recuperan casi por completo al ser regresadas al medio hipotónico (prueba *t* student pareada $p < 0.01$). La única cepa que recuperó por completo su peso fue la cepa BY4742 (prueba de *t* student pareada $p = 0.052$) (**figura 2b**).

Es importante mencionar que el choque osmótico fue realizado en un periodo de tiempo entre 4 a 6 minutos y puede ser repetido múltiples veces, pasando del agua destilada al KCl de nuevo y así sucesivamente, por lo cual, dichos cambios en el volumen celular son un proceso rápido y reproducible. Con lo anterior, se realizó el cálculo de cambio de volumen (Δ) para cada una de las cepas utilizadas, que representa el porcentaje de la diferencia de las medias de peso inicial y peso obtenido posterior al choque osmótico (**figura 2b**); estos resultados indican que la cepa 42300 reduce su volumen hasta en un $\Delta = 25.30\%$, siendo ésta la que mayor

reducción de volumen presentó de las 4, seguida de W303 con un $\Delta = 22.51\%$, 5x47 con un $\Delta = 19.91\%$ y por último BY4742 con un $\Delta = 17.65\%$.

a)



b)

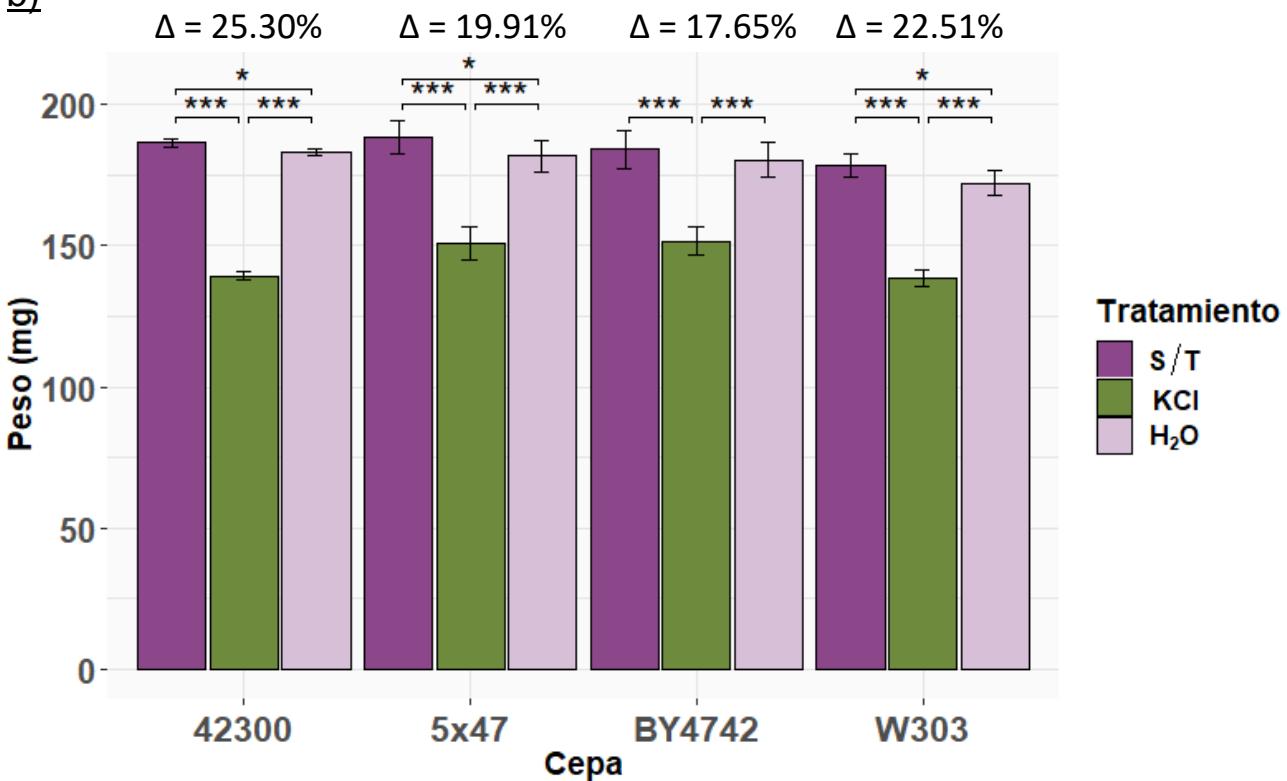


Figura 2. Choque osmótico en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Fotografías que ilustran el cambio en el volumen de las células sometidas a cloruro de potasio 1 M.
- Peso obtenido (mg) antes y después de someter a las diferentes cepas a un choque osmótico con cloruro de potasio y posteriormente con agua destilada. Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Los asteriscos sobre las barras representan el valor p obtenido de la prueba estadística: * <0.01 ; *** <0.0001 .

6.2 Producción de la toxina control

Para evaluar la producción de la toxina en condiciones basales, se utilizaron los medios inductores MI y MIF, que contienen concentraciones diferentes de sales (ver anexo 1: medios de cultivo). Después de 16 h de inducción, se realizaron los experimentos de inhibición en placa con las células y el sobrenadante obtenido de éstas sobre céspedes de la cepa sensible (**figura 3a**). Los resultados muestran que no existe diferencia entre los halos de inhibición (cm^2) obtenidos por las células independientemente del medio utilizado (prueba de t student $p = 0.35$); sin embargo, el halo de inhibición (cm^2) obtenido por la toxina secretada al medio fue significativamente mayor (prueba de t student $p < 0.00001$) cuando las células fueron inducidas en medio MI, a diferencia del medio MIF (**figura 3b**).

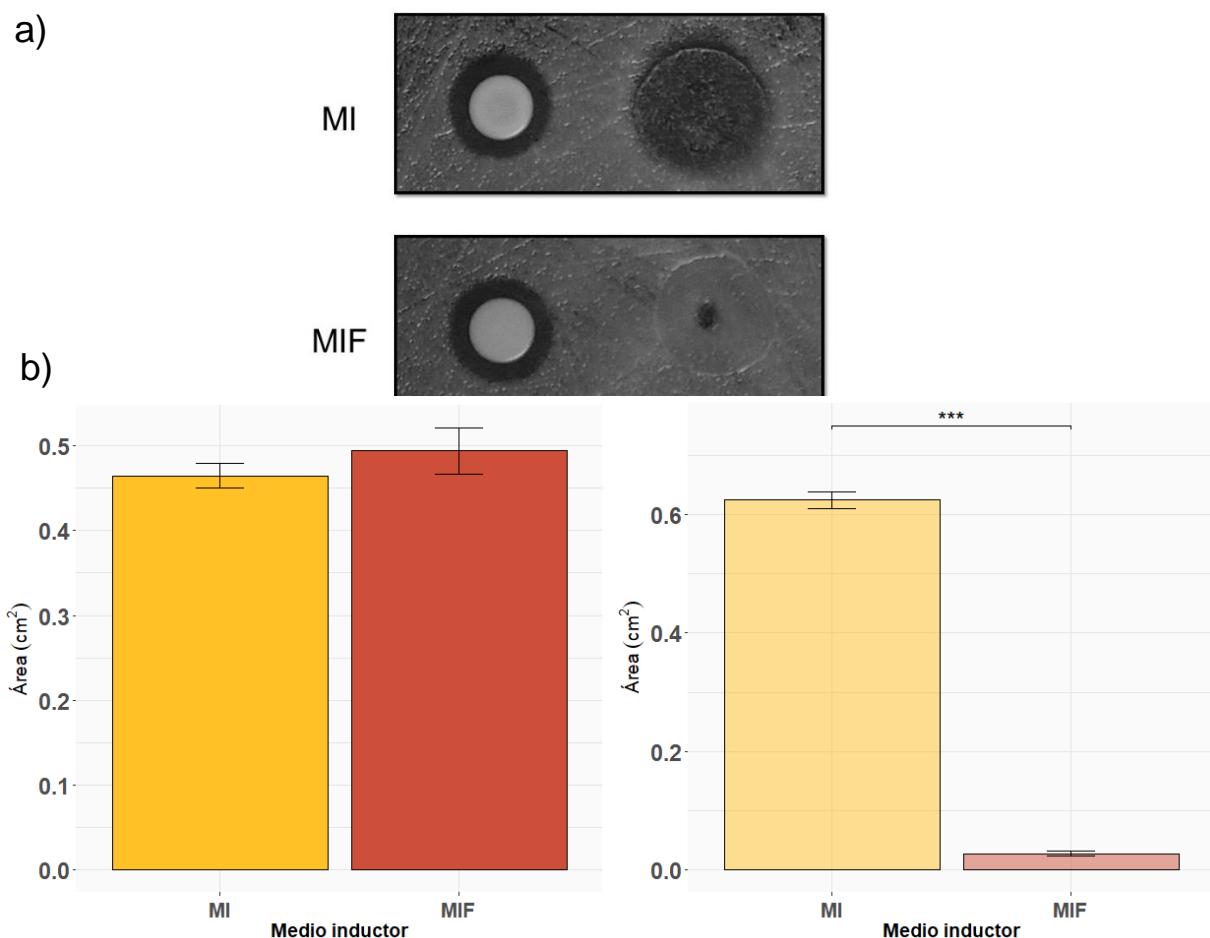


Figura 3. Halos de inhibición obtenidos de la cepa productora de la toxina *K1*.

- Fotografías que ilustran los halos de inhibición obtenidos por células productoras de la toxina *Killer* sobre céspedes de células sensibles en ambos medios inductores (izquierda), así como la toxina contenida en el sobrenadante de éste (derecha).

- b) Diferencias en el área de inhibición producida (cm^2) en los distintos medios inductores a los cuales se sometió la cepa productora de la toxina. En el lado derecho el resultado de las células, en el izquierdo del sobrenadante.

Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Los asteriscos sobre las barras representan el valor p obtenido de la prueba estadística: *** <0.00001 .

6.3 Solución osmótica en céspedes de 5x47

Los experimentos de inhibición en placa a pesar de ser sencillos y altamente reproducibles contienen muchos factores a controlar para asegurar que el halo de inhibición observado se debe exclusivamente a la toxina *Killer* secretada por la cepa productora; por esta razón, se evaluó el posible efecto de la solución de KCl 1 M sobre el césped de la cepa sensible 5x47 (**figura 4**). El papel filtro fue utilizado con el propósito de localizar visualmente el punto exacto en el que fue colocada la solución osmótica. No se mostraron halos de inhibición en ninguna de las cantidades de solución osmótica colocadas a las 8, 12, 24 y 48 horas de crecimiento del césped, indicando que dicha solución no produce efecto alguno en el crecimiento de éste y puede ser utilizada para experimentos posteriores.

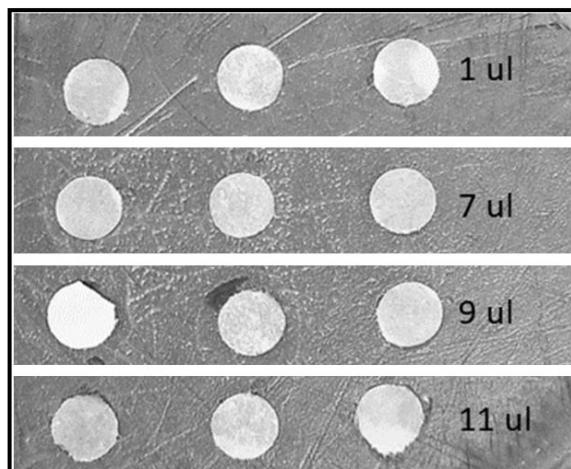


Figura 4. Solución osmótica sobre céspedes de cepa sensible.

Fotografía representativa de los experimentos realizados para evaluar el posible factor de confusión que suponía utilizar la solución osmótica sobre los céspedes de la cepa sensible.

6.4 Producción de la toxina posterior al choque osmótico

La evaluación de la producción de la toxina posterior al choque osmótico se realizó tras la unión de las metodologías de choque osmótico y cambio de volumen, así como la evaluación de halos inhibición en placa; para lo cual, se consideraron dos condiciones a evaluar durante este proceso.

En el primer experimento de este trabajo, las células son sometidas a dos lavados con agua destilada previo al tratamiento con KCl, mientras que las células que han sido obtenidas del medio inductor se siembran directamente en los céspedes de células sensibles, de manera que, para obtener una evaluación más acertada de estos procedimientos, se evaluaron dos condiciones previas al choque osmótico: células lavadas (L) y células sin lavar (SL). Las células L fueron lavadas en dos ocasiones con agua destilada estéril tras haber sido obtenidas del medio inductor, mientras que las células SL permanecieron sin alteraciones. Después del tratamiento obtenido (lavadas o sin lavar) ambas fueron sometidas a un choque osmótico con KCl 1 M y sembradas en céspedes de la cepa sensible para evaluar la producción de la toxina mediante halos de inhibición. Posteriormente, ambas fueron regresadas a condiciones hipotónicas (agua destilada) para, de igual manera, evaluar la producción de la toxina bajo estas condiciones. Los sobrenadantes obtenidos de cada condición osmótica también se utilizaron para evaluar la secreción de la toxina en el momento del choque osmótico (**figura 1**). Este experimento fue realizado con células de la cepa 42300 inducidas en ambos medios inductores MI y MIF de manera independiente.

6.4.1 Células en Medio MI

Los halos de inhibición (cm^2) observados en las células obtenidas del medio inductor MI muestran una diferencia significativa contra el control (ANOVA $p < 0.05$) (**figura 5**). Las células L y SL al ser sometidas al choque osmótico con KCl mostraron un halo de inhibición mayor que el halo producido por las células control ($p < 0.01$). A pesar de que los halos producidos por las células L posterior al choque son mayores, no existe una diferencia significativa entre éstos y los halos obtenidos por las células SL posterior al choque ($p = 0.9$) (**figura 5b**). Un efecto similar fue observado en los halos de inhibición cuando las células fueron regresadas al medio hipotónico, ya que fueron mayores que el control ($p < 0.05$), pero no existen diferencias significativas entre ellas ($p = 1$) (**figura 5b**).

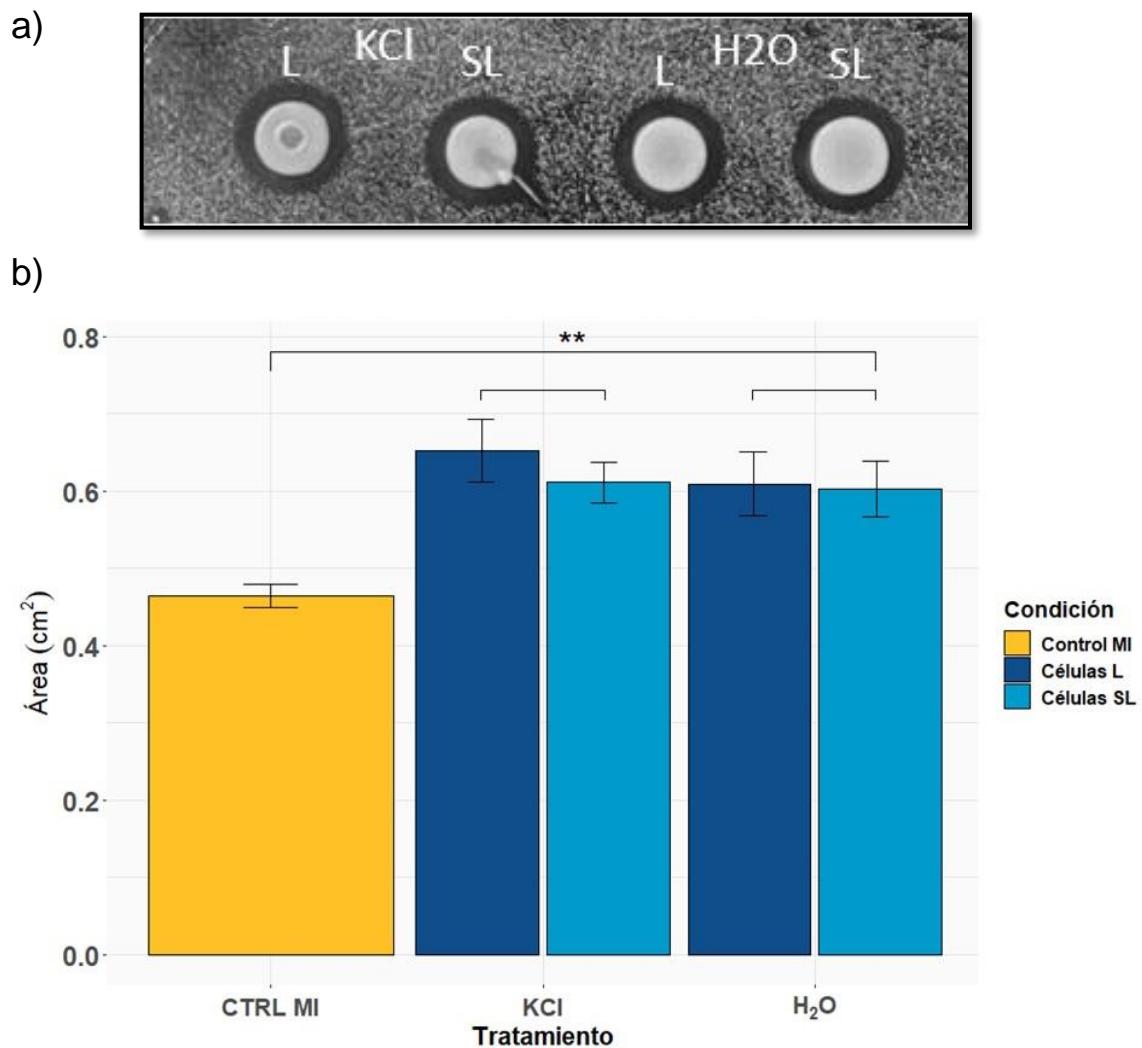
Por otro lado, cuando se evaluó el sobrenadante obtenido de las condiciones osmóticas a las cuales fueron sometidas las células, no se observó ningún halo de inhibición, lo que sugiere que las células no secretan toxina al momento del choque osmótico con KCl (**figura 5c**).

