



Universidad Autónoma de Querétaro.

Facultad de Ciencias Naturales.

Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana.

Expresión heteróloga del canal Tok1p del sistema *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae* en líneas celulares de mamífero.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Luz Aleyda De la cruz Sariñana.

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Junio del 2022

México



Universidad Autónoma de Querétaro.

Facultad de Ciencias Naturales.

Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana.

Expresión heteróloga del canal Tok1p del sistema *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae* en líneas celulares de mamífero.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Luz Aleyda De la Cruz Sariñana

Dirigido por:

DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ.

DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ.

Presidente.

DRA. VERÓNICA MORALES TLALPAN.

Secretario.

DR. ROBERTO AUGUSTO FERRIZ MARTÍNEZ.

Vocal.

DR. JORGE LUIS CHÁVEZ SERVÍN.

Sinodal.

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA.

Sinodal.

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Junio del 2022

México.

DEDICATORIAS.

Con amor y gratitud:

A mi hijo Eynher por la fortaleza, el amor y la alegría que le brinda a mi persona.

A mis padres Cirilo y Yadira, mis hermanos Brisa e Isaac por ser el pilar de mi crecimiento, la confianza ante los retos y la seguridad frente a mis miedos.

A mi incondicional amiga Jaqueline Vázquez por ser mi compañera en cada viaje y par en cada uno de mis pasos.

AGRADECIMIENTOS.

Financiamiento:

- Beca Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Matrícula: 679872
- Financiamiento de Secretaría de Educación Pública - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciencia Básica (SEP-CONACYT A1-S-26966)
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Laboratorios Nacionales: Laboratorio de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ).
- Fondo para el Desarrollo del Conocimiento (FONDEC 2019).

Apoyo logístico y técnico:

- Dra. Verónica Morales Tlalpan, Laboratorio de Biofísica de Membranas y Nanotecnología. Facultad de Ciencias Naturales. UAQ
- M en C. Adriana González Gallardo, Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM campus Juriquilla.
- Dr. Carlos Saldaña por su paciencia, apoyo y entrega total en la orientación y desarrollo del proyecto con énfasis en el aprendizaje y aporte científico.
- Los Doctores sinodales: Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez, Dr. Jorge Luis Chávez Servín y la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa por la retroalimentación de calidad y el apoyo constante con el objetivo de enriquecer el proyecto.
- Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (INB-UNAM) por brindar el espacio, insumos e instalaciones.
- Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada de la Universidad Autónoma de Querétaro-Universidad Autónoma de México (LAVIS UAQ-UNAM) por permitir el uso de equipo e instalaciones.

- Laboratorio de Biofísica de Membranas y Nanotecnología, Unidad de Microbiología Básica y Aplicada. A cada uno de los integrantes de mi laboratorio por compartir sus conocimientos, brindar en todo momento apoyo incondicional y el sentir de un gran equipo.
- Dra. Patricia Roitman Genoud por su apoyo, cariño, empatía e incentivo moral en todo momento y ayudarme a ser competente dominando mis temores.
- Dra. Dolores Ronquillo por su empatía, cariño y conocimientos en cada momento de mi estancia, alentando siempre a ampliar mis horizontes.
- Sharay Vargas por el apoyo incondicional y cariño sincero desde un inicio y los cuales aún perduran, gracias.
- Amigos y profesores de la Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana por ser pilar fundamental en mi aprendizaje, soporte en tempestades y ofrecer el sentir de una gran familia.

INDICE

I. RESUMEN EN ESPAÑOL.	9
III. INTRODUCCIÓN.	11
IV. ANTECEDENTES.	14
4.1 Capacidades competitivas de las levaduras.	14
4.1.1 Secuestro de nutrientes.	15
4.1.2 Producción y tolerancia a altas concentraciones de etanol.	15
4.1.3 Competencia por hierro.	16
4.1.4 Producción de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's).	16
4.1.5 Producción de toxinas.	17
4.2 Sistema <i>Killer</i> en levaduras.	18
4.3 Factores relacionados con el efecto <i>Killer</i> .	21
4.3.1 Potencial de hidrogeno.	21
4.3.2 Temperatura.	22
4.3.3 Concentración de cloruro de sodio.	22
4.3.4 Vectores	22
4.4 Sistema <i>Killer</i> de <i>S.cerevisiae</i> .	22
4.4.1 Componentes virales.	23
2.4.1.2 Virus auxiliar L-A	23
4.4.1.1 Virus satelital M.	23
4.4.2 Ciclo de replicación viral.	25
4.4.3 Toxina <i>Killer</i> 1 (<i>K1</i>).	28
2.4.3.1 Síntesis de la toxina <i>K1</i>	29
4.4.4 Blanco molecular de la toxina <i>K1</i> : TOK1p.	32
4.5 Importancia del sistema <i>Killer</i> .	38
4.6 Sistemas de expresión heteróloga.	39
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	42
VII. HIPÓTESIS.	43
VIII. OBJETIVO GENERAL.	43
8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	43
IX. METODOLOGÍA.	43
9.1 Modelaje estructural del canal TOK1.	43

9.2 Análisis bioinformático de TOK1 y homólogos.	44
9.3 Cultivo celular.	44
9.4 Estructuración de plásmidos.	46
9.5 Pre-cultivo de bacterias competente <i>Escherichia coli</i> C2925H.	49
9.6 Transformación de células competentes por choque térmico.	50
9.7 Determinación de bacterias transformantes.	51
9.8 Purificación de DNA del plásmido por lisis alcalina.	51
9.9 Observación de la calidad y cuantificación del DNA plasmídico.	53
9.10 Restricción enzimática del DNA plasmídico.	54
9.11 Lectura en electroforesis de bandas de DNA digeridos.	54
9.12 Extracción de bandas digeridas de DNA.	55
9.13 Construcción molecular del vector de transfección pcDNA 3-EGFP- TOK1; TOK1 A; TOK1 B.	57
9.14 Transfección transitoria en células de mamífero.	57
9.15 Obtención de la toxina K1 de la cepa 42300 para ensayos de viabilidad celular. --	61
9.16 Determinación de la viabilidad del cultivo MCF-7.	62
9.17 Desecho de residuos biológicos.	63
X. RESULTADOS.	64
10.1 Modelamiento estructural del canal TOK1p.	64
10.2 Homólogos del canal TOK1 en <i>Homo sapiens</i>	65
10.3 Alineamiento de canales de potasio: TOK1-TASK 3.	66
10.4 Modelamiento del canal TOK1 versus TASK 3.....	67
10.5 Transfección transitoria del canal TOK1p, TOK1 A, TOK1 B en células de mamífero.	68
10.6 Viabilidad del cultivo celular MCF-7 frente a la toxina K1.	69
XI. DISCUSIÓN.	70
XII. CONCLUSIONES	76
XIII. PERSPECTIVAS.	77
ANEXOS.	94

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sistema Killer.-----	21
Tabla 2. Canales de la familia KCNK.-----	66

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..-----	14
Figura 2. Componentes virales del sistema <i>Killer</i> .-----	25
Figura 3. Replicación viral de M1 y L-A-----	27
Figura 4. Dominios de la <i>pptox K1</i> -----	30
Figura 5. Homología en el procesamiento de la toxina <i>K1</i> y la insulina.-----	32
Figura 6. Representación del canal TOK1p.-----	33
Figura 7. Efecto Killer de una cepa <i>K^{ill+}</i> .-----	36
Figura 8. Plasmido GEM-9Zf (-).-----	46
Figura 9. Plásmido pGEMA.-----	47
Figura 10. Plásmido pGEMA TOK1.-----	48
Figura 11. Vector pcDNA 3 EGFP.-----	49
Figura 12. Restricción enzimática del plásmido pc DNA 3-EGFP.-----	54
Figura 13. Modelamiento estructural del canal TOK1p.-----	64
Figura 14. Regiones de similitud del canal TOK1 en <i>Homo sapiens</i> .-----	65
Figura 15. Alineamiento global: TOK1, TASK 3.-----	67
Figura 16. Modelaje de canales selectivos a potasio.-----	67
Figura 17. Expresión heteróloga del canal TOK1.-----	68
Figura 18. Viabilidad celular de la línea MCF-7.-----	69

I. RESUMEN EN ESPAÑOL.

Ciertas cepas de levadura producen y secretan toxinas de origen proteico, fenotipo denominado “*Killer yeast*”. En *S.cerevisiae* el fenotipo es por infección de dos virus dsRNA citoplasmáticos de la familia *Totiviridae*, de la clase *Micovirus*. El virus satelital M, confiere la síntesis y producción de las toxinas y el virus L-A auxiliar, proporciona cápsides mediante partículas similares a virus (VLPs), para la estabilidad viral. Se han identificado cuatro tipos de virus M: M1 (1.6 Kb), M2 (1.5 Kb), M28 (1.8 Kb) y *Mlus* (2.1-2.3 Kb) los cuales sintetizan a las toxinas *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* respectivamente, siendo la *K1* la mayor estudio. Tras la liberación de la secuencia del genoma de *S.cerevisiae* en 1995, se encontró un marco de lectura que codificaba para un canal de potasio con dos dominios de poro en tándem denominado: TOK1 (*Two domains Outwardly Potassium K+ Channel*) con una función de rectificador saliente de potasio. Al producir una delección del mismo no parecía tener un fenotipo importante ya que, la levadura podría sobrevivir. Posteriormente, en 1999 se determinó como potencial blanco molecular de la *K1*. Así mismo se ha sugerido que las cepas productoras son capaces de protegerse del efecto de su propia toxina mediante el uso de su propia preprotoxina (pptox) como medida de autoinmunidad. Actualmente se desconoce los mecanismos moleculares por los cuales interactúa la toxina *K1* molecular con su potencial blanco molecular. En el presente proyecto por medio de la expresión heteróloga se plantea la expresión del canal TOK1 en líneas celulares de mamífero en las cuales se pueda explorar los elementos mínimos necesarios para establecer el sistema *Killer*. En relación a los resultados obtenidos se propone la expresión heteróloga transitoria exitosa de elementos, así como la conservación de su función.

Palabras clave: sistema *Killer*, TOK1, expresión heteróloga, células de mama.

II. ABSTRACT.

Certain yeast strains produce and secrete toxin of protein origin, a phenotype called “*Killer yeast*”. In *S.cerevisiae* the phenotype is due to infection with two cytoplasmic dsRNA viruses of the Totiviridae family, of the Micovirus class. The satellite virus M confers the synthesis and production of toxins and the auxiliary virus L-A provides capsids by virus –like particles (VLPs) for viral stability. Four types of M viruses have been identified: M1 (1.6 kb), M2 (1.5 kb), M28 (1.8 Kb) y Mlus (2.1-2.3 Kb) which synthesize *K1*, *K2*, *K28* and Klus toxin respectively, with *K1* being the major study. Following the release of the *S.cerevisiae* genome sequence in 1995, a reading frame was found that coded for a potassium channel with two tandem pore domains named TOK1 (Two domains Outwardly Potassium K⁺ Channel) with potassium outward rectifier function. Producing a deletion of the same did not seem to have an important phenotype since, the yeast could survive. Subsequently, in 1999 it was determined as a potential molecular target of *K1*. It has also been suggested that the producing strains are able to protect themselves from the effect of their own toxin by using their own preprotoxina (pptox) as a measure of autoimmunity. The molecular mechanism by which the molecular *K1* toxin interacts with its potential molecular target are currently unknown.

