



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

**Estudio de los sitios blanco de la toxina *Killer (K1)* de
Saccharomyces cerevisiae en el canal de potasio Tok1p**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencias
Biológicas

Presenta

Jimena Ramírez Villarreal

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha: Octubre 2021.

México.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Estudio de los sitios blanco de la toxina *Killer (K1)* de *Saccharomyces cerevisiae* en el canal de potasio Tok1p

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Jimena Ramírez Villarreal

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Presidente

Dr. Roberto A. Ferríz Martínez
Secretario

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Vocal

Dr. Adán Hernández Cortés
Suplente

Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha: Octubre 2021.

México.

DEDICATORIAS

Para todas las personas que siempre están en mi corazón por su gran amor y apoyo, ustedes son la razón de mis logros y el principal motivo para continuar persiguiendo lo que más me gusta en la vida.

Los quiero.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Financiamiento:

- SEP-CONACyT Ciencia básica número: A1-S-26966.
- CONACyT LAVIS-UAQ.
- FONDEC 2019 y Ciencia Básica.
- Becas Nacionales CONACYT: 1003112.

Apoyo técnico y logístico:

- Dra. Verónica Morales Tlalpan – Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, UAQ, Aeropuerto.
- Maestra Adriana González Gallardo – Unidad de Proteogenómica, UNAM, Juriquilla.
- Dr. Carlos Saldaña por su constante apoyo para guiar y mejorar el proyecto.
- A los Doctores sinodales: Adán Hernández Cortés, Ataúlfo Martínez Torres, Roberto A. Ferriz Martínez y Marco Antonio Sánchez Ramos por sus valiosos comentarios, sugerencias y apoyo para enriquecer este proyecto.
- Unidad de Proteogenómica de la INB-UNAM por el espacio, e instalaciones brindadas, y también por el apoyo logístico.
- Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS UAQ-UNAM) por el apoyo con equipo de cómputo para realizar los modelos teóricos, así como el uso de las instalaciones.

ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL	6
RESUMEN EN INGLÉS	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	9
Microorganismos y toxinas	9
Toxina <i>Killer</i> (<i>K1</i>) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Transportadores iónicos en las levaduras y su importancia	15
Canal de potasio con rectificación saliente Tok1	16
Tok1 como blanco molecular de <i>K1</i>	18
Importancia de la toxina <i>Killer</i>	20
Importancia de las cisteínas	22
PLANTEAMIENTO TEÓRICO	20
Estudio de los sitios de unión de la toxina	20
Importancia de las cisteínas.....	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	25
Procedimiento análisis computacional	25
Determinar el modelo estructural de TOK1	26
Modelaje TOK1A y TOK1B tetramérico	26
Medición de distancias en el modelo TOK1, TOK1A y TOK1B.....	26
Búsqueda de cisteínas en proteínas homólogas a TOK1	27
RESULTADOS	28
Estructura de TOK1 por minimización	28

Modelaje canal segmentado TOK1A y TOK1B	31
Mutagénesis dirigida	32
Modelaje estructura toxina (alfa y beta)	34
Medición de distancias en toxina y TOK1	36
Separación de puentes disulfuro de la toxina	37
Alineamientos dominios de poro 1 y 2	41
Análisis KRE1-TOK1.....	43
Hipótesis alternativa aminoácidos aromáticos	46
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	52
ANEXOS	53
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de toxina	13
Figura 2. Proceso de maduración <i>K1</i>	14
Figura 3. Topografía Tok1	17
Figura 4. Mecanismo de acción de la toxina.....	18
Figura 5. Efecto letal de <i>K1</i>	19
Figura 6. Resumen de objetivos	27
Figura 7. Modelaje de Tok1	28
Figura 8. Alineamiento múltiple	29
Figura 9. Estructura de Tok1	30
Figura 10. Modelaje Tok1A y Tok1B	31
Figura 11. Mutagénesis dirigida cisteína 7	32
Figura 12. Mutagénesis dirigida cisteína 9, 10 y 11	32

Figura 13. Modelaje de las subunidades de <i>K1</i> alfa y beta	35
Figura 14. Distancias entre cisteínas de Tok1	36
Figura 15. Perfil de hidropatía subunidades alfa y beta	38
Figura 16. Alineamiento de (P1) en proteínas homólogas a Tok1	40
Figura 17. Alineamiento de (P2) en proteínas homólogas a Tok1	41
Figura 18. Análisis Kre1p	44
Figura 19. Análisis Tok1	45
Figura 20. Análisis de aminoácidos aromáticos en Tok1	46
Figura 21 (Anexos). Análisis superficial de Tok1	59
Figura 22 (Anexos). Proceso de medición de distancias en Tok1	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de energía libre	33
Tabla 2. Distancias entre cisteínas en el canal Tok1	36
Tabla 3. Distancias de las subunidades alfa y beta	37
Tabla 4. Conteo de cisteínas en proteínas homólogas a Tok1	42
Tabla 5 (Anexos). Identificadores de secuencias y PBDs	53

RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de sintetizar toxinas. Esto es por medio de una coinfección viral mediada por el virus satélite M1 y el virus ayudante L-A de la familia *Totiviridae*. Existen en la naturaleza varios tipos de toxinas *K1*, *K2*, *K28*, *Klus*, siendo *K1* una de las más estudiadas. El fenómeno denominado como *Killer*, es la consecuencia de la inhibición del crecimiento de cepas de levadura sensibles a la toxina. Hasta el momento no se conoce el mecanismo de acción de la toxina *K1*, pero, sí se sabe que está mediado por dos pasos: 1) la unión de la toxina al 1,6 β -glucano de la pared de levaduras sensibles, su translocación a la membrana plasmática, en donde 2) la toxina interacciona con Kre1p, una proteína anclada a GPI, que está encargada de la síntesis y arreglo estructural de proteínas de la pared celular. Una vez en este punto, se considera que podría tener dos objetivos diferentes; incrustarse directamente formando poros en la membrana, causando desbalance osmótico y matando a las células o unirse a un sitio desconocido del canal de potasio Tok1, generando la salida de potasio hasta matar a las células por el mismo desbalance osmótico. En el laboratorio se ha logrado determinar, por experimentos modificados de Kirby & Bauer, que la toxina es capaz de matar no solo a levaduras *Saccharomyces* sensibles, sino también a otros microorganismos patógenos de importancia biomédica como *Klebsiella pneumoniae*. En el presente trabajo y por medio de mutagénesis dirigida *in silico*, se planea determinar el posible sitio de unión de la toxina *K1* en el canal de potasio Tok1. Con base en los resultados obtenidos, se propone a las cisteínas y a las tirosinas como el lugar de interacción toxina-canal.

PALABRAS CLAVE

Levadura, TOK1, biomedicina, antimicrobianos, toxinas.

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is capable of synthesizing toxins. This is through a viral co-infection mediated by the satellite virus M1 and the helper virus L-A of the *Totiviridae* family. Several types of toxins *K1*, *K2*, *K28*, *Klus* exist in nature, *K1* being one of the most studied. The phenomenon known as *Killer* is the consequence of the inhibition of the growth of yeast strains sensitive to the toxin. So far, the mechanism of action of *K1* toxin is not known, but it is known to be mediated by two steps: 1) binding of the toxin to the 1,6 β -glucan of the sensitive yeast wall, its translocation to the plasma membrane, where 2) the toxin interacts with Kre1p, a GPI-anchored protein, which is in charge of the synthesis and structural arrangement of cell wall proteins. Once at this point, it is considered that it could have two different objectives; to embed itself directly forming pores in the membrane, causing osmotic imbalance and killing the cells or to bind to an unknown site of the Tok1 potassium channel, generating the exit of potassium until killing the cells by the same osmotic imbalance. In the laboratory it has been possible to determine, by modified Kirby & Bauer experiments, that the toxin is capable of killing sensitive *Saccharomyces* yeasts and other pathogenic microorganisms of biomedical importance such as *Klebsiella pneumoniae*. In the present work and employing *in silico* targeted mutagenesis, we plan to determine the possible binding site of the *K1* toxin in the Tok1 potassium channel. Based on the results obtained, cysteine and tyrosine are proposed as the site of toxin-channel interaction.

KEYWORDS

Yeast, TOK1, biomedicine, antimicrobial, toxins.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, las estadísticas de muerte en la población a causa de enfermedades infecciosas se redujeron considerablemente (Aguilar 2015). En la actualidad, ya existen medicamentos dedicados a eliminar muchos de estos padecimientos. Sin embargo, debido a la poca variedad de moléculas existentes y a su uso indiscriminado, poco a poco los agentes infecciosos han expresado resistencia a estos fármacos (RDU-UNAM 2019). Ahora, los microorganismos resistentes son una de las principales causas de muerte en la población, incluso superan las estadísticas de otras causas de mortalidad, como enfermedades congénitas, degenerativas, entre otras. Esto es de gran importancia, porque incluso las moléculas más agresivas disponibles en la actualidad ya no son eficientes (Karp y Patton 2013). Es vital encontrar nuevas moléculas que sean capaces de combatir este tipo de infecciones, por ello, ahora, se han estado estudiando diversos compuestos que muestren actividad antimicrobiana. Dentro de este tipo de moléculas antimicrobianas, podemos mencionar a las toxinas. Algunas de ellas, son producidas por levaduras y su efecto letal se extiende a una amplia variedad de microorganismos (de la Peña et al. 1981; Woods y Bevan 1968; Magliani et al. 1997).

Saccharomyces cerevisiae, es una de las levaduras que tiene la capacidad de producir toxinas. Las más estudiadas hasta el momento son conocidas como *Killer (K)*: *K1*, *K2*, *K28* y *Klus*. Algo que caracteriza a estas toxinas, es que tienen efectos letales sobre levaduras patógenas como *Candida albicans* (Bussey 1991; de la Peña et al. 1980; Woods y Bevan 1968; Bradshaw 1990). Se ha probado que la toxina *Killer (K1)*, es capaz de matar a microorganismos patógenos tales como: *Salmonella thipymurium* y *Klebsiella pneumoniae*, entre otros (Villarreal J 2018). Sin embargo, hasta el momento se desconoce gran parte del mecanismo de acción de la toxina, dentro de estos eventos, la interacción de *K1* y Tok1. El presente trabajo, estudia a la toxina *Killer K1*, a su blanco molecular el canal de potasio Tok1 y propone a las cisteínas como el sitio de unión toxina-canal.

ANTECEDENTES

Microorganismos y toxinas

En los últimos años, han sido descritas una gran variedad de moléculas, con efectos antimicrobianos (Sakkas y Papadopoulou 2017). Este hallazgo no es sorprendente, debido a que de la naturaleza se han logrado extraer una gran variedad de compuestos, que con el tiempo se han utilizado para combatir enfermedades. Esto tiene sentido, porque los seres vivos como plantas, insectos, microorganismos y algunos animales tienen la capacidad de producir sustancias que, a la larga, favorecen su colonización en el ambiente o en su caso, les funcionan como mecanismos de defensa ante depredadores. En el caso de los microorganismos, las levaduras que se encuentran en un ambiente muy competido por la disponibilidad de nutrientes o la cantidad de espacio, con el tiempo pueden expresar algún mecanismo de defensa como la producción de toxinas (Boynton 2019; Kumar et al. 2019).

Este tipo de levaduras productoras de toxinas, se han podido aislar de una amplia variedad de lugares, mayormente en frutas en descomposición y mosto de bebidas fermentadas (Bevan y Makower 1963). Las toxinas, son sustancias interesantes, porque pueden ser capaces de tolerar una gran cantidad de cambios físicos y químicos, estas propiedades son adaptaciones a las características físicas y químicas del entorno en el que el microorganismo habita (Magliani et al. 1997). Además, cada microorganismo presenta variaciones importantes en las toxinas que produce, como la tolerancia a altas salinidades, tolerancia a diversos rangos de pH y temperatura involucrados en su síntesis (Mannazzu et al. 2019; Magliani et al. 1997). Hasta el momento, se han podido identificar alrededor de 100 toxinas, las cuales pertenecen a 46 géneros diferentes de microorganismos que han sido considerados como productores, estos géneros están representados mayormente, por especies de levaduras (Mannazzu et al. 2019). Algunos ejemplos de levaduras productoras de toxinas ampliamente estudiados son *Pichia*, *Ustilago*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces* (Magliani et al. 1997).

Las levaduras y sus toxinas ya están siendo utilizadas fuera de los laboratorios, como en el caso de *Debaryomyces*, que ya ha sido aprobada para su uso en la industria alimentaria (Banjara et al. 2016). Por su parte, los géneros *Pichia* y *Ustilago*, son estudiados por su capacidad de producir toxinas monoméricas o triméricas y además por su potencial como posibles toxinas recombinantes (Magliani et al. 1997). Las toxinas asesinas nativas de *Pichia*, *Ustilago*, *Candida*, entre otras, por lo general son pequeñas, funcionan a un rango de pH ácido y en su mayoría el mecanismo letal que presentan es el arresto del ciclo celular, la producción de quitinasas que degradan la pared celular o inducen el bloqueo de la síntesis de la pared en las células (Magliani et al. 1997; Cailliez et al. 1994). Sin embargo, su efecto letal no presenta un amplio espectro de microorganismos blanco y este tipo de péptidos tienden a perder su estabilidad y letalidad en medios de cultivo sintéticos, lo que dificulta su estudio en laboratorio (Mannazzu et al. 2019; Magliani et al. 1997).

La adquisición de compuestos de defensa como las toxinas, se ha estudiado que puede ocurrir por medio de la incorporación de plásmidos lineales de ADN de cadena doble extracelulares, igualmente pueden integrar a su genoma fragmentos de ADN libres, puede ser también una característica propia codificada en sus cromosomas y en algunos casos, pueden ser obtenidos por la infección de ciertos tipos de partículas virales o partículas similares a los virus (VLPs) mayormente constituidos con ARN de cadena doble (Schmitt y Breinig 2006). En general las toxinas pueden clasificarse en dos grandes grupos: las exotoxinas y endotoxinas, dentro de estos grupos nos concentraremos en *Saccharomyces cerevisiae* y las exotoxinas del tipo *Killer* (Wickner 1976).

La levadura *S. cerevisiae*, secreta toxinas *Killer* y puede llegar a expresar tres posibles fenotipos: levaduras neutrales, es decir que no tienen sensibilidad a la toxina, levaduras sensibles denominadas como *Kill-*, las cuales sí tienen sensibilidad a las toxinas, pero no producen este tipo de péptidos y finalmente las levaduras *Kill+*, quienes son productoras de toxinas y además expresan autoinmunidad (Sesti et al. 2001; Woods y Bevan 1968).

Las toxinas *Killer* se caracterizan por el hecho de que su síntesis, solo se puede obtener por medio de una coinfección viral, además, pueden existir muchas combinaciones de virus de ARN en el citoplasma, lo que puede resultar en toxinas estructural y funcionalmente distintas (Bevan, Herring, y Mitchell 1973; Schmitt y Breinig 2006; Rodríguez-Cousiño 2017).

La toxina *Killer* (K1) de *Saccharomyces cerevisiae*

La producción de toxinas en la levadura de panadería *S. cerevisiae* fue un evento estudiado y reportado inicialmente en 1963 por Bevan y Makower. Estos investigadores observaron en el mosto de la cerveza a un microorganismo contaminante, el cual, eliminaba a la levadura utilizada para el proceso de fermentación, dando como resultado un producto no deseado debido a su mal sabor, lo que representaba un problema serio en la industria (Woods y Bevan 1968). Después de aislar la cepa contaminante, descubrieron que la levadura *S. cerevisiae* estaba involucrada y que producía un “factor” que provocaba la inhibición del crecimiento de otras levaduras. Con el tiempo este fenómeno fue investigado con más detalle adquiriendo así el nombre que tiene en la actualidad: toxina *Killer* o toxina *K1* (Pfeiffer et al. 1988; de la Peña et al. 1981; Kagan 1983; Bussey 1991).

Las toxinas que desde entonces y a la fecha son ampliamente estudiadas son la toxina *K1*, *K2* y *K28*, las cuales son normalmente toxinas heterodiméricas, estabilizadas por dos o tres puentes disulfuro (Schmitt y Breinig 2002). Una de las ventajas en su estudio, es que presentan una mayor estabilidad para su manejo en el laboratorio y tienen un gran potencial de uso en la industria médica, agrícola y alimentaria (Magliani et al. 1997; Liu et al. 2015). Las levaduras pueden producir toxinas *Killer* porque adquieren una infección de dos virus de ARN de cadena doble, ambos de la familia *Totiviridae*. La presencia e infección de estas dos partículas virales en la levadura, tiene como resultado la síntesis del péptido inmaduro o preprotoxina (*pptox*). La infección es heredada a las células hijas, durante el proceso de gemación (Peña, 1981; Bussey, 1991; Bevan, Herring, y Mitchell 1973; Schmitt y Breinig 2006).

Los virus M y L-A que están involucrados en la coinfección son por lo general de la misma familia, pero diferentes entre sí. Los virus satélites M1, M2 y M28 están implicados en la síntesis de las toxinas *K1*, *K2* y *K28* respectivamente. Para la producción de la toxina *K1*, es necesaria la infección del virus satélite M1 o ScvM1, el cual cuenta con un tamaño de genoma de 1.8 kb, con un único marco de lectura abierto que codifica para la *pptox*, el cual es responsable de la citotoxicidad de la toxina, así como de la autoinmunidad en la levadura (Bevan, Herring, y Mitchell 1973; Schmitt y Breinig 2002; Wickner 1976).

Por otro lado, también están implicados los virus L-A que son de tipo ayudantes. Estos virus presentan un tamaño de genoma de 4.6 kb y codifican para una ARN polimerasa, que se encarga de la síntesis de los ARN que codifican proteínas para su anclaje a las células blanco (Gag-pol) y en la síntesis de cápside para ambos componentes virales (Schmitt y Breinig 2002; Icho y Wickner 1989). Por sí solos los virus L-A no son letales, se ha visto que no son capaces de afectar el crecimiento en cepas sensibles, tampoco son capaces de inducir letalidad en su huésped (Schmitt y Breinig 2006). Las levaduras productoras a pesar de ser autoinmunes si presentan total sensibilidad a otras toxinas *Killer* diferentes a la propia (Magliani et al. 1997).

El péptido inmaduro (*pptox*), está compuesto por cuatro subunidades delta (δ), alfa (α), gamma (γ) y beta (β), es sintetizado en el citoplasma de la levadura, para posteriormente por medio de la secuencia líder o péptido señal ser dirigido para modificaciones postraduccionales, primero, al retículo endoplasmático en donde se corta parte del péptido señal en la subunidad δ (región pre) y es *N*-glucosilado en la subunidad γ (Schmitt y Breinig 2002; 2006). Posteriormente, se dirige al aparato de Golgi en donde después de plegarse, por medio de enzimas peptidasas y carboxilpeptidasas Kex1p y Kex2p respectivamente, será escindida la subunidad γ y la región pro (δ), acoplado paralelamente a las subunidades α y β (Marquina 2002; Bostian et al. 1984). Finalmente, se incorporan tres puentes disulfuro para estabilizar ambas subunidades (Figura 1). La toxina ya madura, por medio de la vía retrógrada del Golgi, se dirige rumbo a la membrana plasmática, en donde se forma una vesícula que se fusiona con la pared y

membrana celular, permitiendo que la toxina sea liberada al exterior (Bostian 1983; Peña, 1981; Bussey, 1991).

Existe un proceso similar en humanos, como es el caso de la insulina, que inicia con la síntesis de su precursor que es la proinsulina. Éste último es un péptido compuesto por tres cadenas A, B y C, el cual debe pasar por diversas modificaciones hasta su maduración a insulina (Hou & Pessin 2009; Vakilian 2019). Al igual que la toxina, esas modificaciones son realizadas por los mismos organelos: aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Igualmente, la célula hace uso de enzimas homólogas a las Kex1p y Kex2p para eliminar la cadena C. El péptido maduro, consta de dos cadenas, una corta A y una larga B que son estabilizadas por dos puentes disulfuro (Figura 2) (Vakilian 2019).