6.4.2 ARNm de K1 en medio MI

Las diferencias en los resultados anteriores permitieron observar los distintos comportamientos de las células productoras de la toxina en cada una de las condiciones y tratamientos. La secreción de la toxina posterior al choque osmótico

abre la pregunta de qué tan rápida es la respuesta ante esta condición, tomando en cuenta que el tiempo promedio en el que se realiza el experimento es de 4 a 6 minutos. Por esta razón, se realizó una extracción de ARN total para observar los cambios de los niveles transcripcionales en la expresión de la toxina *Killer* en cada tratamiento; se agregó una nueva variable a considerar, de acuerdo con los halos de inhibición obtenidos (**figura 5b**), que fue la producción de la toxina después del lavado doble con agua destilada antes del choque osmótico en las células L de ambos medios inductores.

Para observar la presencia e integridad de cada uno de los productos de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (**figura 6**); éste nos indica que todos los productos fueron exitosamente obtenidos y que presentan un tamaño un poco más grande que el esperado para la secuencia de la toxina *K1* aproximadamente 1000 pb (Bostian et al., 1984). La intensidad de las bandas obtenidas permite inferir, de manera cualitativa, diferencias entre cada uno de los transcriptos, similares a las observadas en los halos de inhibición.



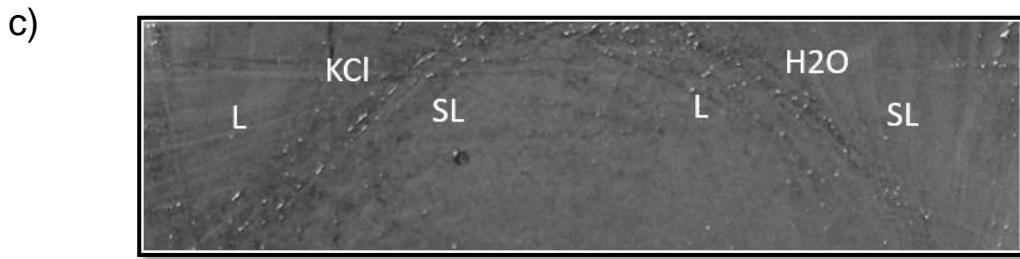


Figura 5. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medio inductor MI.

- Fotografía que ilustra los halos de inhibición obtenidos por la cepa productora de la toxina K1 en diferentes condiciones (L, SL) y tratamientos (KCl, H₂O)
- Diferencias del área de inhibición producida (cm²) en los diferentes tratamientos y el control.
- Fotografía que ilustra la falta de halos de inhibición por los sobrenadantes obtenidos de cada tratamiento.

Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Los asteriscos sobre las barras representan el valor p obtenido de la prueba estadística: ** <0.01.

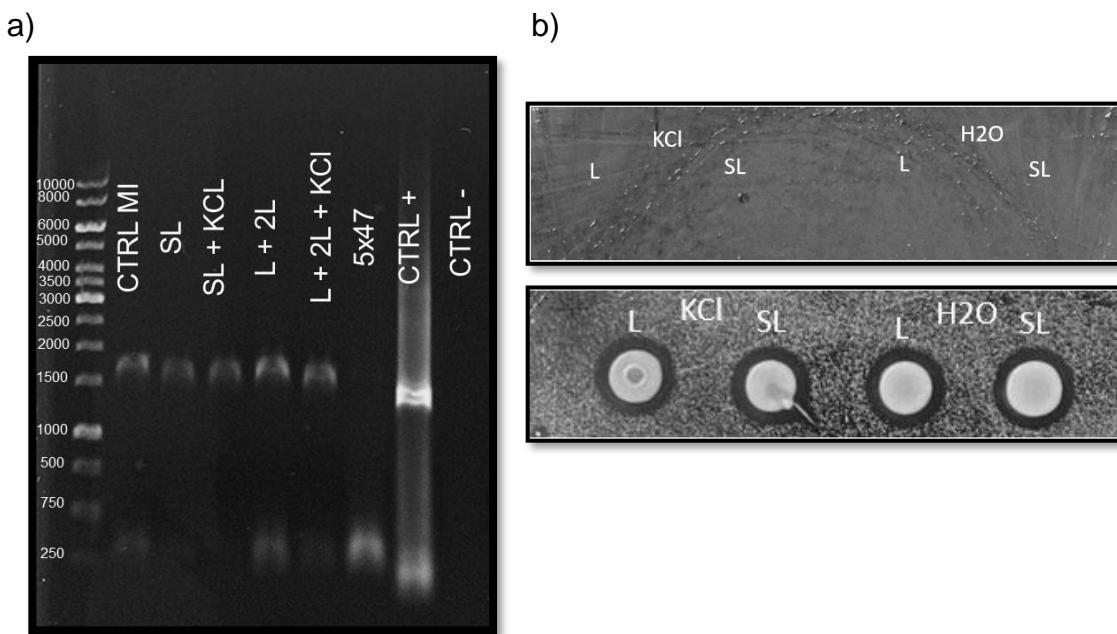


Figura 6. ARNm de *K1* en medio MI.

- Productos de PCR obtenidos a partir del ADNc de *K1* posterior al choque osmótico en medio MI. CTRL MI: Control MI; SL: células sin lavar, sin tratamiento; SL + KCl: células sin lavar con choque osmótico; L + 2L: células lavadas dos veces; L + 2L + KCl: células lavadas dos veces más choque osmótico; 5x47: células sensibles (no productoras de toxina); CTRL+: control positivo; CTRL-: control negativo.

- b) Halos de inhibición obtenidos posterior al choque osmótico. De arriba hacia abajo: al momento del choque osmótico (sobrenadante obtenido), después de 16 h (células productoras).

6.4.3 Células en Medio MIF

Los halos de inhibición producidos por las células que se obtuvieron del medio inductor MIF también mostraron una diferencia significativa contra el control (ANOVA $p < 0.05$) (**figura 7**); sin embargo, en este caso las células L después de haber sido sometidas al choque osmótico, son las únicas en generar un halo de inhibición significativamente mayor al control ($p < 0.01$), sin diferencias significativas entre los demás tratamientos (**figura 7b**). Interesantemente, el sobrenadante obtenido bajo estas condiciones sí logra generar un halo de inhibición sobre el césped de células sensibles y existe diferencia entre los diferentes tratamientos (ANOVA $p < 0.001$) (**figura 7c**). Dichos halos de inhibición son significativamente mayores al obtenido por el sobrenadante del medio inductor posterior a las 16 h de inducción (control) ($p < 0.001$); así mismo, el sobrenadante obtenido por las células L posterior al choque osmótico genera un halo de inhibición significativamente mayor que el generado por el sobrenadante de las células SL posterior al choque osmótico ($p < 0.05$), sin ninguna diferencia significativa entre los tratamientos restantes (**figura 7d**).

Esto indica una clara diferencia entre el medio inductor utilizado y los tratamientos a los cuales fueron sometidas las células, obteniendo como respuesta un comportamiento diferente a corto y largo plazo, puesto que el halo de inhibición es observado a partir de las 16 h de cultivo y es constantemente producido por las células inoculadas, mientras que el halo de inhibición producido por el sobrenadante, aunque también es observado una vez que el césped de las células sensibles haya crecido, representa la producción de toxina en un momento puntual temporalmente, por lo cual es repoblado al cabo de 48 h.

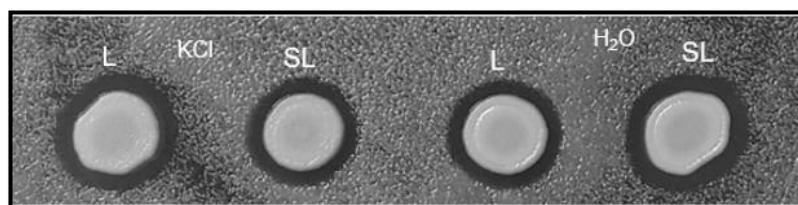
Por último, cuando son analizados los datos significativos de los halos de inhibición producidos por las células de los diferentes medios inductores, se obtiene que las células L obtenidas del medio MIF posterior al choque osmótico, también producen un halo de inhibición mayor al control del medio MI (**figura 9**) pero no entre su equivalente de las células L en medio MI, ni entre los tratamientos restantes; esto indica que cualquiera de los cambios osmóticos a los cuales fueron sometidas las células de las diferentes condiciones, son suficiente para generar un halo de inhibición mayor al control, resaltando las células L y SL obtenidas del medio MIF posterior al choque osmótico (**figura 7d**).

6.4.4 ARNm de K1 en medio MIF

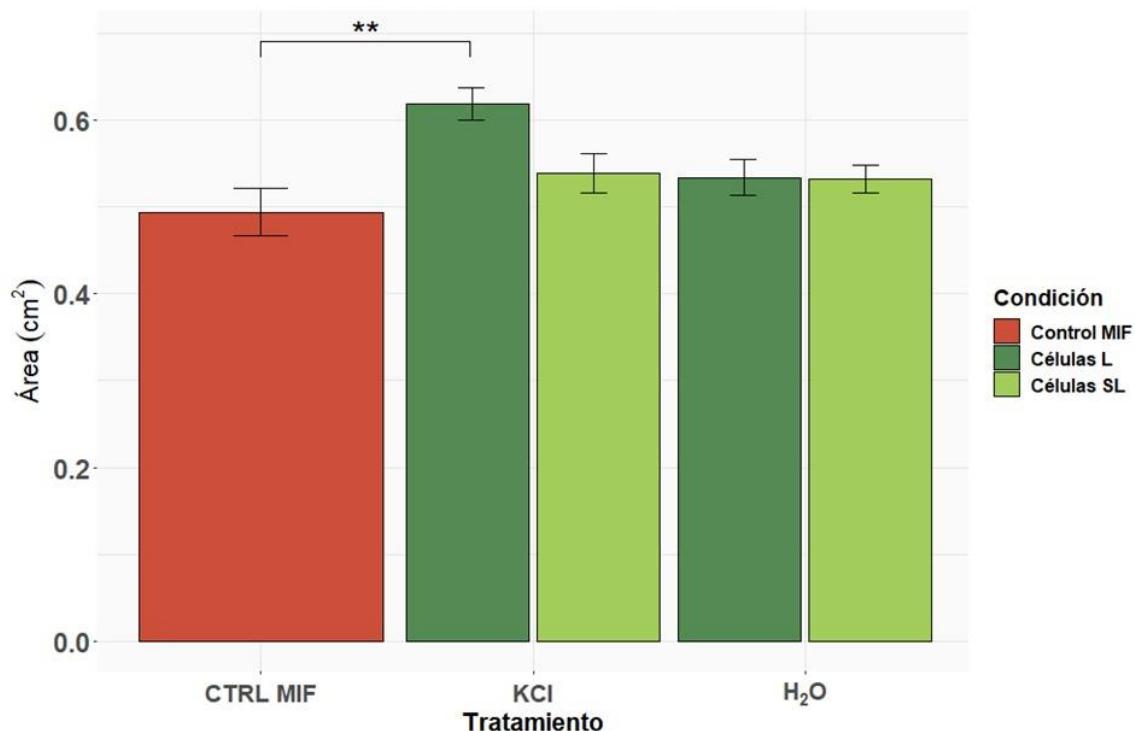
Los productos de PCR obtenidos a partir del ADNc de las células en medio MIF mostraron diferencias de tamaño entre ellos (**figura 8a**), contrario a lo que se observó para los productos obtenidos del medio MI. Los productos del control y las

células SL (antes del choque osmótico) presentan un tamaño aproximado de 1 200 y 900 pb, respectivamente, a pesar de ser condiciones equivalentes entre ellas. Por otro lado, el producto de las células SL posterior al choque osmótico (SL+KCl) presenta un tamaño aproximado de 1 200 pb; mientras que el de las células lavadas antes del choque (L+2L) parece ser ligeramente mayor que el anterior, y, por último, los productos de las células lavadas después del choque (L+2L+KCl) presentan un tamaño muy similar al de las células SL+KCl, de 1 200 pb aproximadamente. Estos resultados indican que el transcripto de la toxina *K1* se encuentra modificado bajo esta combinación de condiciones. Es importante mencionar que el orden presentado en la **figura 8**, conserva el mismo orden en el que se obtuvieron las células al momento del tratamiento con Trizol para la extracción de ARN, por lo que además de los tratamientos administrados a éstas, solo existe la diferencia de un par de minutos entre cada una de ellas.

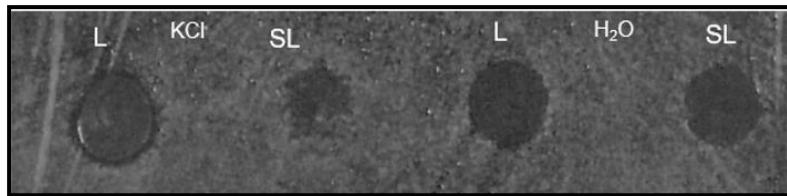
a)



b)



c)



d)

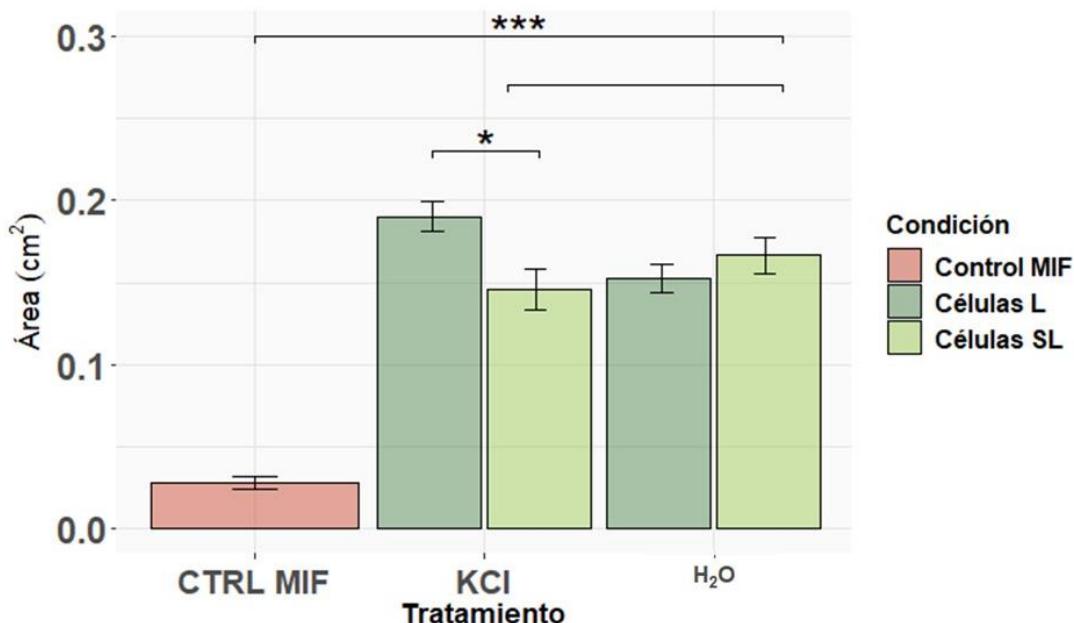


Figura 7. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medio inductor MIF.

- Fotografía que ilustra los halos de inhibición obtenidos por la cepa productora de la toxina *K1* en diferentes condiciones (L, SL) y tratamientos (KCl, H₂O).
- Diferencias del área de inhibición producida (cm²) en los diferentes tratamientos y el control.
- Fotografía que ilustra los halos de inhibición producidos por el sobrenadante obtenido en cada tratamiento.
- Diferencias del área de inhibición producida (cm²) por el sobrenadante de cada tratamiento.

Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Los asteriscos sobre las barras representan el valor p obtenido de la prueba estadística: * <0.05; ** <0.01; *** <0.001.

6.4.5 Análisis de la secuencia de ARNm de *K1*

De acuerdo con los resultados anteriores, la secuenciación de los productos de PCR obtenidos fue indispensable. Desafortunadamente, solo fue posible obtener las secuencias de cuatro de los cinco tratamientos, puesto que el producto de L+2L (células lavadas antes del tratamiento) no fue exitoso al no obtener colonias que fueran transformadas con el vector. Cabe resaltar, además, que estos productos

fueron priorizados para su secuenciación y en la finalización de este trabajo son los únicos obtenidos para su posterior análisis.