In the present project, by means of heterologous expression, we propose the expression of the TOK1 channel in mammalian cell lines in which the minimum elements necessary to establish the *Killer System* can be explored. In relation to the results obtained, we propose the successful transient heterologous expression of elements as well as the conservation of their function.

Key words: *Killer system*, TOK1, heterologous expression, breast cell.

III. INTRODUCCIÓN.

En las levaduras la presencia de capacidades altamente específicas es una cualidad que le otorga al organismo su característica de ubicuidad (Muccilli & Restuccia, 2015). Dentro de las capacidades competitivas se encuentra un mecanismo denominado “Sistema *Killer*”.

El primer precedente del sistema *Killer* tiene registro en el año 1963, dentro del género *Saccharomyces* de la especie *cerevisiae*. La descripción del fenómeno exponía que ciertas cepas de *S.cerevisiae* (*Killer yeast*) producían y secretaban toxinas (*Killer toxic*) de origen proteico o glucoproteico con efecto letal en cepas sensibles de la misma especie o relacionadas (Bevan, 1963; Woods 1968).

En un ambiente silvestre el sistema *Killer* ofrece las ventajas de: supervivencia, al generar una defensa antimicrobiana hacia especies sensibles; condición competente, a través de la eliminación de organismos sensibles con la misma necesidad de nutrientes requeridos para su crecimiento y desarrollo; adaptación y colonización, mediada en respuesta a condiciones estresantes del medio en el cual habitan (Pieczynska, Korona, & De Visser, 2017).

Actualmente, se tiene conocimiento de que el sistema *Killer* está presente en diversos géneros de levadura: *Pichia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces lactis*, *Ustilago maydis*, *Cryptococcus humicola*, *Candida*, *Turulopsis*, *Devaryomyces*, entre otros. Cada género secreta un tipo diferente de toxina y su genoma es asociado a: virus conformados por RNA bicatenario (dsRNA), RNA segmentados, genes cromosómicos o DNA Lineal. (Magliani, 1997).

En *S. cerevisiae* específicamente, el fenotipo *Killer* es otorgado por la co-infección de dos virus dsRNA (double-stranded RNA) citoplasmáticos extra cromosómicos, pertenecientes de la familia *Totiviridae*, de la clase *Micovirus* (Buck, 1991).

El virus auxiliar L-A (4.6 Kb), proporciona cápsides de partículas similares a virus (*Virus Like Particles, VLPs*) las cuales otorgan para ambos virus estabilidad en el citoplasma de la cepa infectada además de intervenir en la replicación viral mediada

por sus dos marcos de lectura (5'ORF; 3'ORF). El virus satelital M por su parte, a través de su único marco de lectura abierto (5'ORF) confiere la secuencia genómica para la síntesis y producción de las toxinas (Magliani, 1997; Schmitt, 2002).

Se han identificado cuatro tipos de virus M en *S.cerevisiae*: ScV-M1 (1.8 Kb), ScV-M2 (1.5 Kb), ScV-M28 (1.9 Kb), ScV-M*Klus* (2.1-2.3 Kb) los cuales permiten la síntesis de las toxinas *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* respectivamente, además de componentes de auto-protección hacia la propia toxina producida y secretada. (Magliani, 1997; Sesti, 2001; Rodríguez-Cousiño, 2011).

La toxina *Killer 1 (K1)*, es la exotoxina más estudiada hasta el momento. Dentro de la cepa de levadura, se encuentra como una preprotoxina (*pptox*) de 35 KDa, compuesta por cuatro dominios: δ , dominio líder encargado del plegamiento y secreción de la toxina; α , dominio que posee dos regiones hidrofóbicas que facilitan la inserción de la toxina madura a la membrana plasmática de la cepa sensible; γ , dominio central que contiene tres sitios de N-glucosidación requeridos en la maduración de la toxina; β , dominio necesario para establecer la unión en la pared celular en la cepa sensible. La toxina madura *K1* (19 KDa) está formada solo por los dominios α - β unida por uno a tres puentes disulfuro (Magliani, 1997).

A pesar del descubrimiento del efecto *Killer* en levaduras sensibles en los años 60's, el blanco molecular de la toxina *K1* no fue determinado sino hasta el año 1999. Partiendo de la secuenciación total del genoma de *S.cerevisiae* en el año 1995, se encontró través de uno de sus múltiples marcos de lectura la codificación para un canal selectivo a potasio con dos dominios de poro en tándem el cual fue denominado TOK1 (*Two domains Outwardly Potassium K⁺ Channel*). Este canal se encontraba en el brazo izquierdo del cromosoma X y era expresado a nivel de la membrana plasmática con una función de rectificador saliente de potasio. La delección del mismo no presenta un fenotipo de importancia para la levadura ya que, esta sobrevive en su ausencia (Ketchum, 1995).

Consecuente al descubrimiento del canal TOK1p, en el año 1999 fue propuesto como un potencial blanco molecular de la toxina *K1*. El efecto *Killer* observado se vinculó con un aumento en la probabilidad del estado abierto del canal en interacción con la toxina, la cual desencadenaba un flujo descontrolado de iones de potasio (K^+) hacia el espacio extracelular, evento el cual culminaría en muerte celular (Ahmed *et al.*, 1999).

Asimismo, en el año 2001 fue descrita la presencia de inmunidad de las cepas *Killer* hacia la propia toxina producida y secretada. Este fenómeno aún no presenta estudio a detalle pero, se cree que la preprotoxina (*pptox*) o toxina inmadura establece una interacción con el canal TOK1p desde la cara interna en el espacio intracelular evitando que esté se active por exposición externa a su propia toxina empleado así, un posible mecanismo de autoinmunidad (Sesti *et al*, 2001; Vališ *et al*, 2006; Gier,2019).

Con ende a lo anterior, el objetivo del presente proyecto tiene la finalidad expresar el canal TOK1p, blanco molecular del sistema *Killer* en líneas celulares de mama. Mediante el empleo de sistemas de expresión heteróloga, se puede realizar el estudio y exploración de los componentes mínimos necesarios para establecer el sistema fuera del organismo innato así como dar pauta a la exploración de posibles aplicaciones biotecnológicas

No obstante, el enfoque principal no está dirigido al desarrollo del sistema para una aplicación inmediata de índole de tratamiento o terapia génica. Sin embargo, el análisis de los componentes del sistema en líneas celulares de mamífero permite establecer las bases de estas posibles vertientes a largo plazo como es el control de la proliferación celular mediada por un blanco específico.

Actualmente se tiene el precedente de que el canal TOK1p de *S.cerevisae* puede ser expresado de manera segmentada (TOK1B) en células de riñón embrionario (HEK-293) y células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) en una transfección transitoria (Saldaña, 2002).

IV. ANTECEDENTES.

4.1 Capacidades competitivas de las levaduras.

La levadura es un microorganismo unicelular eucarionte aerobio facultativo, perteneciente al reino fungí. Con una morfología globular de 5 a 10 μm de diámetro (figura 1A), posee características celulares tanto vegetal como animal. (Alberts et al., 2015).

Presenta una pared celular formada de quitina en lugar de celulosa, así como membranas plasmáticas las cuales delimitan a la célula y a los orgánulos (figura 1B) a excepción de cloroplastos que son inexistentes en este organismo. La composición de las membranas plasmáticas es mayormente de ergosterol y no de colesterol como lo es en eucariontes superiores (Van Der Rest et al., 1995).

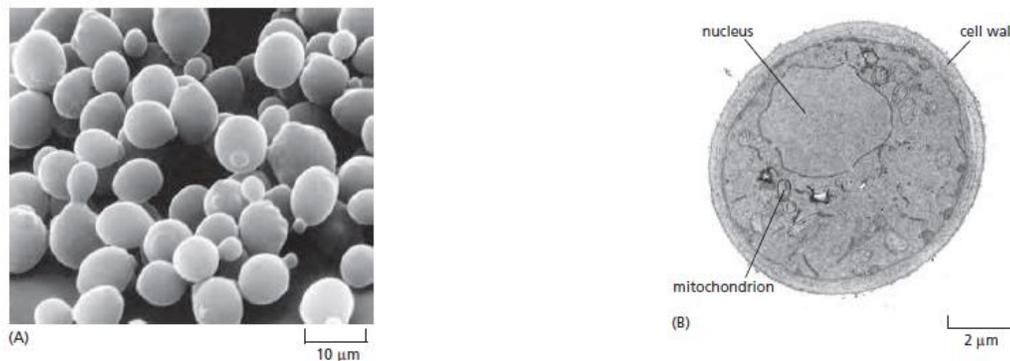


Figura 1. *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Una micrografía electrónica de barrido de un grupo de células con presencia de protuberancias denominadas yemas. (B) Una micrografía electrónica de transmisión procedente de una sección transversal de una célula de levadura en donde se muestra el núcleo, mitocondria y pared celular. Imagen tomada del libro de Albert et al., 2015.

A pesar de tratarse de microorganismos, se encuentran ampliamente distribuidos en los diversos biomas. Su ubicuidad o capacidad de estar presente en todas partes, es atribuible a la diversidad en sus capacidades altamente competitivas las cuales le permiten desde la obtención de nutrientes para el crecimiento, la adaptación y supervivencia al medio y condiciones estresantes hasta la colonización de diversos ecosistemas tanto naturales como relacionados a la actividad humana, eso por mencionar alguno de los numerables beneficios (Muccilli & Restuccia, 2015).

Los principales rasgos competitivos presentes en las levaduras se mencionan a continuación:

4.1.1 Secuestro de nutrientes.

En la actividad metabólica de las levaduras, el uso preferencial de fuentes de carbono procedentes de carbohidratos tiene un impacto más allá de la conversión y uso del sustrato por parte del organismo. Un rápido agotamiento de glúcidos como lo son la fructosa, glucosa o sacarosa en el medio por parte de las levaduras representa un mecanismo antagonista para el crecimiento de organismos con los mismos requerimientos nutricios En la levadura *Candida oleophila* se ha observado este rasgo competitivo, mediante un alto secuestro de fructosa origina el crecimiento lento y una baja propagación del hongo patógeno *Brotis cinerea*, comúnmente presente en la pudrición de heridas en frutas y causante de la formación de moho gris en las mismas (Mercieret al., 1994).