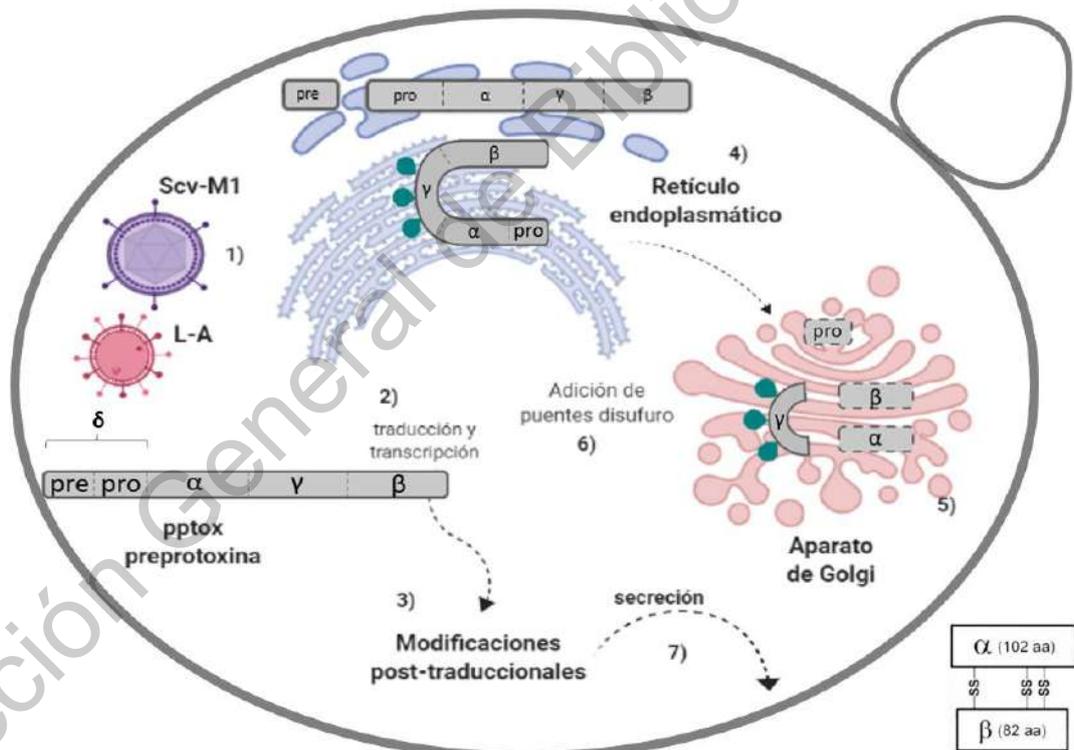


Figura 1. Producción de toxina. La infección de M1 y L-A hace que se transcriba un preprotoxina, la cual pasa por diversas modificaciones postraduccionales en retículo endoplasmático y Golgi para escindir las subunidades δ y γ . Hasta obtener una toxina madura (subunidades α y β) estabilizada por tres puentes disulfuro (Generado parcialmente con Biorender).

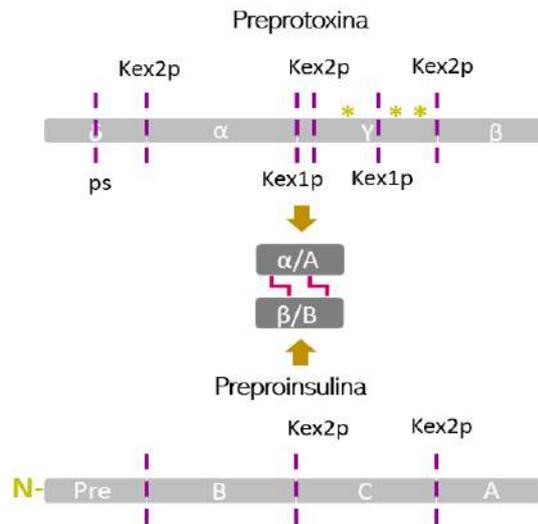


Figura 2. Proceso de maduración de la toxina K1 y la insulina. Se muestran los sitios de corte (púrpura) al péptido *pptox* para la maduración de la toxina, las peptidasas y carboxilpeptidasas Kex1p y Kex2p. Se observa la composición de la preproinsulina y el proceso de maduración, la cual se realiza por medio de proteasas homólogas a las de la toxina, la posterior estabilización por puentes disulfuro y en ambos casos la obtención de un péptido α-β (toxina) o A-B (insulina), estabilizadas con puentes disulfuro (rojo).

La toxina madura está conformada por dos subunidades: α compuesta aproximadamente de 172 aminoácidos, la cual, por sí sola se ha visto que es capaz de matar esferoplastos y β compuesta por 140 aminoácidos, esencial para la unión a la pared celular, ambas subunidades son unidas y estabilizadas por tres puentes disulfuro (Bussey, 1990; Cartwright, 1992; Breinig, 2002; Magliani et al. 1997). Recientemente, se hizo la propuesta, que la unión entre α y β podría estar dada únicamente por dos puentes disulfuro (Gier, 2019). Todavía no se ha estudiado con detalle, pero, se cree que la *pptox* está relacionada con la inmunidad de la levadura a su propia toxina. Esto podría deberse a la unión de la *pptox* en la cara interna de su blanco molecular, un canal de potasio, evitando que éste se active por exposición externa a la toxina (Vališ et al. 2006; Sesti et al. 2001).

Transportadores iónicos en las levaduras y su importancia

El potasio es un ion que, debido a su relevancia en la actividad celular, tiende a acumularse en mayor proporción dentro de las células. Esto se debe a que esta molécula es esencial para ciertos procesos químicos y fisiológicos; la

concentración de este ion dentro de la célula es alrededor de 155 mM, por el contrario, el sodio, es una molécula considerada tóxica en altas concentraciones en el citoplasma, es por esto por lo que la concentración intracelular de sodio es de 12 mM. Por lo regular, las levaduras no suelen encontrarse en ambientes que son ricos en sodio, sin embargo, puede haber ciertos ambientes en donde es aún más necesario el potasio para poder contrarrestar los efectos del sodio y en contraste, también puede haber ciertas condiciones en las que sea necesario movilizar potasio fuera de la célula para mantener el equilibrio osmótico (Ariño 2019; 2010).

Debido a lo anterior, gran parte del gasto energético de las células se centra en la acumulación o movilización de grandes cantidades de potasio y iones esenciales. Entre las funciones fisiológicas que el potasio tiene se encuentran: la regulación del volumen celular, regulación del pH intracelular, el mantenimiento y regulación del potencial de membrana, mantener el ambiente citosólico ideal para la síntesis de proteínas y para las reacciones enzimáticas (Alijo y Ramos 1993). Para mantener un correcto equilibrio de los iones, los microorganismos cuentan con alguna de las siguientes estrategias: El uso de transportadores específicos con afinidad al potasio o tienen un sistema de “depuración” de cationes tóxicos, no necesarios, que son encerrados en orgánulos en donde son procesados para su posterior eliminación o secreción (Ariño 2010; Bañuelos et al. 2002).

Los mecanismos de transporte selectivo en la levadura *S. cerevisiae* están regulados por una gran variedad de transportadores. Dentro de sus funciones, podemos enlistar que ayudan a mantener la homeostasis de diversos iones, entre ellos el potasio; eliminar iones tóxicos, conservar el potencial de membrana, balancear el pH intracelular y mantener la presión necesaria (turgencia) que ayude a mantener la estructura y forma ideal en las células. (Armstrong y Rothstein 1967). Los transportadores también ayudan a combatir el estrés osmótico (Ariño 2010; de la Peña et al. 1982).

Hasta el momento hay registro de 6 transportadores con un papel relevante en las levaduras. Los sistemas de absorción de potasio Trk1 y Trk2; los

simportadores fosfato-sodio, transportadores para salida de sodio y protones Nha1 y Ena1, también transportadores de salida como Pma1p que bombea H⁺/K⁺. Por último, el canal Tok1, el cual es un canal específico para la movilización externa de potasio (Bertl et al. 2003; Bertl et al. 1998; Ketchum et al. 1995).

Canal de potasio con rectificación saliente Tok1

El único canal de potasio con rectificación saliente es el canal Tok1. Es una proteína que consta de 691 aminoácidos. En la literatura se puede encontrar bajo muchos nombres: YKC1, DUK1, YORK, YPK1, TOK1, o Tok1, siglas que representan *Tandem pore domain outwardly rectifying K⁺ channel* (TOK1), lo cual significa, canal de potasio con dos dominios de poro en tándem (Ketchum et al. 1995). Este canal es activado por despolarización de la membrana plasmática, es ligeramente sensible al pH y puede también ser modulado por la concentración de potasio al interior de las células (Ahmed et al. 1999; Ketchum et al. 1995; Saldaña 2002).

Este canal forma parte de las familias de canales de potasio descritos hace algunos años, incluso fueron descubiertos años después que la toxina (Ketchum et al. 1995). Hasta el momento, se cree que pudieron surgir durante un proceso en donde se fusionaron dos tipos diferentes de canales de potasio: Un canal *shaker*, dependiente de voltaje que consta de 6 cruces transmembrana y una región de poro y otro tipo de canal del tipo KcsA de origen bacteriano, compuesto por dos pasos transmembrana y una región de poro (Saldaña et al. 2002; Guerrero-Galán et al. 2018). También hay otras hipótesis que apuntan a que el origen de Tok1 está en partículas virales o en procesos de *splicing* alternativo (Thiel et al. 2013).

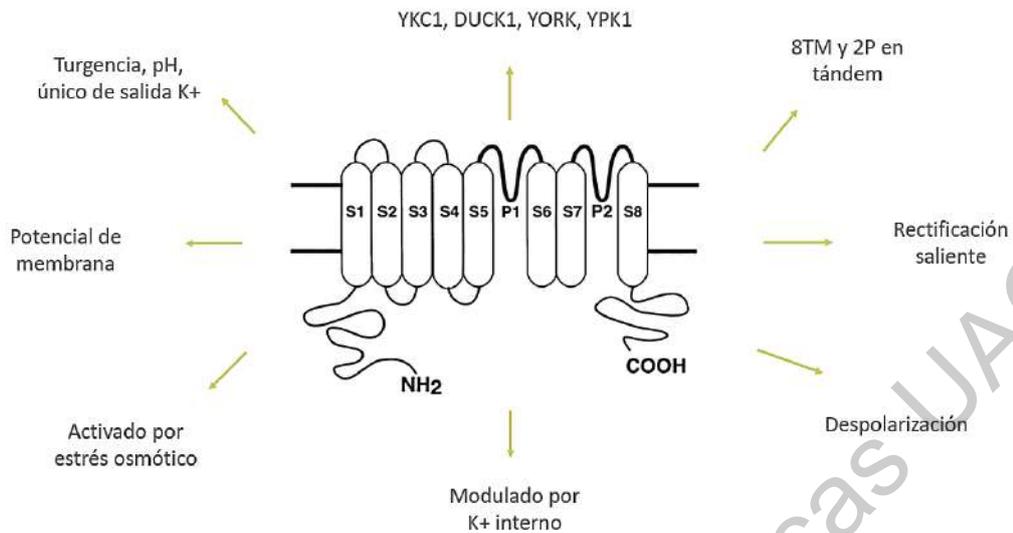


Figura 3. Topografía de Tok1 y funciones. Se muestra la estructura del canal de potasio con 8 cruces transmembranales y dos dominios de poro en tándem (mapa topográfico) las flechas indican todas las posibles funciones que presenta este tipo de canal en la levadura. (Modificada de Reid, 1996).

El papel fisiológico de Tok1 aún no ha sido especificado en la literatura. No obstante, hay varios estudios que sugieren que tiene un papel importante en la regulación y regeneración del potencial de membrana; además de jugar un rol parecido al transportador Pma1p, cuando éste es inhibido o reduce su actividad, como en la ausencia de glucosa, se cree que es capaz de mantener balanceado el pH intracelular en condiciones normales y estrés (Ariño 2010; 2019; Zahumenský et al. 2017). Se ha visto que es capaz de movilizar potasio al interior celular, en experimentos con mutantes de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Zahumenský et al. 2017). Además, se ha observado que su actividad es ligeramente sensible al pH, también se ha determinado el papel de cada uno de los dominios formadores de poro y su contribución a la selectividad iónica. Saldaña y colaboradores en 2002, realizaron la mutagénesis dirigida de Tok1 para separar los dos dominios de poro generando dos proteínas (biogénesis), que no existen en la naturaleza. El primer fragmento, genera un canal de 6 cruces transmembranales y un dominio formador de poro, al cual se le denominó TOK1A, y la segunda de dos cruces transmembranales y un dominio formador de poro, denominado TOK1B. Estas construcciones, permiten separar los dos dominios formadores de poro generando dos canales de manera artificial que

nos brindan la oportunidad de obtener más información acerca de su función por separado (TOK1A/TOK1B) y en conjunto (Tok1) (Saldaña, 2002).

El canal Tok1 como blanco molecular de K1

Mediante la expresión del canal de potasio Tok1 en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, se pudo determinar que el blanco molecular de la toxina *Killer*, es Tok1 (Ahmed et al. 1999). El mecanismo completo de acción de la toxina aún no ha sido descrito ampliamente. Aunque, hay estudios que sugieren los posibles mecanismos de acción de la toxina (Bussey 1991; Ahmed et al. 1999). Después de que la toxina interacciona en la pared celular, K1 se asocia con la proteína Kre1p, codificada por el gen *KRE1* (*Killer resistant*), los cuales son encargados del arreglo estructural y síntesis de proteínas de la pared celular, entre ellas el 1,6 β - glucano, en donde la toxina se une inicialmente en la pared celular (Breinig 2002; Brown et al. 1993).

Es importante mencionar, que este factor *kre* anclado a GPI, había sido considerado como un sistema de inmunidad a la toxina en células de levadura sensibles, debido a que las mutantes de dicha proteína generan una disminución en la letalidad de la toxina, aunque no una total resistencia a K1 (Boone et al. 1990). También se ha sugerido que al ser una toxina heterodimérica, puede romper sus enlaces disulfuro por efecto del pH extracelular ácido próximo a 4.6, permitiendo que alguna de las subunidades (posiblemente β) se una al glucano de la pared y posteriormente, otra subunidad, (posiblemente α) interactúe en el canal de potasio Tok1 (Figura 5). Es por esto, que la primera barrera en donde se encuentra la pared celular y Kre1p, no es suficiente para generar inmunidad completa a la toxina (Schmitt 1995; Boone et al. 1990; Sesti et al. 2001).

La interacción de una de las subunidades de K1 con Tok1, provoca la despolarización de la membrana plasmática, activando el canal de potasio que en consecuencia cambia su probabilidad de apertura (Schmitt y Breinig 2002). Posteriormente, libera iones potasio al medio extracelular de manera descontrolada, hasta poco a poco matar a las células al perder su balance osmótico (de la Peña et al. 1981; Pfeiffer et al. 1988). Hay experimentos que respaldan esta teoría, en donde se ha visto que las levaduras al sobre expresar

Tok1, adquieren una mayor sensibilidad a la toxina. En el mismo sentido, la delección del gen Tok1 genera resistencia a la K1, por lo que los efectos de la toxina requieren el producto de este gen (Ahmed 1999; Sesti 2001).

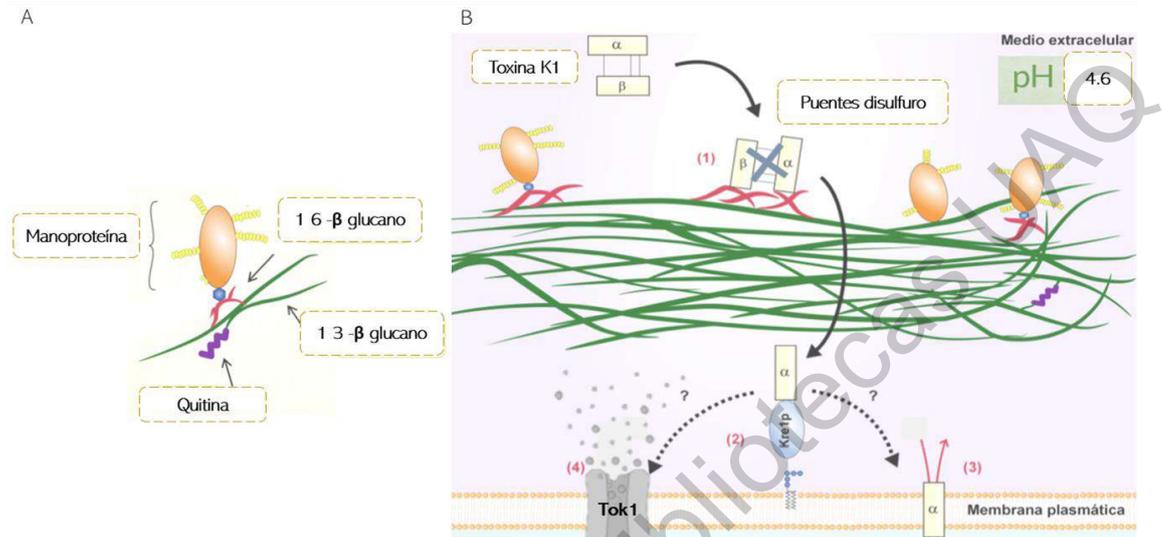


Figura 4. Posible mecanismo de acción de la toxina. Se muestra en el panel A) la estructura y las proteínas involucradas en el arreglo de la pared celular de la levadura. B) Se muestra la separación del puente disulfuro debido al pH, la unión de la toxina a la pared celular y su posterior translocación a la membrana plasmática, para interactuar con Kre1p y las dos hipótesis sobre su efecto: activadora de canales Tok1 o formadora de poros. (Modificada de Schmitt 2002).

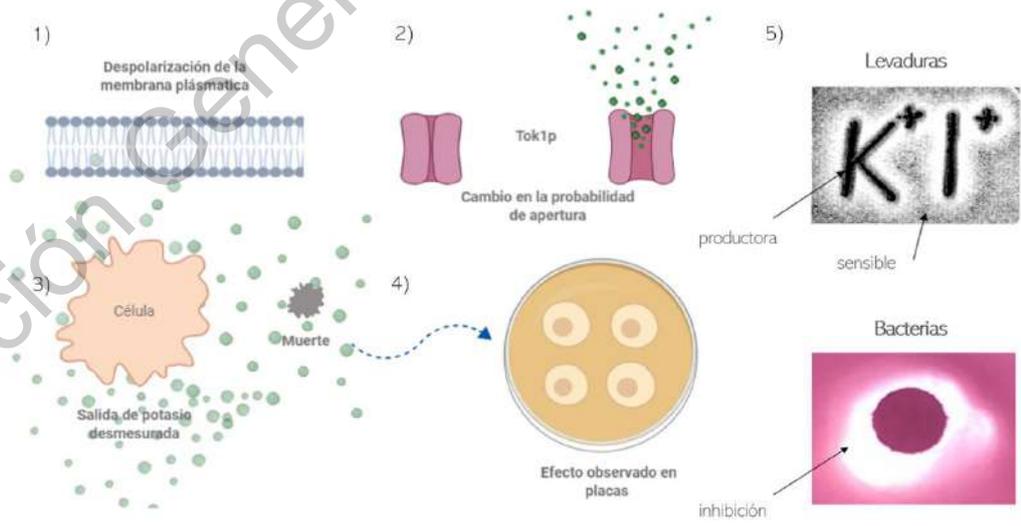


Figura 5. Efecto letal de K1. Se muestra una caricatura de los efectos fisiológicos descritos para la toxina *Killer* en levaduras sensibles. 1) El primer paso es la despolarización de la membrana plasmática, lo cual lleva a 2) La activación de canales de potasio Tok1, su cambio en la probabilidad de apertura y en consecuencia 3) La salida desmesurada de potasio que descarga a la célula de este ion, induciendo la muerte en células sensibles. 4) Se puede observar una caricatura de un experimento en placa Kirby Bauer, 5) Inhibición de bacterias.

en donde es visible por medio de halos de inhibición el área de muerte. 5) Se observan fotografías de experimentos reales (Ahmed 1999 y Villarreal J 2018) y el área de inhibición que induce la toxina en levaduras y bacterias. (Generado con Biorender).

Importancia de la toxina *Killer*

Este fenómeno en la levadura es de gran interés en investigación porque se pueden estudiar diversos aspectos de la interacción toxina-canal, también aspectos evolutivos y además puede llegar a tener diversas aplicaciones (Cerikcioğlu 2003; Liu et al. 2015). Dentro de lo más interesante que se ha estudiado, es que estos canales de potasio que son el blanco molecular de la toxina no están presentes en humanos, por lo que la toxina no es tóxica para nosotros (Fakruddin, Hossain, y Ahmed 2017).

También podría tener uso en la industria alimenticia o en la industria de bebidas como la cerveza, aplicando cepas de levadura productoras de *K1* modificadas genéticamente para ser utilizadas como cultivos iniciadores, que eviten la presencia de microorganismos que afectan la calidad del producto, mejorando así procesos como la elaboración del vino, cerveza o licores, e incluso ampliando la vida de anaquel de diversos productos envasados, al ser la toxina utilizada como un bioconservador.

Además, la toxina no solamente es capaz de matar a levaduras sensibles del mismo género, como se ha visto, sino que también puede presentar un importante efecto en hongos y otras levaduras (Polonelli et al. 1983; Conti et al. 2002; Bracesco et al. 2006). También puede asesinar a patógenos de importancia biomédica, por lo que actualmente está siendo estudiada a profundidad contra: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* y *Candida albicans*, estos microorganismos ya fueron probados con una variedad de la toxina *K1* y debido al buen efecto que se observó en los estudios que se realizaron, el compuesto fue propuesto como un potencial probiótico (Fakruddin, Hossain, y Ahmed 2017).

Además, en el grupo de trabajo, se buscaron marcos de lectura abiertos similares a Tok1 en bacterias patógenas, encontrando posibles proteínas homólogas aún

no descritas en la literatura y que además presentan una estructura secundaria (perfil de hidropatía) semejante a Tok1 (De Blas C 2016; Villarreal J 2018). Con relación a lo anterior, también se realizaron experimentos de laboratorio en los cuales se probó la toxina en la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (Villarreal J 2018).