La primera observación de las secuencias obtenidas fue la diferencia de tamaño entre ellas y entre el control (secuencia de ARNm de *K1* en *S. cerevisiae* obtenida de NCBI, número de acceso KJ796680), puesto que todas presentan entre 50 y 270 nucleótidos más que el control (**tabla 5**). Por esta razón, la traducción de todas las secuencias y su posterior alineamiento múltiple fue llevado a cabo. Este análisis permite evaluar de manera general *in silico* los cambios que pudieran presentarse en la proteína debido a la gran cantidad de nucleótidos adicionales que presentan. A pesar de esto, el ARNm de CTRL, SL y SL + KCl presentan cambios mínimos en la secuencia de aminoácidos de la proteína, conservando todas sus subunidades con mutaciones que parecen ser silenciosas (**tabla 6**); contrario a lo observado con el ARNm obtenido de las células L + 2L + KCl, puesto que representan el péptido de menor tamaño obtenido, careciendo de la parte terminal de la subunidad γ y toda la subunidad β . Estos resultados indican que bajo la combinación de tratamientos a los cuales fueron sometidos las células, la polimerasa no solamente comete errores al transcribir la secuencia (como es de esperarse) sino que, además, aunque logra transcribir la secuencia de la toxina por completo, en la mayoría de los casos, ésta se posiciona erróneamente río arriba de la secuencia.

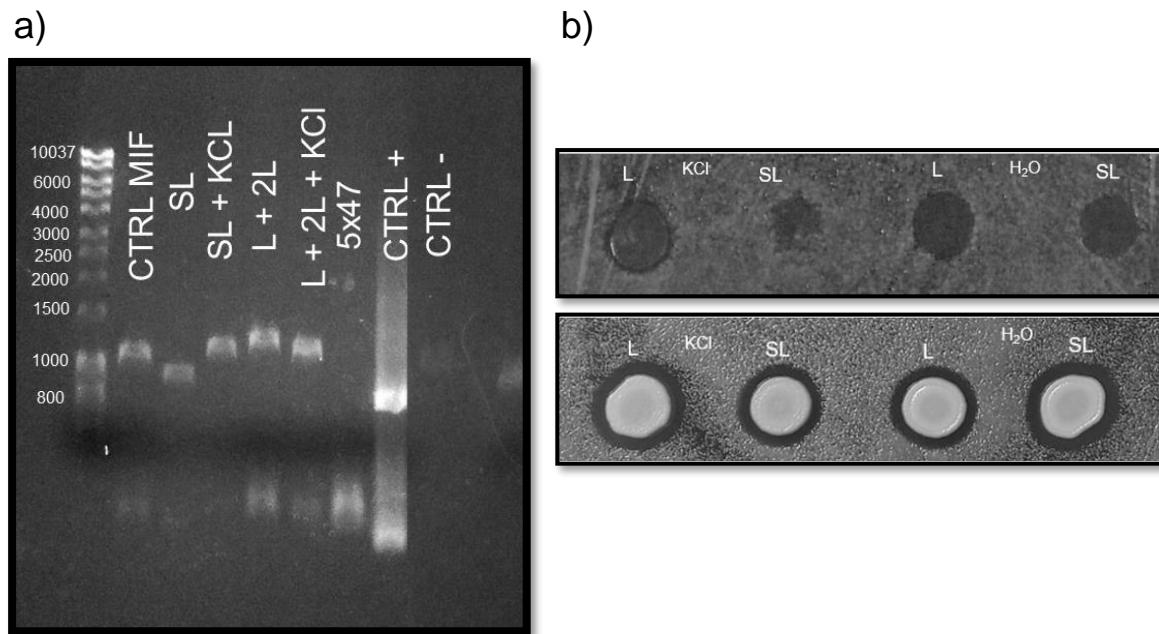


Figura 8. ARNm de *K1* en medio MIF.

- a) Productos de PCR obtenidos a partir de ADNc de *K1* posterior al choque osmótico en medio MIF. CTRL MIF: Control MIF; SL: células sin lavar, sin tratamiento; SL + KCl: células sin lavar con choque osmótico; L + 2L: células lavadas dos veces; L + 2L + KCl: células lavadas dos veces con choque osmótico; 5x47: células sensibles (no productoras de toxina); CTRL+: control positivo; CTRL-: control negativo.

- b) Halos de inhibición obtenidos posterior al choque osmótico. De arriba hacia abajo: al momento del choque osmótico (sobrenadante obtenido), después de 16 h (células productoras).

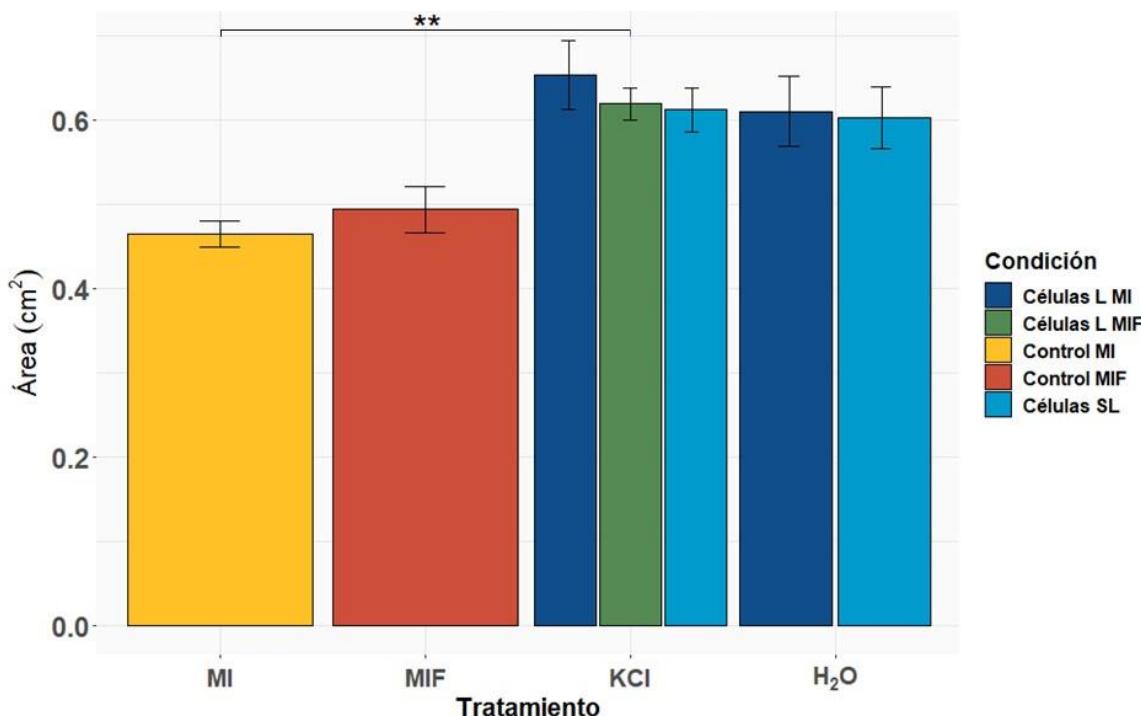


Figura 9. Producción de la toxina posterior al choque osmótico, medios MI, MIF y condiciones con valores significativos.

Diferencias del área de inhibición (cm^2) entre los distintos tratamientos significativos con su control correspondiente y entre ellos.

Las líneas sobre las barras representan el error estándar. Los asteriscos sobre las barras representan en el valor p obtenido de la prueba estadística: ** <0.01 .

Tabla 5: características de los productos de PCR (nt)

Id	Condición	Nucleótidos totales	Nucleótidos río arriba	Nucleótidos río abajo
KJ796680	Control	951	NA	NA
1	CTRL MIF	1230	195	84
2	SL	1224	191	82
3	SL + KCl	1218	189	81
4	L + 2L + KCl	993	86	NA

Tabla 5. Características de los productos de PCR obtenidos (nt).

Comparación entre los productos de PCR de las diferentes condiciones osmóticas en medio MIF y el control (secuencia de la preprotoxina K1 de *S. cerevisiae* obtenida de NCBI). Nucleótidos totales y nucleótidos extra.

Tabla 6: características en los péptidos de los productos de PCR (aa)						
Id	Condición	Aminoácidos (aa) totales	aa conservados (subunidades)	Mutaciones (aa)		
				posición	original	reemplazo
KJ796680	Control	316	NA	145	T	I
1	CTRL MIF	316	313 ($\delta-\alpha-\gamma-\beta$)	180	A	V
				251	F	L
2	SL	316	314 ($\delta-\alpha-\gamma-\beta$)	3	K	S
				196	S	G
				251	F	L
3	SL + KCl	317	305 ($\delta-\alpha-\gamma-\beta$)	8	L	V
				9	V	R
				10	R	S
				11	S	V
				12	V	S
				13	S	I
				14	I	L
				15	L	F
				17	F	H
				33	P	S
				34	Inserción	L
				252	F	L
4	L+2L+ KCl	211	192 ($\delta-\alpha-\gamma^*$)	24	V	F
				26	A	S
				36	E	Codón de paro
				64	D	H
				95	V	L
				96	G	F
				107	G	A
				136	S	P
				138	S	A
				153	V	A
				157	D	H
				162	F	L
				169	L	V
				179	A	S
				180	N	Y
				186	K	Codón de paro
				191	A	P
				204	T	S
				209	D	N

Tabla 6. Características en los péptidos de los productos de PCR obtenidos (aa). Comparación entre los péptidos de los productos de PCR de las diferentes condiciones osmóticas en medio MIF y el control (secuencia de la preprotoxina K1 de *S. cerevisiae* obtenida de NCBI). Aminoácidos totales (correspondientes a la toxina), mutaciones y subunidades conservadas.

7. Discusión

7.1 Choque osmótico

Diferentes cepas de *S. cerevisiae* son capaces de reducir su volumen en presencia de KCl 1 M y de recuperarlo casi por completo posteriormente al ser regresadas a un medio hipotónico. En la **figura 2b**, es posible observar los distintos comportamientos que cada una de las cepas adopta ante este tratamiento. La cepa productora de la toxina fue la que mayor reducción de volumen presentó de las cuatro con un $\Delta = 25.30\%$; sin embargo, no recupera su volumen por completo. Por otro lado, la cepa BY4742 fue la única cepa que recuperó su volumen por completo al ser regresada al medio hipotónico teniendo el delta más bajo de las cuatro $\Delta = 17.65\%$. Esta concentración de KCl ha sido reportada como la concentración máxima a la cual se obtiene una mayor reducción de volumen, puesto que los resultados de otros autores (Petelenz-Kurdziel et al., 2011; Saldaña et al., 2021) indican que no existen diferencias significativas cuando las células son sometidas a concentraciones 1 M y 1.5 M, independientemente del osmolito utilizado, por esta razón no se esperaría que las células pudieran ser capaces de reducir aún más su volumen bajo concentraciones más elevadas de la solución osmótica.

A pesar de que durante el experimento se buscó trabajar siempre con el mismo peso inicial de células independientemente de la cepa utilizada, esto no fue posible debido a que cada una de ellas cuenta con una tasa de crecimiento diferente y esta variable no fue tomada en cuenta durante la realización del experimento, es por esta razón, que se observó una variación en los datos obtenidos (**figura S1**, diagrama de caja y bigotes, Anexo 2: material suplementario). Algunos autores han apuntado a explicar que el grado de respuesta ante un choque osmótico depende de la fase de crecimiento en la que se encuentren las levaduras, puesto que las más jóvenes tendrán una pared celular más delgada y podrán reaccionar al estímulo en menor tiempo, mientras que las levaduras en su fase estacionaria modifican la composición de su pared, resultando en una más gruesa (Klis et al., 2002, 2014), y aunque reducirán su volumen en una proporción equivalente a las jóvenes, podrían tardar más en hacerlo (Martínez De Marañón et al., 1996; Petelenz-Kurdziel et al., 2011). De esta manera, es posible que la variación en los deltas obtenidos en cada una de las cepas se deba a qué tan homogénea se encuentre la población de células a las 36 horas de cultivo.

Aun tomando estas variables en cuenta, los resultados indican que cada cepa posee una diferente respuesta al estímulo, puesto que todos los experimentos fueron realizados bajo el mismo tiempo de exposición a cualquiera de las soluciones utilizadas. Se ha observado que la reducción del volumen celular tras el choque osmótico se lleva a cabo en un periodo de 8-10 segundos, mientras que la recuperación de volumen puede llevar hasta 20 segundos (Martínez De Marañón et al., 1996; Saldaña et al., 2021). Es probable que cada cepa cuente con mecanismos diferentes para la recuperación de volumen, y por esta razón, las cepas 42300, 5x47 y W303 no hayan sido capaces de recuperar su volumen por completo al ser

regresadas al medio hipotónico debido a que no se les dio el tiempo necesario para hacerlo. Por otro lado, es importante mencionar que, bajo las condiciones empleadas en este experimento, no fue posible observar el efecto reportado por otros autores, ya que para las cepas W303, BY4741 y CBS 1171, se reporta una reducción de volumen de hasta un 60%, 65% y 62%, respectivamente (Martínez De Marañon et al., 1997; Petelenz-Kurdziel et al., 2011; Saldaña et al., 2021), mientras que las cepas 42300, W303, BY4742 y 5x47, utilizadas en este estudio, presentan una reducción de volumen de 25.30%, 22.51%, 17.65% y 19.91%, respectivamente.

7.2 Producción de la toxina control

Desde el descubrimiento del fenotipo *Killer*, los ensayos de inhibición en placa han sido utilizados para observar y cuantificar de manera acertada y altamente reproducible este fenómeno (Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Schmitt & Tipper, 1990; Sesti et al., 2001; Somers & Bevan, 1969), estableciendo distintos parámetros para obtener resultados óptimos, como el rango de pH al cual la toxina es estable (4.6-4.8) (Woods & Bevan, 1968), así como diferentes medios “productores de toxina” o “inductores” que, como su nombre lo dice, ayudarán a obtener mejores resultados en dicha producción (Bajaj et al., 2013; Flegelova et al., 2002; Orentaite et al., 2016). Estudios en nuestro equipo de trabajo, han aportado nuevas variables a considerar cuando se busca obtener una producción máxima de toxina *Killer* bajo el ensayo de inhibición de placa, como lo son la cantidad de levadura sensible a colocar en el césped (3 mg) y el tiempo al cual la levadura tiene un pico en la producción de toxina (16 h) (Molina Vera, 2021).

Cuando se evaluó el medio inductor MI, se obtuvieron halos de inhibición consistentes con lo reportado por otros autores y por nuestro equipo de trabajo, tanto de la cepa *Killer* (**figura 3b**) como de la toxina secretada en el medio (Fredericks et al., 2021; Molina Vera, 2021; Woods & Bevan, 1968); por consiguiente, estas condiciones fueron establecidas como nuestro primer control (CTRL MI). Con todos estos parámetros tomados en cuenta, el uso de un nuevo medio inductor que propiciara cambios metabólicos en la levadura productora de toxina fue evaluado.

El medio MIF, es un medio inductor modificado en las concentraciones de todos sus ingredientes, destacando principalmente $FeCl_3$, que aumenta 500 veces su concentración con respecto del medio MI. Como se ha mencionado anteriormente, el Fe^{+3} es un micronutriente de suma importancia dentro de diferentes procesos celulares entre los que se encuentra el transporte vesicular (Patel et al., 2018; Tan et al., 2022) y la respiración celular (Garber Morales et al., 2010). Parece ser que dichas variables están relacionadas con el sistema *Killer*; la primera se cree es la encargada de liberar la toxina al medio extracelular mediante la vía secretora (Bostian et al., 1984), mientras que la segunda puede potenciar o inhibir el sistema *Killer*, ya que la principal característica en común de los medios inductores utilizados es la presencia de glicerol, además, se ha observado que el fenotipo *Killer* puede perderse en condiciones anaerobias (Polonell et al., 1992). Por estas razones, el

medio MIF fue evaluado como una nueva condición a la que se sometió a prueba el sistema *Killer*, sin embargo, cuando la cepa productora de toxina es inducida en este medio, a pesar de obtener un halo de inhibición semejante al producido por las células del medio MI, la toxina secretada en el medio MIF forma un halo de inhibición significativamente menor que el obtenido por la toxina secretada en el medio MI (**figura 3b**). Esto puede deberse a múltiples factores, entre los que se incluyen que la levadura sea capaz de producir la toxina, pero no de liberarla al medio de manera eficiente o, por el contrario, que la toxina sí sea liberada al medio, pero no sea funcional; para determinarlo, experimentos de metabolómica y estudios de proteómica serán clave para concluir si existe alguna alteración debido a la alta concentración de hierro. Diversos estudios han servido para establecer la estrecha relación que existe entre el hierro y su metabolismo con la traducción de proteínas, puesto que muchas de las que se encuentran relacionadas con la iniciación, elongación y terminación del proceso traduccional necesitan de manera directa o indirecta (en la vía de señalización) grupos Fe-S; tanto así que uno de los efectos adversos de la deficiencia de hierro es una baja en la tasa de traducción proteica (Romero et al., 2021). Por esta razón, sería lógico suponer que la tasa traduccional aumenta cuando se tienen concentraciones de hierro mayores a las necesarias, aun así, más estudios relacionados con estas variables son necesarios para poder obtener una respuesta concreta. De cualquier manera, opuesto a lo esperado, el efecto *Killer* no es potenciado bajo estas condiciones. Para efectos de este estudio, experimentos adicionales con Brefeldina A (Lippincott-Schwartz et al., 1991) para modificar el transporte vesicular, así como analizar potenciales cambios en el peso molecular de la toxina mediante electroforesis de proteínas en un gel SDS-PAGE, proporcionarán nuevas pistas que permitan comprender mejor este fenómeno observado.