4.1.2 Producción y tolerancia a altas concentraciones de etanol.

La producción y tolerancia a niveles altos de etanol es un mecanismo “antiséptico” de las levaduras como resultado de su capacidad anaeróbica facultativa (Stanley et al, 2010). Mediante la ruta glucolítica se genera piruvato y en un ambiente anaeróbico el organismo fúngico opta por la vía de fermentación alcohólica en la cual, por cada molécula de ácido pirúvico se realiza la producción de dos moléculas de etanol y una molécula dióxido de carbono (CO₂) a través de una descarboxilación reductiva (Tuite & Oliver, 1991). *S.cerevisiae* representa el mejor ejemplo, utiliza la fermentación alcohólica para la producción de etanol, el cual es eliminado como desecho metabólico toxico en el espacio extracelular y origina un efecto inhibitor del crecimiento en microorganismos competidores intolerantes a la molécula, mediada por la inestabilidad a nivel de membrana (Piškur et al, 2006).

Incluso en condiciones aeróbicas, la fermentación alcohólica es la ruta de preferencia por parte de la levadura en condiciones de competencia. Este es denominado “*Crabtree Effect*” (Crabtree, 1928).

4.1.3 Competencia por hierro.

El hierro representa un micronutriente esencial para el crecimiento microbiano, tanto para levaduras como bacterias incluyendo la patogenicidad, debido a su potencial redox (Freimoser et al., 2019). La producción y liberación de sideróforos representa uno de los múltiples sistemas de adquisición de hierro para satisfacer las demandas. Los sideróforos, moléculas quelantes de hierro, son sintetizadas y liberadas al espacio extracelular con la finalidad de secuestrar el hierro presente (Fe^{3+}), convertirlo a complejos de menor toxicidad y mayor asimilación (Fe^{2+}) para consecuentemente privar su captación por otros microorganismos. (Wandersman et al., 2004). En *Aureobasidium pullulans* HN6.2, produce y libera el sideróforo fusarinina C el cual exhibe la actividad antimicrobiana ante el patógeno *Vibrio anguillarum*, bacteria marina que afecta a diversas especies de peces como salmón del atlántico al ocasionarle vibriosis (W. Wang et al., 2009)

4.1.4 Producción de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's).

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) son moléculas de bajo peso molecular (<300 Da) con baja solubilidad en agua. Comprende las clases de: cetonas, aldehídos, fenoles, derivados de benceno, hidrocarburos, alcoholes, tioésteres, ciclohexanos y compuestos heterocíclicos (Morath et al., 2012). Su relevancia es debido a su efecto antagonista al liberarse en forma de gases o vapores, mediante conjunto compuestos volátiles denominados volatiloma. Su composición química está determinada por la levadura de procedencia, nicho ecológico de crecimiento y organismo antagónico al cual va dirigido (Parafati et al., 2017).

Candida intermedia, es una levadura que recientemente ha mostrado una actividad antimicrobiana sobre organismos de interés médico como agrícola a través de investigaciones de proteómica. La liberación de su volatiloma en especial del compuesto 2-feniletano, inhibe el crecimiento y esporulación de *Aspergillus carbonarius* (hongo filamentoso) el cual genera la de ocratoxina A (OTA), micotoxina con efecto carcinogénico a nivel renal, inmunotoxicidad, inhibición de

biosíntesis proteica y de respiración mitocondrial, así como el aumento en la peroxidación lipídica (Tilocca et al., 2019).

4.1.5 Producción de toxinas.

Las toxinas son sustancias o moléculas producidas a partir de fuentes biológicas (microorganismos, plantas, animales, etc.) con efectos nocivos en un organismo vivo. En la naturaleza muchos organismos tanto procariotas como eucariotas exhiben el fenotipo y aun cuando las variaciones en su tamaño, especificidad y avidéz al blanco molecular así como mecanismo de acción son muy amplias, en sí representan una defensa el espécimen que lo expresa y una herramienta biotecnológica y/o terapéutica con diversas aplicaciones en sectores como salud humana, animal; agroalimentación, seguridad del recurso hídrico , entre otros (de la Pena et al 1981; Clark *et al.*, 2019)

Aun cuando la descripción de la producción de toxinas se evoca principalmente a productores bacterianos como *Vibrio cholerae* y *Clostridium botulinum*, algunas cepas de levaduras también presentan el fenotipo de secreción de toxinas en su entorno extracelular. Este fenómeno evolutivo conservado y característica biológica representa una capacidad altamente competitiva y a su vez forma parte de un sistema denominado “Sistema *Killer*” (Makower & Bevan, 1963).

El sistema *Killer* es un fenómeno descrito por primera vez en el organismo *Saccharomyces Cerevisiae* en 1963. El fenómeno descrito señalaba que, ciertas cepas de *S.cerevisiae* nombradas como “levaduras asesinas” (*Killer yeast* o *K^{ll+}*), producían y secretaban una exotoxina de origen proteico o glucoproteico denominada “factor asesino” (*Killer factor*) el cual resultaba letal para cepas sensibles de la misma especie (*sensitive yeast* o *K^{ll-}*) o relacionadas (Woods & Bevan, 1968; Somers, 1969) .

Actualmente se tiene el conocimiento que el sistema *Killer* no solo se centra en la producción, secreción y efecto letal de toxinas maduras sobre un blanco molecular en el medio extracelular, de igual forma engloba su contraparte: la inmunidad. Las

Yeast Killer (K^{ll+}) exhiben inmunidad a su propia toxina madura al momento de ser secretada y a otras toxinas secretadas por el mismo tipo de cepas *Killer* a pesar de presentar mismo blanco molecular que las *sensitive yeast* (K^{ll-}). Esta fascinante propiedad se encuentra relacionada en la interacción establecida entre preprotoxina o toxina inmadura y el blanco molecular desde el espacio intracelular, concibiendo un bloqueo de senilidad al efecto *Killer*.(Sesti et al., 2001)

En ambiente silvestre, el sistema *Killer* ofrece ventajas a las cepas productoras de toxina: el ser una defensa contra células microbianas sensibles y a su vez generar una condición competitiva y de supervivencia en el nicho ecológico donde se desarrollen, en especial durante las primeras fases de crecimiento microbiano (Wang,2012).

4.2 Sistema *Killer* en levaduras.

A pesar de ser *S.cerevisiae* la cepa de levadura en la cual se exhibe el precedente del sistema *Killer*, actualmente se tiene el conocimiento que puede presentarse en diversos géneros y en los cuales la base genética que ofrece al huésped el fenotipo *Killer* es variable entre cada uno de ellos y contempla desde la infección viral hasta la contención del material genético de forma episomal (Magliani, 1997). Así mismo, las toxinas *Killer* producidas difieren entre cada especie o cepa (tabla 1), mostrando características particulares que van desde tamaño molecular, estructura madura, blanco molecular, mecanismo de reconcomiendo y aniquilación (Marquina, 2002).

Base genética	Genero	Genoma	Genoma (Kbp)	Proteína codificada	proteína (kDa)	Conformación de la toxina	Receptor de la toxina	Mecanismo de acción
dsRNAs viral	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScV-M1	1.8	<i>K1</i>	19.0	Dímero α - β	B-1-6-D-glucano. Canal TOK1p	Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana.
		ScV-M2	1.5	<i>K2</i>	21.5	Dímero α - β	B-1,6-D-glucano	Incremento de la permeabilidad de

								iones en la membrana.
		ScV-M28	1.9	K28	21.5	Dímero α - β	A-1,3-Manosa	Inhibición de la síntesis DNA
		ScV-Klus	2.1-2.3	Klus	-	-	-	-
		ScV-L-A	4.6	Gag	76	-	-	Proteína principal de la cápside para virus L-A y M.
				Gag-Pol	180	-	-	RNA polimerasa dependiente de RNA. Síntesis de partículas similares a virus (VLPs).
	<i>Ustilago maydis</i>	UmV-M1/M2	1.4	P1	19.0	Dímero α - β	-	Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana
		UmV-M2	0.98	P4	11.1	Monómero	-	Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana
		UmV-M2	1.2	P6	17.7	Dímero α - β	-	Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana.
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	HuV-M	1.0	-	-	-	-	-
		HuV-L*	4.6	Gag			-	-

				Gag-Pol	-	-	-	RNA polimerasa dependiente de RNA
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ZbV-M	2.1	-	-	-	-	-
		ZbV-L*	4.6	Gag	-	-	-	Proteína principal de la cápside.
				GaG-Pol	-	-	-	RNA polimerasa dependiente de RNA
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	PrV-M	-	-	-	-	-	-
Plásmido lineal dsDNA	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pgk1,L2	8-8-13.4	-	156.5	Trímero $\alpha\beta\gamma$	Quitina	Arresto el ciclo celular en fase G ₁ , por actividad de quitinasa
	<i>Pichia nosifovora</i>	pPin1-1,1-3	18-10	-	>100	-	-	-
	<i>Pichia acaciae</i>	pPac1-1,1-2	13.6-6.8		~190	Trímero	Quitina	Arresto del ciclo celular en fase G ₁ por actividad de quitinasa
Genes nucleares cromosomal	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	0.9	KHR	20	Monómero		Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana celular

		<i>KHS</i>	2.1	KHS	75	Monómero	-	Incremento de la permeabilidad de iones en la membrana celular
	<i>Pichia farinosa</i> KK1	<i>SMK1</i>	0.6	SMKT	14.2	Dímero αβ	β-glucano de la pared celular	Inhibición de la síntesis de β-1,3 glucano
	<i>Williopsis mrakii</i> HM-1	<i>HMK</i>	0.85	HM-1	10.4	Monómero	β-glucano de la pared celular	Incremento la permeabilidad de la membrana
Secuencias de dsRNA-L* aún no han sido identificadas en algunos géneros de levaduras, por ende los productos virales mostrados Gag y Gag-Pol son predichos por analogía con GAG Y Gag-Pol presente en <i>S.cerevisiae</i> . ScV-L-A Tabla recuperada y modificada de:(Magliani, 1997; Schmitt, 2002;Rodríguez-Cousiño <i>et al.</i> , 2011)								

Tabla 1. Sistema *Killer*.

Sistema *Killer* presente en los diversos géneros de levadura más investigados.

4.3 Factores relacionados con el efecto *Killer*.

Se ha observado que, así como la base genética del fenotipo *Killer* influye en la producción y secreción de la toxina; factores externos de igual forma interfieren en la misma modificando desde la conformación de la toxina, su actividad hasta la propagación de la misma (Liu, 2015).