Hay más evidencias en la literatura sobre el efecto *Killer* en *Candida albicans*, que ayudaron a confirmar que la presencia de marcos de lectura homólogos a Tok1, podrían corresponder a blancos moleculares homólogos para la toxina en otros microorganismos de importancia médica (Polonelli et al. 1983; Baev et al. 2003). De acuerdo con esto, se podría proponer como un péptido antimicrobiano, diferente de los antibióticos actuales.

Para poder proponer a un péptido nuevo como un antibiótico, es indispensable que esa nueva molécula cumpla con ciertas características y que no sea tóxica para el ser humano. En el caso de la toxina, esto ya se ha estudiado con resultados favorables (Fakruddin, Hossain, y Ahmed 2017). Aunque no es suficiente, se tienen que conocer todos los detalles de su mecanismo de acción y de su blanco molecular. Por ello, en el laboratorio se estudiará por minimización de estructuras con programas como SWISS-MODEL, la posible conformación estructural del canal Tok1 con canales “molde”: TREK1 el cual es un canal de potasio en mamíferos con dos dominios de poro en tándem y 4 cruces transmembrana; TWIK1 que es un canal de potasio presente en mamíferos con dos regiones de poro en tándem y 4 cruces transmembrana. Estos canales normalmente juegan un papel importante sobre las células que los expresan como: neuronas, cardiomiocitos, células musculares y vasculares; ayudando en la regulación de frecuencia cardíaca y el ritmo de contracción en arterias pulmonares (Rödström et al. 2020; NCBI structure 2021).

El canal de potasio Tok1, en su estructura contiene un número mayor de cisteínas en comparación con otros canales de potasio. La función de estas cisteínas en este tipo de canales hasta el momento se desconoce, por lo que, se buscará por medio de análisis informáticos hacer una comparación del número de cisteínas de Tok1 y sus homólogos en otros microorganismos, así mismo, se desea plantear si su presencia está implicada en el funcionamiento de la toxina.

La propuesta en este proyecto es el estudio *in silico* de las cisteínas como blanco de la toxina K1, buscando por medio de herramientas informáticas la presencia y posible distribución de las cisteínas en Tok1, la toxina y proteínas homólogas. El pH y los puentes disulfuro son de gran interés, debido a que sin estas características la toxina no podría tener un efecto letal sobre levaduras sensibles. Esto es debido a que, la unión de la toxina a la pared celular y a esferoplastos ya se ha comprobado que radica en las cisteínas 248 y 312, localizadas en la subunidad beta (Gier 2019, 2020). De hecho, la inhibición causada por la toxina se incrementa a niveles bajos de pH 4.6 – 4.7 y la letalidad a través del tiempo es irreversible.

IMPORTANCIA DE LAS CISTEÍNAS

Las cisteínas son de relevancia en la naturaleza, debido a que estabilizan proteínas como canales iónicos en forma de puentes disulfuro, también pueden estar involucradas en sitios catalíticos de proteínas enzimáticas, lo cual ayuda a catalizar diversos sustratos de interés para la célula; son además sitios funcionales de pequeñas proteínas (Backus 2018). Así mismo, son capaces de proteger a las células de posibles daños causados por especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros oxidantes celulares. Igualmente se sabe que trabajan en proteínas que regulan el estado REDOX intracelular. Los residuos de cisteína normalmente son conservados en las proteínas, se estima que la mayoría de las proteínas existentes, al menos tienen una cisteína (Andersson, Hultberg, y Lindgren 2000; Backus 2018).

Se había descrito que las cisteínas, están implicadas únicamente en la estabilidad de las proteínas al formar puentes disulfuro y que, estos enlaces a su vez también son capaces de proteger a las proteínas de cambios extremos de pH. En la actualidad, se está estudiando el papel que tienen los puentes disulfuro en la función de las proteínas. Actualmente la literatura, señala que existen dos tipos de enlaces disulfuro: los estructurales y los reversibles (Schmidt 2006; Wouters 2010; Nagahara 2011; Cremers 2013; Sun et al. 2017).

Existe evidencia que los enlaces disulfuro reversibles tienen aspectos diferenciales entre sí. Tal como el tamaño de las proteínas; la distancia entre sus

cisteínas, la carga neta de las secuencias y se sabe que son proteínas altamente hidrofóbicas, normalmente, cuentan con la presencia de aminoácidos como la serina, glicina y fenilalanina, características que son de vital importancia para determinar si una proteína potencialmente forma puentes disulfuro reversibles.

A pesar de que por el momento son difíciles de determinar *in silico*, ya hay algunos ejemplos de este tipo de proteínas y sus funciones, como es el caso de la bacteria *E. coli*, que cuenta con un factor de transcripción OxyR capaz de detectar el peróxido de hidrógeno, la proteína es activada y funcional cuando forma un puente disulfuro (Choi et al. 2001). Otro microorganismo, es *Aspergillus restrictus*, que produce una proteína con 149 aminoácidos y en su secuencia cuenta con 4 cisteínas, las cuales forman puentes disulfuro que estabilizan al péptido y que además presentan una función de “switch” encendido/apagado de la proteína (Nayak, Rathore, y Batra 1999).

Las cisteínas además de formar y disociar sus puentes disulfuro para hacer funcionales a las proteínas, también son sitios blanco de diversas moléculas. Como en el caso del Virus de la hepatitis C, el cual presenta 19 cisteínas en las secuencias de sus glicoproteínas de cápside, las cuales ayudan al anclaje de los viriones a sus receptores celulares CD18 (McCaffrey et al. 2012). En la naturaleza hay interacciones cisteína-cisteína entre canales de potasio y toxinas. Un ejemplo de esta interacción es el caso de algunos escorpiones del género *Androctonus*, productores de “potassium channel toxins” (KTxs). Este tipo de toxinas tiene su blanco en canales de potasio, en regiones específicas cercanas a la región de poro y en motivos ricos en cisteína: CKKX, CKXK, CXKKX, que cuenten también con lisinas (K), argininas (K) o algún aminoácido de carga positiva (X) (Martin-Eauclaire y Bougis 2012).

JUSTIFICACIÓN

La levadura *S. cerevisiae* es un gran modelo experimental para estudiar aspectos como las coinfecciones virales en levadura, la autoinmunidad, producción de toxinas, entre otros. Por lo que este microorganismo puede tener diversas aplicaciones, por ejemplo, en la industria vitivinícola, evitando la contaminación del mosto durante el proceso de fermentación de una gran variedad de bebidas.

El desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos (*K1*), que serían de gran ayuda en una crisis mundial sin antibióticos y estudiar a Tok1 como una potencial diana para el diseño de nuevos fármacos.

HIPÓTESIS

- Las cisteínas identificadas como 281, 411, 415, 418, presentes en el canal Tok1 potencialmente se asocian con cisteínas de la toxina *K1*.
- Los puentes disulfuro de las subunidades que estabilizan a la toxina *K1* se disocian por efecto del pH, permitiendo la interacción con cisteínas del canal de potasio Tok1.
- Las cisteínas del canal Tok1: 281, 411, 415 y 418 no están implicadas en la formación de puentes disulfuro.

OBJETIVO GENERAL

Análisis de la estructura-función de los modelos de la toxina *K1* y el canal de potasio Tok1 para resolver los posibles sitios de unión toxina-canal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las predicciones estructurales de la preprotoxina, las subunidades alfa y beta de la toxina madura, el canal de potasio Tok1 y las construcciones segmentadas tetraméricas de TOK1A y TOK1B.
- Medición de distancias entre cisteínas de la toxina *K1* y el canal Tok1.
- Modelamiento de la mutagénesis dirigida *in silico* de las cisteínas 281, 411, 415 y 418.

METODOLOGÍA

Procedimiento análisis computacional

Para poder averiguar si las cisteínas juegan algún rol importante en el mecanismo de acción de la toxina, primero se realizará mutagénesis sitio dirigida *in silico*, para poder descartar diversas zonas y cisteínas del canal que no estuvieran relacionados con la interacción de la toxina. Las mutantes a realizar son las 13 cisteínas (una a una) por metionina, se eligió este aminoácido debido

a su semejanza con las cisteínas en cuanto a su estructura, tamaño y la presencia de un átomo de azufre, el cual por sí solo no puede formar puentes disulfuro. El programa medirá los cambios en la energía libre del canal, energía que es requerida para mantener la estructura funcional. También se planean realizar estudios informáticos con SWISS MODEL y PYMOL como medición de distancias entre cisteínas, para determinar que cisteínas están involucradas directamente en la estructura del canal formando puentes disulfuro y cuales no están formando enlaces y debido a ello potencialmente podrían interactuar con la toxina.

Para estos análisis, se utilizó la secuencia de Tok1, la preprotoxina K1, Krep1 y marcos de lectura abiertos homólogos a Tok1. Las principales herramientas bioinformáticas que se usaron fueron: NCBI como base de datos para obtener todas las secuencias, I-TASSER y SWISS MODEL como programas para modelar las probables estructuras de los canales o proteínas a analizar. Los programas como CHIMERA, PYMOL y herramientas de *Docking* ayudarán a determinar todo el análisis estructural, medir distancias, valores de energía y generar las mutantes cisteínas – metioninas. También se utilizaron herramientas online como Smart BLAST, *Protein* BLAST y MUSCLE para realizar los diversos alineamientos de secuencias, encontrar sitios conservados y localización de cisteínas en las secuencias.

Determinar el modelo estructural de TOK1

Se realizaron diversos alineamientos en MUSCLE y Smart BLAST con la secuencia de Tok1 y la secuencia de canales de potasio con dos dominios de poro y que cuenten con estructura cristalográfica publicada, estos alineamientos fueron comparados con las regiones transmembrana S1 a S8 publicadas de Tok1. De esta manera se puede hacer una selección más certera sobre el canal “molde” para la minimización estructural posterior. Los canales que fueron verificados de este modo: TWIK1, TREK1 y TASK1, seleccionando solo aquellos que abarcarán la mayor parte estructural de Tok1. Después por medio de SWISS-MODEL se genera el modelo estructural probable de Tok1.

Modelaje TOK1A y TOK1B tetramérico

Este tipo de modelaje se realiza en SWISS-MODEL, con las partes de la secuencia correspondiente al canal de potasio Tok1 segmentado con base a las construcciones de Saldaña et al 2002. A su vez poder obtener con las partes TOK1A y TOK1B el arreglo estructural tetramérico, además de esto la división inducida de las cisteínas presentes en las regiones de poro P1 correspondiente a TOK1A y P2 correspondiente a TOK1B, lo que nos dará una idea de los posibles sitios de interacción de la toxina *K1* y los cambios estructurales que puedan surgir.

Medición de distancias en el modelo de TOK1, TOK1A y TOK1B

Una vez realizados los modelos, estos son analizados en PYMOL, herramienta que permite realizar la medición de las distancias entre cada una de las cisteínas de interés desde un mismo punto que son los átomos de azufre de cada cisteína y poder obtener así una relación del promedio de las distancias (en Ångstroms) que tienen las cisteínas en los modelos y poder compararlas con los valores teóricos promedio. Esto ayudará a descartar posibles cisteínas que estén ayudando en la conformación estructural del canal.

Búsqueda de cisteínas en proteínas homólogas a Tok1

Por medio de herramientas de alineamiento, se pueden buscar secuencias con alta similitud a Tok1 presentes en otros microorganismos. Una vez obtenida esta búsqueda, se procede a analizar las secuencias en busca de cisteínas conservadas en todos los microorganismos o en su caso realizar un conteo de cisteínas presentes en toda la secuencia. Para poder así contrastar esa información con información publicada sobre esos microorganismos y su sensibilidad a la toxina *K1*. Además, se analizará la secuencia de Kre1p, el cual ha sido propuesto como un posible blanco molecular de la toxina; para así, suponer qué eventos suceden al interactuar la toxina en células sensibles y finalmente, con estas secuencias se puede realizar un análisis filogenético.

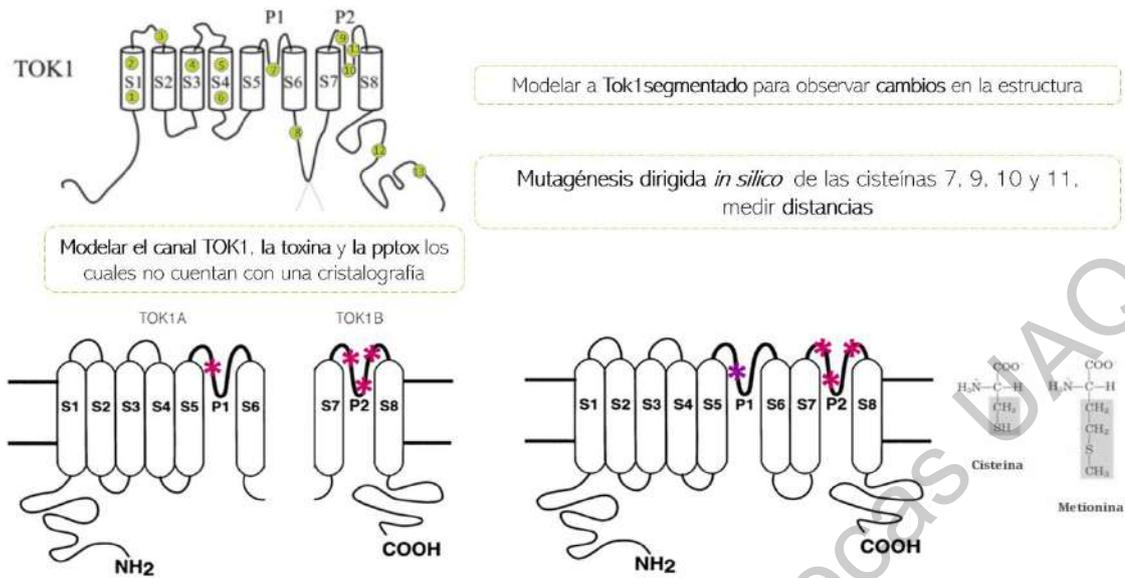


Figura 6. Resumen de objetivos *in silico*. Se presenta en la figura el resumen de los objetivos *in silico*. 1) el modelaje de Tok1, 2) las construcciones de TOK1A y TOK1B, la mutagénesis dirigida *in silico*, 3) el modelaje de la toxina, 4) medición de distancias. (Mapa topográfico de Saldaña 2002 y Reid 1996).

RESULTADOS

ESTRUCTURA DE TOK1 POR MINIMIZACIÓN

En la figura 7 podemos observar los resultados del modelaje estructural que se realizó en el laboratorio utilizando SWISS-MODEL. Esta herramienta utiliza la secuencia de cualquier proteína (en este caso Tok1) y buscar en la base de datos secuencias y estructuras similares para realizar un alineamiento, resultados con los que se hará la minimización estructural y la obtención final del modelo predictivo de nuestra proteína de interés.

En el panel A, se observa la estructura de TREK1 canal de potasio de 4 cruces transmembrana y dos regiones de poro en tándem (semejante a Tok1) presente en mamíferos. En B, podemos observar al canal de potasio igualmente de 4 cruces transmembrana TWIK1. En C, un transportador de potasio en levadura TRKA y en D se puede apreciar el modelo de Tok1 que consta de 8 cruces transmembrana y 2 regiones de poro en tándem. En la parte posterior de la figura podemos observar las regiones de poro de cada una de las estructuras. Es

evidente la semejanza estructural de las regiones de poro de los canales de potasio, siempre conservan una característica forma cuadrangular.

En el mismo sentido, los canales TREK1, TWIK1 y el transportador TRKA ya cuentan con una estructura definida por cristalografía, por lo que las semejanzas vistas en las regiones de poro al compararlas con el modelo de TOK nos hablan de un buen modelaje, cercano a la estructura real. Este acercamiento estructural también nos da idea de cómo se encuentran las zonas en las que posiblemente la toxina interactúa y nos da la oportunidad de medir distancias y observar la localización de las cisteínas de interés.

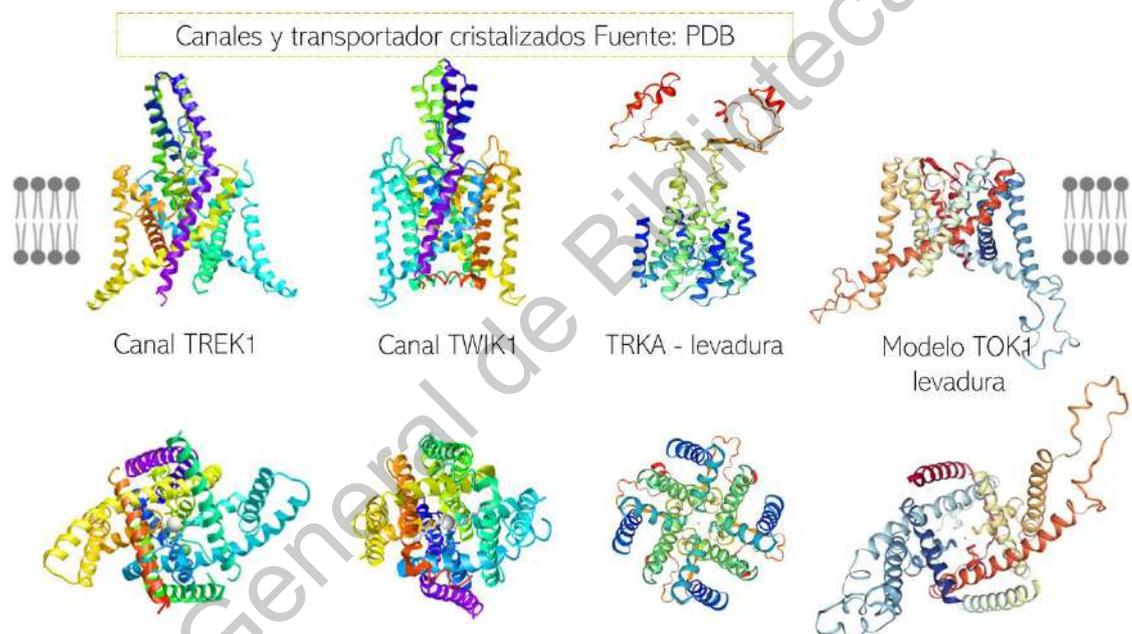


Figura 7. Modelaje estructural TOK1. En A se muestra la estructura de TREK1 junto con su región de poro, en B, se muestra a TWIK1, ambos canales de potasio de cuatro cruces transmembrana y dos regiones de poro en tándem. En C se observa la estructura del transportador de potasio TRKA para contrastar las demás estructuras. Los tres, ya cuentan con una estructura cristalográfica. Y en D, se muestra la predicción de estructura para Tok1.

El alineamiento triple realizado entre TOK1, TWIK1 y TREK1, muestra una amplia región en rojo, la cual es conservada en los tres canales vistos en la figura 8. Se puede inferir que ambos canales (TWIK1 y TREK1) son adecuados para poder determinar la estructura Tok1. Sin embargo, al realizar un análisis más

detallado de los alineamientos, la secuencia de TREK abarca la mayor parte de los aminoácidos que conforman a TOK, incluso abarca del cruce transmembrana 2 (S2) al cruce transmembrana 8 (S8) y las dos regiones de poro. Por lo tanto, este canal de potasio fue elegido para realizar el modelaje estructural y de esta manera se aseguró que el modelamiento fuera más certero. Por otro lado, en el caso de la secuencia de TWIK, se vieron comprometidas las secciones transmembrana de la 1 a la 4 (S1-S4), lo que representaría la pérdida de información en el modelaje de la mitad de los cruces transmembrana del canal Tok1.