Otra posible explicación, es que mientras se encuentra en el medio MIF, la levadura no produzca la toxina *Killer* a la misma tasa a la cual lo haría bajo otras condiciones. Esto debido a que, a altas concentraciones de Fe^{+3} extracelular, la levadura tiende a encontrarse en arresto celular para sobrevivir, evitando tomar más hierro del necesario (Čanadi Jurešić et al., 2021; Martínez-Garay et al., 2016; Sorribes-Dauden et al., 2022). Esto se ha observado en diferentes cepas de *S. cerevisiae* capaces de sobrevivir a altas concentraciones de Fe^{+3} (Sorribes-Dauden et al., 2022), similares a las empleadas en este experimento. Tomando todos estos resultados en cuenta, se estableció que el segundo control a evaluar en experimentos posteriores, serían los datos obtenidos del medio MIF (CTRL MIF).

7.3 Producción de la toxina posterior al choque osmótico: medio MI

La producción de la toxina posterior al choque osmótico se evaluó en dos puntos temporales diferentes, entre los que se pueden encontrar distintas respuestas y procesos celulares. Dichos puntos fueron la producción de la toxina posterior al choque osmótico de manera inmediata (toxina presente en el sobrenadante) y la producción de toxina 24 horas después del choque osmótico (halos de inhibición

obtenidos en los ensayos de placa). Como se ha mencionado anteriormente, estos ensayos han sido ampliamente utilizados para evaluar la producción de toxina de manera eficiente (Molina Vera, 2021; Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Schmitt & Tipper, 1990; Sesti et al., 2001; Somers & Bevan, 1969), sin embargo, se necesitan de varias horas para observar el efecto, por lo que, en estudios de este tipo existe la posibilidad que durante dicho tiempo la levadura se adapte, responda y modifique procesos celulares, obteniendo que la relación experimento-resultado no sea estrictamente directa.

En la **figura 5**, cuando las células son inducidas en el medio MI y posteriormente sometidas al choque osmótico con KCl 1 M, los resultados indican dos puntos a destacar: no es posible observar la producción de la toxina, mediante halos de inhibición, al momento del choque osmótico; y, que la producción de toxina sí es observable cuando las células son colocadas en los ensayos de inhibición de placa, obteniendo diferencias significativas contra el control. Este fenómeno podría explicarse por la respuesta de adaptación metabólica y de choque osmótico.

Cuando la levadura productora de toxina se encuentra cultivada en medio YPD y posteriormente es inducida durante 16 h en medio inductor MI (ver metodología producción de toxina control: condiciones de cultivo), se provoca un cambio de condiciones en el medio de cultivo, el cual estresa a la cepa *Killer* al cambiar la fuente de carbono. Esto, de manera general, provoca cambios en la expresión de genes que permitan captar y metabolizar la nueva fuente de carbono, pasando de un crecimiento fermentativo a uno respiratorio no proliferativo, reduciendo sus tasas de transcripción y traducción, incluso hasta después de 11 h, tiempo al cual se observa un pico en la producción de ARNm nuevamente (Radonjic et al., 2005). Es posible incluso, que la levadura entre en fase estacionaria durante este proceso, debido a que la fuente de carbono nueva, que es glicerol, no sea suficiente para mantener el cultivo.

Posteriormente, cuando la célula es mantenida en choque osmótico, entrará en una fase de adaptación, regulación de volumen y distintos procesos celulares entre los que destacan la producción de glicerol (Hohmann et al., 2007) y arresto del ciclo celular (Escoté et al., 2004), todo esto en un espacio reducido del citoplasma producto de la reducción del volumen, obteniendo una tasa de respuesta más lenta (Geijer et al., 2013).

Estudios indican que la tasa de producción de proteínas a nivel transcripcional y traduccional se ve reducida cuando la célula se encuentra en arresto celular (Martínez et al., 2004; Pérez-Ortín et al., 2019; Romero-Santacreu et al., 2009; Warringer et al., 2010); aun así, es capaz de responder a diferentes estímulos a causa que la maquinaria transcripcional se encuentra presente (Radonjic et al., 2005); sin embargo, debido a la gran carga energética que representa traducir proteínas (Pérez-Ortín et al., 2019; Wagner, 2005), solo se encargará de traducir aquellas que le son estrictamente necesarias para adaptarse al fenómeno al cual

ha sido expuesta (Rep et al., 2000; Warringer et al., 2010), esto explicaría el por qué no observamos halos de inhibición cuando evaluamos el sobrenadante obtenido del choque osmótico (**figura 5c**), lo que podría indicar que la toxina no se está traduciendo al no tener prioridad sobre otras proteínas; mientras que una vez que la célula se ha adaptado al choque osmótico, ha recuperado su volumen y se ha adaptado a nueva fuente de carbono (Martinez et al., 2004), puede entonces concentrarse en traducir aquellos ARNm que quedaron remanentes. Por esta razón, se vuelve necesario realizar transcriptomas de la cepa *Killer* en las condiciones de estrés osmótico y altas concentraciones de hierro manejadas en este proyecto, además de realizar experimentos que nos permitan medir glicerol intracelular durante la fase de adaptación y respuesta al choque osmótico, así como experimentos para comprobar que la célula entra en arresto celular.

Bajo estas circunstancias, el efecto *Killer* observado aquí es resultado de una combinación de respuestas a diferentes condiciones a las cuales la célula ha sido sometida: cambio de medio de cultivo, inducción de proteína *Killer*, choque osmótico y competencia con césped de levadura sensible. Estos resultados son consistentes cuando se evaluaron los productos de PCR para el ARNm obtenido de las diferentes condiciones osmóticas (**figura 6a**) en las que se observó que dicho ARNm para la toxina *Killer* se encuentra presente al momento del choque osmótico, pero no parece estar siendo traducido a proteína al no observar halos de inhibición producidos por el sobrenadante obtenido en ese momento. Este ARNm puede quedarse precargado en los ribosomas -“en espera”- a ser traducido, dado que se ha observado bajo choques osmóticos de concentraciones 1 M, que no solamente la vida media de los ARNm aumenta, sino que también éstos son retenidos en cuerpos de P, principalmente aquellos que no son específicos para la respuesta al choque osmótico (Romero-Santacreu et al., 2009). Esto explicaría la razón por la cual se observan halos de inhibición, producidos por las células, mayores que el control independientemente de la condición osmótica a la cual ha sido sometida la célula: choque osmótico con KCl 1 M o medio hipotónico (agua destilada), este estímulo parece ser suficiente para obtener una mayor producción de la toxina *Killer*.

7.4 Producción de la toxina posterior al choque osmótico: medio MIF

Es posible que las células en el medio MIF modifiquen su metabolismo fermentativo a uno respiratorio al ser cambiadas del medio YPD al medio MIF (ver metodología producción de toxina control: condiciones de cultivo), debido no solo a que se han adaptado a una nueva fuente de carbono, sino también porque se ha observado que el hierro promueve la respiración celular (Philpott et al., 2012) y como se ha mencionado, cuentan con una fuente excesiva de éste; sin embargo, en ambos casos se converge en una respuesta de arresto celular (Radonjic et al., 2005; Sorribes-Dauden et al., 2022). Durante este evento, la célula no se encuentra produciendo proteínas que no le son necesarias para sobrevivir, al mismo tiempo que ha dejado de captar hierro para evitar intoxicarse (Čanadi Jurešić et al., 2021; Martínez-Garay et al., 2016; Sorribes-Dauden et al., 2022).

Cuando las células son extraídas del medio para su posterior tratamiento con KCl, diversos fenómenos y estímulos podrían explicar los resultados obtenidos aquí. Primero, tenemos a las células L, que fueron lavadas en dos ocasiones previo al choque osmótico y son las únicas capaces de producir un halo de inhibición mayor al control cuando son sembradas en el césped de la cepa sensible (**figura 7b**). Es posible que estos lavados con agua sean de ayuda a eliminar el Fe^{+3} extracelular que haya quedado remanente entre las células y esto les permita adaptarse más eficientemente y responder con mayor rapidez al nuevo estímulo al cual han sido sometidas: el choque osmótico. Contrario a lo observado en las células del medio MI, cuando regresamos a las células a un medio hipotónico después de haber sido mantenidas en KCl, éstas no producen un halo de inhibición mayor que el control. El por qué sucede esto no se puede responder con certeza; bajo esta combinación de factores, el choque osmótico no parece ser suficiente estímulo para mantener una tasa elevada de producción de toxina después de salir del arresto celular y adaptarse a la nueva fuente de carbono.

Por otro lado, las células SL, que no fueron lavadas previo al choque osmótico, tampoco presentan un halo de inhibición mayor al control. Salir del arresto celular parece ser un proceso bastante complejo y costoso para la célula (Martinez et al., 2004; Radonjic et al., 2005) y aunque es capaz de responder a diferentes estímulos puesto que la maquinaria transcripcional está presente, la producción de la toxina *Killer* queda en último lugar de las prioridades celulares, dado que además de salir del arresto celular, estas células SL tienen que encargarse de terminar de asimilar y metabolizar el hierro, responder al choque osmótico mediante la vía HOG para recuperar su volumen y posterior a todo lo anterior, producir la toxina para competir por recursos con la cepa sensible.

Uno de los resultados más interesantes fue el observar halos de inhibición producidos por el sobrenadante obtenido del choque osmótico (**figura 7c**), debido a que esto indica que la toxina se está liberando en ese momento, contrario a lo observado en el sobrenadante del choque osmótico de las células obtenidas de medio MI (**figura 5c**); además, esto apuntaría a argumentar, que las células en medio MIF sí están produciendo la toxina *Killer*, pero no la liberan al medio. El choque osmótico parece ser el estímulo faltante que las células necesitan para liberar la toxina, posiblemente por la reducción de volumen; sin embargo, la razón por la cual retienen a la toxina hasta ese momento es desconocida. Por otro lado, es importante mencionar que el sobrenadante obtenido de las células en medio hipotónico también produce halos de inhibición, lo que indica que la célula aún continúa liberando toxina en el *swelling* (durante la regulación de volumen).

7.5 Secuencias de producto de PCR

Los productos de amplificación secuenciados, una vez analizada su secuencia, presentan diferentes tamaños entre ellos. A pesar de contar con una Taq polimerasa de alta fidelidad en nuestra reacción de PCR (ver metodología RT-PCR para ARNm de K1: PCR; tabla 2), cuando son evaluados en el alineamiento múltiple es posible

observar diversas mutaciones en dichos productos obtenidos, que provocan cambios en los aminoácidos (**figura S5**, Anexo 2: material suplementario).

La secuencia control (CTRL), que no ha sido sometida a ningún tratamiento, a pesar de contar con nucleótidos río arriba de la secuencia de la preprotoxina (**tabla 5**), ésta se encuentra íntegra, presentando todas las subunidades conocidas y resultando en únicamente tres mutaciones, de las cuales, dos parecen ser silenciosas, dado que producen aminoácidos del grupo no polar. De igual manera, la secuencia obtenida de las células SL previo al choque osmótico, también presenta tres mutaciones en su secuencia de aminoácidos, de las cuales, sólo una parece ser silenciosa; además, esta secuencia también conserva todas las subunidades de la preprotoxina, como se esperaría, al tratarse de condiciones equivalentes (**tabla 6**; **figura S5**).

Interesantemente, cuando comenzamos a tratar a las células con KCl 1 M, las secuencias comienzan a acortarse y presentar una mayor cantidad de mutaciones. La secuencia obtenida de las células SL + KCl presenta 12 mutaciones, de las cuales una es una inserción y la secuencia de las células L + 2L + KCl presenta 19 mutaciones de las cuales dos son un codón de paro, además de carecer de toda la subunidad β de la toxina (**tabla 6**; **figura S5**).

Este dato abre la pregunta, si dicho transcripto se traduce a una proteína funcional. Se podría argumentar, con los resultados obtenidos en experimentos anteriores (**figura 7a** y **7c**) que sí se trata de una proteína capaz de producir el efecto *Killer* en células sensibles a pesar de las mutaciones observadas aquí; sin embargo, es importante recalcar, que la extracción de ARN llevada a cabo en este protocolo fue obtenida justo después de realizar el estímulo de choque osmótico. Los halos de inhibición obtenidos en la **figura 7a** pueden tratarse de una toxina diferente, al encontrarse la célula adaptada a las condiciones expuestas mencionadas anteriormente; de igual manera, existe la posibilidad de que el halo de inhibición observado en la **figura 7c**, tampoco represente lo observado en este transcripto, puesto que podría tratarse de una proteína que ya había sido transcrita y traducida con anterioridad. Estudios posteriores evaluando la evolución de los transcriptos de la proteína bajo estas condiciones en diferentes puntos temporales permitirán obtener una respuesta más acertada de si estos cambios permanecen. Esto devuelve el foco de atención en estudiar la estructura y función de la toxina, puesto que se ha observado que la subunidad β (Gier et al., 2019) es la que ejerce el efecto *Killer* y los resultados obtenidos aquí indican que el halo de inhibición producido por estas células es mayor con respecto al control, mientras que el transcripto es el de menor tamaño y carece de la subunidad β .

Es valioso mencionar que, en todas las secuencias analizadas, las cisteínas se mantienen conservadas en las mismas posiciones que en la secuencia control KJ796680 (**Figura S5**, Anexo 2: material suplementario), esto es importante debido a que la toxina madura se conforma de la subunidad alfa y beta unida por enlaces

disulfuro (Bostian et al., 1984; Bussey et al., 1990; Marquina et al., 2002). Esto indicaría que sin importar de la gran cantidad de nucleótidos río arriba de la secuencia, el procesamiento de la proteína se mantiene de manera conservada.

8. Conclusión y perspectivas

En este trabajo, se evaluó la producción de toxina *Killer* bajo el estrés osmótico en células obtenidas del medio inductor MI; al mismo tiempo, dicha producción de toxina también fue evaluada bajo el estrés osmótico en células obtenidas de un medio inductor diferente, el medio MIF, que se encuentra modificado en las concentraciones de todos sus ingredientes, principalmente FeCl_3 .

En ambos casos, fue posible obtener una mayor producción de toxina bajo el estrés osmótico en ensayos de inhibición en placa y, para el caso de las células obtenidas del medio MIF, también fue posible obtener halos de inhibición de toxina secretada en el medio (KCl o H_2O), después del choque osmótico.

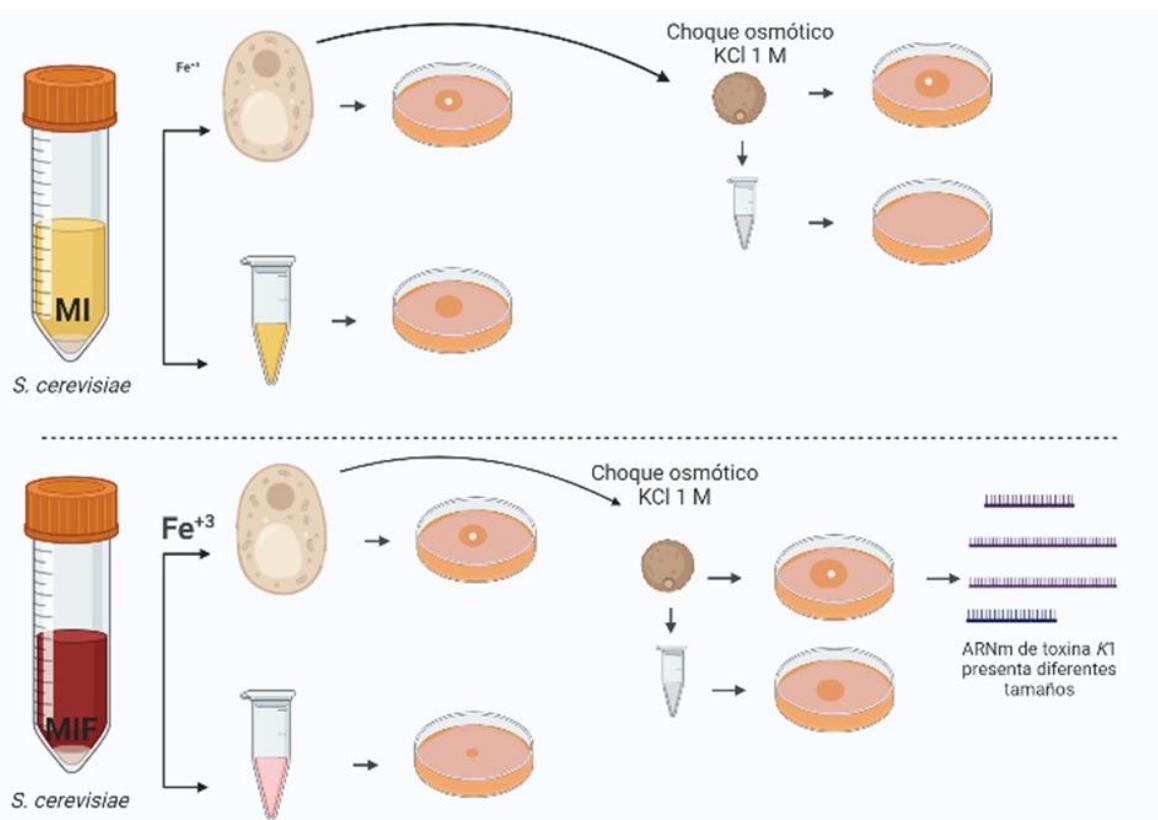


Figura 10. Representación esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo.