A continuación se mencionan los factores con mayor relevancia

4.3.1 Potencial de hidrogeno.

La mayoría de las toxinas *Killer* son estables y su toxicidad se maximiza en valores de pH ácido, en un rango de la escala de 4.0 a 5.5. La toxina *Killer* SMKT producida por la levadura *P.farinosa* KK1, se presenta como toxina madura en forma de heterodimero en un pH ácido mientras que, en presencia de un pH alcalino sufre una disociación de sus dos subunidades α y β perdiendo con ello su actividad *Killer* en el β-glucano blanco molecular presente en la pared celular de cepas sensibles (Price,1999)

4.3.2 Temperatura.

La mayoría de las toxinas actúan eficientemente a bajas temperaturas, sin embargo, existen ciertos casos donde las toxinas pueden presentarse de manera estable hasta en valores de 35 °C (Liu, 2015). La toxina Pikt, producida por *Wickerhamomyces anomalus*, empleada comúnmente en la elaboración de vino, presenta una resistencia a temperaturas de 35°C en presencia de un pH de 4.4, la cual le hace apta para ser utilizada durante el proceso de almacenaje de barriles, puesto que conserva su actividad antimicrobiana (Comitini,2004)

4.3.3 Concentración de cloruro de sodio.

Las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) del medio afecta de manera considerable la acción de algunas toxinas(Llorente, 1997). Este es el ejemplo de la toxina SMKT procedente de cepas de *P. farinosa* KK1. En presencia de una contención de NaCl a 2.0 M muestra su máxima actividad letal. Cabe señalar que, este factor no es general para todas las toxinas *Killer*, ya que por ejemplo toxinas *K1* ,*K2* y *K28* producidas y secretadas por la levadura *S.cerevisiae* no son dependiente de la concentración de NaCl en el medio (Suzuki, 1994)

4.3.4 Vectores

Si bien no se considera un factor que modifique la actividad de alguna toxina de forma directa, los vectores o vehículos representan un mecanismo de propagación para las *Killer yeast* y por ende de su efecto letal. La *Drosophila melanogaster*, en particular es uno de los vectores de mayor propagación para las levaduras (Ganter, 1986). La difusión de *Killer yeast* tiene comienzo cuando el insecto que porta a las cepas *Killer* en sus patas contamina los medios en donde se establece; ejemplo de ello son los frutos en descomposición y tallos, hábitat característico debido a la concentración alta de fructuosa y pH ácido, factores favorables para el crecimiento y colonización de las levaduras (Starmer, 1987).

4.4 Sistema *Killer* de *S.cerevisiae*.

El fenotipo *Killer* presente en *S.cerevisiae* más estudiado hasta el momento es otorgado por una co-infección viral es decir, la base genética de producir y secretar

toxinas procede de dsRNA lineal de dos virus citoplasmáticos: El virus auxiliar L-A y el virus satelital M (Buck, 1991). Ambos virus están constituidos por una cadena doble de RNA (RNA dc) de ácido nucleico (Figura 2) y pertenecen a la familia Totiviridae de la clase micovirus, la cual se encuentran ampliamente distribuida en hongos superiores y levaduras (Bruenn, 1980).

En un principio de la co-infección viral, se presenta como clasificación de parasitismo para la levadura huésped (*host*) debido al alto costo metabólico asociado con la replicación viral, la producción de toxinas e inmunidad, seguido de una coadaptación de la cepa *host* y el virus logrando una simbiosis ya que, por su parte ambos virus utilizan los orgánulos de la levadura para la replicación y traducción de su material genético mientras que la levadura adquiere un fenotipo *Killer* que le confiere una defensa y una habilidad competente (Pieczynska, 2017; Schmitt & Tipper, 1992).

4.4.1 Componentes virales.

2.4.1.2 Virus auxiliar L-A

El virus auxiliar L-A (4.6 Kb) es un virus el cual proporciona una cubierta proteica denominada nucleocápside a través de dos marcos de lectura 5'ORF y 3'ORF (*Open Reading Frame*). La nucleocápside es una capsula constituida por partículas similares a virus (*Virus Like Particles, VLPs*) que contiene en su interior el material genético y otorga estabilidad viral en el citoplasma de la cepa *host* e interviene en la replicación de ambos virus (Magliani et al., 1997; Schmitt, 2002).

Los virones L-A o partículas virales maduras presentan una estructura icosaedrica o casi esférica de su cápside, con un diámetro promedio de 39 nm. La nucleocápside por sí sola no es infecciosa (Bruenn, 1991; Tang, 2005) .

4.4.1.1 Virus satelital M.

La presencia del virus satelital M confiere a la cepa infectada la capacidad de producir y secretar una exotoxina. Se han identificado cuatro tipos de virus satelital M: ScV-M1 (1.8 kb), ScV-M2 (1.5 kb), ScV-M28 (1.9 kb) y ScV-Mlus (2.1-2.3 Kb) los

cuales permiten la síntesis y secreción de las toxinas *K1*, *K2*, *K28* Y *Klus* respectivamente más componentes de inmunidad (Magliani, 1997; Sesti et al., 2001; Rodríguez-Cousiño, 2011).

La síntesis de la exotoxina es mediada a través de un único marco de lectura 5'ORF situado en la cadena M (+) ssRNA la cual codifica inicialmente a una preprotoxina (*pptox*) precursora de la toxina madura (Magliani, 1997).

Cada virus M es dependiente en la coexistencia del virus auxiliar L-A para una replicación estable y mantenimiento dentro del citoplasma de la levadura infectada. En una levadura *Killer* se tiene la capacidad de únicamente producir y secretar una de las tres toxinas más estudiadas toxinas (*K1*, *K2*, *K28*) debido a que los genomas del virus satelital M se excluyen entre sí a nivel de replicación y por ende solo se ha de encontrar dos viriones en el interior de la cepa, cada uno correspondiendo al virus L-A y al virus M (Schmitt, 1992; Schmitt, 2006).

Dentro del sistema *Killer*, la levadura *S.cerevisiae* puede expresar tres fenotipos factibles: neutral, levadura que no presenta sensibilidad a la toxina; sensible o *K^{III-}*, levadura sensible a toxinas pero con ausencia de producción de la misma; *Killer* o *K^{III+}*, levaduras productoras de toxina y autoinmunidad a la misma, pero con sensibilidad a otra toxina *Killer* distinta a la producida (Woods & Bevan, 1968; Sesti et al., 2001).

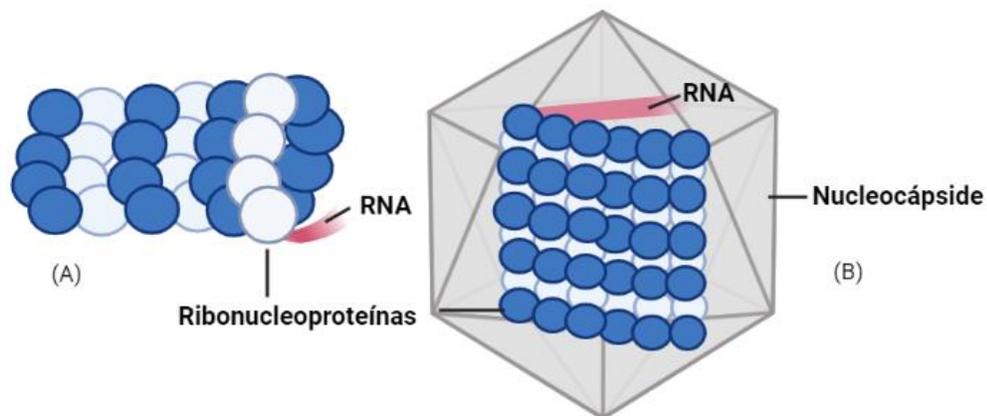


Figura 2. Componentes virales. Complejo estructural de RNA y Ribonucleoproteínas (RNP), proteínas unidas al material genético con actividad enzimática, estabilizadora del plegamiento en la auto-replicación y de la transcripción del genoma viral (A). Estructura general de un virión del virus auxiliar L-A y virus M (B). Tomada y modificada del libro de Murray et al 2021; creada en BioRender.com.

4.4.2 Ciclo de replicación viral.

El ciclo viral es independiente a la replicación del huésped y tiene comienzo con la replicación del virus auxiliar L-A. En un inicio la cadena L-A (-) ssRNA (*Single Stranded, ss*) es transcrita a un RNA mono catenario de sentido positivo L-A (+) ssRNA en el interior del virión. Al término de la replicación, la cadena L-A (+) ssRNA es exportada hacia el medio citoplasmático de su huésped para ejercer dos funciones: como un RNAm para la síntesis proteica viral y como plantilla de la replicación de la cadena L-A (-) ssRNA la cual garantiza un nuevo ciclo de replicación viral (Magliani, 1997; Schmitt, 2006)

En relación a la síntesis proteica, la cadena positiva del virus L-A presenta dos marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames; ORFs*). El ORF1 situado en el extremo 5' codifica a una proteína denominada "Gag" principal componente estructural de la cápside. Por su parte el ORF2 localizado en el extremo 3' codifica para dos copias de una ARN polimerasa dependiente de RNA (su síntesis es mediada por un cambio de marco ribosómico -1). La enzima es expresada como una proteína de fusión de dos componentes: "Gag-Pol" necesarios para el ensamble correcto de la nucleocápside (Dinman, 1991).

Una vez concluida la síntesis proteica de ambos marcos de lectura, la proteína de fusión *Gag-Pol* realiza dos actividades a través de sus dominios: el dominio Pol se adhiere a un sitio de unión de la cadena L-A (+) ss RNA denominado como: sitio de unión a virus (*Virus Binding Site, VBS*) el cual se localiza a 400 pares de bases aguas arriba del carboxilo terminal en el extremo 3'. El anclaje establecido entre el genoma y el dominio Pol asegura que, al momento de formar la cápside la hebra sea localizada en el interior de la misma y con ello brindar protección del material

genético de las proteasas del huésped. Por su parte, el dominio Gag inicia la polimerización de proteínas Gag libres previamente sintetizadas para edificar la cápside. En este proceso existe una competencia entre ambos virus por las proteínas virales Gag necesarias para su encapsidación (Schmitt, 2006).

Al finalizar la cadena L-A (+) ssRNA ejerce su segunda función: como plantilla. A partir de esta cadena se genera una transcripción de extremo a extremo en sentido opuesto para generar la cadena L-A (-) ssRNA. La transcripción es mediada por la segunda copia de la proteína de fusión Gag-Pol la cual desempeña el papel de transcriptasa dependiente de RNA. Al término del proceso se tendrá un partícula viral madura o virón (Bostian, 1980).

Cada virón, está constituido por: una cápside formada por 60 dímeros asimétricos de la proteína Gag. Dentro de él, es contenido dos hebras de material genético (*Double Stranded RNA, dsRNA*), cada uno en diferente sentido (cada copia con un peso de 4.6 kb) y dos copias de la proteína Gag-Pol, proteínas que codifica el mismo genoma necesarias para la actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (Wickner, 1992). De manera aislada, el virus auxiliar L-A no confiere el fenotipo *Killer* ni origina alguna modificación en el crecimiento o muerte celular (Castón, 1997)

La replicación de los virus M es similar a los virus L-A (Figura 3). La única diferencia es que, en cada virón M se puede estar contenido dos copias del genoma M dsRNA de tamaño menor antes de ser exportados hacia el citoplasma del huésped. Este fenómeno es nombrado "*headful packaging*" (Esteban, 1986).