TOK1	81	yfpvitacigpvantisiacvvekwrslknnsvvtprsndtdvlnmqkvtvfdppgifavniislvgftsniilmhlf	160
TWIK1		-----	
TREK1		-----	
TOK1	161	skkltylksqlninitgwtiaggmLLVDVIVCSLNDMPISYKTIIGFWFACISSGLYLVC-TIILTIHFIGYKLG-----	233
TWIK1	1	-----MLQSLAGSSCVRLVERHRSAMCFGLVGLYLLYLVFGAWFSSVELPYEDLLRQELR	57
TREK1	1	-----MKRQN-----VRILS-----LIVCTFTYLLVGAAVFDALESDEMREEEKLK	42
TOK1	234	----KYPPTFNLPNE-RSIMAYTVLLSLNLIWGAGMFS---GLLHITYGNALYFCTVSLTLVGLGDILPKSVGAKIMVL	305
TWIK1	58	KLKRRFLEEHECLSEP--QLEQFLGRVLEASNYGVSVLSnasGNWKNKDFTSALFFASTVLSITGYGHTVPLSDGGKAFCI	135
TREK1	43	AEEIRIKGKYNISSEdyRQLELV---ILQSEPHRAGV-----QWKFAGSFYFAITVITTIIGYGHAAAGTDAGKAFCM	111
TOK1	306	IFSLSGVLMGLIVfmrRSIIQKSSgpIFFFHRVEKGRSKSWKhymdssknlseraefdImkcIRQTASRKQHWFSLSVt	385
TWIK1	136	IYSVIGIPFTLLFL---TAVVQRVT--VHVTRRPVLYFHIRWG-----FSKQVVAIVHAVLLGF-	189
TREK1	112	FYAVLGIPLTLVNF---QSLGERMN--TFV-RYLLKRIKKCCG-----MRNTDVSMMNVTVGF-	164
TOK1	386	IAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAG-----RAFFVIWALGAVPLMGAILSTV	456
TWIK1	190	VIVSCFFFIIPAAVFSVLEDDWNFLESFYFCFISLSTIGLGDYVPGE--GYNQKFRELYKIGITCYLLGLIAMLVLETf	267
TREK1	165	FSCM-GTLCIGAAAFSQCEEWSFFHAYYYCFITLTTIGFGDYVALQTKGALQK-KPLYVAFSFMYLVLGLTVIGAFNLV	242
TOK1	457	GOLLFDISTSLDIKIGESfnnkVKSIVFNQRQALSFMVNTGEIFEESDTADGDLEENTSSQSSQISEFNNDN-SEEND	535
TWIK1	268	C-----ELHELKFRK-----MFYVKKDKDEDLVHIMEHDQLS-----	300
TREK1	243	VLRFLTMNSEDERDAEE-----RASLAGNRNSMVIHIPEEPRPSRPRYKADVPDLQSVCSCTCYRSQDYGGRSVAPQNS	317
TOK1	536	SGVTSPP---ASLQESFSSLSKASSPEGILPLEyVSSAEYALQoSGTCLNRLNQLLELKAVKkIhricladkdytIsfsdw	612
TWIK1	301	-----FSSVTEQVAGLKEEQKQSEPF-----VASQSPPYED-GSADH-----	336
TREK1	318	FSAXLAPhyFHSISYKIEEISPSTLKNLSLPSP-ISSISPGLHS-FT-DHQRLMKRRKSV-----	374

Figura 8. Alineamiento triple: TOK1, TWIK1 y TREK1. Se muestra el análisis de secuencias realizado para determinar el molde o posibles moldes para la construcción de la estructura TOK1. En rojo se pueden observar las regiones de la secuencia que son conservadas entre los tres canales de potasio (MUSCLE).

Modelo TOK1

P1 NALYFCTVSLLLTVGLGDIL

P2 NCIYFCFLCLLLTIGYGDYA

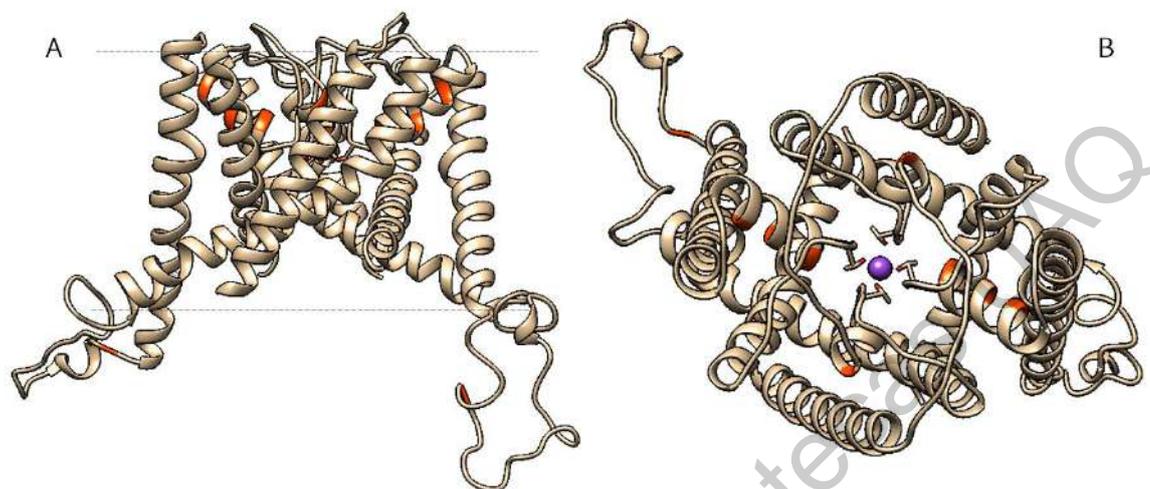


Figura 9. Estructura de Tok1. Se muestra el modelo construido por minimización estructural del canal de potasio por medio del programa SWISS-MODEL. A) Se muestra la conformación estructural tetramérica de Tok1, en naranja se pueden observar las cisteínas C281, C411, C415 y C418 (7,9,10 y 11) en línea punteada el plano de la membrana plasmática. B) Se presenta la región de poro, en naranja se resaltan las cisteínas, en rojo se muestra el filtro de selectividad (GYG) y (GLG). (CHIMERA).

MODELAJE CANAL TOK1 SEGMENTADO (TOK1A Y TOK1B)

Se determinó la estructura de las construcciones TOK1A y TOK1B, para de esta manera poder observar si el canal presentaba algún cambio en su conformación estructural, si cambiaban o no la distribución de cisteínas de interés 281, 411, 415, 418. Además, una vez planteados los modelos, se puede realizar la medición de distancias entre ellas, para así poder analizar y comparar, con respecto al modelo original de Tok1, si las distancias cambiaron y si son capaces de formar puentes disulfuro entre ellas. Si dichas cisteínas no forman puentes disulfuro, probablemente estén disponibles para poder asociarse con la toxina K1. Como se puede observar en la figura 9 y 10, no hay cambios fuertes en la estructura con respecto al canal Tok1 original, además la localización de las cisteínas de interés sigue intacta para los tres casos analizados.

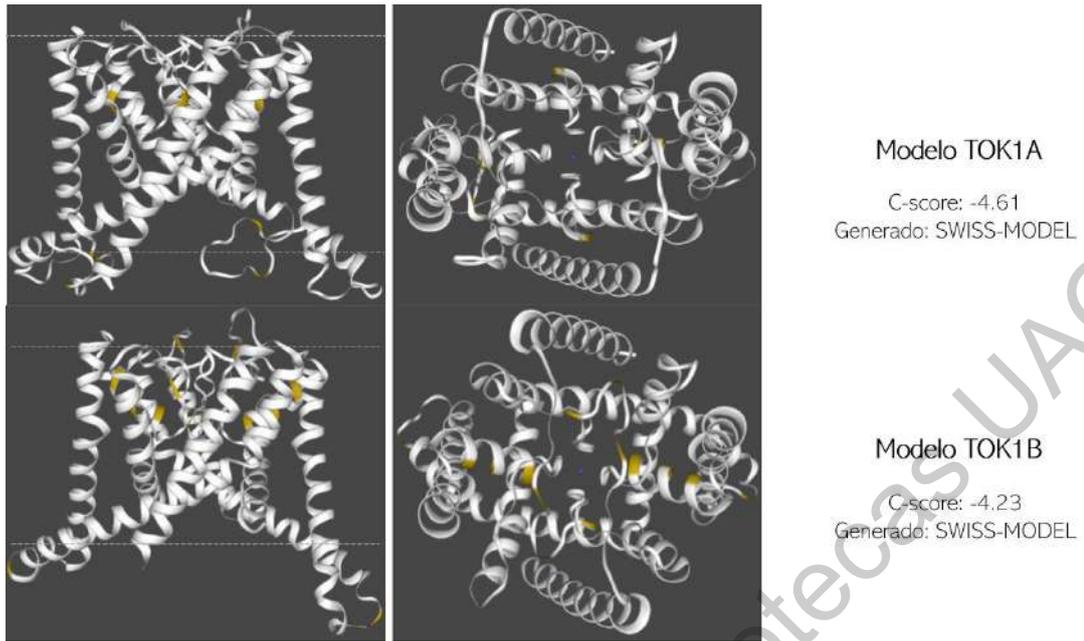


Figura 10. Modelaje TOK1A y TOK1B. Se muestra el modelo de TOK1A y TOK1B realizado *in silico*. En amarillo podemos observar la localización de las cisteínas para cada una de las estructuras. En la parte superior de izquierda a derecha podemos ver la estructura del canal completo, seguido de la rotación de la estructura en 90° para observar la región de poro de TOK1A y en la parte posterior podemos apreciar a TOK1B.

MODELAJE ESTRUCTURAL MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida tuvo que ser realizada *in silico*. La tabla que contiene los valores de delta G con las mutantes de cisteínas por metioninas, fue realizada por medio del programa CHIMERA. Programa que genera rotámetros de los aminoácidos de interés (mutagénesis) y medir el cambio de los valores de energía libre de cada mutante con base en la energía total inicial.

Posteriormente, se realizó la misma mutagénesis dirigida en el programa PYMOL, de igual manera cambiando las cisteínas por metioninas. En este caso en particular únicamente se realizó el cambio de las cisteínas de interés, la primera presente en TOK1A, identificada como la cisteína 281. Y en la sección TOK1B se trabajó con las cisteínas 411, 415 y 418. El programa puede modificar la rotación del aminoácido que reemplazará al original. Se seleccionó la región más adecuada para que el aminoácido nuevo tomara exactamente la posición del aminoácido original y no hubiese alteraciones en la estructura debido a esto.

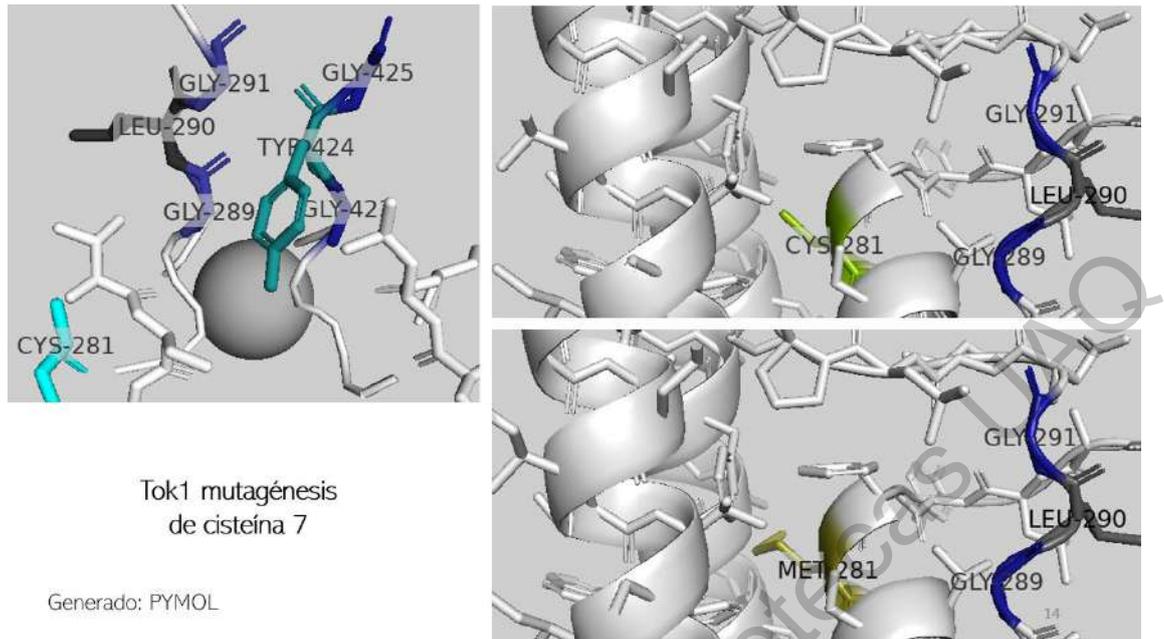


Figura 11. Mutagénesis dirigida 7. A) Se puede apreciar el modelaje estructural de TOK1A, en verde la cisteína número 7 (281) y en azul y gris el filtro de selectividad. En B) se puede observar el cambio de la estructura para que muestre los grupos en los aminoácidos. La cisteína 281 (7) será mutada por metionina en la misma posición. D) Se puede observar el cambio de cisteína por metionina en la posición 281.

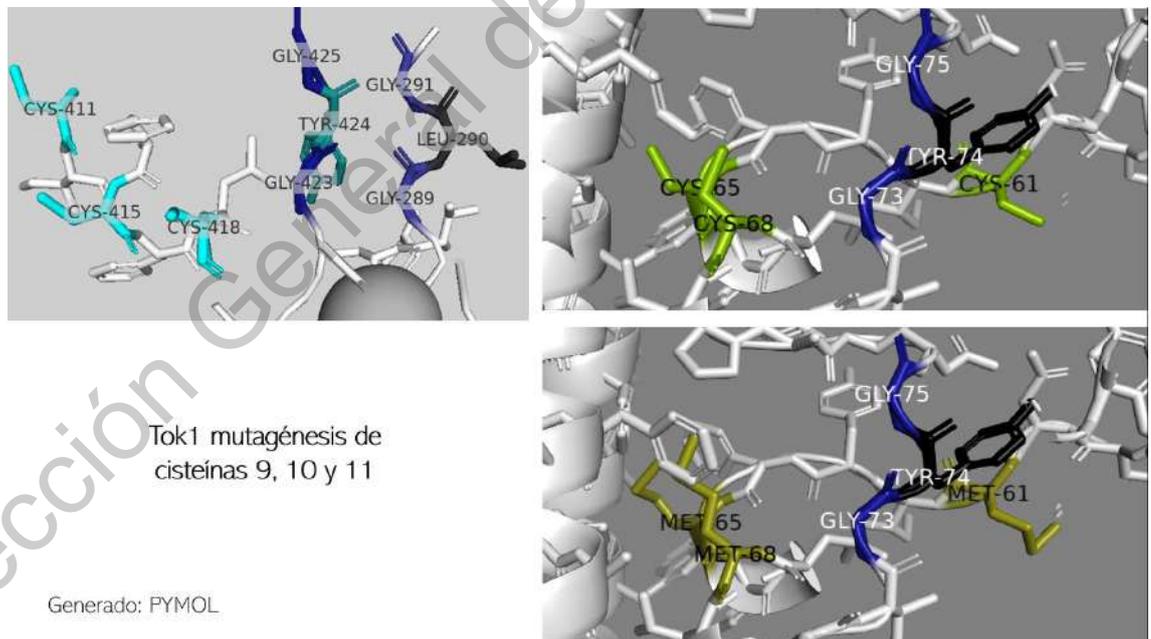
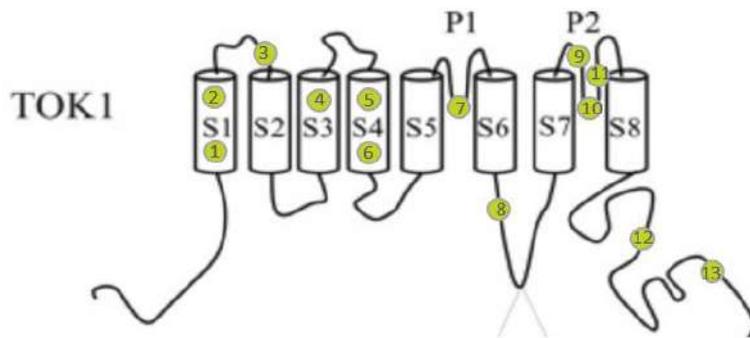


Figura 12. Mutagénesis dirigida 9, 10 y 11. En A) se muestra la estructura de TOK1B, en verde las cisteínas 9, 10 y 11 (61, 65 y 68). Además de mostrar en negro y azul el filtro de selectividad. En B) un acercamiento de la zona, C) la molécula completa con el esqueleto de los aminoácidos expuesto. D) Se observa en las mismas posiciones 61, 65 y 68 el cambio de cisteína por metionina.



Estabilidad	Tok1	Cys1	Cys2	Cys3	Cys4	Cys5	Cys6
Energía	1443.59	2516.54	2938.92	2228.28	1353.83	2240.82	1381.36
Estabilidad	Cys7	Cys8	Cys9	Cys10	Cys11	Cys12	Cys13
Energía	1272.29	1221.89	2887.19	2233.46	2170.46	1154.08	1212

Tabla 1. Valores de energía libre. Se muestra la tabla del registro de los cambios en el valor de energía libre medida *in silico* en la mutagénesis dirigida una a una de las 13 cisteínas presentes en Tok1 por metionina, para la selección de cisteínas candidatas para mutagénesis *in silico* con el programa PyMol.

Se hizo un registro (Tabla 1) en donde se muestra el valor total de energía libre del canal de potasio Tok1 sin cambios y un listado de las cisteínas presentes en el canal y la diferencia de los valores de energía libre. Se observaron diversos cambios al mutar una a una las cisteínas por metioninas. Los valores de energía disminuían o incrementaban con respecto al valor original total del canal. Aquellas cisteínas que tuvieran un papel clave en estabilizar al canal, es decir, que mostraran valores altos de energía libre con respecto al valor inicial, fueron descartadas. Aquellas cisteínas que tuvieran un cambio en el valor de energía, pero, que no afectarían la estabilidad del canal debido a su ubicación, fueron seleccionadas. Las cisteínas 281, 411, 415 y 418 pueden ser utilizadas potencialmente para mutagénesis dirigida *in vitro* y para realizar el análisis bioinformático. La número 281, se encuentra localizada en la región de poro 1 (P1) y las otras tres se encuentran localizadas a la misma distancia una de la otra, dentro de la región de poro 2 (P2).

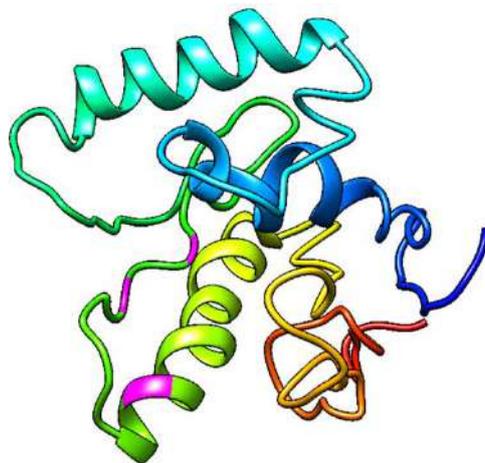
MODELAJE ESTRUCTURAL DE LA TOXINA

Una vez realizados los modelos estructurales para el canal de potasio Tok1, es mucho más fácil pensar en realizar el modelaje de la toxina *Killer*. Teniendo las dos partes modeladas y al afinar dichos modelos con base a las secuencias y a

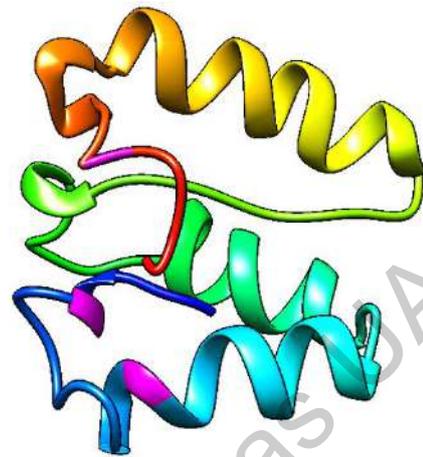
proteínas semejantes, se puede pensar en un posterior análisis y modelamiento tipo *docking*, lo que nos permite hacer un acercamiento del mecanismo de acción específico, al modelar la interacción directa entre el canal de potasio TOK1 y la toxina K1.

Es importante mencionar que esta toxina tampoco tiene ninguna estructura reportada en las bases de datos, ni hay proteínas similares que cuenten con cristalografía, por lo que se tiene que realizar un modelaje totalmente *de novo*, el cual no podrá contar con estructuras de referencia que apoyen el correcto modelamiento de la estructura. Sin embargo, algo que si nos puede ayudar a determinar si el modelaje es correcto, son las cisteínas y su localización. Estas cisteínas deben estar localizadas en zonas de fácil acceso para generar los puentes disulfuro con la otra subunidad.

Para este modelaje, se utilizó la secuencia de la toxina mostrada en la figura 13, obteniendo así la secuencia de la subunidad alfa, que consta de 103 aminoácidos con 3 cisteínas y para beta la secuencia de 83 aminoácidos con 3 cisteínas. El proceso de modelaje se realizó con la herramienta I-TASSER y PYMOL. Este tipo de herramienta es mucho más eficiente y presenta una mayor precisión con respecto a cada pieza que conforma el modelaje final, realiza una cantidad mayor de alineamientos y búsqueda de proteínas con similitud en secuencias y es mucho más detallada para moléculas y proteínas pequeñas como la toxina. Posterior al modelaje, se hizo la medición de distancias entre las cisteínas de cada subunidad de la toxina.



Subunidad alfa K1
 C-score: -3.68
 EAPWYDKIWEVKDWLLQRATDGNWGKSITWGSFV
 ASDAGVVI FGINVCKNCVGERKDDI STDCGKQTL
 ALLVSI FVAVTSGHHLI WGGNRPVSQSDPNGATV
 A α (103)



Subunidad beta K1
 C-score: -3.09
 YVYPMCEHGIKASYCMALNDAMVSANGNLYGLAEK
 LFSEDEGQWETNYYKLYWSTGQWIMSMKFIEESID
 NANNDFEGCDTGH β (83)

Figura 13. Modelaje subunidades α y β de K1. En la parte izquierda de la figura se muestra el modelaje de la subunidad alfa de la toxina, en cian se muestran las 3 cisteínas que forman puentes disulfuro con beta, abajo se muestra su secuencia de 103 aminoácidos. En la parte derecha se puede observar la estructura modelada para la subunidad beta de la toxina, en verde las cisteínas presentes y debajo la secuencia de aminoácidos, 83 en total.