Tomando todos estos resultados en conjunto, se han obtenido nuevas formas de evaluar y obtener una mayor producción de toxina *Killer* de *S. cerevisiae*; sin embargo, los resultados obtenidos al analizar las secuencias del ARNm de la toxina *Killer* en el momento del choque osmótico, abren nuevas preguntas sobre cómo estímulos externos pueden afectar en poca (cambios mínimos) o en gran medida

(pérdidas de subunidades completas) la secuencia de la proteína y si estos cambios pueden o no afectar la efectividad o funcionalidad de la proteína.

La información recabada en este trabajo, nos recuerda que el fenotipo *Killer* es un sistema sumamente complejo y es afectado por todos los estímulos externos que se presenten en la levadura, en este caso: la captación de hierro, el choque osmótico, medio de cultivo y fuente de carbono, así como la interacción con la cepa sensible; considerando, además, que aunque son estímulos que si bien podrían evaluarse de manera independiente, es sumamente complicado esperar que la célula responda de manera exclusiva, sobre todo en simbiosis como ésta (virus M y L-A). Múltiples estudios posteriores se deben realizar para esclarecer los procesos involucrados aquí, considerando especialmente que el sistema *Killer* es una interacción entre dos organismos y no un factor de expresión que depende únicamente de uno de ellos: análisis del transporte vesicular en ambos medios inductores, así como el análisis de la proteína obtenida en cada resultado (cada sobrenadante evaluado) en un gel SDS-PAGE, un transcriptoma por cada medio inductor, así como un transcriptoma del estrés osmótico, son tan solo algunos de los principales estudios a realizar.

9. Referencias bibliográficas

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L., & Goldstein, S. A. N. (1999). A Molecular Target for Viral Killer Toxin: TOK1 Potassium Channels. *Cell*, 99(3), 283–291. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674(00)81659-1).
- Aitmanaitė, L., Konovalovas, A., Medvedevas, P., Servienė, E., & Serva, S. (2021). Specificity determination in *saccharomyces cerevisiae* killer virus systems. *Microorganisms*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020236>
- Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., & Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by hot1 depends on a HOG1-mediated recruitment of the rna pol II. *The EMBO Journal*, 22(10), 2433–2442. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg243>
- Babazadeh, R., Adiels, C. B., Smedh, M., Petelenz-Kurdziel, E., Goksoř, M., & Hohmann, S. (2013). Osmostress-induced cell volume loss delays yeast Hog1 signaling by limiting diffusion processes and by Hog1-specific effects. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080901>
- Babazadeh, R., Furukawa, T., Hohmann, S., & Furukawa, K. (2014). Rewiring yeast osmostress signalling through the MAPK network reveals essential and non-essential roles of Hog1 in osmoadaptation. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04697>
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P., & Ljungdahl, P. O. (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of trk1, trk2 and tok1 null mutations. *Molecular Microbiology*, 47(3), 767–780. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03335.x>
- Bevan, E. A., & Makower, M. (1963). The Physiological Basis of the Killer Character in Yeast. *Proc. 11th Int. Congr. Genet. I, (abstract)*, 202–203.
- Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Bum, V., Smith, A., & Tipper, D. J. (1984). Sequence of the Preprotoxin dsRNA Gene of Type I Killer Yeast: Multiple Processing Events Produce a Two-Component Toxin. *Cell*, 36(3), 741–751. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674\(84\)90354-4](https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674(84)90354-4).
- Bostian, K. A., Hopper, J. E., Rogers, D. T., & Tipper, D. J. (1980). Translational Analysis of the Killer-Associated Virus-Like Particle dsRNA Genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA Encodes Toxin. *Cell*, 19, 403–414. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674\(80\)90514-0](https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674(80)90514-0).

- Bracesco, N., Salvo, V. A., Carrau, F. M., & Nunes, E. (2006). Physicochemical modification of the excretion product of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains results in fungicidal activity against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiology Letters*, 256(1), 132–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00113.x>
- Bruenn, J. A. (1980). Virus-like Particles of yeast. *Ann Rev Microbiol*, 34, 49–68. <https://doi.org/doi: 10.1146/annurev.mi.34.100180.000405>.
- Bussey, H., Boone, C., Zhu, H., Vernet, T., Whiteway, M., & Thomas, D. Y. (1990). Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia*, 46(2), 193–200. <https://doi.org/doi: 10.1007/BF02027313>
- Bussey, H., & Sherman, D. (1973). Yeast Killer Factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 298(4), 868–875. [https://doi.org/doi: 10.1016/0005-2736\(73\)90391-x](https://doi.org/doi: 10.1016/0005-2736(73)90391-x).
- Bussey, H., Sherman, D., & Somers, J. M. (1973). Action of Yeast Killer Factor: a Resistant Mutant with Sensitive Spheroplasts. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 113(3), 1193–1197. <https://doi.org/doi: 10.1128/jb.113.3.1193-1197.1973>.
- Čanadi Jurešić, G., Čurko-Cofek, B., Barbarić, M., Mumić, N., Blagović, B., & Jamnik, P. (2021). Response of *Saccharomyces cerevisiae* W303 to Iron and Lead Toxicity in Overloaded Conditions. *Current Microbiology*, 78(4), 1188–1201. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02390-3>
- Cyert, M. S., & Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 677–713. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.147207>
- da Silva, G. A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(2), 112–121. <https://doi.org/doi: 10.1007/s002530050791>
- De La Peña, P., Barros, F., Gascon, S., Laze, P. S., & Ramos, S. (1981). Effect of Yeast Killer Toxin on Sensitive Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(20), 10420–10425.
- De Nadal, E., & Posas, F. (2015). Osmostress-induced gene expression - A model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS Journal*, 282(17), 3275–3285. <https://doi.org/10.1111/febs.13323>

- De Nadal, E., & Posas, F. (2022a). The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast. *FEMS Yeast Research*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foac013>
- De Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G., & Posas, F. (2004). The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes. *Nature*, 427(6972), 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature02258>
- Eldarov, M. A., Kishkovskaya, S. A., Tanaschuk, T. N., & Mardanov, A. V. (2016). Genomics and biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Biochemistry (Moscow)*, 81(13), 1650–1668. <https://doi.org/10.1134/S0006297916130046>
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., & Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biology*, 6(10), 997–1002. <https://doi.org/10.1038/hcb1174>
- Fanjul de Moles, M. L., Hernández-Fonseca, K., Massieu, L., Verdugo Díaz, L., Hiruart Urdanivia, M., Fuentes, B., Moreno, E., Martínez, M., & Hudson, R. (2008). Biología funcional de los animales. 1. Una fisiología comparada metabólica y ambiental. *Editorial Siglo Ventiuno*, 1, 247–254.
- Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2014). Killer yeasts as biocontrol agents of spoilage yeasts and bacteria isolated from wine. *BIO Web of Conferences*, 3. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302001>
- Flegelova, H., Novotna, I., Vojt, K., & Janderova, B. (2002). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *Yeast Research*, 2, 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00070.x>
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195(1), 1–10. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0378-1119\(97\)00140-6](https://doi.org/doi: 10.1016/s0378-1119(97)00140-6).
- Fredericks, L. R., Lee, M. D., Eckert, H. R., Li, S., Shipley, M. A., Roslund, C. R., Boikov, D. A., Kizer, E. A., Sobel, J. D., & Rowley, P. A. (2021). Vaginal Isolates of *Candida glabrata* Are Uniquely Susceptible to Ionophoric Killer Toxins Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.02450-20>
- Fujimura, T., Ribas, J. C., Makhov, A. M., & Wickner, R. B. (1992). Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature*, 359, 746–749. <https://doi.org/doi: 10.1038/359746a0>.
- Galaris, D., Barbouti, A., & Pantopoulos, K. (2019). Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Molecular Cell Research*, 1866(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118535>

- Garber Morales, J., Holmes-Hampton, G. P., Miao, R., Guo, Y., Münck, E., & Lindahl, P. A. (2010). Biophysical characterization of iron in mitochondria isolated from respiring and fermenting yeast. *Biochemistry*, 49(26), 5436–5444. <https://doi.org/10.1021/bi100558z>
- Geijer, C., Medrala-Klein, D., Petelenz-Kurdziel, E., Ericsson, A., Smedh, M., Andersson, M., Goksör, M., Nadal-Ribelles, M., Posas, F., Krantz, M., Nordlander, B., & Hohmann, S. (2013). Initiation of the transcriptional response to hyperosmotic shock correlates with the potential for volume recovery. *FEBS Journal*, 280(16), 3854–3867. <https://doi.org/10.1111/febs.12382>
- Gier, S., Lermen, M., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2019). Substitution of cysteines in the yeast viral killer toxin K1 precursor reveals novel insights in heterodimer formation and immunity. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49621-z>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippson, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/doi:10.1126/science.274.5287.546>.
- Hanes, S. D., Burn, V. E., Sturley, S. L., Tippert, D. J., & Bostian, K. A. (1986). Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: Implications for processing and immunity. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 83, 1675–1679. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.83.6.1675>.
- Hannig, E. M., & Leibowitz, M. J. (1985). Structure and expression of the M2 genomic segment of a type 2 killer virus of yeast. *Nucleic Acid Research*, 13(12), 4379–4400. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/13.12.4379>.
- Hinnen, A., Hicks, J. B., & Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Genetics*, 75(4), 1929–1933. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.75.4.1929>.
- Hohmann, S., Krantz, M., & Nordlander, B. (2007). Yeast Osmoregulation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 428, pp. 29–45). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28002-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28002-4)
- Holmes-Hampton, G. P., Jhurry, N. D., McCormick, S. P., & Lindahl, P. A. (2013). Iron content of *Saccharomyces cerevisiae* cells grown under iron-deficient and iron-overload conditions. *Biochemistry*, 52(1), 105–114. <https://doi.org/10.1021/bi3015339>
- Hutchins, K., & Bussey, H. (1983). Cell Wall Receptor for Yeast Killer Toxin: Involvement of (1-6)-B-D-Glucan. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 154(1), 161–169. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.154.1.161-169.1983>.

- Icho, T., & Wickner, R. B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*, 264(12), 6716–6723.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83488-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83488-3)
- Kachroo, A. H., Laurent, J. M., Yellman, C. M., Meyer, A. G., Wilke, C. O., & Marcotte, E. M. (2015). Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science*, 348(6237), 921–925.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa0769>
- Ketchum, K. A. ;, Joiner, W. J. ;, Sellers, A. J. ;, Kaczmarek, L. J., & & Goldstein, S. A. N. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542), 690-95.
<https://doi.org/DOI: 10.1038/376690a0>
- Klis, F. M., de Koster, C. G., & Brul, S. (2014). Cell wall-related bionumbers and bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 13(1), 2–9. <https://doi.org/10.1128/EC.00250-13>
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
- Li, A., Jia, X., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2011). Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38488–38497.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286666>
- Li, L., & Ward, D. M. (2018). Iron toxicity in yeast: transcriptional regulation of the vacuolar iron importer Ccc1. *Current Genetics*, 64(2), 413–416.
<https://doi.org/10.1007/s00294-017-0767-7>
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., & Klausner', R. D. (1991). Brefeldin A's Effects on Endosomes, Lysosomes, and the TGN Suggest a General Mechanism for Regulating Organelle Structure and Membrane Traffic. *Cell*, 67, 601–616. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90534-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90534-6)
- Lukša, J., Ravoitytė, B., Aitmanaitė, A., Lina, K., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S., & Servienė, E. (2017). Different metabolic pathways are involved in response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M viruses. *Toxins*, 9(8), 233. <https://doi.org/10.3390/toxins9080233>
- Macia, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Solé, R., & Posas, F. (2009). Dynamic Signaling in the Hog1 MAPK Pathway Relies on High Basal Signal Transduction. *Science Signaling*, 2(63).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000056>

- Maeda, T., Takekawa, M., & Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding an SH3-Containing Osmosensor. *Science*, 269(5223), 554–558. <https://doi.org/10.1126/science.7624781>
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast Killer Systems. *FEMS Yeast Research*, 10(3), 369–400. <https://doi.org/doi:10.1093/femsyr/fow003>
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
- Martinac, B., Zhut, H., Kubalski, A., Zhou, X., Culbertson, M., Busseytt, H., & Kung, C. (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(16), 6228–6232. <https://doi.org/doi: 10.1073/pnas.87.16.6228>.
- Martínez De Marañon, I., Gervais, P., & Molin, P. (1997). Determination of Cells' Water Membrane Permeability: Unexpected High Osmotic Permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 56, 62–70. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971005\)56:1<62::AID-BIT7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971005)56:1<62::AID-BIT7>3.0.CO;2-T)
- Martínez De Marañon, I., Marechal, P.-A., & Gervais, P. (1996). Passive Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shifts: Cell Volume Variations Depending on the Physiological State. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(1539), 519–523. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1539>
- Martinez, M. J., Roy, S., Archuleta, A. B., Wentzell, P. D., Santa Anna-Arriola, S., Rodriguez, A. L., Aragon, A. D., Quiñones, G. A., Allen, C., & Werner-Washburne, M. (2004). Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: Gene expression and identification of novel essential genes. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5295–5305. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-11-0856>
- Martínez-Garay, C. A., de Llanos, R., Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. (2016). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins to elevated iron concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1906–1916. <https://doi.org/10.1128/AEM.03464-15>
- Martínez-Pastor, M. T., Perea-García, A., & Puig, S. (2017). Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(75), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2215-8>
- Maturano, Y. P., Nally, M. C., Toro, M. E., de Figueroa, L. I. C., Combina, M., & Vazquez, F. (2012). Monitoring of killer yeast populations in mixed cultures:

Influence of incubation temperature of microvinifications samples. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(11), 3135–3142.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1123-1>

Mazzoni, C., & Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta h*, 1783(7), 1320–1327.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.015>

McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., & Lordkipanidze, D. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), 10309–10318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114>

Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O., & Sunnerhagen, P. E. R. (2009). mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA*, 15(4), 600–614.
<https://doi.org/10.1261/rna.1403509>

Molina Vera, C. A. (2021). Estabilidad y efecto de la toxina K1 recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*. *Repositorio UAQ*.

Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E., & Clarke, K. J. (1983). Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 129, 2023–2034.
<https://doi.org/10.1099/00221287-132-7-2023>

Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. In *Biotechnology Journal* (Vol. 14, Issue 9, pp. 1–9). Wiley-VCH Verlag.
<https://doi.org/10.1002/biot.201800421>

O'Brien, K. P., Remm, M., & Sonnhammer, E. L. L. (2005). Inparanoid: A comprehensive database of eukaryotic orthologs. *Nucleic Acids Research*, 33, 476–480. <https://doi.org/10.1093/nar/gki107>

Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugelavicius, R., & Bamford, D. H. (2016). K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 16(2).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>

Outten, C. E., & Albetel, A. N. (2013). Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 662–668.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.020>

Palfree, R. G. E., & Bussey, H. (1979). Yeast Killer Toxin: Purification and Characterisation of the Protein Toxin from *Saccharomyces cerevisiae*.

European Journal of Biochemistry, 93(3), 487–493.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12847.x>

Patel, D., Xu, C., Nagarajan, S., Liu, Z., Hemphill, W. O., Shi, R., Uversky, V. N., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., & Witt, S. N. (2018). Alpha-synuclein inhibits Snx3-retromer-mediated retrograde recycling of iron transporters in *S. cerevisiae* and *C. elegans* models of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 27(9), 1514–1532. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy059/4857232>

Pérez, F., Ramírez, M., & Regodón, J. A. (2001). Influence of Killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 393–399. <https://doi.org/10.1023/a:1012034608908>

Pérez-Ortíñ, J. E., Tordera, V., & Chávez, S. (2019). Homeostasis in the Central Dogma of molecular biology: the importance of mRNA instability. *RNA Biology*, 16(12), 1659–1666. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1655352>

Petelenz-Kurdziel, E., Eriksson, E., Smedh, M., Beck, C., Hohmann, S., & Goksör, M. (2011). Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Integrative Biology*, 3(11), 1120–1126. <https://doi.org/10.1039/c1ib00027f>

Philpott, C. C., Leidgens, S., & Frey, A. G. (2012). Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1823, Issue 9, pp. 1509–1520). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.012>

Polonell, L., Menozzi, M., Campani, L., Gerloni, M., Conti, S., Morace, G., & Chezzi, C. (1992). (138) Anaerobic Yeast Killer Systems. *Journal of Epidemiology*, 8(3), 471–476.