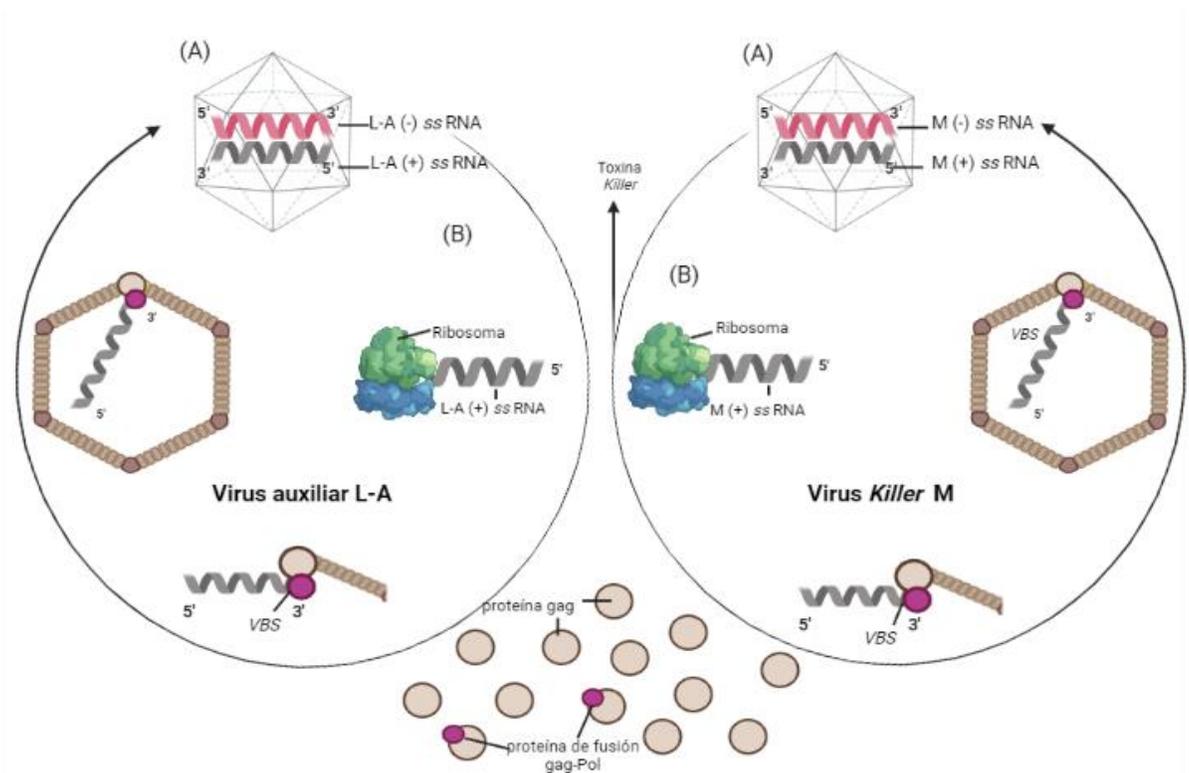


Figura 3. Replicación viral. Transcripción de la cadena L-A (+) ssRNA y la cadena M (+) ssRNA a partir de una hebra de RNA mono catenario negativo (RNAmc-) dentro de su estructura vírica o virón respectivamente (A). La exportación fuera del virón de la cadena plus de RNA mono catenario del virus L-A auxiliar hacia el espacio citosólico de la levadura huésped da inicio al ciclo viral para ambos virus. La hebra L-A (+) ssRNA ejerce dos funciones: en primer orden como una plantilla de la cual se replica una hebra L-A en sentido negativo para asegurar un nuevo ciclo de replicación viral y en segundo lugar como un RNA mensajero para la síntesis proteica en la cual se proporcionan dos tipos de proteínas: la proteína Gag la cual conforma en su mayoría la estructura de la nucleocápside y la proteína de fusión “gag-pol” en la cual: el dominio Pol establece un anclaje a través del sitio de unión al virus (Virus Binding Site, VBS) encontrado 400 pares de bases aguas arriba del carboxilo terminal del extremo 3’ en el genoma y el cual asegura que al momento de formación de la nucleocápside la hebra se situó en el interior de esta para su protección. Por su parte el dominio Gag permite la polimerización de proteínas Gag para la formación de la nucleocápside necesaria en ambos virus. Referente a la hebra plus del virus M *Killer* su función es destinada a dos objetivos: generan en su síntesis una de las cuatro toxinas *Killer* actualmente reportadas y el servir como plantilla para generar una copia *minus* o hebra negativa que asegura la replicación viral (B). Tomada y modificada de Schmitt, 2006; creada en BioRender.com.

4.4.3 Toxina *Killer 1 (K1)*.

En el género de *Saccharomyces* de la especie *cerevisiae* las toxinas *KHR*, *KHS*, *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* son identificadas como responsables fenotipo *Killer*; todas exhiben una diversidad en su base genética de la cual proceden y esta a su vez, establece entre las mismas diferencias que enmarcan desde la composición de aminoácidos, la conformación como toxina madura hasta su modo de acción molecular (Magliani *et al.*, 1997b; Schmitt, 2002).

Las toxinas *KHR* (*Killer of Heat Resistant*) y *KHS* (*Killer of Heat Suceptible*) proceden de una base genética de DNA cromosómico. La toxina *KHR* esta codificada en el brazo izquierdo del cromosoma IX mientras que la toxina *KHS* se encuentra en el genoma del brazo derecho del cromosoma V. Ambas toxinas en su conformación madura son de menor peso molecular respecto a sus precursores; *KHR* parte de una *preprotoxina* de 33 kDa en tanto la toxina *KHS* tiene un precursor de 79 kDa. Pese a que las toxinas tienen su principio en DNA cromosómico las diferencias son marcadas en especial en su mecanismo de acción. La toxina *KHS* exhibe un posible mecanismo semejante al de las toxinas *K1* o *K2* esto debido a mostrar 3 grupos de secuencias de aminoácidos hidrofóbicos. Respecto a la toxina *KHR* su mecanismo es probablemente diferente de *K1* o *K2* consecuente de no exponer de manera puntal regiones hidrofobicas en la conformación de proteína funcional (Goto *et al.*, 1990a; Goto *et al.*, 1991b; Goto, 1990)

Por su parte las toxinas *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* son toxinas heterodiméricas, estabilizadas por dos o más puentes disulfuro (Schmitt & Breinig, 2002). Proceden de un virus dsRNA citoplasmático de la familia *Totiviridae* denominado M. El virus M se clasifica en cuatro tipos: M1 (1.8 Kb), M2 (1.5 Kb), M28 (1.9 Kb) y *Mlus* (2.1-2.3 Kb) según la toxina codificada. A partir del único ORF (*Open Reading Frame*, *ORF*) en el extremo 5' de una cadena ssRNA *plus* es secuenciado un precursor primario polipeptídico denominado *preprotoxina* o "*pptox*" el cual, posterior a su síntesis sufre modificaciones postraduccionales a través del retículo endoplásmico para dar origen a una *protoxina* y esta a su vez, trastocarse al aparato de Golgi para

madurar y generar una toxina competente durante el almacenamiento en vesículas de secreción (Bussey, 1972; Magliani, 1997)

2.4.3.1 Síntesis de la toxina *K1*

La toxina *K1* (19 kDa) es la exotoxina más estudiada del sistema *Killer*. Procede de un precursor primario o *preprotoxina* (*pptox*) de 35 kDa (316 aminoácidos), producto de la síntesis de la cadena M1 (+) ssRNA. La *pptox* se encuentra integrada por cuatro sub-unidades: δ , (44 residuos de aminoácidos) dominio dentro del cual es localizado el péptido líder o señal (26 residuos de aminoácidos); α , (103 residuos de aminoácidos) dominio con presencia de dos regiones hidrofóbicas; γ , dominio central con tres posibles sitios de N-glucosidación; β , (83 residuos de aminoácidos) dominio vinculado en el reconcomiendo en cepas sensibles (Skipper, 1984; Boone, 1990; Bussey *et al.*, 1990; Zhu, 1992).

La síntesis de la cadena M1 (+) ssRNA por parte de los ribosomas de la cepa huésped en el citoplasma es la pauta inicial de la edificación de la toxina *K1*. El precursor primario o *preprotoxina* (*pptox*) recién sintetizado es dirigido hasta el lumen del retículo endoplasmico (RE) rugoso para sus posteriores modificaciones postraduccionales. La conducción es guiada por el péptido líder y proteínas citosolicas denominadas comúnmente “chaperonas” (*Ssa1p-Ssa4p*). Una vez situada la *pptox* en el lumen, la secuencia líder es escindida del dominio δ para su degradación mediante la acción de una peptidasa en el extremo N-terminal. La *pptox* dentro del retículo es sometida a diversas modificaciones mediante la acción de Hsp70 Bip (*kar2p*) y calnexina (*cne1p*): glucosilación en los tres posibles sitios del dominio γ ; plegamiento competente guiado por el dominio δ (el cual posterior a ello será eliminado por corte enzimático de una carboxipeptidasa). Las modificaciones originan un péptido denominado *protoxina* (45 kDa) cuya conformación está dada por los dominios α - γ - β . A través del transporte anterógrado vesicular con una cubierta de COP-II la *protoxina* es dirigida hacia el aparato de Golgi hasta el compartimento tardío para efectuar cortes enzimáticos (los cuales difieren en velocidad) por parte de carboxipeptidasas: endopetidasa *Kex2p* y *Kex1p*

en residuos di-básicos (Bostian et al., 1984; Marquina, 2002b). La escisión elimina la región γ y al mismo tiempo que produce las subunidades α y β de manera separada; ambas almacenadas en una vesícula de secreción establecen generalmente tres puentes disulfuro entre sí, mediante una maduración favorecida por la acidificación del pH vesicular adoptando la estabilidad de ambas subunidades y conformando el dímero, estructura de la toxina madura *K1* la cual es secretada por la cepa *Killer* en vesícula de fusión de membrana y pared celular para así, sea liberada en el medio extracelular (Magliani, 1997; Schmitt, 2006; Gier,2019) .