¿LAS CISTEÍNAS PUEDEN FORMAR PUENTES DISULFURO?

De acuerdo con el modelo estructural que se realizó para Tok1 y sus variantes TOK1A y TOK1B, se logró medir las distancias entre cada una de las cisteínas (281, 411, 415, 418) por medio de la herramienta bioinformática PYMOL, la cual tiene la opción de medir distancias al hacer la selección de dos aminoácidos. Para obtener datos confiables, se realizó la medición desde un mismo punto de la estructura del aminoácido cisteína, es decir, se midió la distancia desde los átomos de azufre de cada cisteína. Con este método, se logró eliminar la variación que el programa puede llegar a tener, si se miden los aminoácidos desde otros puntos. Posteriormente, se registraron en una tabla, junto con el valor teórico de la distancia entre puentes disulfuro (azufre - azufre) obtenida en la literatura el cual es cercano a 2.05 Ångstroms. Estos valores tienen un rango que va de los 2 hasta los 6 Ångstroms lo que nos ayuda a determinar con un

rango definido, si las cisteínas de interés en el canal forman o no puentes disulfuro.

Tabla de distancias entre cisteínas en el canal de potasio			
Cisteína		Modelo	Distancia (ángstroms)
Puentes disulfuro		Teorico	2.05 - 3.05
281	418	TOK1	15.2
418	415	TOK1	7.9
415	411	TOK1	6.9
281	411	TOK1	24
281	415	TOK1	21.5
281	418	TOK1	20.3
281	281'	TOK1	30.9
418	411'	TOK1	28.6
418	415'	TOK1	25.2
418	418'	TOK1	19.1
418	281'	TOK1	22.2
415	411'	TOK1	35.4
415	415'	TOK1	32.1
415	418'	TOK1	25.3
415	281'	TOK1	24.2
411	411'	TOK1	37.6
411	415'	TOK1	35.3
411	418'	TOK1	28.6
411	281'	TOK1	26.2

Tabla 2. Distancias entre cisteínas. En la columna cisteína se muestran 1 valor teórico y 2 valores reales de distancias entre cisteínas medidas en estructuras con cristalografía. Posteriormente se numeran las cisteínas de interés en la cadena A de Tok1 con su identificador de secuencia: 281, 411, 415 y 418 o 281', 411', 415' y 418' refiriéndose a la cadena B de Tok1. Y finalmente, la columna distancia que muestra todos los valores en ángstroms.

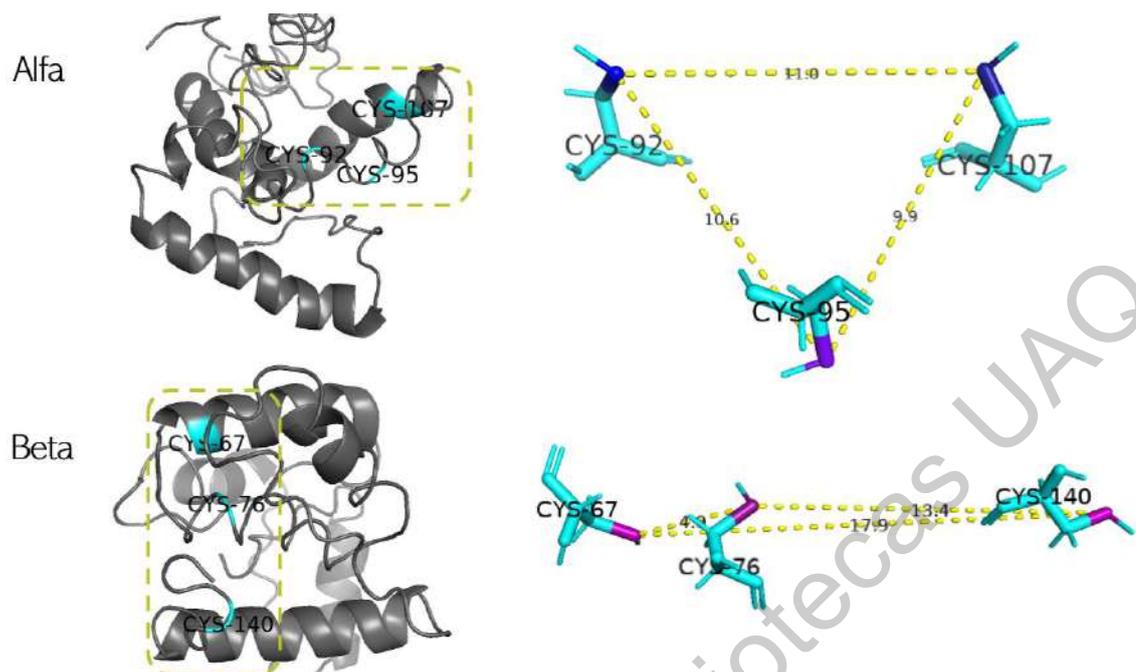


Figura 14. Medición de distancias α y β . Se observan del lado izquierdo las figuras de las subunidades α y β en gris, en cian se localizan las 3 cisteínas que estabilizan a la toxina K1. A la derecha, podemos observar la estructura de las cisteínas en *sticks* de las dos subunidades, en color azul y púrpura, se muestra el átomo de SH desde donde se midieron las distancias entre cada cisteína (línea punteada amarilla).

Subunidad alfa K1			Subunidad beta K1		
Cisteínas		Distancias	Cisteínas		Distancias
95	92*	10.6	67*	76	4.9
95*	107*	9.9	76*	140*	13.4
92	107	11	140	67	17.9
Inmunidad			Unión		

Tabla 3. Distancias entre cisteínas de α y β . Valores de distancias entre los grupos SH en las cisteínas de las subunidades de la toxina, todos los valores se han registrado en ángstroms. Los asteriscos azules indican su función en la inmunidad/unión y por otro lado el asterisco rojo, indica que su posible función es la formación de puentes disulfuro con la otra subunidad de la toxina.

SEPARACIÓN DE PUENTES DISULFURO

De acuerdo con los datos obtenidos por Sun y colaboradores en el 2017, se logró realizar un acercamiento de dichos resultados obtenidos al modelo de la toxina. Es decir, los parámetros publicados por Sun indican que son capaces de predecir puentes disulfuro reversibles son: la carga neta de la proteína, la

longitud del puente disulfuro entre dichas proteínas, el tamaño de la proteína, la hidrofobicidad y la presencia de ciertos aminoácidos como la serina, glicina y fenilalanina cercanas a las cisteínas formadoras de puentes disulfuro.

Para determinar si la toxina cuenta con este tipo de enlaces reversibles, se hizo un análisis manual de algunos de esos parámetros, seleccionados debido a la disponibilidad de datos o herramientas para determinarlos. Por ello se seleccionó a la hidrofobicidad, la presencia de aminoácidos serina, glicina y fenilalanina en ambas proteínas y su proximidad a las cisteínas. No se pudo utilizar el servidor propuesto por el grupo de investigación debido a que solo puede predecir dichos enlaces en proteínas registradas en el PDB que cuenten con cristalografía. Además de realizar este análisis con la toxina, también se realizó una pequeña prueba con 2 toxinas de *Saccharomyces* del tipo *Killer*: *K2* y *K28*. Las cuales presentaron características similares a las de la toxina *K1*. (Datos aquí no mostrados).

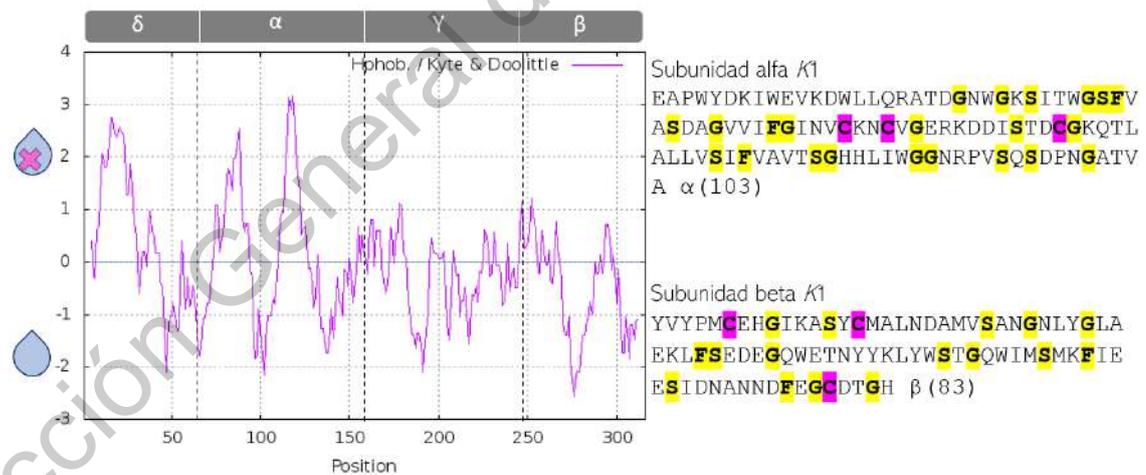


Figura 15. Perfil de hidropatía de α y β. Se muestra el perfil de hidropatía para toda la preprotoxina, se pueden observar en la sección de α, dos picos hidrofóbicos y en la sección de beta un pico hidrofílico. En la parte derecha de la figura se pueden observar las secuencias de aminoácidos para α y β, con los aminoácidos serina, glicina y fenilalanina en amarillo, junto con las cisteínas en rosa.

BÚSQUEDA DE CISTEÍNAS EN CANALES TOK DE OTROS HONGOS

Las regiones de poro en los canales de potasio con dos regiones en poro en tándem son de gran importancia e interés en investigación. Esto debido a que, dentro del mismo canal, las dos regiones de poro pueden llegar a tener funciones diferentes y secuencias diferentes, también es notoria la asimetría que presentan estos canales. Esto ha llevado a la observación de que las regiones de poro son punto clave como blanco de otras moléculas.

El fenómeno *Killer*, se sabe tiene un amplio espectro de efectividad en levaduras, esto debido a la presencia del blanco molecular Tok1 como en el caso del género *Candida*. Hasta el momento se ha determinado la presencia de cisteínas en Tok1 de *Saccharomyces cerevisiae* junto con su sensibilidad a la toxina. Pero, no se ha estudiado si la presencia de cisteínas está conservada en los canales Tok1 de otras levaduras.

Se realizó un alineamiento con la herramienta BLASTp usando como secuencia clave al canal de *Saccharomyces*, para determinar aquellas levaduras que tienen identificado un canal Tok1. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias obtenidas. Los alineamientos fueron analizados, determinando la presencia de cisteínas y los filtros de selectividad.

Scer	231	KLKGYPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWL I W G A M F S G L L	HIT Y G N A L Y F C T V S L	TVGLGDLPK-SVGA K I M V L I	306
Spar	227	KLKGYPTFNLLPNERSIMAYTVLLSVWL I W G A M F S A L L	HIT Y G N A L Y F C T V S L	TVGLGDLPK-SVGA K I M V L I	302
Klma	199	LKKKYAATFNLLENERLIMSFTFVFSIWF L W G S A L F S R L L	HLTYGNSLYFCVSVS	TIGLGDTPD-TTASEMILI	274
Cota	188	HARHYAEDFOLTTAQR T L M L Q T I L F L L Y L L I G A L V F S T V E	GWTYLDAVY W A D V T L	TVFGDYAAA-SPLGRALLIP	263
Fuox	190	SVGHYPNDFNLTPSQRTLM L Q T I M F L L Y L L V G A V V F S N I E	NWNYLDTVY W A D V T L	TVFGDPTAQ-TNLGRALMMP	265
Zygm	185	YLGKYPKFNLMKNERTLMVFTLFFSVLL I W G G M F S R I L	HVTFGAALYFSTVSI	TVGLGDTPN-DVATKELIMV	260
Vern	203	HTRRYPKDFQLTASQR T L M L Q T I A Y L F Y L L I G A L V F A E I E	GWVYLDVY W A N T T L	TIGYGDSPS-STLARALLIP	278
Aspu	197	FLGHYPQNFVLTSDQR T L I L Q T T S S V W L A I G G V I F S H V - [1]	DISYANAVYFSDITI	TVFGDTPPT-TALGRGLVFP	272
Aslu	187	VLGHYPQYFALTDGQR T L I L Q T T A F V W L L I G A A I F H A V - [2]	DISFADALYFSDVTI	TLGYGDTPP-SSVGKGLVFP	263
Kaex	192	RLGKYPATFNLF T N E R S I I L F T V F L S W L I W G S A M F S G L I	NISYGNALYYCTVSL	TVFGDVLPP-SIAAKIMALI	267
Lasu	189	WKDYYPKEFQLTMPQR T L M L Q T I S F L T Y L I A G A A V F G H I E	GWALLDALY W A D V T L	TVGLGDSPS-THTGRALLFP	264
Cagl	208	KLQKYPQFNLLPNERSIMVFTVILSIW L I W G A M F S R L L	HISYGNALYFC T V S L	TIGLGDLPK-STAAKCMALV	283
Asfu	201	ILGHYPQYFALTDGQR T L I L Q T L S F V I W L L I G A A V I F S R V - [1]	DISFADALYFSDVTI	TVFGDTPPT-TAIGRGLVFP	276
Last	221	WRGHYPQFTLTESQR T L I L Q T M M F V W L A G G G I F S R I E [6]	NWTFANALYFC D V T I	TVFGDTPPS-MDVSRLVFP	302
Sugl	330	RLKRSVVPLSITHMQSR L M F L N V I F V W I G F G G I F T A M I [1]	GLTFGDAMYFCMVC	TVAGDLPK-THLSRTIIF	406
Decg	5	FLGHYPENFALSASQR T L I L Q T M T F F I W L G G G A A F S K L E [6]	SWGFADALYFC D V T I	TVFGDTPPS-TDATRGIVFP	86
Smyl	177	FKNFYPPEFNLDNERAVMVT F C L S I W F I W G A M F S G L L	DISYGVALLYETASV	TVFGDTPPH-NVAGKIMCLF	252
Piku	326	LKKKYKPVFNIDHVEETLV I Q T L M G V W L I G A A V F T R V L	NLRSDAYLYFTVSV	TIGMQGVPMhNVAGETLTSI	402
Tria	195	CAGHYPKDFILSLSQR T L M L Q T I L V M I Y L H V G A T V F A A I E	DWGYLEAVY W A D V T L	TIGFGDTPQ-TNLGQALVFP	270
Hano	233	KKGKYKATFNLSHDERAVMLYTFGFQLW L W G A W L Y S K C L [2]	DVSYGVSLYSILCGA	TVFGDTPFSH-KTSGRLISMV	310
Hanu	233	RRGKYKATFNLSHDERAVMLYTFGFSLW L M W G A W L Y S K C L [2]	DVSYGVSLYALCGA	TVFGDTPYST-KTSGRIISMV	310
Trap	213	-PDFARRGSGLTRQRGLMFMVIVLVVYIAFGALVNSILL [2]	-SFINGLYFVSVSI	TIGFGDTPPK-TTGARVNTCV	287
Pens	76	KVSPVSAADRRKIECTSI V F R V T F I I L L L G G A A V Y S T I E	GNSLMDALYFTDYTL	TIGLGDTPQ-THLGRSLLFP	151
Neuc	187	QQGHYAKDFMLTPSQRTLM L Q T I S F L T Y L L I G A L T F S N T E	GWNYLDGVY W A A V T L	TVFGDTPYPT-STLGRALLFP	262

Figura 16. Alineamiento de la vecindad de la región formadora de poro 1 de proteínas homólogas al canal TOK1. Se muestra el alineamiento múltiple de canales de potasio (región P1) de rectificación saliente en: Scer (*Saccharomyces cerevisiae*), Spar (*Saccharomyces paradoxus*), Kmar (*Kluyveromyces marxianus*), Colta (*Colletotrichum tanacetii*), Fuox (*Fusarium oxysporum*), Zygm (*Zigosaccharomyces mellis*), Vern (*Verticillium nonalfalfae*), Aspu (*Aspergillus puulaauensis*), Aslu (*Aspergillus luchuensis*), Kaex (*Kazachstania exigua*), Lasu (*Lachnellula suecica*), Cagl (*Candida glabrata*), Asfu (*Aspergillus fumigatus*), Last (*Lasiodiplodia theobromae*), Sugl (*Sugiyamaella lignohabitans*), Decg (*Decorospora gaudefroyi*), Smyl (*Saccharomycodes ludwigii*), Piku (*Pichia kudriavzevii*), Tria (*Trichoderma asperellum*), Hano (*Hanseniaspora opuntiae*), Hanu (*Hanseniaspora uvarum*), Trap (*Trametes pubescens*), Pens (*Penicillium subrubescens*), Neuc (*Neurospora crassa*). Y cisteínas en azul, filtro selectividad en purpura. (Secuencias: ver anexo #1).

Scer	414	FCFL-C	TIGYG	DYAPRTGAGRAFFV	IWALGAVPLMGAIL	STVGDLLFDISTSLDIKIGES	--FN--NKVKSIVF	---	484
Spar	410	FCFL-C	TIGYG	DFAPRTGAGRAFFV	IWALGAVPLMGAIL	STVGDLLFDISTSLDIRIGES	--LN--NKVKSIVF	---	480
Klma	383	FCIL-S	TIGYG	NLCPIITGCCGRAFFV	LWICIGAVPLMTVLI	STVGDLSLYRCSRTIDRRIRRYI	YFEKPEAQTL	SFKNI	460
Cota	403	FCFL-C	TIGYG	DRTPVSNAGKAF	VFWSLALALPTMTVMIS	NAGDVIKAVRDATLELGNITIL	PGE---	RGFHEDLM	477
Fuox	408	FCFV-S	TIGYG	DVTPISNAGKSF	VFWSLALALPTMTVLI	SNAGDTVVKLIRDGTLRLGNVTIL	PGE---	DNFKSDLK	482
Zygm	368	FCFL-C	TIGYG	DFAPKTGAGRAFFV	CWSLAAVPLMSAIL	STVGDSLFDLAKSAGLPISKK	--FNLGRGIKPFVP	---	440
Vern	416	FCFL-C	TIGYG	DLSLVSNAGR	VFWVWTLALALPTTVMIS	NAGDTVLAVKNAVLELGNVTIL	PGE---	RGFKEDLA	490
Aspu	418	FCFT-S	TIGYG	DITPTTNAAR	PVFWWSLAVPTMTSLISK	MSDITLDVGYQRVTNGVADWTVL	POSGQYSAAISQWS		495
Aslu	407	FGFC-S	TIGYG	DITPTTNAAR	PFVWWSLIVSPTMTVLI	SEMSTIVVAFKHATSVFADWTVL	POSGKYRDLRKF		484
Kaex	375	FCFL-C	TIGYG	DFAPSTGAGRAFFV	WAIWALGAVPLMGAIL	STLGDVLYDTASKIDSSFAKK	--FG--FAMKYMIVTTV		449
Lasu	399	FCFL-C	TIGYG	DFYPTSHSGK	PFVWWSLALAIPLTIVISK	MGDITVKEVEDLTLWIANITIL	PGE---	KGVSALK	473
Cagl	391	FCFL-C	TIGYG	DYAPETGAGRAFFV	LWSIIGAVPLMGAIL	STAGDLLYASSESLDVKLGKW	--LK--NSVKTVLI	---	461
Asfu	436	FGFC-S	TIGYG	DFTPTTNAAK	PFVWWSLIVAVPTMTVLI	SEMSTIVVAFKHATSKVADWTVL	POSSKYQAF	LQRLP	513
Last	512	FCYV-S	TIGYG	DLAPKSNAGR	SFFVWWSLIVAVPTMTVLI	SDMGDVISGFKNATSKLADWTVL	PKDGIWDFLQSH		589
Sugl	516	FCGL-L	YANSFG	DFTPKSPGGRT	FFVWAIWAVPMTILISS	SSITFTITEEGDRFTRRL	-VRTTGFIGNL	SVFNK	592
Decg	262	FCYV-S	TIGYG	DLAPKSNAGR	CFFVWWSLIVAVPTMTVLI	VSDLGDTVAKFKWSEDEFADFTVLP	KEGIWRAFLDKHP		339
Smyl	370	FCFL-C	TIGYG	DFAAKSAGRAFFV	IWALAAVPLMTALISTVGD	FLFDIGTPV-----IKFC	-----		427
Piku	511	FCFY-N	TLGQG	SQSPSTPGGK	TFFAWALAAIPVMTILIST	SSDFVFSKLTQIEKIPFFEIV	FECNSHSLRRFGE		588
Tria	407	FCFI-A	TIGYG	DLAPVSNAGRAFFV	WWSLALALPTITVLI	SHAGSTVVKIRDSIRLGNVTIL	PGE---	DAYLSSLK	481
Hano	456	FAFLdC	TIGYG	DFILTTGSSRAFFV	LALAAIPLMTSLINAI	GDSLSLTIGWSF-----	VKYVII--		517
Hanu	456	FAFLdC	TIGYG	DFILTTGSSRAFFV	LALAAIPLMTSLINAI	GDSLSLGSF-----	VKYAVIA--		517
Trap	639	FCFL-A	TIGYG	DFAPVTPAGRS	VFWALFGVGTLTIVVSVQ	EAGSRYKSA-----			692
Pens	279	FTYT-S	LTTIGYG	DYFPTSNL	GKVFIFWWSLALAIPLANL	VTALGHALHIWLVCECSGWI	RHWLHRGRP---	EEHHDDH	353
Neuc	399	MAYV-S	LTTIGYG	DITPVSNAGK	SFWFWALALALPTMTVLI	SNAGDITVKGIKDATDKVATV	TILPSE---	RGFKSEFK	473

Figura 17. Alineamiento de la vecindad de la región formadora de poro 2 de proteínas homólogas al canal TOK1. Se muestra el alineamiento múltiple de canales de potasio (región P2) de rectificación saliente en: *Scer* (*Saccharomyces cerevisiae*), *Spar* (*Saccharomyces paradoxus*), *Kmar* (*Kluyveromyces marxianus*), *Colta* (*Colletotrichum tanacetii*), *Fuox* (*Fusarium oxysporum*), *Zygm* (*Zigosaccharomyces mellis*), *Vern* (*Verticillium nonalfalfae*), *Aspu* (*Aspergillus puulaauensis*), *Aslu* (*Aspergillus luchuensis*), *Kaex* (*Kazachstania exigua*), *Lasu* (*Lachnellula suecica*), *Cagl* (*Candida glabrata*), *Asfu* (*Aspergillus fumigatus*), *Last* (*Lasiodiplodia theobromae*), *Sugl* (*Sugiyamaella lignohabitans*), *Decg* (*Decorospora gaudefroyi*), *Smyl* (*Saccharomycodes ludwigii*), *Piku* (*Pichia kudriavzevii*), *Tria* (*Trichoderma asperellum*), *Hano* (*Hanseniaspora opuntiae*), *Hanu* (*Hanseniaspora uvarum*), *Trap* (*Trametes pubescens*), *Pens* (*Penicillium subrubescens*), *Neuc* (*Neurospora crassa*). Y cisteínas en azul, filtro selectividad en rosa, cisteínas ausentes en gris. (secuencias: ver anexo #1).