Posas, F., & Wurgler-Murphy, S. M. (1996). Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "Two-Component" Osmosensor. *Cell*, 86, 865–875. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80162-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80162-2)

Radonjic, M., Andrau, J. C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T. T. J. P., Van Leenen, D., Van Berkum, N. L., & Holstege, F. C. P. (2005). Genome-wide analyses reveal RNA polymerase II located upstream of genes poised for rapid response upon *S. cerevisiae* stationary phase exit. *Molecular Cell*, 18(2), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.010>

Raitt, D. C., Posas, F., & Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO Journal*, 19(17), 4623–4631. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4623>

- Ramírez Villarreal, J. (2018). Estudio de la estructura-función de la Toxina Killer (K1) de *Saccharomyces cerevisiae* en TOK1 y sus posibles homólogos en microorganismos de importancia médica. *Repositorio UAQ*.
- Regot, S., De Nadal, E., Rodriíguez-Navarro, S., González-Novo, A., Pérez-Fernandez, J., Gadal, O., Seisenbacher, G., Ammerer, G., & Posas, F. (2013). The Hog1 stress-activated protein kinase targets nucleoporins to control mRNA export upon stress. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17384–17398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444042>
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., & Schmitt, M. J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 168(3), 353–358. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408071>
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1822–1832. <https://doi.org/10.1128/AEM.02501-10>
- Romero, A. M., Martínez-pastor, M. T., & Puig, S. (2021). Iron in translation: From the beginning to the end. *Microorganisms*, 9(5), 2–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051058>
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., & Alepuz, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 15(6), 1110–1120. <https://doi.org/10.1261/rna.1435709>
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>
- Saldaña, C., Villava, C., Ramírez-Villarreal, J., Morales-Tlalpan, V., Campos-Guillen, J., Chávez-Servín, J., & García-Gasca, T. (2021). Rapid and reversible cell volume changes in response to osmotic stress in yeast. *Journal of Brazilian Microbiology*, 52, 895–903. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00427-0>/Published
- Sangorrín, M. P., Zajonskovsky, I. E., Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Giraudo de Van Broock, M. R., & Caballero, , Adriana Catalina. (2001). Killer behaviour in

wild wine yeasts associated in Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented... *J. Basic Microbiol.*, 41(2), 105–113. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200105\)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200105)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W)

Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>

Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: Preprotoxin Is Processed to an a/b Heterodimeric Protein Toxin. *VIROLOGY*, 213(2), 341–351. <https://doi.org/doi: 10.1006/viro.1995.0007>.

Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. (1990). K28, A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(9), 4807–4815. <https://doi.org/doi: 10.1128/mcb.10.9.4807-4815.1990>.

Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., & Goldstein, S. A. N. (2001). Immunity to K1 Killer Toxin: Internal TOK1 Blockade membrane. First, killer cells bind toxin normally to their. *Cell*, 105(5), 637–644. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/doi: 10.1016/s0092-8674(00)81659-1).

Somers, J. M., & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genet. Res., Comb*, 13(1), 71–83. <https://doi.org/doi: 10.1017/s0016672300002743>.

Sorribes-Dauden, R., Jordá, T., Peris, D., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. (2022). Adaptation of *Saccharomyces* Species to High-Iron Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213965>

Tan, S., Zhang, X., Zhang, Q., Li, Y. M., Zhang, P., & Yin, L. P. (2022). HRM and CRAC in MxIRT1 act as iron sensors to determine MxIRT1 vesicle-PM fusion and metal transport. *Plant Signaling and Behavior*, 17(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.2005881>

Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H. Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., & Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO Journal*, 26(15), 3521–3533. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601796>

Trujillo Barrientos Jessica Gabriela. (2022). Proteínas homólogas del canal TOK1 de *Saccharomyces cerevisiae* en microorganismos patógenos: Su papel como posibles blancos moleculares de las toxinas Killer (K1). *Repositorio UAQ*.

Valzano, M., Cecarini, V., Cappelli, A., Capone, A., Bozic, J., Cuccioloni, M., Epis, S., Petrelli, D., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., Favia, G., & Ricci, I. (2016). A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill

- malaria parasites. *Malaria Journal*, 15(1), 15–21.
<https://doi.org/10.1186/s12936-015-1059-7>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., & Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Wagner, A. (2005). Energy constraints on the evolution of gene expression. *Molecular Biology and Evolution*, 22(6), 1365–1374.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi126>
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., & Hodgson, V. J. (1995). Interactions between Killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127(3), 213–222.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x>
- Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., & Sunnerhagen, P. (2010). The HOG Pathway Dictates the Short-Term Translational Response after Hyperosmotic Shock. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 3080–3092.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E10>
- Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol*, 51(1), 115–126.
<https://doi.org/doi: 10.1099/00221287-51-1-115>.

10. ANEXO 1: medios de cultivo

10.1 Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

Receta para 100 ml:

- Glucosa 2 g
- Peptona de carne 2 g
- Extracto de levadura 1 g

10.2 Agar YPD

6 cajas Petri de 90x15 mm

- Medio YPD
- Agar 2.5 g

10.3 Agar YPD pH 4.7

Receta para 100 ml

- Medio YPD
- Agar 2.5 g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.36 g

Procedimiento

- En un matraz se agregan los siguientes reactivos: glucosa, peptona de carne, extracto de levadura y fosfato monopotásico agregando 45 ml de agua destilada (*matraz 1*).
- En un matraz diferente se agrega el agar con 50 ml de agua destilada (*matraz 2*).
- Se calibra el potenciómetro a utilizar y se mide el pH del medio preparado en el *matraz 1*.
- Se ajusta el pH a 4.5 con ácido cítrico 1 M, registrando el volumen utilizado de éste.
- Se agrega el volumen restante de agua destilada para aforar a 50 ml.
- Posterior a la esterilización en autoclave se vacía el contenido del *matraz 1* en el *matraz 2*, que contiene el agar.
- Se homogeniza y vierte en cajas de Petri.

10.4 Medio inductor para levaduras (MI)

Receta para 100 ml.

- Extracto de levadura 0.75 g
- Peptona de carne 0.5 g
- Glucosa 1 g
- FeCl_3 0.0005 g
- MnSO_4 0.005 g
- MgSO_4 0.05 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g
- KCl 0.08 g
- CaCl_2 0.03 g
- Glicerol 5.2 g
- Ajustado a pH 4.7 con ácido cítrico.

10.5 Medio inductor para levaduras modificado (MIF)

Receta para 100 ml.

- Extracto de levadura 0.75 g
- Peptona de carne 0.5 g
- FeCl_3 0.243 g
- MgSO_4 0.012 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.198 g
- KCl 0.03 g
- CaCl_2 0.022 g
- Glicerol 2.6 g
- Ajustado a pH 4.7 con ácido cítrico.

11. ANEXO 2: material suplementario

11. 1 Choque osmótico a diferentes cepas de *S. cerevisiae*: diagrama de caja y bigotes

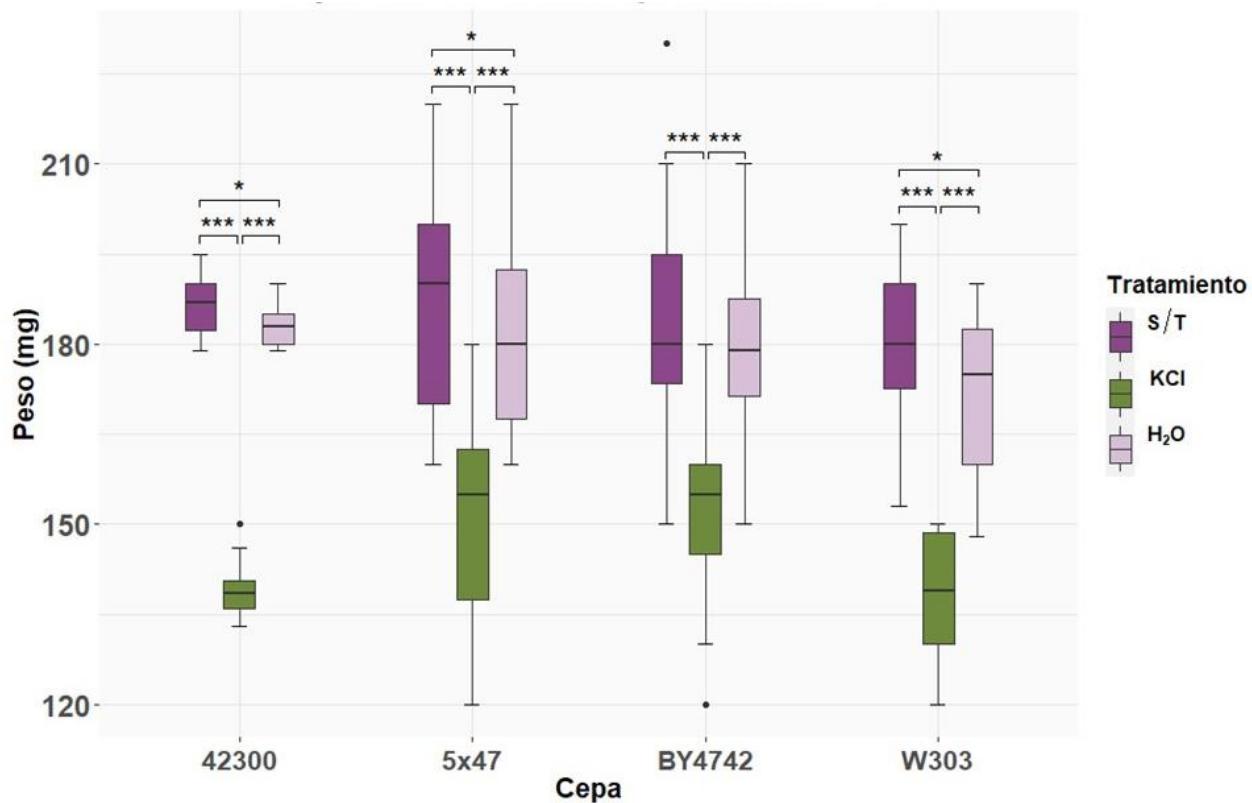
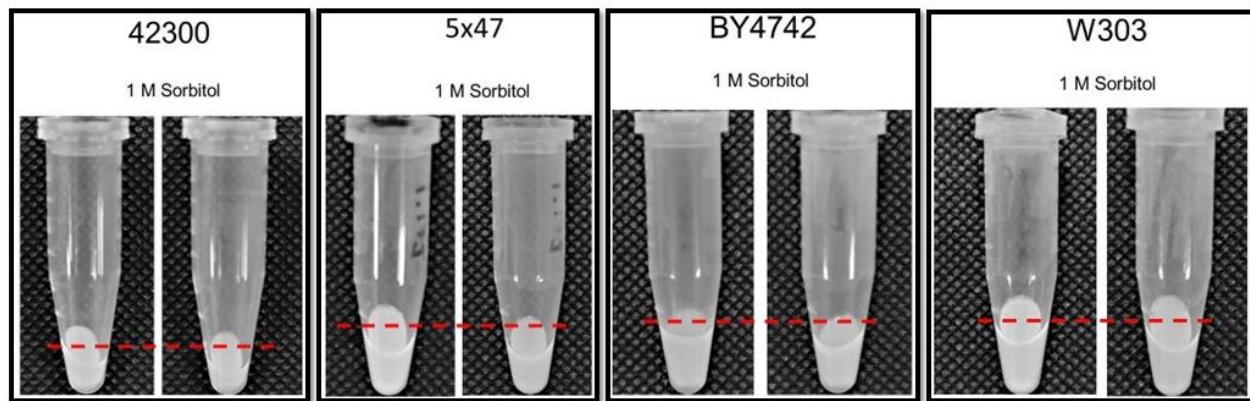


Figura S1. Diagrama de caja y bigotes de choque osmótico con KCl 1 M en diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Es posible observar en este diagrama, la capacidad de regulación de cada cepa ante el choque osmótico debido a la variación de los datos. La cepa productora de toxina, 42300, tiene la menor variación de datos de las cuatro cepas.

11.2 Choque osmótico a diferentes cepas de *S. cerevisiae* con sorbitol 1 M

a)



b)

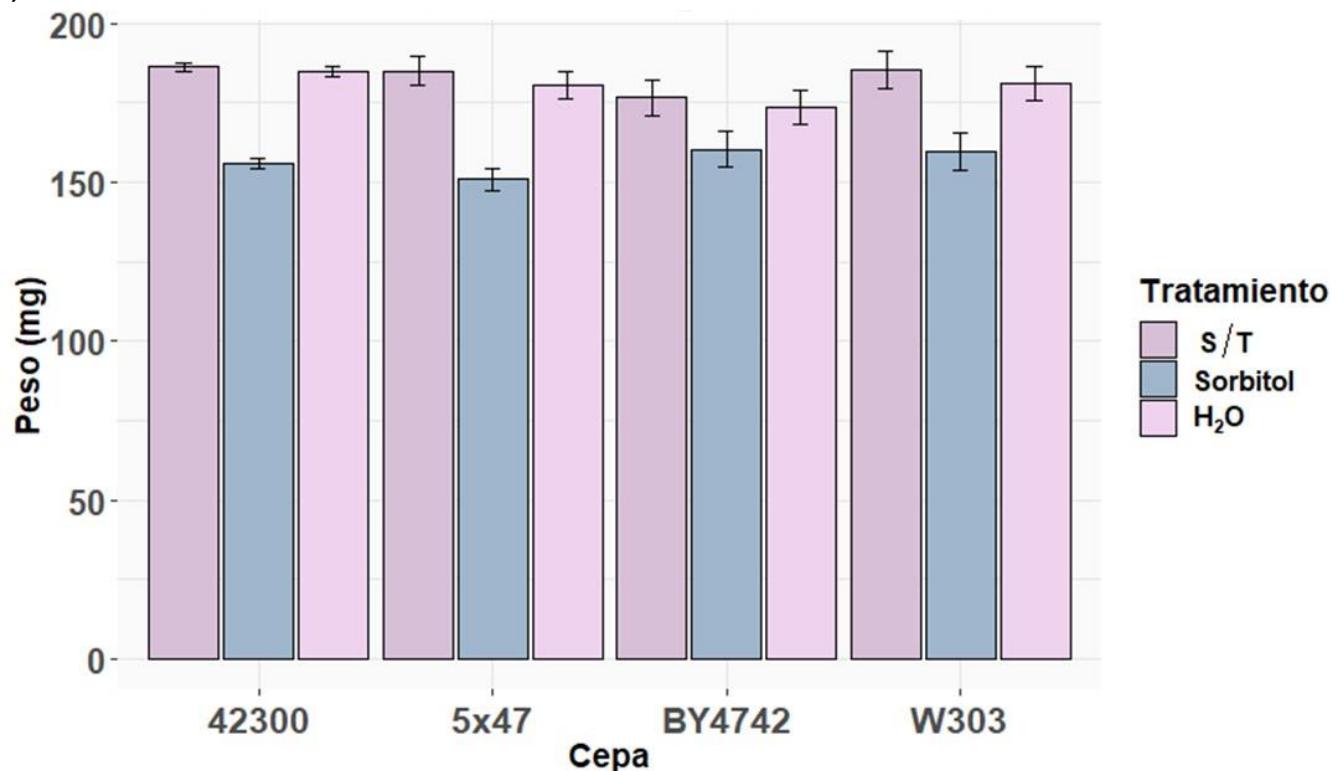


Figura S2. Choque osmótico a diferentes cepas de *S. cerevisiae* con Sorbitol 1 M.

- Fotografías que ilustran el cambio en el volumen de las células sometidas a Sorbitol 1 M
- Peso obtenido (mg) antes y después del choque osmótico con sorbitol y posteriormente con agua destilada. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

No existe distribución normal en los datos presentados, por lo cual, no fue posible realizar una prueba estadística con ellos.