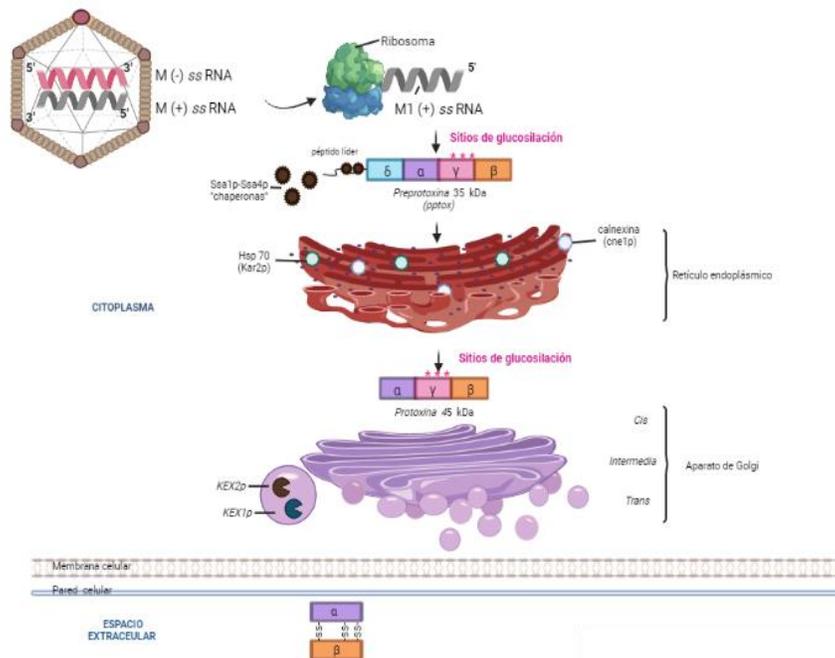


Figura 4. Dominios de *pptoX* *K1*. La *pptoX* es el precursor primario de la toxina *K1* una vez secuenciado de la cadena M1 (+). Su conformación está dada por 4 principales dominios. Con lectura inicial en el extremo N-terminal se describe: el péptido señal (posición 1-26) requerido en la dirección de la *pptoX* hacia el retículo endoplásmico y el cual, a su vez forma parte del dominio δ o dominio líder (posición 27-44) encargado de la secreción y plegamiento de la proteína. Subsecuente, es localizado el dominio α (posición 45-147), necesaria para el efecto letal en células sensibles con ausencia de pared celular (esferoplastos); dominio γ (posición 148-242), subunidad susceptible a la glucosilación por parte del aparato de Golgi y preciso para la maduración de la toxina en vesículas de secreción; dominio β (posición 243-316) localizado en el extremo C-terminal y esencial para la

unión de la toxina a la pared celular de cepas sensibles. Tomada y modificada de Gier, 2019; creada en BioRender.com.

El procesamiento de la toxina *Killer 1* dentro de la levadura *S.cerevisiae* presenta una similitud con respecto a una molécula de gran importancia biológica en el metabolismo humano (Figura 5). La insulina es sintetizada en las células β en los islotes de Langerhans a partir de un precursor denominado preproinsulina, péptido de 110 residuos de aminoácidos conformado por una secuencia líder y tres cadenas B, C y A. El procesamiento del péptido está precisado por enzimas pertenecientes a las familias de peptidasas (Hsp70 Bip y Calnexina) para eliminar el segmento de secuencia líder y generar una proinsulina. La proinsulina da origen a la insulina bioactiva mediante modificaciones postraduccionales llevadas en los orgánulos del retículo endoplasmico y aparato de Golgi; sufre procesamiento al igual que la protoxina por proteasas homólogas a *Kex1p* y *Kex2p*; carbopeptidasa: H y endopeptidasas: PC1 y PC2, estas últimas dependientes de calcio (Ca^{2+}) que precisan de un pH ácido dentro de los gránulos de secreción. La insulina está conformada por las cadenas A (cadena corta de 20 residuos de aminoácidos) y B (cadena larga de 31 residuos de aminoácidos) estabilizadas por tres puentes disulfuro entre las cisteínas, dos externos (A7-B7; A20-B19) y uno interno (A6-A11). (Mayer, 2007; Niswender, 2011; M. Liu *et al.*, 2018; Vakilian, 2019). Actualmente se ha considerado que la toxina *K1* se encuentre estabilizada por dos puentes disulfuro entre sus dos subunidades que conforman el dímero (Gier *et al.*, 2019).

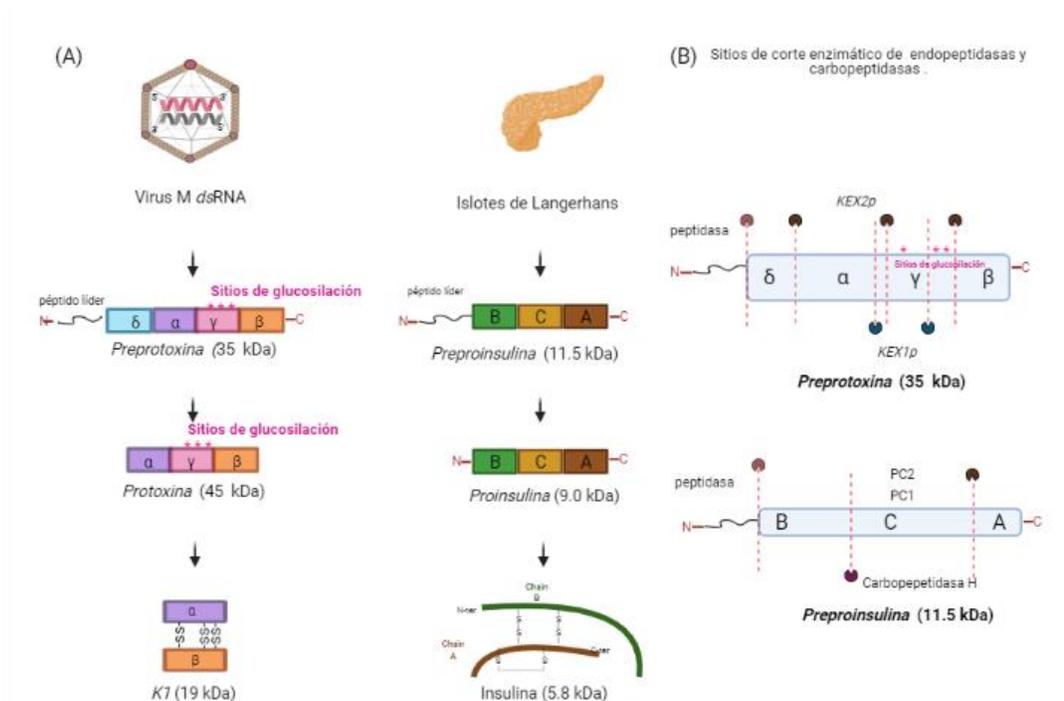


Figura 5. Homología en el procesamiento de la toxina K1 y la insulina. Ambos péptidos comparten similitud en el proceso de maduración (A). La proinsulina, al igual que la protoxina sufre cortes enzimáticos (línea roja punteada) por peptidasas H y carboxipeptidasas PC1, PC2 homólogas a Kex1p y Kex2p (B). Tomada y modificada de Vakilian, 2019; creada en BioRender.com

4.4.4 Blanco molecular de la toxina K1: TOK1p.

TOK1 (*Two domains Outwardly Potassium K⁺ Channel*) es una proteína de 691 residuos de aminoácidos que se encuentra codificado por gen DUKY localizado en el brazo izquierdo del cromosoma X del genoma de la levadura y es el único canal de potasio de rectificación saliente con dos dominios de poro en tándem. Actualmente el canal es nombrado como TOK1 sin embargo, dentro de la bibliografía también se identifica con las siglas: TOK1 o Tok1, DUCK1, YORK, YPK1 o YKC1 (Ketchum et al., 1995).

El canal de potasio TOK1p es expresado en las membranas celulares y se clasifica como un transportador iónico, proteína formadora de poros en la membrana biológica que permiten el transporte a través diversos iones para su intercambio y/o eliminación. Aun cuando su papel fisiológico no está esclarecido en la literatura,

varios estudios otorgan una contribución en procesos como: el balance del pH intracelular, mantenimiento del potencial de membrana, preservación de la correcta estructura y forma de las células así como una intervención auxiliar en el proceso de estrés osmótico. Mediante la respuesta a un estímulo fisiológico el transportador TOK1p experimenta conformaciones de apertura y cierre regulando así, la permeabilidad del potasio a través de la membrana (Hille, 1978; Ariño *et al.*, 2014)

TOK1p como canal, consta de 8 segmentos transmembranales y dos dominios de poro en tándem: el primero situado en el TM5-6 y el segundo localizado en el TM7-8; cada dominio de poro contiene un octapéptido. La forma funcional del canal es un dímero y es activado por despolarización de la membrana, modulado por concentración interna de potasio y presenta una alta sensibilidad al pH. (Figura 6) (Ketchum, 1995; Ahmed, 1999; Saldaña C, 2002).

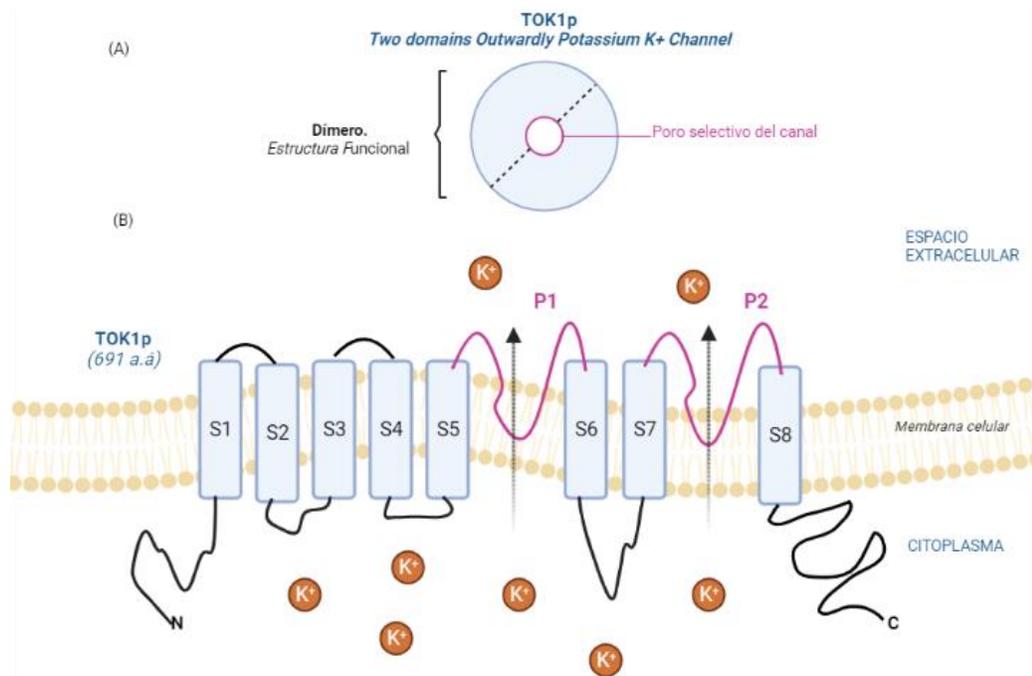


Figura 6. Representación del canal TOK1p. Proteína de 691 residuos de aminoácidos codificada en el brazo izquierdo del cromosoma X por el gen DUKY del genoma de la levadura y expresado en la membrana plasmática. Su estructura cuaternaria es un dímero y el poro de selectividad del canal es el único en la cepa como rectificador saliente (B). El mapa topográfico del canal TOK1p en estructura de monómero muestra 8 cruces transmembranales (S1-S8) y sus 2 dominios de poro (P1, P2) con

rectificador saliente del ion de potasio (K^+) (B). Tomada y modificada de Ahmed, 1999; Saldaña C, 2002; creada in BioRender.com

Con respecto a lo anterior, la movilización y acumulación de potasio (K^+) representa para la cepa de levadura un catión monovalente de vital importancia para procesos fisiológicos y químicos relacionados en la actividad celular posicionándolo a cargo de funciones fisiológicas vitales entre las cuales se encuentran: regulación y mantenimiento del potencial de membrana, regulación del volumen celular y pH intracelular, correcto proceso de reacciones enzimáticas y proporcionar un ambiente citosólico ideal para la correcta síntesis proteica (Ramos, 1992; Alijo & Ramos, 1993)

Como catión monovalente tiende a acumularse dentro de la célula y su concentración intracelular oscila alrededor de 135 mM, concentración 7.5 veces mayor comparado con el sodio (Na^+) catión que tiende a presentar concentraciones de 18 mM y una actividad toxica en concentraciones elevadas en el citoplasma. El flujo apropiado de ambos cationes y con ello un mantenimiento del equilibrio homeostático así como correcto gradiente electroquímico de H (+) es imprescindible para la absorción y utilización de nutrientes, crecimiento y la supervivencia celular en la levadura (Canadell & Ariño, 2016; Yenush, 2016).