BÚSQUEDA DE CISTEÍNAS EN ORF'S

Después de realizar el alineamiento se hizo un conteo de cisteínas en marcos de lectura abiertos semejantes a TOK1, además este número de cisteínas se comparó con canales de potasio Tok1 ya identificados. Se hizo el conteo de cisteínas en secuencias pertenecientes a bacterias: *Listeria*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, de las cuales ya hay evidencias de sensibilidad a la toxina. El número de cisteínas es reducido en procariontes.

Presencia de cisteínas en canales de potasio homólogos de diferentes microorganismos			
aa	Organismo/canal potasio	Número cisteínas	Secuencia GenBank
1 - 691	TOK1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	NP_012442
1 - 741	TOK1 - <i>Candida albicans</i>	8	XM_707536.2
1 - 741	ORF TOK - <i>Candida glabrata</i>	8	XP_449528
1 - 353	ORF TOK - <i>Ustilago maydis</i>	5	KIS70213
1 - 714	TOK1 - <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	5	XM_024465761
1 - 821	TOK1 - <i>Cryptococcus neoformans</i>	5	ACD13149
1 - 628	TOK1 - <i>Kluyveromyces lactis</i>	13	QEU62531
1 - 639	TOK1 - <i>Kluyveromyces marxianus</i>	12	XM_022818658
1 - 684	TOK1 - <i>Colletotrichum aenigma</i>	6	XM_037318861
1 - 375	ORF TOK - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	WP_016528883
1 - 381	ORF TOK - <i>Salmonella entérica</i>	1	MEV19890
1 - 289	ORF TOK - <i>Listeria monocytogenes</i>	0	GAT38857
1 - 362	ORF TOK - <i>Escherichia coli</i>	0	NP_415449
1 - 351	ORF TOK - <i>Shigella flexneri</i>	0	WP_000749868

Tabla 4. Recuento de cisteínas en proteínas homólogas. Se presenta el tamaño de las secuencias en (aa), el organismo se muestra el microorganismo en donde fue encontrada esa proteína y además si es un ORF o una secuencia ya clasificada como homóloga del canal de potasio TOK1. En la siguiente columna se muestra el número de cisteínas presentes en la secuencia y en la columna secuencia, se muestra el número de referencia para cada secuencia probada.

La información nueva que brinda esta búsqueda es muy interesante. Al proponer a las cisteínas como sitio de unión se esperaría que todas las secuencias contaran con al menos una cisteína en su estructura, que fuese capaz de interactuar con la toxina. Para el caso de bacterias como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, ya hay evidencia en el laboratorio de que la toxina es capaz de mantener su letalidad. Sin embargo, aquí podemos observar que no hay cisteínas presentes en su secuencia. En el mismo sentido, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella entérica* (otra variedad) igualmente presentan experimentos que respaldan su sensibilidad a la toxina y en sus secuencias al menos contienen a una cisteína. Para el caso de *Candida albicans*, *Ustilago maydis* y otros géneros de hongos, también se cuenta con más de una cisteína en su estructura y la mayor parte de dichos hongos son sensibles a K1. Por lo tanto, el efecto *Killer* no solo precisa de la presencia de cisteínas para actuar.

ANÁLISIS DE KRE1: ¿IMPLICADO EN EL EFECTO KILLER?

Una vez obtenidos los resultados anteriores, una pregunta que siempre se tiene es si la toxina podría estar interactuando en otros sitios, como por ejemplo la proteína Kre1p, que como sabemos está involucrada en la síntesis y arreglo estructural de proteínas en la pared celular de las levaduras (Roemer 1995; Breinig, 2004). Para descartar una vez más esta idea, se hizo el análisis de la secuencia de dicha proteína. Lo cual determinó que Kre1p: 1) No tiene cisteínas entre sus aminoácidos, lo cual implica que la interacción que media con la toxina (quizá alfa) es momentánea y no es permanente, como se había llegado a plantear en la literatura. Por medio de una búsqueda en BLASTp de KRE1 y Tok1, se pudo encontrar la filogenia de dichas proteínas. Posteriormente con el programa MUSCLE se realizó un alineamiento múltiple con las coincidencias del primer alineamiento con BLASTp.

Posteriormente, Gblocks, se encarga de “*curar*” el alineamiento múltiple, asegurándose que las secuencias no tengan regiones “*gap*” y quitando las secuencias no adecuadas. Por medio de la ayuda de PhyML, se pudo hacer el análisis filogenético y finalmente obtener el árbol filogenético por medio de TreeDyn. Los resultados mostraron que ambas proteínas están presentes en los mismos grupos de levaduras y hongos, con excepción de la familia *Haseniaspora*, la cual no aparece para Tok1, sin embargo, en otros análisis realizados en este mismo proyecto, estas levaduras sí cuentan con la proteína. Algunos de estos grupos, se ha determinado que son sensibles a la toxina o sintetizan sus propias toxinas. Además, se podrá pensar que la coexistencia de dichas proteínas está implicada en el mecanismo de acción de la toxina, una de ellas como mediadora en la membrana plasmática y la segunda como el blanco molecular final de la toxina.

KRE1

```
MMRRTLLHSFATLLLSLSLWSAAVMAAVTTQVTVVTVNVAGALVTETTIWDPATAAAAAT  
TTAQTGFFTTVFTTTNDVGTTVTLTQTVNRRATMLPTTTTSTSSSTGKTTTTVPTATSSLS  
SGLYLSTVTTTNDLGTTVTLTQTFTHSSTSATSASSSVSSSVSSSGSSSSVKTTTSTG  
SAVAETGTRPDPSTDFTEPPVSAVTSLSIDSYITITEGTTSTYTTTRAPTSMWVTVVRQ  
GNTITVQTTTFVQRFSSQYVTVASPSVGSIGMGTLTGTVGVIKSAIKKTVSHNEAQHLGM  
SSFTSILGGLLTVLIWFL
```

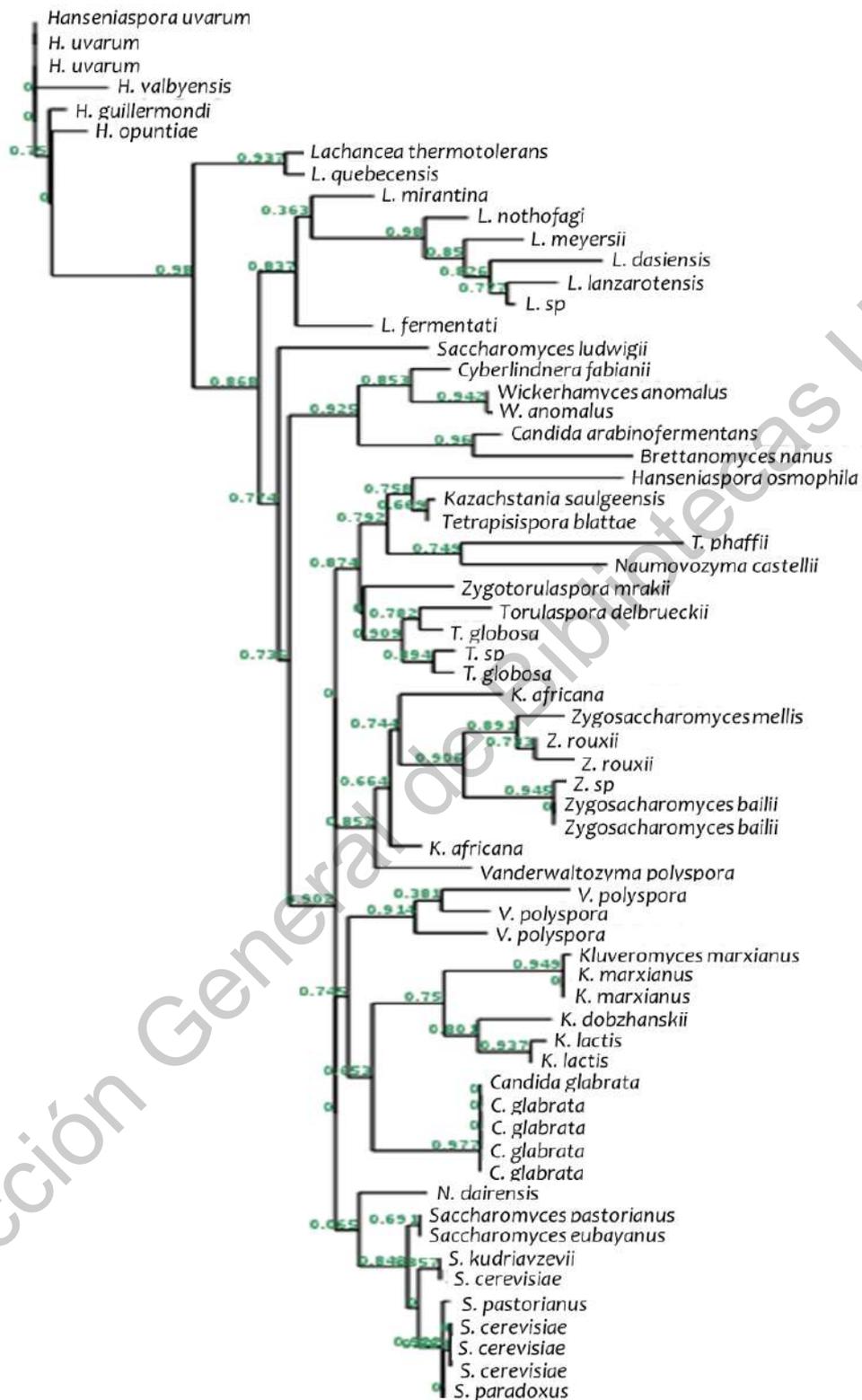


Figura 18. Análisis Kre1p. Se muestra la secuencia de Kre1p, la cual no contiene cisteínas. Además, se puede observar el análisis filogenético de la proteína y su presencia en hongos levaduriformes.

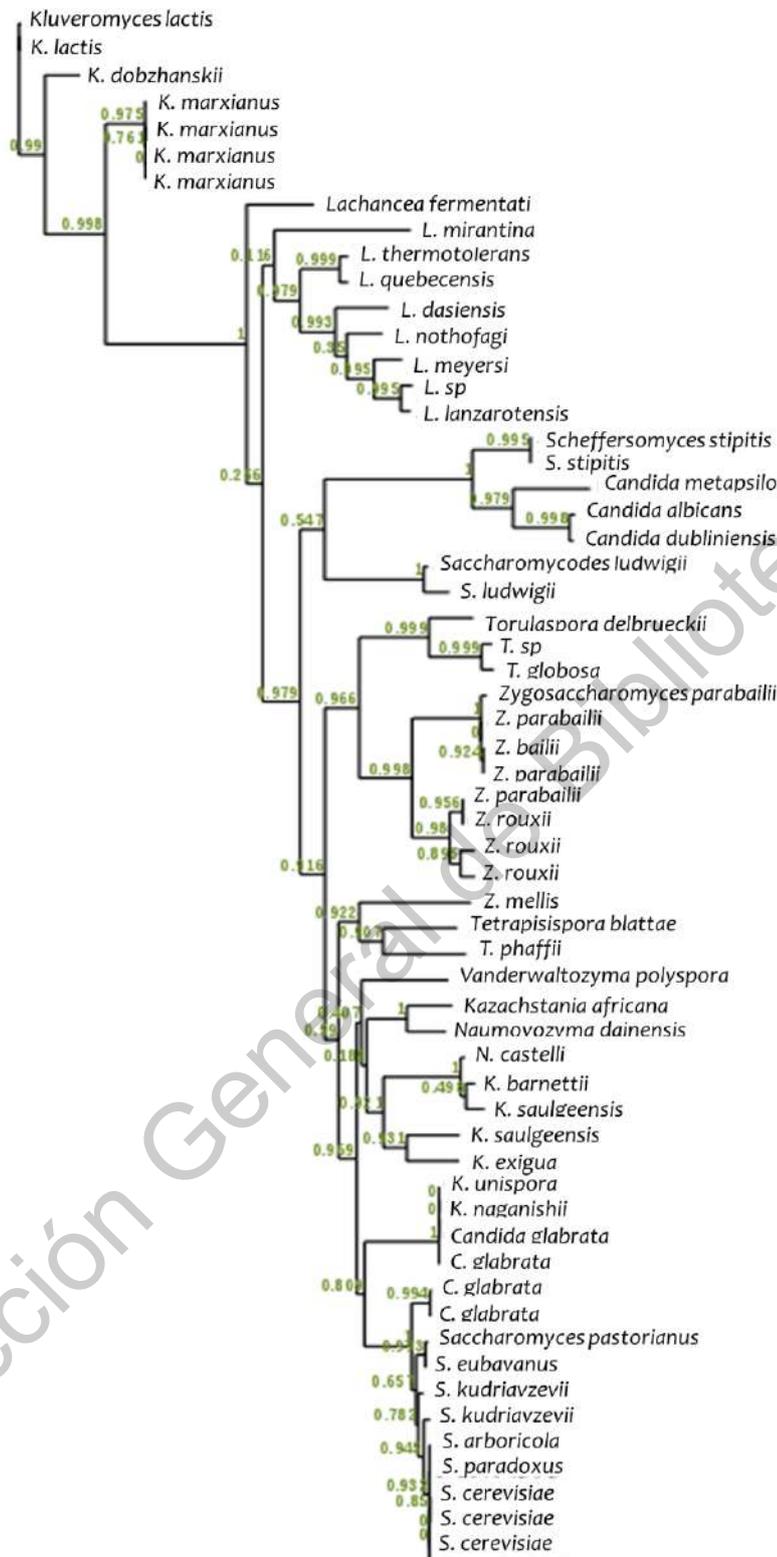


Figura 19. Análisis de Tok1. Análisis filogenético de la proteína Tok1, se muestra su presencia en hongos levaduriformes.

HIPÓTESIS ALTERNA

En la secuencia de Kre1p no hay cisteínas, pero si hay interacción con la subunidad alfa. Además, no tienen cisteínas todas las secuencias de microorganismos sensibles a la toxina o con marcos de lectura similares a TOK1, como se observó para el caso de *Listeria* y *Klebsiella*. Si no hay cisteínas, entonces las cisteínas en la toxina tienen algún otro aminoácido de anclaje para el efecto *Killer*.

Las cisteínas no solo pueden formar puentes disulfuro con otras cisteínas, también pueden formar puentes de hidrógeno con aminoácidos como la tirosina o el triptófano perteneciente al grupo de aminoácidos aromáticos. Esta interacción se da por medio del grupo OH presente en su estructura y a ambientes oxido-reductivos. Por lo que se hizo el análisis de la presencia de tirosinas en la región de poro y se observó que tanta cercanía tenían a las cisteínas.

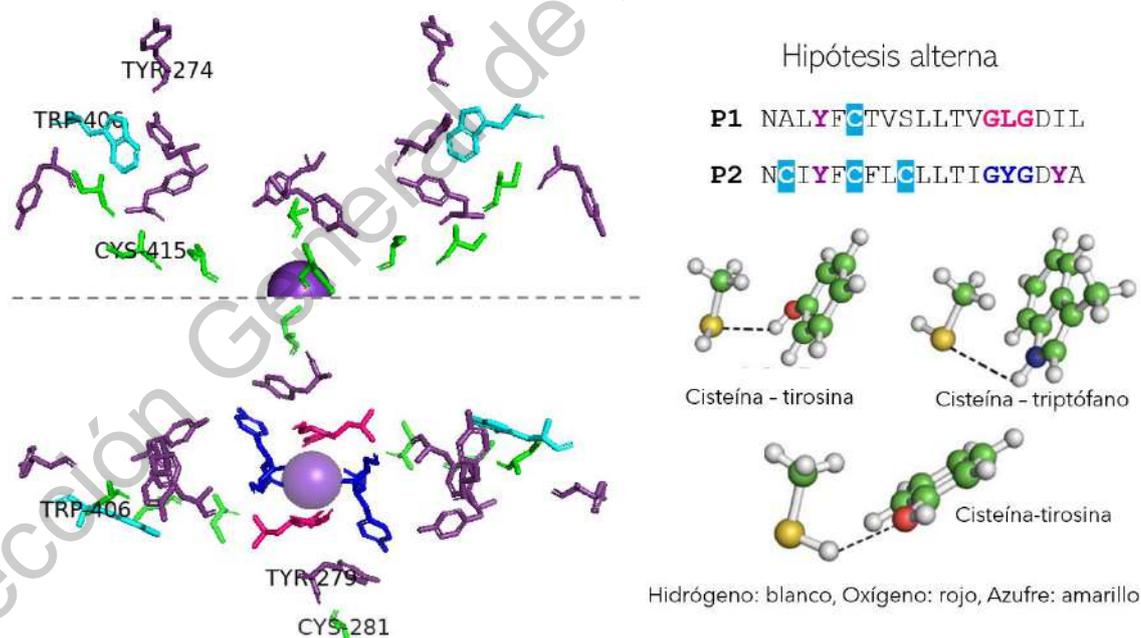


Figura 20. Análisis de aminoácidos aromáticos en Tok1. Análisis de la presencia de tirosina y triptófano en la región de poro de TOK1 y su proximidad con las cisteínas de la zona. Podemos ver los aminoácidos cisteína en color verde, las tirosinas en morado y los triptófanos en cian, las vistas es el canal completo y la región de poro. También se muestra la secuencia de las regiones P1 y P2 del canal. Junto con las posibles interacciones de la cisteína con estos aminoácidos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Hasta el momento no se ha determinado la estructura del canal de potasio Tok1 y solo los perfiles de hidropatía habían sido utilizados para tratar de entender su estructura. En este proyecto se logró obtener por modelaje una estructura tentativa del canal Tok1 de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante el uso de TREK1 como molde (figuras 7 y 9). Normalmente los canales de potasio de tipo K2P (cuatro cruces transmembrana y dos regiones de poro en tándem), tienen bien conservados los dominios de poro. Es probable que canales como Tok1, tengan también conservadas las regiones de poro, porque son canales de potasio (Copley 2004; Jegla y Salkoff 1994; Thiel et al. 2013; Derst y Karschin 1998).

Por lo tanto, el utilizar proteínas que cuenten con cristalografía, como en el caso de TREK1 en la minimización estructural, dan como resultado una predicción acertada y mayormente aproximada de la región de poro, junto con el arreglo de las hélices o cruces transmembrana. Por lo tanto, la localización de las cisteínas en los modelos estructurales hechos es correcta debido a que están basadas en la secuencia proteica de Tok1 obtenida del NCBI y semejante al mapa topográfico mostrado en la figura 3, el cual está basado en la secuencia que fue publicada por Ketchum en 1995. También se hizo un análisis superficial de Tok1, ver anexo #2.

A pesar de que Tok1, TREK1 y TWIK1 no pertenecen a la misma familia de canales de potasio y además que los organismos a los que pertenecen son diferentes entre sí, podemos observar que los canales de potasio en general presentan alto grado de identidad y similitud en su estructura como se mostró en la figura 7 y 8. (Jegla y Salkoff 1994; Thiel et al. 2013; Derst y Karschin 1998). La predicción estructural para las construcciones segmentadas TOK1A y TOK1B nos ayudó a determinar visualmente si existen cambios en la localización de las cisteínas que son de interés para el proyecto y si hay cambios en la estructura en general. No se observaron dichos cambios en ninguno de los aspectos anteriores de la figura 10.