11.3 Choque osmótico con FeCl_3 1 M y 15 mM a cepa productora de toxina K1 (42300)

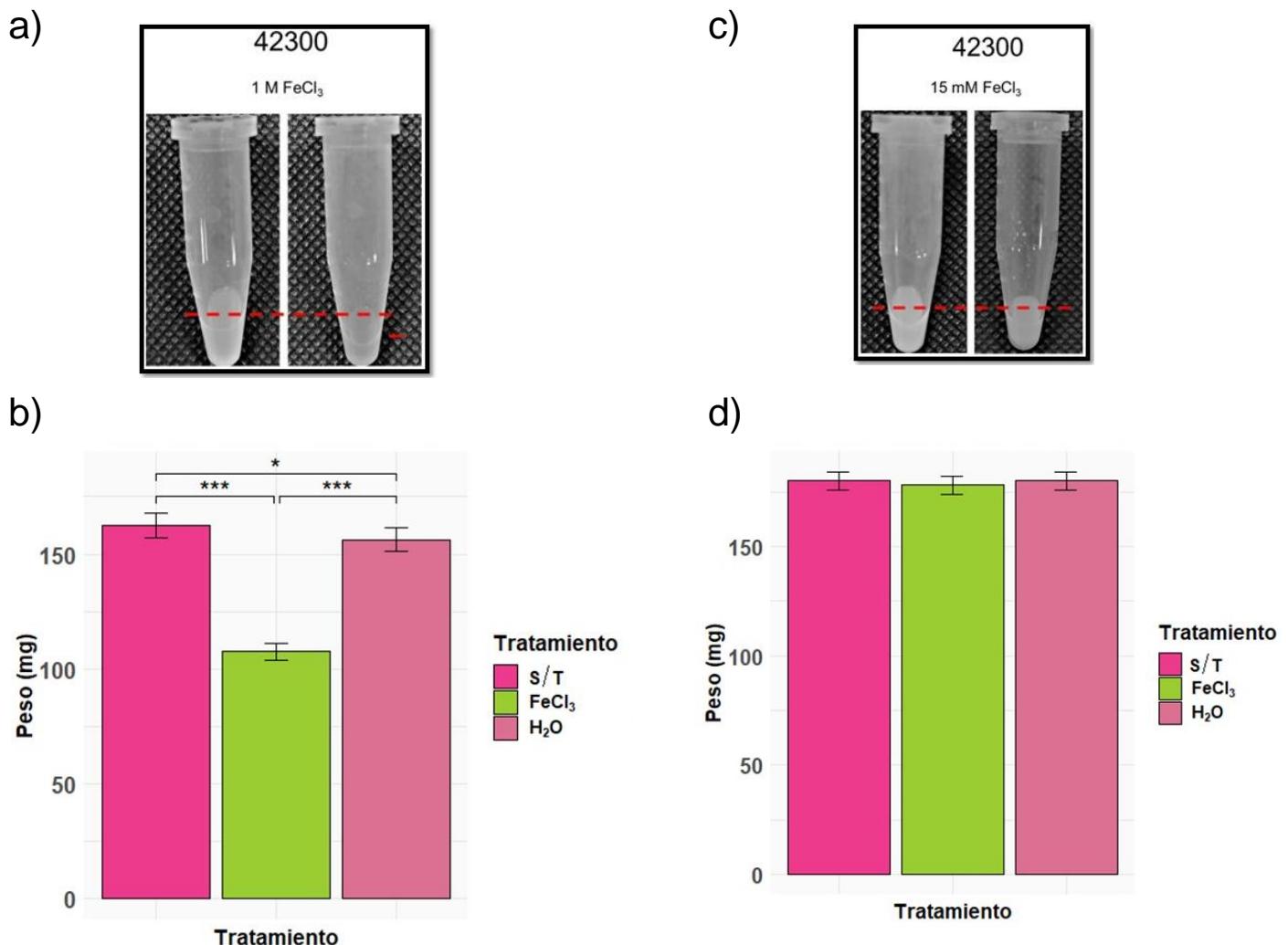


Figura S3. Choque osmótico a la cepa productora de toxina 42300 con diferentes concentraciones de FeCl_3 .

- Fotografías que ilustran el cambio de volumen de las células sometidas a FeCl_3 1 M.
- Peso obtenido (mg) antes y después del choque osmótico con FeCl_3 y agua destilada. Las células pierden peso al ser sometidas al choque osmótico (prueba de *t* test pareado $p < 0.0001$), mismo que recuperan casi por completo en agua destilada (prueba de *t* test pareado $p = 0.002$).
- Fotografías que ilustran el invariable cambio en el volumen de las células sometidas a FeCl_3 15 mM.
- Peso obtenido (mg) antes y después del choque osmótico con FeCl_3 15 mM y con agua destilada. No existe distribución normal de los datos, por lo cual, no fue posible realizar una prueba estadística con ellos. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

11.4 Producción de Toxina por diferentes cepas *Killer* de *S. cerevisiae* (*K1* y *Klus*) en medio inductor MI y MIF

a)

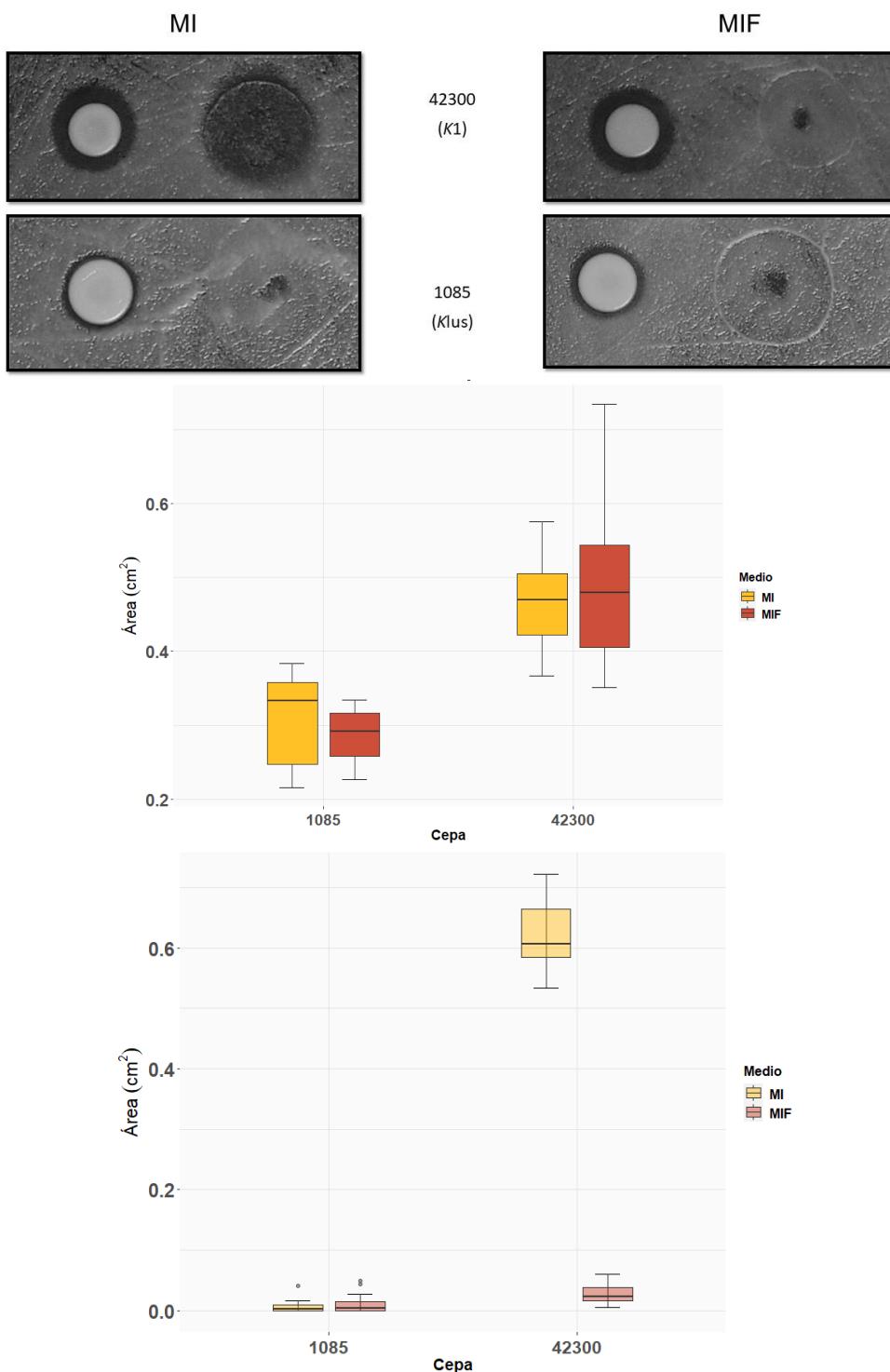


Figura S4. Producción de toxina *Killer* por diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

- a) Fotografías que muestran el halo de inhibición obtenido por las células de la cepa 42300 (productora de *K1*) y 1085 (productora de *Klus*) en diferentes

- medios inductores, así como el halo de inhibición producido por la toxina secretada en éstos.
- b) Diferencias en el área de inhibición producida (cm^2) por las células productoras de toxina en ambos medios inductores.
 - c) Diferencias en el área de inhibición producida (cm^2) por la toxina secretada en el sobrenadante de ambos medios inductores de las dos cepas productoras.

Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

Debido a la falta de datos por parte de la cepa 1085, ya que no en todas las ocasiones analizadas logró formar halos de inhibición ($n = 12$), no existe distribución normal de los datos, por lo cual, no se realizó una prueba estadística para verificar la evidente diferencia entre ambas cepas.

11.5 Secuencias de aminoácidos: análisis de alineamiento múltiple

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Péptido Líder Delta; Alfa; Gama; Beta; Cisteínas; Mutaciones.

L + 2L + KCl	MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHIVS LNDVAGP-A TAPVSLLPREAPWYDKIWEVKDWL	58
SL + KCl	MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHIVS LNDVAGP-A TAPVSLLPREAPWYDKIWEVKDWL	60
SL	MTSPTQVLVRSVSILFFITLLHIVS LNDVAGP-A TAPVSLLPREAPWYDKIWEVKDWL	59
KJ796680	MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHIVS LNDVAGP-A TAPVSLLPREAPWYDKIWEVKDWL	59
CTRL	MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHIVS LNDVAGP-A TAPVSLLPREAPWYDKIWEVKDWL	59
.**: :.*.*****:.*:***** * *****:*****:*****:*****		
L + 2L + KCl	LQRATHGNWGKSITWGSFVASDAGVVIIFGINVCKNCIFERKDDISTDCAKQTLLALLVSIE	118
SL + KCl	LQRATDGNWGKSITWGSFVASDAGVVIIFGINVCKNCVGERKDDISTDCGKQTLLALLVSIE	120
SL	LQRATDGNWGKSITWGSFVASDAGVVIIFGINVCKNCVGERKDDISTDCGKQTLLALLVSIE	119
KJ796680	LQRATDGNWGKSITWGSFVASDAGVVIIFGINVCKNCVGERKDDISTDCGKQTLLALLVSIE	119
CTRL	LQRATDGNWGKSITWGSFVASDAGVVIIFGINVCKNCVGERKDDISTDCGKQTLLALLVSIE	119
*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
L + 2L + KCl	VAVTSGHHIWGNNRPVQADPNAGATVARRDISTAADGHIPLDISALNDIINEHGISILP	178
SL + KCl	VAVTSGHHIWGNNRPVQSQSDPNAGATVARRDISTVADGDIPLDFSAALNDILNEHGISILP	180
SL	VAVTSGHHIWGNNRPVQSQSDPNAGATVARRDISTVADGDIPLDFSAALNDILNEHGISILP	179
KJ796680	VAVTSGHHIWGNNRPVQSQSDPNAGATVARRDISTVADGDIPLDFSAALNDILNEHGISILP	179
CTRL	VAVTSGHHIWGNNRPVQSQSDPNAGATVARRDISTVADGDIPLDFSAALNDILNEHGISILP	179
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
L + 2L + KCl	SYASQYVRSDTDEHTTSFVVTNNYCSLHTLIH-----	211
SL + KCl	ANASQYVKRSDTAEHTTSFVVTNNYTSLHTDLIHHGNGTYTTFTTPHIPAVAKRYVYPMC	240
SL	ANASQYVKRSDTAEHTTSFVVTNNYTSLHTDLIHHGNGTYTTFTTPHIPAVAKRYVYPMC	239
KJ796680	ANASQYVKRSDTAEHTTSFVVTNNYTSLHTDLIHHGNGTYTTFTTPHIPAVAKRYVYPMC	239
CTRL	VNASQYVKRSDTAEHTTSFVVTNNYTSLHTDLIHHGNGTYTTFTTPHIPAVAKRYVYPMC	239
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
L + 2L + KCl	-----EHGIKASYCMAINDAMVSANGNLYGLAELKFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIE	211
SL + KCl	EHGIKASYCMAINDAMVSANGNLYGLAELKFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIE	300
SL	EHGIKASYCMAINDAMVSANGNLYGLAELKFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIE	299
KJ796680	EHGIKASYCMAINDAMVSANGNLYGLAELKFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIE	299
CTRL	EHGIKASYCMAINDAMVSANGNLYGLAELKFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIE	299

L + 2L + KCl	ESIDNANSDFEGCDTGH* 211	
SL + KCl	ESIDNANNDFEGCDTGH* 317	
SL	ESIDNANNDFEGCDTGH* 316	
KJ796680	ESIDNANNDFEGCDTGH* 316	
CTRL	ESIDNANNDFEGCDTGH* 316	

Figura S5. Secuencias de aminoácidos en formato FASTA en un análisis de secuencias múltiple.

Secuencia de toxina *Killer K1* (preprotoxina). Se muestran las subunidades, mutaciones y cisteínas en diferentes colores.

11.6 Árbol filogenético de las secuencias

Phylogenetic Tree

This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.

Branch length: Cladogram Real



Figura S6. Árbol filogenético obtenido de las secuencias de aminoácidos de la figura S5.

11.7 Listado de genes de la cepa 42300 de *S. cerevisiae*

Tras evaluar el listado de genes obtenidos en la secuenciación del genoma de la cepa productora de la toxina *K1*, se puede comprobar que el material genético que codifica para dicha proteína no es genómico, tal como lo marca la literatura, reforzando las conclusiones de este trabajo.

42300

species	protein	read_counts
<i>Staphylococcus warneri</i>	DNA gyrase subunit A	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	ABC transporter, ATP-binding protein	8
<i>Staphylococcus warneri</i>	protein disaggregation chaperone	140
<i>Staphylococcus warneri</i>	tRNA (uracil-5-)methyltransferase Gid	30
<i>Staphylococcus warneri</i>	thymidylate synthase	64
<i>Staphylococcus warneri</i>	tryptophan synthase subunit alpha	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	isopropylmalate isomerase large subunit	19
<i>Staphylococcus warneri</i>	urease	11
<i>Staphylococcus warneri</i>	hypothetical protein lmo2206	119
<i>Staphylococcus warneri</i>	protein kinase	291
<i>Staphylococcus warneri</i>	peptide methionine sulfoxide reductase	254
<i>Staphylococcus warneri</i>	aspartate semialdehyde dehydrogenase	279
<i>Staphylococcus warneri</i>	metallo-beta-lactamase superfamily protein	43
<i>Staphylococcus warneri</i>	RNA polymerase sigma factor	49
<i>Staphylococcus warneri</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	363
<i>Staphylococcus warneri</i>	chaperonin GroEL	10
<i>Staphylococcus warneri</i>	pyrimidine-nucleoside phosphorylase	29
<i>Staphylococcus warneri</i>	branched-chain amino acid carrier protein	189
<i>Staphylococcus warneri</i>	bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase/chorismate muta	116
<i>Staphylococcus warneri</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	58
<i>Staphylococcus warneri</i>	pyruvate carboxylase	14
<i>Staphylococcus warneri</i>	glutamate synthase NADPH large chain	113
<i>Staphylococcus warneri</i>	lipoate protein ligase A	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	85
<i>Staphylococcus warneri</i>	Hsp60, 60K heat shock protein HtpB	10
<i>Staphylococcus warneri</i>	catabolite control protein A	170
<i>Staphylococcus warneri</i>	ClpB protein	60
<i>Staphylococcus warneri</i>	elongation factor Tu	284
<i>Staphylococcus warneri</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	9
<i>Staphylococcus warneri</i>	hypothetical protein SA1453	140
<i>Staphylococcus warneri</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	20

Staphylococcus warneri	hypothetical protein SAB1216	196
Staphylococcus warneri	transcriptional repressor CodY	30
Staphylococcus warneri	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	35
Staphylococcus warneri	phosphotransferase system enzyme I	192
Staphylococcus warneri	catalase	222
Staphylococcus warneri	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	893
Staphylococcus warneri	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	174
Staphylococcus warneri	pyruvate kinase	10
Staphylococcus warneri	DNA polymerase III PolC	36
Staphylococcus warneri	nitrate reductase 1, alpha subunit	27
Staphylococcus warneri	dihydrolipoamide succinyltransferase	225
Staphylococcus warneri	Adenosine synthase A	9
Staphylococcus warneri	homoserine kinase	72
Staphylococcus warneri	(p)ppGpp synthetase	47
Staphylococcus warneri	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	8
Staphylococcus warneri	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	407
Staphylococcus warneri	MarR family transcriptional regulator	144
Staphylococcus warneri	excinuclease ABC subunit A	365
Staphylococcus warneri	methicillin resistance factor FemA	147
Staphylococcus warneri	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	4
Staphylococcus warneri	succinyl-CoA synthetase subunit beta	16
Staphylococcus warneri	serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	119
Staphylococcus warneri	endopeptidase Clp ATP-binding chain C	485
Staphylococcus warneri	glycerol ester hydrolase	171
Staphylococcus warneri	lipoate protein ligase	6
Staphylococcus warneri	hypothetical protein	280
Staphylococcus warneri	fructose-1,6-bisphosphatase	346
Staphylococcus warneri	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	2
Staphylococcus warneri	carbamoyl phosphate synthase small subunit	489
Staphylococcus warneri	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	12
Staphylococcus warneri	S-adenosylmethionine synthase	24
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SAHV_0924	222
Staphylococcus warneri	recombinase A	285
Staphylococcus warneri	fructose-bisphosphatase	382
Staphylococcus warneri	malic enzyme	5
Staphylococcus warneri	carbamoyl phosphate synthase large subunit	289
Staphylococcus warneri	serine hydroxymethyltransferase	2