En el canal TOK1p la movilización de K^+ (2.66 Å: angstrom) es a través de los dos dominios de poro tándem, región clave en la selectividad iónica y permeabilidad del este aun cuando su longitud sea casi el doble en comparación con el sodio (1.9 Å). En el año 2002 a través del trabajo de Saldaña C y colaboradores se observó que la selectividad al K^+ por parte de los dominios formadores de poros era afectada al separarlos mediante mutagénesis dirigida al canal TOK1p para generar dos fragmentos del canal cada uno con un dominio formador de poro: el primero, una proteína conformada por 6 segmentos transmembranales y un dominio de poro denominado TOK1A y el segundo fragmento, formado por dos segmentos transmembranales y un domino de poro nombrado TOK1B, ambos no existentes en la naturaleza (Saldaña C, 2002).

El efecto de muerte celular que ejercen las cepas *K^{ill+}* del género *S.cerevisiae* en organismos sensibles de la misma especie o relacionado es mediado por la sensibilidad de diversas moléculas blanco a las toxinas, estas fungen como receptor permitiendo el reconocimiento de la toxina y con ello su efecto. El blanco molecular puede ser localizado en la pared celular, membrana plasmática o en el interior de la célula (Novotná, 2004; Sheppard & Dikicioglu, 2019).

A pesar del descubrimiento del efecto *Killer* en los años 60's, el blanco molecular de la toxina *K1* no fue determinado hasta el año 1999. A partir de la secuenciación del genoma de *S.cerevisiae* se encontró en uno de sus múltiples marcos de lectura el canal selectivo a potasio TOK1. Consecuentemente en 1999, mediante la expresión del canal de potasio TOK1p en ovocitos de rana *Xenopus laevis* se precisó como potencial blanco molecular de la toxina *K1* (Ahmed et al., 1999).

El mecanismo de acción de la toxina *K1* aún no ha sido puntualizado ampliamente, no obstante, existen estudios que proponen posibles mecanismos de acción de esta toxina (Bussey, 1991). Con mayor aceptación es el efecto *Killer* producido por medio de la asociación de la toxina *K1* con una proteína denominada Kre1p localizada en la membrana plasmática para posteriormente interactuar con el canal de potasio TOK1p (Figura 7) (Ahmed et al., 1999; Breinig & Schmitt, 2002).

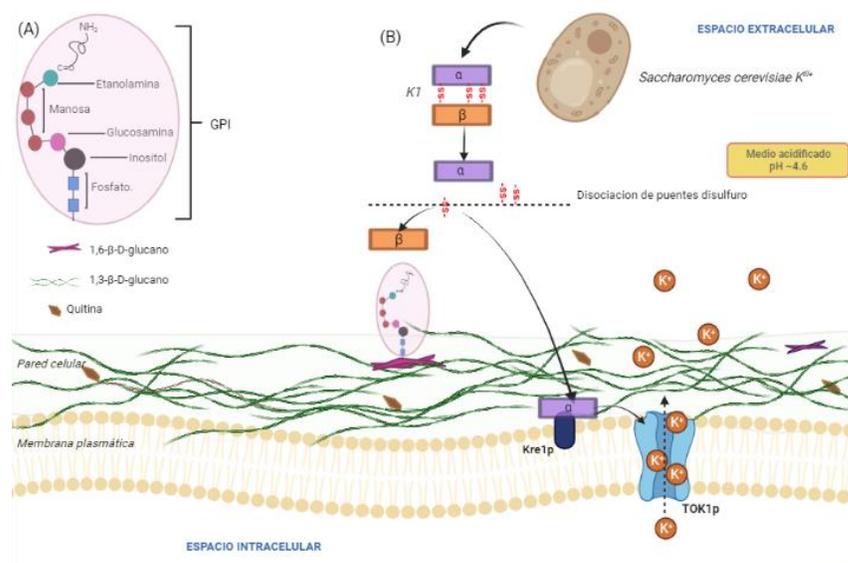


Figura 7. Efecto *Killer* de una cepa K^{ill+} . Mediante el mecanismo de acción de toxina *K1* sobre el canal TOK1p en una cepa sensible K^{ill-} . Receptores primarios y componentes de la pared celular (A). Posterior a la liberación de la toxina *K1* esta sufre una disociación de sus subunidades, efecto de un pH ácido ~4.6 presente en el medio extracelular. La interacción de las subunidades en la pared celular y la membrana plasmática por medio de reconcomiendo de diversos receptores produce una muerte celular en cepas sensibles a la toxina. Tomada y modificada de Ketchum, 1995; creada en BioRender.com

Posterior a la liberación de la toxina al espacio extracelular, se ha sugerido que *K1* heterodimérica se disocia en sus dos subunidades α y β debido al efecto del pH ácido extracelular con valor aproximado de 4.6 el cual genera rompimiento de sus enlaces disulfuro (Pfeiffer, 1988). La separación permite la unión de una de las subunidades de la toxina, probablemente de subunidad β con 1,6- β -D-glucano proteína unida a un glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el espacio extracelular (Breinig et al., 2002a, Breinig et al., 2002b). 1,6- β -D-glucano es un receptor así como uno de los principales componentes presentes en la pared celular al igual que 1,3- β -D-glucano, manoproteínas y quitina (Boone et al., 1990). El receptor es clasificado como primario y codificado por el gen *KRE1* (*Killer resistant*) el cual codifica proteínas estructurales de la pared celular, así como la proteína Kre1p, proteína localizada en la membrana celular. Una vez establecida la interacción con la pared celular de la cepa sensible, la subunidad α posiblemente presenta una translocación hacia la membrana plasmática la cual genera una posible interacción con la proteína Kre1p y una unión al canal TOK1p provocando con ello, la activación de este y un cambio de probabilidad de apertura (Ahmed et al., 1999; Bertl, 1998). La apertura del canal sin control de cierre conduce a la despolarización de la membrana, liberación desmesurada de iones de potasio hacia el espacio extracelular y desbalance osmótico, eventos que culminan en la muerte celular. La inhibición causada por la toxina es incrementada a pH bajos (rango de 4.0-4.7) y es irreversible a través del tiempo (de la Pena et al., 1981; Schmitt & Reiter, 2008).

Dentro de la estructura del canal TOK1p, la presencia de un mayor número de cisteínas (13 residuos de cisteínas) con respecto a otros canales de potasio es un

aspecto a considerar. Las cisteínas se encuentran relacionadas con diversos aspectos entre ellos: la estabilidad de la proteína al formar puentes disulfuro estructurales, enlace formado mediante un átomo de O₂ (oxígeno) en acercamiento con un átomo de S (azufre) estableciendo una interacción S—O; protección frente a posibles daños por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS); transformaciones biológicas como reacciones catalíticas de proteínas enzimáticas (Backus, 2019).

En relación al efecto *Killer*, las cisteínas se han considerado como elemento clave del efecto letal de la toxina *K1* debido a los puentes disulfuro que establecen en pH de rangos bajos (4.5-4.7). Evidencia actual indica que las cisteínas 248 y 312 localizadas en la subunidad β de la toxina intervienen en la unión de la toxina *K1* con cepas sensibles y esferoplastos, estas últimas genéticamente modificadas que presentan ausencia de pared celular (Gier et al., 2019, 2020) .

La interacción toxina-blanco molecular por cisteínas en la naturaleza ya se ha reportado, ejemplo de ello es el caso reportado en *Arabidopsis*, planta herbácea perteneciente a la familia *Brassicáceas* la cual posee una *cinasa* CRK36 de tipo receptor rico en cisteínas y el cual es un componente de señalización que regula varios procesos celulares como la inmunidad vegetal. El receptor responde al patógeno fúngico necrótico *Alternaria brassicicola* desencadenando la muerte celular y el estallido de ROS (Lee,2017). Otro ejemplo, es el observado en purificados veneno Marroquín escorpión *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y su alta afinidad selectiva por diversos canales de potasio. La clase de toxinas denominadas “*K⁺ channel toxins*” o “*K⁺ channel blocker’s toxins (KTxs)*”, péptidos cortos (28-40 residuos de aminoácidos) reticulados por tres a cuatro puentes disulfuro presentan afinidad de unión a los canales K_v4 mediante interacciones hidrofóbicas, de enlace de hidrogeno y electrostáticas a nivel de filtro de selectividad del poro del canal, así como el vestíbulo exterior del mismo; sitios con motivos ricos en cisteína y aminoácidos de carga positiva como lisina o arginina. La unión produce en ambas moléculas (toxina y blanco) una reorganización estructural que concluye en el bloqueo del canal (Martin-Eauclaire & Bougis, 2012).

Por otra parte, es conveniente considerar el papel posible factor protector de los blancos moleculares ya que, en ausencia de estos posiblemente no se efectuará el reconcomiendo y por ende se evadiera el efecto de la toxina sobre la cepa sensible. En 1990, el receptor Kre1p se consideró un factor de inmunidad a la toxina debido a que las cepas mutantes con ausencia del receptor presentaban una disminución en el efecto de letalidad pero no una nula inmunidad a la toxina; esto genero la pauta a colocar al receptor como una primera interacción de la toxina, pero no la única y final (Bussey et al., 1990; Sesti et al., 2001). Con respecto al canal TOK1p, evidencia respalda su papel de resistencia frente a la toxina presente en cepas con delección del canal y así mismo una mayor sensibilidad cuando este es sobre expresado (Adam Bertl et al., 1993; Ahmed et al., 1999)

4.5 Importancia del sistema *Killer*.

A partir del descubrimiento del sistema *Killer* de la levadura *S.cerevisiae*, su investigación así como aplicación del mismo para diversos sectores humanos ha generado un creciente interés (Schmitt & Breinig, 2002; Muccilli & Restuccia, 2015).