En cuanto a la mutagénesis dirigida *in silico*, se pudo determinar que las 4 cisteínas en la región de poro tienen cierta cercanía con el filtro de selectividad, lo cual podría también estar relacionado al efecto de la toxina en esos sitios. Sin embargo, para llegar a una conclusión sobre esto, hacen falta más estudios, como determinar la distancia entre esos dos objetivos y hacer experimentos *in vitro*. En las demás secciones de la figura 11 y 12 podemos observar las mutantes de cisteína-metionina y que no hay cambios estructurales en ninguna de las 4 mutantes, porque en ambas imágenes conservan las formas de otros aminoácidos y de la proteína en general intactas. Lo cual podría deberse a semejanzas en sus propiedades, como que las cisteínas tienen una masa molar de 121.16 g/mol, y las metioninas de 149.21 g/mol; ambos aminoácidos son solubles en agua y en ácido acético, son polares y no tienen carga (PubChem-NCBI 2021). Lo que concuerda con la tabla 1 en donde se muestran los cambios en la energía libre al realizar esta intervención en el canal.

La predicción estructural de las subunidades α y β de la toxina realizadas en la figura 13, muestran la posible estructura real de este péptido. Debido a que no hay estructuras de proteínas determinadas similares a la toxina, no se pueden comparar estas estructuras con otras toxinas *Killer*, para determinar si tienen características semejantes entre sí. Pero, se puede inferir por el sitio donde se encuentran localizadas las cisteínas, que las estructuras podrían ser muy cercanas a la estructura original, debido a que se encuentran en sitios accesibles para formar puentes disulfuro entre subunidades y además están accesibles para su potencial interacción con el canal Tok1 (Gier, Schmitt, y Breinig 2020; Ahmed et al. 1999).

El análisis de distancias de Tok1 y de las subunidades en la toxina vistos en la figura 14 y tabla 3, apoyan esta idea, debido a que en el canal no se encontró evidencia que sugiera que las cisteínas 281, 411, 415, 418 (7, 9, 10 y 11) formen puentes disulfuro entre sí que ayuden a la estabilidad de la proteína. Por otro lado, las distancias de alfa y beta tampoco muestran relación con el tamaño teórico de los puentes disulfuro, el cual está en 2.05 Ångstroms, todas las medidas obtenidas fueron mayores a este valor, lo que indica que no forman puentes disulfuro entre ellas y potencialmente están libres para interactuar K1-

Tok1. Este mismo resultado se obtuvo al medir las distancias de las conformaciones segmentadas del canal Tok1. Todo el proceso de medición de distancias fue documentado y se puede observar en el anexo #3.

El grupo de laboratorio proponía que la separación de las subunidades α y β de la toxina al momento de interactuar con cepas sensibles, disociaban sus puentes disulfuro por efecto del pH extracelular ácido de la levadura. La evidencia que apoyaba esta hipótesis es que experimentos realizados por el grupo, demostraron que, a pH neutro, el efecto de la toxina desaparecía a través del tiempo, caso opuesto, en experimentos con pH de 4.6 o 4.7, el efecto de la toxina se mantenía de manera irreversible. Estos eventos aún no han sido estudiados con detalle y existe poca literatura al respecto, como el trabajo realizado por Sun y colaboradores en el 2017, quienes estudiaron los enlaces disulfuro reversibles en diversas proteínas, análisis que está respaldado por literatura que habla sobre el cambio en las teorías clásicas, que indican que los puentes disulfuro son enlaces inmóviles, carentes de ejercer alguna dinámica con los cambios en el entorno (Sun et al. 2017; Schmidt 2006; Wouters 2010; Nagahara 2011; Cremers 2013; Yang 2007; Choi et al. 2001).

Se tuvo que hacer una selección de las características para determinar este tipo de enlaces determinadas por los investigadores. Esto limitado a la disponibilidad de información acerca de la toxina y las herramientas disponibles para poder hacer el análisis. Por lo tanto, el análisis se acotó a las siguientes características: La hidrofobicidad de los componentes de la toxina, la presencia de serina, glicina y fenilalanina en la toxina, junto con su cercanía a las cisteínas y la comparación de estos datos con otras toxinas *Killer* y toxinas bacterianas, resultados que no se presentan en este proyecto. Sin embargo, se logró observar que, en ambos componentes de la toxina, hay grandes cantidades de serina, glicina y fenilalanina, además en el perfil de hidropatía de la preprotoxina, se puede observar en la figura 15, la alta hidrofobia que tiene la sección alfa con respecto a la hidrofilia observada mayormente en beta. Los resultados preliminares del análisis con otras toxinas indican que estas características solo se encuentran en toxinas *Killer*. Hasta el momento no se había determinado porque se disocian estos puentes. Sin embargo, la evidencia descrita en este proyecto sugiere que

ambas subunidades son capaces de disociar sus puentes disulfuro como parte de la acción de la toxina, es decir, para ser letal, la toxina necesita activarse y esto lo hace por medio de sus cisteínas y la separación de los puentes disulfuro. Este tipo de mecanismos también han sido estudiados en otros organismos en la naturaleza (Nayak 1999; Choi et al. 2001).

Hasta este punto, el mecanismo de acción de la toxina tiene algunas semejanzas con otros modelos de estudio en los cuales las cisteínas son de gran relevancia, así mismo, al igual que el caso de los posibles puentes disulfuro con función en la toxina, también hay otras proteínas que requieren de este tipo de aminoácidos y la versatilidad de sus enlaces (Choi et al. 2001; Martin-Eauclaire y Bougis 2012; McCaffrey et al. 2012).

Los canales Tok1 tienen la característica de ser versátiles en función y estructura, esto debido a la presencia de 8 cruces transmembrana y dos regiones de poro en tándem, que le brindan al canal asimetría al dividir las dos regiones de poro; además de esta característica, las secuencias del canal en sus regiones de poro tienden a ser variables lo que brinda o no una mayor estabilidad a una u otra región P. Además, se ha observado que la función del canal es variable cuando es segmentado en TOK1A y TOK1B (Saldaña 2002, Roller 2008). Por lo que las regiones de poro son de gran relevancia para la función general del canal y está relacionado estrechamente a la localización de las cisteínas aquí estudiadas, al analizar las secuencias de las regiones de poro P1 y P2 en Tok1 de *Saccharomyces* y otros microorganismos con supuestos canales Tok1 (Canal de potasio con dos cruces transmembrana y dos regiones de poro en tándem) se intentó determinar si las cisteínas están conservadas en estas familias.

Lo que se observó en las figuras 16 y 17, es que, en algunos de los hongos analizados, la secuencia del poro es variable. Así mismo, los filtros de selectividad se mantienen en todos los casos. Flanqueando estas secuencias, se encontraron algunas cisteínas como se muestra en la figura 17 aunque su presencia es insuficiente, al menos en la región de poro 2. En el primer dominio de poro figura 16, podemos encontrar una cantidad alta de cisteínas cercanas al filtro de selectividad, pero, no está presente en todas las secuencias, esto podría

deberse a que estos microorganismos potencialmente no son sensibles a la toxina o a que existe otro sitio blanco en donde las cisteínas de la toxina interactúan en el canal. Por otro lado, se estableció que la región de poro número 2 que contiene a las cisteínas 411, 415 y 418 posiblemente sea el encargado de la interacción. Lo que concuerda con que *Candida albicans*, sensible a la toxina, no cuenta con la cisteína número 7 (Polonelli y Conti 2009). Todas las secuencias utilizadas para el análisis están descritas en el anexo #1.

De hecho, al analizar el número de cisteínas presentes en algunas de las bacterias en la tabla 4, con las que se experimentó en el laboratorio con la toxina y en donde se estableció que son sensibles a la toxina, se descubrió que solo expresan proteínas con una o ninguna cisteína. Lo que sugiere con mayor fuerza que las cisteínas en el canal requieren de algún otro elemento para que la toxina pueda llevar a cabo su interacción en las regiones de poro. Tras hacer un análisis, para determinar si Kre1p tiene que ver con este hecho, se llegó a la conclusión de que Kre1p no tiene cisteínas para interactuar con alfa, a pesar de que se sabe que ambas proteínas (Tok1 y Kre1p) están presentes en los mismos grupos de microorganismos y que si hay una interacción toxina-Kre1p, figuras 18 y 19. Aunque la interacción con Kre1p no es suficiente para que la toxina tenga un efecto. Debido a que la ausencia de esta proteína solo permite el paso directo de la subunidad alfa a la región de la membrana plasmática, en donde se encuentra su blanco molecular (Schmitt 2001).

En este punto surge la hipótesis alterna, que apunta a otros aminoácidos clave en la interacción Tok1-K1 además de las cisteínas, figura 20. Químicamente, es posible que las cisteínas puedan hacer nuevos enlaces con aminoácidos pertenecientes al grupo de aminoácidos aromáticos. Un ejemplo de esto es la posible interacción de la cisteína con el grupo OH de la tirosina en ambientes oxido-reductores. De acuerdo con esto, se estudió la presencia de este tipo de aminoácidos en la región de poro Tok1. Se descubrió que la presencia de cisteínas en el poro está acompañada de aminoácidos aromáticos como tirosina, y triptófano (Mazmanian et al. 2016). Para el caso específico de la tirosina, se encontró que tiene una corta proximidad con las cisteínas en ambos dominios de poro. Por lo que no se descarta la idea de una interacción con oxígenos,

hidrógenos y el azufre de la cisteína con estos nuevos aminoácidos, a pesar de esto es necesario realizar los experimentos *in vitro*.

CONCLUSIONES

La toxina, las cisteínas y la presencia del canal Tok1 en hongos y levaduras, es un sistema altamente conservado. Las cisteínas en las regiones P1 y P2 de Tok1 y en la toxina podrían tener interacción en la región de poro debido a las pruebas *in silico* y a la literatura, por medio de puentes de hidrógeno con aminoácidos como la tirosina y el triptófano o formando puentes disulfuro entre cisteínas. Es posible que las cisteínas en la toxina puedan hacer enlaces disulfuro reversibles, cuando la proteína necesite ese tipo de enlaces para cumplir su función.

El uso de herramientas informáticas tiene un amplio campo de trabajo y muchas nuevas posibilidades como una excelente alternativa de trabajo a los ensayos *in vitro* en casos de emergencia y además como un apoyo teórico a los datos experimentales *in vitro* obtenidos, o en su caso como conocimientos previos necesarios a los ensayos experimentales. Además, brinda una visión con resolución que muchas veces los ensayos *in vitro* no tienen: la posible conformación estructural de los elementos con los que se está trabajando y su puntual localización.

PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos *in vitro* para validar las observaciones realizadas *in silico* en este estudio.
- Determinar el mecanismo de acción de la toxina en microorganismos de importancia biomédica y ver si los aminoácidos aromáticos reportados en este proyecto tienen un papel importante K1-Tok1.
- Retomar el estudio del papel que tiene el pH y su importancia en la inhibición reversible/irreversible de cepas sensibles, que se ha visto en experimentos realizados en el laboratorio.
- Realizar más estudios sobre los puentes disulfuro reversibles en la toxina *Killer*.

ANEXO 1: Cuadro con identificadores de secuencias

La tabla muestra todas las secuencias que fueron utilizadas para realizar los diversos análisis bioinformáticos de este proyecto. Se muestra el nombre del microorganismo y su número de identificación perteneciente al NCBI. Ninguna de esas secuencias está registrada en el PBD.

TWIK1 ID PBD: 3UKM

TREK1 ID PBD: 4TWK

Secuencias utilizadas en los análisis	
# Identificador	Nombre microorganismo
GFP67548.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
XP_033767193	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
QGN15173.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
TKW56775.1	<i>Colletotrichum tanacetii</i>
TVY71741.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
GCE98460.1	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>
XP_028499303.1	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
XP_041559213.1	<i>Aspergillus puulaauensis</i>
XP_041542539.1	<i>Aspergillus luchuensis</i>
KAG0668029.1	<i>Kazachstania exigua</i>
TVY82823.1	<i>Lachnellula suecica</i>
KTB15013.1	<i>Candida glabrata</i>
ACD13145.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>
KAB2578057.1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
XP_018737332.1	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>
KAF1836450.1	<i>Decorospora gau</i>
SSD62166.1	<i>Saccharomycodes</i>
ONH77793.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>
GFP58861.1	<i>Trichoderma asperellum</i>
OEJ89837.1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
OEJ87040.1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

OJT03447.1	<i>Trametes pubescens</i>
OKO97306	<i>Penicillium subrubescens</i>
CAD53325.1	<i>Neurospora crassa</i>
Análisis filogenético TOK	
XP_455718	<i>Kluyveromyces lactis</i>
QEU62531	<i>K. lactis</i>
CDO96061	<i>K. dozhovskii</i>
XP_022675303	<i>K. marxianus</i>
BAP70955	<i>K. marxianus</i>
KAG0676407	<i>K. marxianus</i>
QGN15173.1	<i>K. marxianus</i>
SCW00738	<i>Lachancea fermentati</i>
SCV03397	<i>L. mirantina</i>
XP_002552876	<i>L. thermotolerans</i>
CUS20727	<i>L. quebecensis</i>
SCU83140	<i>L. dasiensis</i>
SCU90359	<i>L. nothofagi</i>
SCU78726	<i>L. meyersi</i>
SCU77681	<i>L. sp</i>
XP_022629835	<i>L. lanzarotensis</i>
XP_001383990	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
KAG2733363	<i>S. stipitis</i>
KHC78002	<i>Candida metapsilosis</i>
XP_002419744	<i>Candida albicans</i>
SSD60948	<i>Candida dubliniensis</i>
SSD62166.1	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
XP_003678560	<i>S. ludwigii</i>
QLQ81757	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
XP_037140827	<i>T. sp</i>
AQZ16665	<i>T. globosa</i>
SJM84376	<i>Zygosaccharomyces parabaillii</i>

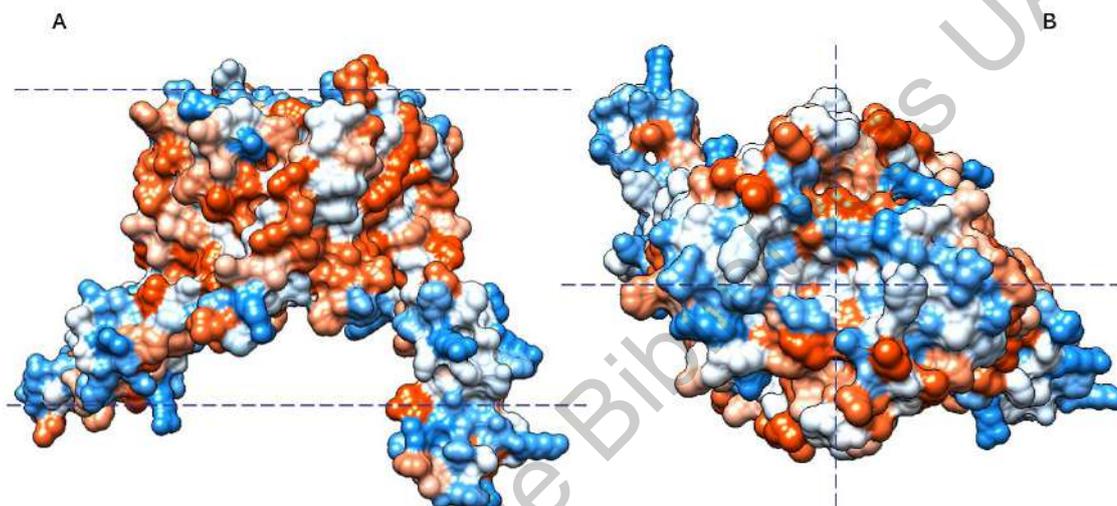
AQZ12437	<i>Z. parabailii</i>
CDH17700	<i>Z. bailii</i>
XP_002498643	<i>Z. parabailii</i>
GAV51211	<i>Z. parabailii</i>
GAV56007	<i>Z. rouxii</i>
GCE98460	<i>Z. rouxii</i>
XP_004179615	<i>Z. rouxii</i>
XP_003687034	<i>Z. mellis</i>
XP_001643315	<i>Tetrapisispora blattae</i>
XP_003954717	<i>T. phaffii</i>
XP_003980208	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
XP_003673884	<i>Kazachstania africana</i>
CAB4256956	<i>Naumovozya dainensis</i>
SMN21721	<i>N. castelli</i>
KAG0668029	<i>K. barnettii</i>
KAG0662997	<i>K. saulgeensis</i>
XP_022462869	<i>K. exigua</i>
OXB41059	<i>K. unispora</i>
KTB15013	<i>K. naganishii</i>
QNG16466	<i>Candida glabrata</i>
XP_448924	<i>C. glabrata</i>
QID86025	<i>C. glabrata</i>
XP_018221235	<i>C. glabrata</i>
EHN01757	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
EJT42201	<i>S. eubayanus</i>
EJS43141	<i>S. kudriavzevii</i>
XP_033767193	<i>S. kudriavzevii</i>
AIR55835	<i>S. arabicola</i>
PTN14395	<i>S. paradoxus</i>
CAD6630477	<i>S. cerevisiae</i>
CAD6632508	<i>S. cerevisiae</i>

AJR55197	<i>S. cerevisiae</i>
Análisis filogenético KRE	
OEJ81776	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
KAF0278331	<i>H. uvarum</i>
KAF0270859	<i>H. uvarum</i>
OBA21764	<i>H. valbyensis</i>
SGZ41518	<i>H. guillermondi</i>
OEJ85881	<i>H. opuntiae</i>
XP_002555031	<i>Lachancea thermotolerans</i>
CUS24990	<i>L. quebecensis</i>
SCV00682	<i>L. miratina</i>
SCU99085	<i>L. nothofagi</i>
SCU84310	<i>L. meyersi</i>
SCU84227	<i>L. dasiensis</i>
XP_022630958	<i>L. lanzarotensis</i>
SCU81035	<i>L. sp</i>
SCW03804	<i>L. fermentati</i>
SSD59255	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
CDR43423	<i>Cyberlindnera fabianii</i>
XP_019040140	<i>Wickerhamyces anomalus</i>
XP_019040229	<i>W. anomalus</i>
ODV86885	<i>Candida arabinofementans</i>
XP_038778908	<i>Brettanomyces nanus</i>
OEJ81816	<i>Hanseniaspora osmophila</i>
KAG0672234	<i>Kazachstaia saulgeensis</i>
SMN19492	<i>Tetrapisispora blattae</i>
XP_004182232	<i>T. phaffii</i>
XP_003683553	<i>Naumovozyima castellii</i>
XP_003676562	<i>Zygorulasporea mrakii</i>
XP_037145404	<i>Torulasporea delcruueckii</i>
XP_003678580	<i>T. globosa</i>

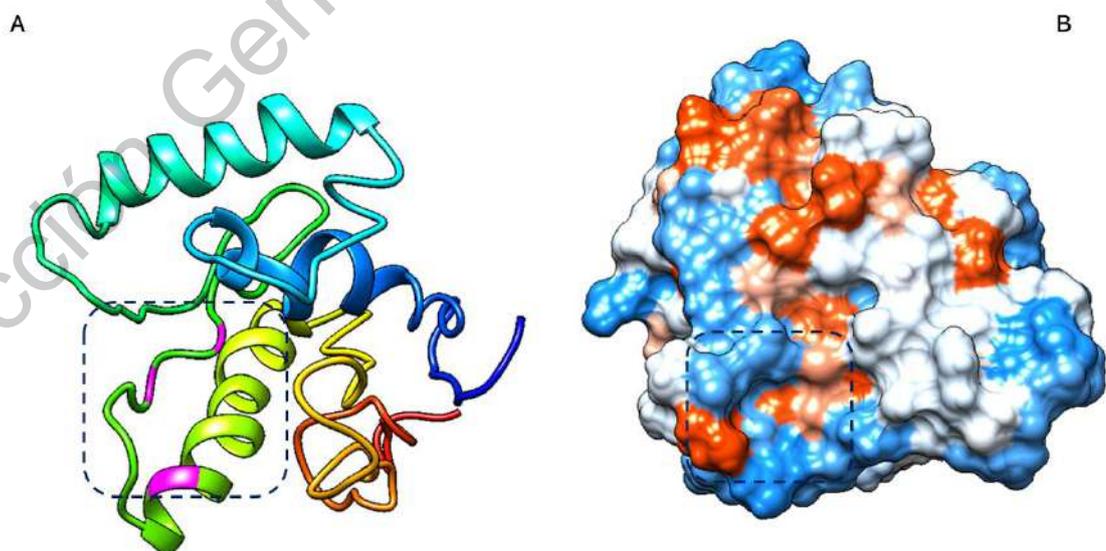
XP_037139802	<i>T. sp</i>
QLQ80686	<i>T. globosa</i>
XP_003955424	<i>K. africana</i>
GCE99900	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>
XP_002495798	<i>Z. rouxii</i>
GAV52855	<i>Z. rouxii</i>
AQZ17279	<i>Z. sp</i>
AQZ11755	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
CDF87358	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
XP_003955425	<i>K. africana</i>
XP_001643167	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
XP_003955426	<i>V. polyspora</i>
XP_022466863	<i>V. polyspora</i>
KAG0663296	<i>V. polyspora</i>
KAG0681915	<i>Kluveromyces marxianus</i>
BAP74076	<i>K. marxianus</i>
XP_022678438	<i>K. marxianus</i>
CDO95049	<i>K. dobzhanskii</i>
QEU61326	<i>K. lactis</i>
XP_454902	<i>K. lactis</i>
XP_449528	<i>Candida glabrata</i>
KTB12841	<i>C. glabrata</i>
KTBO4456	<i>C. glabrata</i>
QNG16888	<i>C. glabrata</i>
AXB40378	<i>C. glabrata</i>
XP_003671168	<i>N. dairensis</i>
QID87481	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
XP_018219578	<i>Saccharomyces eubayanus</i>
EJT43163	<i>S. kudriavzevii</i>
EHN00659	<i>S. cerevisiae</i>
AJT09669	<i>S. pastorianus</i>