Staphylococcus warneri	preprotein translocase subunit SecA	231
Staphylococcus warneri	CTP synthetase	138
Staphylococcus warneri	methionine sulfoxide reductase A	113
Staphylococcus warneri	formate--tetrahydrofolate ligase	20
Staphylococcus warneri	urease subunit beta	1
Staphylococcus warneri	GTP-binding protein LepA	180
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SA0847	417
Staphylococcus warneri	ketol-acid reductoisomerase	7
Staphylococcus warneri	ATP-dependent protease	7
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SAR1372	190
Staphylococcus warneri	glutamine synthetase, type I	21
Staphylococcus warneri	RNA polymerase sigma factor SigB	21
Staphylococcus warneri	factor essential for expression of methicillin resistance	141
Staphylococcus warneri	aconitate hydratase	1136
Staphylococcus warneri	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	3
Staphylococcus warneri	superoxide dismutase, Mn	10
Staphylococcus warneri	adenylosuccinate lyase	146
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SPy_1633	28
Staphylococcus warneri	Cof family protein/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	23
Staphylococcus warneri	UreC	17
Staphylococcus warneri	diaminopimelate decarboxylase	482
Staphylococcus warneri	staphopain cysteine proteinase SspB	109
Staphylococcus warneri	formate acetyltransferase 3	114
Staphylococcus warneri	acetolactate synthase catalytic subunit	10
Staphylococcus warneri	Holliday junction DNA helicase ruvB	3
Staphylococcus warneri	purine nucleoside phosphorylase	46
Staphylococcus warneri	F0F1 ATP synthase subunit alpha	40
Staphylococcus warneri	ATP-dependent DNA helicase DinG	299
Staphylococcus warneri	UBA/THIF-type NAD/FAD-binding protein	20
Staphylococcus warneri	oligopeptide transporter permease	77
Staphylococcus warneri	leucyl-tRNA synthetase	218
Staphylococcus warneri	UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase	29
Staphylococcus warneri	FemB protein	331
Staphylococcus warneri	molecular chaperone DnaK	80
Staphylococcus warneri	adenylosuccinate synthetase	82
Staphylococcus warneri	tryptophan synthase subunit beta	569
Staphylococcus warneri	Holliday junction DNA helicase RuvB	35

Staphylococcus warneri	urease beta subunit UreB, urea amidohydrolase	7
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SA1062	132
Staphylococcus warneri	GMP synthase	166
Staphylococcus warneri	triacylglycerol lipase precursor	678
Staphylococcus warneri	Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	257
Staphylococcus warneri	UDP-glucose pyrophosphorylase	17
Staphylococcus warneri	ATP-dependent DNA helicase dinG	333
Staphylococcus warneri	superoxide dismutase	13
Staphylococcus warneri	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein GidA	164
Staphylococcus warneri	hypothetical protein SP_0095	10
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.13454	2
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.3038	12
Debaryomyces hansenii	peroxin-6	9
Debaryomyces hansenii	ATP-binding cassette transporter	18
Debaryomyces hansenii	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.6812	14
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.8424	1
Debaryomyces hansenii	Ade2p	12
Debaryomyces hansenii	potential glycoprotein glucosyltransferase	2
Debaryomyces hansenii	Ura3p	3
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.8625	2
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.9240	4
Debaryomyces hansenii	potential ER membrane P-type ATPase	26
Debaryomyces hansenii	transcription factor Upc2	15
Debaryomyces hansenii	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit PkaC1	4
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.7551	4
Debaryomyces hansenii	molecular chaperone DnaK	8
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.10874	2
Debaryomyces hansenii	AGC/Akt protein kinase	6
Debaryomyces hansenii	proteolytically activated regulator of alkaline-induced filamentation	1
Debaryomyces hansenii	integrin-like protein	3
Debaryomyces hansenii	potential HSF-type DNA binding transcription factor	7
Debaryomyces hansenii	potential polyamine transporter	16
Debaryomyces hansenii	phosphoribosylformylglycinamidine synthase	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.4109	6
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.8183	10
Debaryomyces hansenii	fungal cell wall GPI anchor synthesis protein Gpi7p fragment	2

Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.1665	4
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.11237	17
Debaryomyces hansenii	potential type 2A-related protein phosphatase	14
Debaryomyces hansenii	potential vacuolar sorting ATPase	16
Debaryomyces hansenii	likely protein kinase	31
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.13719	7
Debaryomyces hansenii	calcineurin catalytic subunit CnaA	1
Debaryomyces hansenii	G-protein alpha subunit	2
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.5691	4
Debaryomyces hansenii	STE20	4
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.11492	2
Debaryomyces hansenii	potential mRNA deadenylase and CCR4-NOT complex subunit Not5p	2
Debaryomyces hansenii	S-adenosylmethionine synthase	7
Debaryomyces hansenii	potential TEA/ATTS type DNA binding protein	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.6953	3
Debaryomyces hansenii	[Cryptococcus neoformans var. grubii]	6
Debaryomyces hansenii	transcriptional repressor of filamentous growth	6
Debaryomyces hansenii	amidophosphoribosyltransferase	1
Debaryomyces hansenii	likely signal transduction kinase	15
Debaryomyces hansenii	peroxin-1	10
Debaryomyces hansenii	rho family protein	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.7622	8
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.5171	6
Debaryomyces hansenii	likely flavohemoglobin	1
Debaryomyces hansenii	Mpk1	1
Debaryomyces hansenii	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase	1
Debaryomyces hansenii	hsp70	19
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.13747	25
Debaryomyces hansenii	Atypical/PIKK/FRAP protein kinase	2
Debaryomyces hansenii	CaNAG1	4
Debaryomyces hansenii	likely multifunctional urea amidolyase	57
Debaryomyces hansenii	eukaryotic translation initiation factor 4A	4
Debaryomyces hansenii	put. CPS1 protein	3
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.6033	8
Debaryomyces hansenii	TI4L	6
Debaryomyces hansenii	pyruvate kinase	5
Debaryomyces hansenii	fimbrin	1

Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.6844	18
Debaryomyces hansenii	elongation factor Tu	2
Debaryomyces hansenii	potential zinc finger transcription factor	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.7089	28
Debaryomyces hansenii	2-isopropylmalate synthase	6
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.2151	4
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CNBB4980	3
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.13961	18
Debaryomyces hansenii	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	7
Debaryomyces hansenii	Victors 74656036 sp Q58Z64.1 DHH1_CRYNV RecName: Full=ATP-d	12
Debaryomyces hansenii	positive regulator of alkaline-induced genes	4
Debaryomyces hansenii	protein kinase kin1	5
Debaryomyces hansenii	potential non-classical secretion pathway protein	1
Debaryomyces hansenii	chaperonin GroEL	3
Debaryomyces hansenii	topoisomerase I	10
Debaryomyces hansenii	homoaconitase LysF	2
Debaryomyces hansenii	glutamate synthase NADPH large chain	3
Debaryomyces hansenii	Leu2p	4
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.1161	17
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.4077	5
Debaryomyces hansenii	Ras family GTP-binding protein Rho1p	10
Debaryomyces hansenii	AGC/NDR/NDR protein kinase	11
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.5343	3
Debaryomyces hansenii	isocitrate lyase	3
Debaryomyces hansenii	potential glycosyl hydrolase	6
Debaryomyces hansenii	protein disaggregation chaperone	1
Debaryomyces hansenii	hypothetical protein CaO19.9980	15
Debaryomyces hansenii	potential forkhead-like transcriptional regulator	9
Debaryomyces hansenii	potential urea active transport protein	7
Debaryomyces hansenii	phosphatidylinositol 4-kinase	2
Debaryomyces hansenii	DNA topoisomerase II	32
Debaryomyces hansenii	isopropylmalate isomerase large subunit	3
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SA1453	7
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SAB1216	3
Staphylococcus epidermidis	transcriptional repressor CodY	3
Staphylococcus epidermidis	catabolite control protein A	11
Staphylococcus epidermidis	Hsp60, 60K heat shock protein HtpB	1

Staphylococcus epidermidis	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	6
Staphylococcus epidermidis	ClpB protein	3
Staphylococcus epidermidis	elongation factor Tu	8
Staphylococcus epidermidis	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	3
Staphylococcus epidermidis	pyruvate carboxylase	1
Staphylococcus epidermidis	type VII secretion system protein secreted protein EsxA	5
Staphylococcus epidermidis	glutamate synthase NADPH large chain	4
Staphylococcus epidermidis	RNA polymerase sigma factor	1
Staphylococcus epidermidis	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	13
Staphylococcus epidermidis	type VII secretion system protein EsaA	8
Staphylococcus epidermidis	branched-chain amino acid carrier protein	7
Staphylococcus epidermidis	bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase/chorismate muta	4
Staphylococcus epidermidis	peptide methionine sulfoxide reductase	15
Staphylococcus epidermidis	protein kinase	12
Staphylococcus epidermidis	aspartate semialdehyde dehydrogenase	8
Staphylococcus epidermidis	type VII secretion system protein EssC, FtsK/SpoIIIE family ATPase	42
Staphylococcus epidermidis	urease	1
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein lmo2206	4
Staphylococcus epidermidis	isopropylmalate isomerase large subunit	2
Staphylococcus epidermidis	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	1
Staphylococcus epidermidis	ABC transporter, ATP-binding protein	1
Staphylococcus epidermidis	protein disaggregation chaperone	5
Staphylococcus epidermidis	glycerol ester hydrolase	11
Staphylococcus epidermidis	endopeptidase Clp ATP-binding chain C	23
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein	11
Staphylococcus epidermidis	zinc metalloproteinase aureolysin	15
Staphylococcus epidermidis	excinuclease ABC subunit A	11
Staphylococcus epidermidis	branched-chain amino acid transport system II carrier protein	1
Staphylococcus epidermidis	putative ATP-binding component of a transport system	1
Staphylococcus epidermidis	methicillin resistance factor FemA	5
Staphylococcus epidermidis	(p)ppGpp synthetase	3
Staphylococcus epidermidis	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	12
Staphylococcus epidermidis	MarR family transcriptional regulator	3
Staphylococcus epidermidis	homoserine kinase	2
Staphylococcus epidermidis	dihydrolipoamide succinyltransferase	6
Staphylococcus epidermidis	DNA polymerase III PolC	5
Staphylococcus epidermidis	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	8

Staphylococcus epidermidis	phosphotransferase system enzyme I	5
Staphylococcus epidermidis	catalase	4
Staphylococcus epidermidis	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	31
Staphylococcus epidermidis	diaminopimelate decarboxylase	8
Staphylococcus epidermidis	adenylosuccinate lyase	9
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SPy_1633	1
Staphylococcus epidermidis	Cof family protein/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	3
Staphylococcus epidermidis	factor essential for expression of methicillin resistance	6
Staphylococcus epidermidis	aconitate hydratase	63
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SAR1372	5
Staphylococcus epidermidis	GTP-binding protein LepA	7
Staphylococcus epidermidis	preprotein translocase subunit SecA	12
Staphylococcus epidermidis	CTP synthetase	8
Staphylococcus epidermidis	recombinase A	22
Staphylococcus epidermidis	S-adenosylmethionine synthase	2
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SAHV_0924	16
Staphylococcus epidermidis	fructose-bisphosphatase	15
Staphylococcus epidermidis	carbamoyl phosphate synthase large subunit	15
Staphylococcus epidermidis	fructose-1,6-bisphosphatase	22
Staphylococcus epidermidis	carbamoyl phosphate synthase small subunit	20
Staphylococcus epidermidis	superoxide dismutase	1
Staphylococcus epidermidis	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein GidA	4
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SP_0095	1
Staphylococcus epidermidis	Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	1
Staphylococcus epidermidis	UDP-glucose pyrophosphorylase	2
Staphylococcus epidermidis	ATP-dependent DNA helicase dinG	14
Staphylococcus epidermidis	GMP synthase	7
Staphylococcus epidermidis	hypothetical protein SA1062	4
Staphylococcus epidermidis	triacylglycerol lipase precursor	25
Staphylococcus epidermidis	type VII secretion system protein EssB, monotopic membrane protein	7
Staphylococcus epidermidis	adenylosuccinate synthetase	3
Staphylococcus epidermidis	Holliday junction DNA helicase RuvB	1
Staphylococcus epidermidis	tryptophan synthase subunit beta	14
Staphylococcus epidermidis	Listeria adhesion protein Lap	3
Staphylococcus epidermidis	molecular chaperone DnaK	4
Staphylococcus epidermidis	oligopeptide transporter permease	4
Staphylococcus epidermidis	leucyl-tRNA synthetase	8

Staphylococcus epidermidis	FemB protein	13
Staphylococcus epidermidis	acetolactate synthase catalytic subunit	1
Staphylococcus epidermidis	Holliday junction DNA helicase ruvB	1
Staphylococcus epidermidis	formate acetyltransferase 3	8
Staphylococcus epidermidis	ATP-dependent DNA helicase DinG	7
Saccharomyces cerevisiae	[Cryptococcus neoformans var. grubii]	5
Saccharomyces cerevisiae	amidophosphoribosyltransferase	2
Saccharomyces cerevisiae	likely signal transduction kinase	18
Saccharomyces cerevisiae	peroxin-1	6
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein	12
Saccharomyces cerevisiae	rho family protein	3
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.7622	1
Saccharomyces cerevisiae	hsp70	76
Saccharomyces cerevisiae	Mpk1	2
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.13747	6
Saccharomyces cerevisiae	eukaryotic translation initiation factor 4A	4
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.6033	9
Saccharomyces cerevisiae	put. CPS1 protein	1
Saccharomyces cerevisiae	likely multifunctional urea amidolyase	21
Saccharomyces cerevisiae	acetate--CoA ligase	1
Saccharomyces cerevisiae	TI4L	3
Saccharomyces cerevisiae	pyruvate kinase	3
Saccharomyces cerevisiae	fimbrin	5
Saccharomyces cerevisiae	calcium/proton exchanger	1
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.6844	7
Saccharomyces cerevisiae	elongation factor Tu	4
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.7089	13
Saccharomyces cerevisiae	2-isopropylmalate synthase	2
Saccharomyces cerevisiae	ClpB protein	1
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.2151	1
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CNBB4980	3
Saccharomyces cerevisiae	hypothetical protein CaO19.13961	19
Saccharomyces cerevisiae	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	6
Saccharomyces cerevisiae	Victors 74656036 sp Q58Z64.1 DHH1_CRYNV RecName: Full=ATP-d	6
Saccharomyces cerevisiae	protein kinase kin1	1
Saccharomyces cerevisiae	topoisomerase I	8
Saccharomyces cerevisiae	homoaconitase LysF	5

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Leu2p	19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.4077	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glutamate synthase NADPH large chain	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.1161	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ras family GTP-binding protein Rho1p	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AGC/NDR/NDR protein kinase	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	potential glycosyl hydrolase	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	potential forkhead-like transcriptional regulator	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DNA topoisomerase II	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	isopropylmalate isomerase large subunit	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.13454	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP-binding cassette transporter	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	peroxin-6	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	tryptophan synthase subunit beta	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.6812	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.8424	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ade2p	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ura3p	17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	potential ER membrane P-type ATPase	28
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit PkaC1	19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	molecular chaperone DnaK	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F0F1 ATP synthase subunit alpha	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AGC/Akt protein kinase	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetical protein CaO19.8183	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glutamate dehydrogenase	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	potential type 2A-related protein phosphatase	24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	potential vacuolar sorting ATPase	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	spermidine synthase	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	likely protein kinase	26
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G-protein alpha subunit	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	calcineurin catalytic subunit CnaA	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sulfate adenyltransferase MET3	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mip1p	73
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	STE20	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vacuolar (H ⁺)-ATPase subunit	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S-adenosylmethionine synthase	25

Pseudomonas stutzeri	flagellar basal-body rod protein FlgG	1
Pseudomonas stutzeri	transketolase	1
Pseudomonas stutzeri	type 4 fimbrial biogenesis protein PilB	1
Pseudomonas stutzeri	type IV pilus inner membrane platform protein PilO	1
Pseudomonas stutzeri	general secretion pathway protein G	1
Pseudomonas stutzeri	5-methyltetrahydropteroylglutamate/homocysteine S-methyltransferase	1
Pseudomonas stutzeri	TDP-glucose pyrophosphorylase	1
Pseudomonas fulva	flagellar biosynthesis sigma factor FliA	1
Pseudomonas fulva	recombinase A	1
Pseudomonas fulva	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1
Pseudomonas fulva	phosphoglycerate kinase	1
Pseudomonas fulva	flagellar P-ring protein precursor FlgI	1
Pseudomonas fulva	ABC transporter, ATP-binding protein	1
Pseudomonas fulva	DNA topoisomerase I	1
Pseudomonas fulva	transport protein	1
Pseudomonas fulva	dihydrolipoamide succinyltransferase	1
Acinetobacter Iwoffii	elongation factor Tu	1

Figura S7. Listado de genes obtenidos en la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* cepa 42300 (MATalpha ade2 thr1 ski2-1 [K1L-k1]; productora de K1), utilizadas en este estudio.