QID81834	<i>S. cerevisiae</i>
AIT17972	<i>S. cerevisiae</i>
AIT23900	<i>S. cerevisiae</i>
CAD6640662	<i>S. paradoxus</i>

ANEXO 2: Análisis superficial del Canal TOK1



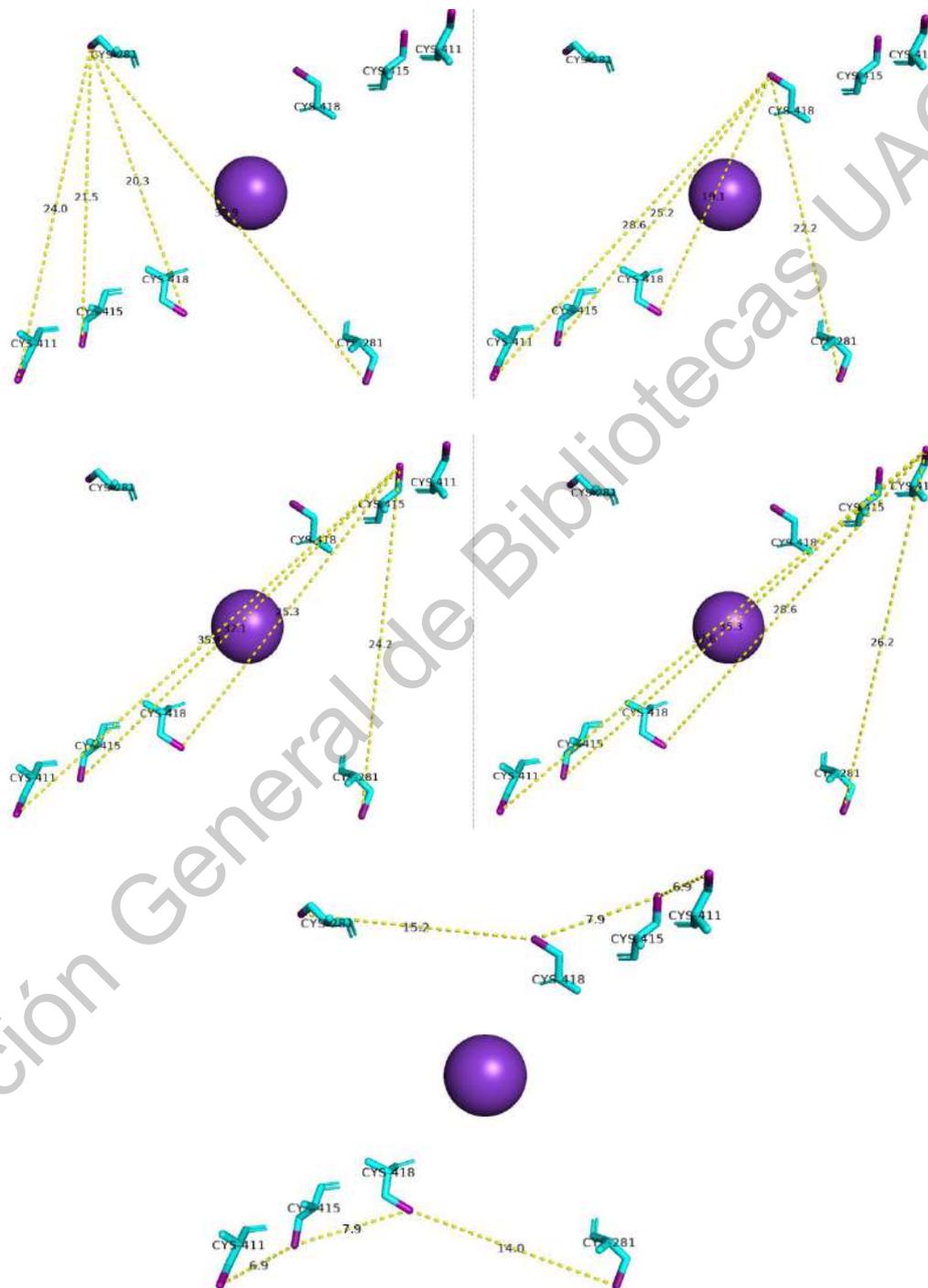
Estructura TOK1. Representación que detalla los aspectos volumétricos y la hidrofobicidad de la superficie del canal de potasio TOK1. Mostrando que en la región superior del poro hay una mayor proporción de regiones hidrofílicas (azul) y en el interior se localizan algunas regiones hidrofóbicas (rojo).



Estructura Subunidad α (K1). Representación que detalla los aspectos volumétricos y la hidrofobicidad de la superficie de la toxina K1 en su subunidad α . Mostrando que en la región superior del poro hay una

mayor proporción de regiones hidrofílicas (azul) y en el interior se localizan algunas regiones hidrofóbicas (rojo).

ANEXO 3: Medición de distancias entre cisteínas de Tok1



Proceso de medición de distancias Tok1. Se muestran las cisteínas presentes en Tok1 (7, 9, 10 y 11) en color cian, en color púrpura se localizan las regiones SH de cada cisteína. En líneas punteadas amarillas las distancias obtenidas. En el centro se localiza el ion de potasio.

REFERENCIAS

1. Aguilar, R. (2015). Los albores de la penicilina en México. Tzintzun.
2. Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T.M., Sturley, S. L., y Goldste, S. A., (1999). A Molecular Target for Viral Killer Toxin: TOK1 Potassium Channels. *Cell* 99 (3): 283-91.
3. Alijo, R., y Ramos, J., (1993). Several Routes of Activation of the Potassium Uptake System of Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1179 (2): 224-28.
4. Ambrish R., Alper K., Yang Z., I-TASSER: una plataforma unificada para la estructura de proteínas automatizada.
5. Andersson, A., Hultberg, B., y Lindgren, A., (2000). Redox Status of Plasma Homocysteine and Other Plasma Thiols in Stroke Patients. *Atherosclerosis* 151 (2): 535-39.
6. Arino, J., Ramos, J., y Sychrova, S., (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (1): 95-120.
7. Ariño, J., Ramos, J., y Sychrova, H., (2019). Monovalent Cation Transporters at the Plasma Membrane in Yeasts. *Yeast* 36 (4): 177-93.
8. Armstrong, W. M., y Rothstein, A., (1967). Discrimination between Alkali Metal Cations by Yeast. II. Cation Interactions in Transport. *The Journal of General Physiology* 50 (4): 967-88.
9. Backus, K. M., (2018). Applications of Reactive Cysteine Profiling., *Springer International Publishing*. 420:375-417.
10. Banjara, N., Nickerson, K.W., Mallory J. S., y Heather E. H., (2016). Killer Toxin from Several Food-Derived *Debaryomyces Hansenii* Strains Effective against Pathogenic *Candida* Yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 222 (04): 23-29.
11. Bañuelos, M.A., Ruiz, M.C., Jiménez, A., Souciet, J.L., Potier, S., y Ramos, J. (2002). Role of the Nha1 Antiporter in Regulating K⁺ Influx in *Saccharomyces Cerevisiae*: Role of the Nha1 Antiporter in Regulating K⁺ Influx in Yeast. *Yeast* 19 (1): 9-15.

12. Bateman, L. A., Nguyen, T. B., Roberts, A. M., Miyamoto, D. K., Ku, W. M., Huffman, T.R., Petri, Y. (2017). Chemoproteomics-Enabled Covalent Ligand Screen Reveals a Cysteine Hotspot in Reticulon 4 That Impairs ER Morphology and Cancer Pathogenicity. *Chemical Communications* 53 (53): 7234-37.
13. Bauer, R. A. (2015). Covalent Inhibitors in Drug Discovery: From Accidental Discoveries to Avoided Liabilities and Designed Therapies. *Drug Discovery Today* 20 (9): 1061-73.
14. Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., y Slayman, C. L. (1998). Physiological Characterization of the Yeast Plasma Membrane Outward Rectifying K⁺ Channel, DUK1 (TOK1), in Situ. *The Journal of Membrane Biology* 162 (1): 67-80.
15. Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P., y 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: Trk1 , Trk2 and Tok1 Null Mutant Yeast. *Molecular Microbiology* 47 (3): 767-80.
16. Bevan, E. A., Herring, A. J., y Mitchell, D. J. (1973). Preliminary Characterization of Two Species of DsRNA in Yeast and Their Relationship to the "Killer" Character. *Nature* 245 (5420): 81-86.
17. Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., y Bussey, H. (1990). Yeast KRE Genes Provide Evidence for a Pathway of Cell Wall Beta-Glucan Assembly. *The Journal of Cell Biology* 110 (5): 1833-43.
18. Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., y 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): 741-51.
19. Bostian, K. A., Jayachandran, S., y Tipper, D. J. (1983). A Glycosylated Protoxin in Killer Yeast: Models for Its Structure and Maturation. *Cell* 32 (1): 169-80.
20. Boynton, P.J. (2019). The Ecology of Killer Yeasts: Interference Competition in Natural Habitats. *Yeast* 36 (8): 473-85.

21. Breinig, F., Tipper, D. J., y Schmitt, M. J. (2002). Kre1p, the Plasma Membrane Receptor for the Yeast K1 Viral Toxin. *Cell* 108 (3): 395-405.
22. Breinig, F., Schleinkofer, K., y Schmitt, M.J. (2004). Yeast Kre1p Is GPI-Anchored and Involved in Both Cell Wall Assembly and Architecture. *Microbiology* (Reading, England).
23. Brown, J. L., Kossaczka, Z., Jiang, B., y Bussey, H. (1993). A Mutational Analysis of Killer Toxin Resistance in *Saccharomyces Cerevisiae* Identifies New Genes Involved in Cell Wall (1-6)-Beta-Glucan Synthesis. *Genetics* 133 (4): 837-49.
24. Bussey, H. (1991). K1 Killer Toxin, a Pore-Forming Protein from Yeast. *Molecular Microbiology* 5 (10): 2339-43.
25. Zhang, C., Freddolino, P. L., Zhang, Y. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45: W291-W299, (2017).
26. Cailliez, J-C., Cantelli, C., Sguy, N., Conti, S., Gerloni, M., Morace, G., y Polonelli, L. (1994). Killer Toxin Secretion through the Cell Wall of the Yeast *Pichia Anomala*. *Mycopathologia* 126 (3): 173-77.
27. Choi, H-J., Seung-Jun K., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Joo-Rang W., Storz, G., y Ryu, S-E. (2001). Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell* 105 (1): 103-13.
28. Copley, R. R. (2004). Evolutionary Convergence of Alternative Splicing in Ion Channels. *Trends in Genetics: TIG* 20 (4): 171-76.
29. Cremers, C. M., y Jakob, U. (2013). Oxidant Sensing by Reversible Disulfide Bond Formation. *Journal of Biological Chemistry* 288 (37): 26489-96.
30. Derst, C., y Karschin, A. (1998). Evolutionary Link between Prokaryotic and Eukaryotic K⁺ Channels. *The Journal of Experimental Biology* 201 (Pt 20): 2791-99.
31. Douglas, C. M., Sturley, S. L., y Bostian, K. A. (1988). Role of Protein Processing, Intracellular Trafficking and Endocytosis in Production of and Immunity to Yeast Killer Toxin. *European Journal of Epidemiology* 4 (4): 400-408.

32. Einfeld, K., Riffer, F., Mentges, J., y Schmitt, M. J. (2000). Endocytotic Uptake and Retrograde Transport of a Virally Encoded Killer Toxin in Yeast. *Molecular Microbiology* 37 (4): 926-40.
33. Fakruddin, Md, Hossain, M. N., y Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Saccharomyces Cerevisiae* IFST062013, a Potential Probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17 (1): 64.
34. Biorender (2021), servidor en línea para plantillas y diseño de novo de imágenes científicas.
35. Gier, S., Schmitt, M. J., y Breinig, F. (2020). Analysis of Yeast Killer Toxin K1 Precursor Processing via Site-Directed Mutagenesis: Implications for Toxicity and Immunity. *MSphere* 5 (1).
36. Gier, S., Lermen, M., Schmitt, M. J., y 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): 13127.
37. Hou, J. C., Min, L., y Pessin, J. E. (2009). Chapter 16 Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. En *Vitamins & Hormones*, 80:473-506. Elsevier.
38. Icho, T., y 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. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (12): 6716-23.
39. Yang, J., Zhang, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions, *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181, 2015.
40. Jegla, T., y Salkoff, L. (1994). Molecular Evolution of K⁺ Channels in Primitive Eukaryotes. *Society of General Physiologists Series* 49: 213-22.
41. Kagan, B. L. (1983). Mode of Action of Yeast Killer Toxins: Channel Formation in Lipid Bilayer Membranes. *Nature* 302 (5910): 709-11.
42. Karp, G., y Patton, J. G. (2013). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. 7th ed. Hoboken, NJ: John Wiley.

43. Ketchum, K.A., Joiner, W. J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L. K., y 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.
44. Kumar, R., Feltrup, T. M., Kukreja, R. B., Patel, K. B., Cai, S., y Singh, B. R. (2019). Evolutionary Features in the Structure and Function of Bacterial Toxins. *Toxins* 11 (1).
45. Lewis, A., McCrossan, Z. A., Manville, R. W., Popa, M. O., Cuello, L. G., y Goldstein, S. A. N. (2020). TOK Channels Use the Two Gates in Classical K⁺ Channels to Achieve Outward Rectification. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (7): 8902-19.
46. Liu, G-L., Chi, Z., Wang, G-Y., Wang, Z-P., Li, Y., y Chi, Z-M. (2015). Yeast Killer Toxins, Molecular Mechanisms of Their Action and Their Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 35 (2): 222-34.
47. Lobato, Tapia, C. A. (2019). Resistencia a antibióticos: cuando nuestro armamento se torna ineficiente. *Revista Digital Universitaria* 20 (5).
48. Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., y Ciani, M. (2019). Yeast Killer Toxins: From Ecological Significance to Application. *Critical Reviews in Biotechnology* 39 (5): 603-17.
49. Marquina, D., Santos, A., y Peinado, J. (2002). Biology of Killer Yeasts. *International Microbiology* 5 (2): 65-71.
50. Martin-Eauclaire, Marie-France, y Pierre, E. B. (2012). Potassium Channels Blockers from the Venom of *Androctonus Mauretanicus*. *Journal of Toxicology* 2012: 1-9.
51. Mazmanian, K., Sargsyan, K., Grauffel, C., Dudev, T., y Lim, C. (2016). Preferred Hydrogen-Bonding Partners of Cysteine: Implications for Regulating Cys Functions. *The Journal of Physical Chemistry B* 120 (39): 10288-96.
52. McCaffrey, K., Boo, I., Tewierek, K., Edmunds, M. L., Pountourios, P., y Drummer, H. E. (2012). Role of Conserved Cysteine Residues in Hepatitis

- C Virus Glycoprotein E2 Folding and Function. *Journal of Virology* 86 (7): 3961-74.
53. Nagahara, N. (2011). Intermolecular Disulfide Bond to Modulate Protein Function as a Redox-Sensing Switch. *Amino Acids* 41 (1): 59-72.
54. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6419722, Cysteine. Retrieved August 5, 2021.
55. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine. Retrieved August 5, 2021.
56. Nayak, S. K., Rathore, D., y Batra, J. K. (1999). Role of Individual Cysteine Residues and Disulfide Bonds in the Structure and Function of *Aspergillus* Ribonucleolytic Toxin Restrictocin. *Biochemistry* 38 (31): 10052-58.
57. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, "Protección ambiental-salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos: clasificación y especificaciones de manejo". Diario oficial, consulta: 03 octubre 2019.
58. Peña, P. de la., Barros, F., Gascón, S., Lazo, P. S., y Ramos, S. (1981). Effect of Yeast Killer Toxin on Sensitive Cells of *Saccharomyces Cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (20): 10420-2.
59. Peña, P. de la., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S., y Lazo, P. S. (1982). The Electrochemical Proton Gradient of *Saccharomyces*. The Role of Potassium. *European Journal of Biochemistry* 123 (2): 447-53.
60. Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G., y Hänel, H. (1988). Effect of a Killer Toxin of Yeast on Eucaryotic Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (4): 1068-69.
61. Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., y Morace, G. (1983). Killer System: A Simple Method for Differentiating *Candida Albicans* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 17 (5): 774-80.
62. Polonelli, L., y Conti, S. (2009). Biotyping of *Candida Albicans* and Other Fungi by Yeast Killer Toxins Sensitivity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 499: 97-115.

63. Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., y Rosa, E. (2017). Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeasts Producing Different Killer Toxins. *Toxins* 9 (10).
64. Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinné, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L. J. (2020). A Lower X-Gate in TASK Channels Traps Inhibitors within the Vestibule. *Nature* 582 (7812): 443-47.
65. Roemer, T., y Bussey, H. (1995). Yeast Kre1p Is a Cell Surface O-Glycoprotein. *Molecular and General Genetics*.
66. Sakkas, H., y Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (3): 429-38.
67. Saldaña, C., Naranjo, D., Coria, R., Peña, A., y Vaca, L. (2002). Splitting the Two Pore Domains from TOK1 Results in Two Cationic Channels with Novel Functional Properties. *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4797-4805.
68. Schmidt, B., Ho, L., y Hogg, P. J. (2006). Allosteric Disulfide Bonds. *Biochemistry* 45 (24): 7429-33.
69. Schmitt, M. J., y Compain, P. (1995). Killer-Toxin-Resistant Kre12 Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*: Genetic and Biochemical Evidence for a Secondary K1 Membrane Receptor. *Archives of Microbiology* 164 (6): 435-43.
70. Schmitt, M. J., y Breinig, F. (2002). The Viral Killer System in Yeast: From Molecular Biology to Application. *FEMS Microbiology Reviews* 26 (3): 257-76.
71. Schmitt, M. J., y Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology* 4 (3): 212-21.
72. Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., y Goldstein, S. A. N. (2001). Immunity to K1 Killer Toxin. *Cell* 105 (5): 637-44.
73. Sun, M-A., Wang, Y., Zhang, Q., Xia, Y., Ge, W., y Guo, D. (2017). Prediction of Reversible Disulfide Based on Features from Local Structural Signatures. *BMC Genomics* 18 (1): 279.

74. Thiel, G., Moroni, A., Blanc, G., y Van Etten, J. L. (2013). Potassium Ion Channels: Could They Have Evolved from Viruses. *Plant Physiology* 162 (3): 1215-24.
75. Vakilian, M., Tahamtani, Y., y Ghaedi, K. (2019). A Review on Insulin Trafficking and Exocytosis. *Gene* 706 (julio): 52-61.
76. Vališ, K., T., Novotná, M. D., Pospíšek, M., y Janderová, B. (2006). Immunity to Killer Toxin K1 Is Connected with the Golgi-to-Vacuole Protein Degradation Pathway. *Folia Microbiologica* 51 (3): 196-202.
77. Villarreal J. (2018). Estudio de la relación estructura-función de la toxina Killer (K1) de *Saccharomyces cerevisiae* en TOK1 y sus posibles homólogos en microorganismos de importancia biomédica. *Repositorio UAQ*.
78. Wickner, R. B. (1976). Killer of *Saccharomyces Cerevisiae*: A Double-Stranded Ribonucleic Acid Plasmid. *Bacteriological Reviews* 40 (3): 757-73.
79. Woods, D. R., y Bevan, E. A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 51 (1): 115-26.
80. Wouters, M. A., Fan, S. W., y Haworth, N. L. (2010). Disulfides as Redox Switches: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (1): 53-91.
81. Yamazaki, Y., y Morita, T. (2004). Structure and Function of Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Proteins. *Toxicon* 44 (3): 227-31.
82. Yang Zhang. Servidor I-TASSER para la predicción de la estructura de proteínas en 3D. *BMC Bioinformatics*, 9:40 (2008).
83. Yang, Y., Song, Y., y Loscalzo, J. (2007). Regulation of the Protein Disulfide Proteome by Mitochondria in Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26): 10813-17.
84. Zahumenský, J., Jančíková, I., Drietomská, A., Švenkrťová, A., Hlaváček, O., Hendrych, T., Plášek, J., Sigler K., y Gášková, D. (2017). Yeast Tok1p Channel Is a Major Contributor to Membrane Potential Maintenance under

Chemical Stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*
1859 (10): 1974-85.

Dirección General de Bibliotecas UAQ