La aplicación del fenómeno se ha evocado principalmente en la industria alimentaria de producción de cervezas, licores y con mayor abordaje en el área vinícola. Las cepas de levadura productoras de toxina *K1* modificadas genéticamente son empleadas en la actualidad como: cultivo precursor en la elaboración de vino, estrategia que evita la presencia de microorganismos indeseados los cuales pudiesen modificar cualidades organolépticas (vida de anaquel y deterioro de la calidad del producto) así como una estrategia para la reducción del tiempo de producción, esto mediado por autólisis de la levadura. A razón de lo anterior, el sistema *Killer* se ha catalogado como un eficiente bioconservador el cual asegura calidad del producto, minimiza mermas y agiliza tiempos de producción (Jane Lombardi et al., 2015; Velázquez et al., 2016).

En el área biomédica, estudios han observado el efecto *Killer* procedente de diversas levaduras no se encuentra delimitado a matar cepas sensibles pertenecientes al mismo género ya que puede exhibir efecto en especies

relacionadas en especial en patógenos de importancia biomédica como lo son: *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis*; estos reportes han postulado a considerar el efecto *Killer* como un potencial antimicrobiano (Polonelli et al., 1983; Morace et al., 1984; Walker et al., 1995).

En el grupo de investigación a través de la búsqueda de marcos de lectura abiertos similares a TOK1 en bacterias patógenas se logró identificar proteínas con homología al canal e inexistencia de reporte previo. Las proteínas no solo exponían homología en secuencia, de igual forma se observó analogía en sus perfiles de hidropatía respecto al de TOK1p. Dentro de las bacterias patógenas y a través de experimentación se precisó la sensibilidad ante la toxina de *Klebsiella pneumoniae*, bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* responsable de enfermedades denominadas como infecciosas oportunistas. El resultado obtenido en el grupo de trabajo, respalda que el efecto de la toxina tiene como elementos claves: la homología con el blanco molecular TOK1p y la posible presencia de residuos de cisteínas, aminoácidos asociados al anclaje de toxina con su blanco (Villarreal J, 2018).

En la actualidad no existe reporte alguno de la presencia de un canal de potasio homólogo al canal TOK1p en seres humanos.

4.6 Sistemas de expresión heteróloga.

Los sistemas de expresión heteróloga son métodos frecuentemente utilizados que permiten la manipulación y expresión genética en una especie o línea celular distinta a la del origen. Su desarrollo se basa en el empleo de un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de DNA/RNA que posee los elementos genéticos necesarios para la transcripción y traducción del objetivo de interés. Los sistemas de expresión heteróloga empleados para la obtención de péptidos ofrecen las ventajas de: una elevada tasa de producción, la obtención de un péptido con modificaciones diseñadas para la incorporación de mejoras y el estudio de la funcionalidad en un organismo diferente al de su origen. (Ferrer-Miralles, 2015).

La bacteria *Escherichia coli*, representa el hospedero más empleado con alta frecuencia en los sistemas de expresión heteróloga debido a: una alta tasa de replicación y ausencia de *N*-glucosilaciones, proceso postraducciona que interfiere en una correcta síntesis de proteínas heterólogas (Yokoyama, 2003). No obstante, el empleo de organismos procariontes resulta poco útil para la síntesis de proteínas complejas como las de origen eucarionte puesto que, su síntesis resulta en una macromolécula tóxica para el hospedador procarionte adicionado a una ineficiencia del procesamiento postraducciona como el correcto plegamiento o corte enzimático, mecanismos que en conjunto generan una molécula mal plegada o ausente de funcionalidad (Aydin, 2012) .

Actualmente el empleo de organismos eucariontes como hospederos ha sido un modelo más atractivo para el estudio de la expresión, procesamiento y secreción de proteínas heterólogas con un alto peso molecular. Células como las levaduras y las células de mamífero proporcionan: capacidad de crecimiento celular siendo hospedero, manipulación genética óptima y eficiente en las modificaciones postraduccionales que brinda en conjunto la capacidad para generar una molécula de alto peso molecular, bioactiva, funcional y de factible escalabilidad hacia otros organismos de mayor complejidad (Buckholz & Gleeson, 1991; Romanos et al., 1992; Smith et al., 1985). Los péptidos procedentes de una expresión heteróloga son objeto de mayor estudio y aplicación en áreas biomédicas, agroalimentarias e industriales (Grillberger, 2009).

Con relación a lo anterior, la levadura organismo eucarionte unicelular ha sido empleado con éxito en la producción de moléculas de importancia terapéutica. Lee y colaboradores en 1999 generaron un sistema de secreción de proteínas recombinantes en *S.cerevisiae* como hospedador. La expresión heteróloga de las proteínas diana: factor estimulante de colonias de granulocitos (hG – CSF) y hormona de crecimiento humano (hGH) se desarrolló mediante el casete de expresión que comprendía: la secuencia líder de la toxina asesina *Kluyveromyces lactis*; 24 residuos de aminoácidos (Ser5-Ala28) del residuo N-terminal de

interleucina 1 β humana (hIL-1 β humana), péptido potenciador; sitio de escisión de endopeptidasa dibásica KEX2; una de las dos proteínas diana. La cepa presento una alta eficacia de secreción (1,3 g/L) de proteína recombinante en el caldo de cultivo (J. Lee et al., 1999). La N-glucosilación del péptido potenciador por la cepa es un factor de influencia para una efectiva secreción de proteínas diana al igual que el procesamiento eficiente por parte de la carbopeptidasa KEX2 (Sleep et al., 1990; Kjeldsen, 2000; Kyoung et al., 2005).

Dentro de la producción y análisis de proteínas heterólogas el fenotipo *Yeast killer* y la producción de toxinas es un campo de gran interés. Se ha identificado en más de 100 especies atribuido a 45 especies de levaduras, pero no siendo exclusivo de las mismas; evidencia reporta la producción de toxinas como mecanismo de competencia en bacterias y hongos (Klassen, 2017). En el espectro de aplicación del sistema se encuentra el empleo como potencial antimicrobiano en animales como humanos; control biológico de plagas en cultivos; estratégico componente de producción y calidad en productos alimenticios, entre otros. (Smith, 1985).

En el año 2017 se presentó por primera vez en *Pichia pastoris* la expresión heteróloga de la toxina *K28* y su producción en variantes fluorescentes conservando la efectividad de estas a pesar de la pronunciada sensibilidad de las toxinas *Killer* a cambios de pH o fusiones a subunidades citotóxicas. *K28*, proteína heterodimérica α/β de la familia A/B secretada por *S.cerevisiae* (K^{ill+}) posee un único y particular mecanismo de muerte relacionado a la unión en la superficie de la pared celular en células diana seguido por endocitosis mediada por receptores y su transporte retrogrado por vía secretora hacia el núcleo(Heintel, 2001). La expresión de la toxina *K28* fusionadas con fluoróforos mCherry y mTFP en la cepa hospedadora *P.pastoris* GS115 (K^{ill-}) se logró debido a una alta densidad de fermentación celular. La expresión heteróloga permitió la obtención un alto rendimiento de la toxina conservando su toxicidad y especificidad de forma *in vivo*. Mediante señales de fluorescencia se permitió comprobar el único componente requerido para la unión de *K28* a receptores primarios de levaduras sensibles es la subunidad β . El empleo

de fluoróforos y su rastreo mediante la fluorescencia el a nivel microscópico en tiempo real permite conocer sitios y mecanismos de acción de las moléculas sin necesidad de procedimientos que requirieran fijación o permeabilización celular ambos métodos empleados en células de mamífero los cuales generan muerte (Giesselmann et al, 2017).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La comprensión del sistema *Killer* de la toxina *K1* es parcial, escasos antecedentes reportan un mecanismo de interacción específico entre la toxina y su blanco molecular. Los diversos enfoques en la investigación del sistema y sus componentes se han limitado en el estudio en hospedadores como otras levaduras del mismo género o especies relacionadas a *S.cerevisiae* sin referencias de una expresión en otra diversidad celular como lo son las células de mamífero.

Estas limitantes de comprensión frenan la posibilidad de estudiar al sistema *Killer* y sus características de producción de toxinas, autoinmunidad, crecimiento celular selectivo entre otros en diversos organismos así como una posible aplicación en campos como lo son: el biomédico, la agrícola y/o industria alimentaria.

VI. JUSTIFICACIÓN.

El empleo de sistemas de expresión heteróloga, técnica de biología molecular representa una oportunidad para la caracterización del mecanismo *Killer* procedente de la toxina *K1*.

La expresión de los componentes del sistema en células de mamífero como hospedero permitirá: eliminar factores intrínsecos propios de la levadura que hasta el momento no han permitido una descripción concreta de la interacción de los elementos toxina-blanco molecular así como el estudio del desarrollo de un sistema con control dirigido y la posible aplicación a largo plazo en el área biomédica.

VII. HIPÓTESIS.

- El empleo del vector de clonación PcDNA 3-EGFP permite el diseño y la construcción molecular del canal TOK1.
- Las líneas celulares de mamífero MCF-7; MCF-12F expresan el canal TOK1p blanco molecular de la toxina *K1*.
- Las líneas celulares de mamífero MCF-7; MCF-12F expresan los segmentos TOK1 A, TOK1 B.

VIII. OBJETIVO GENERAL.

Generar un sistema de expresión heteróloga del canal TOK1p del sistema *Killer* presente en *S.cerevisiae* en líneas celulares de mamífero.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Diseñar la construcción molecular del canal TOK1 del sistema *Killer* de *S.cerevisiae* empleando el vector de clonación pcDNA 3-EGFP.
- Expresar de manera heteróloga y transitoria el canal TOK1p en las líneas celulares MCF-7; MCF-12F.
- Expresar de manera heteróloga y transitoria los segmentos TOK1 A, TOK1 B en las líneas celulares MCF-7; MCF-12F.

IX. METODOLOGÍA.

9.1 Modelaje estructural del canal TOK1.

Para un mejor entendimiento de la posible conformación espacial del canal TOK1, se realizó un modelamiento *in silico*. Mediante el software SWISS-MODEL y el empleo de las secuencias de aminoácidos del canal *TREK 1* y TOK1 se generó un alineamiento de ambas lo cual permitió la minimización estructural del canal mediante el software PyMOL V0.99. El canal *TREK 1* pertenece a la familia *KCNK* y fue seleccionado como molde debido a ser el canal de mayor identidad respecto a la secuencia de TOK1 reportado hasta el momento, abarcando los cruces de transmembrana 2 (S2) hasta 8 (S8) incluidos los dos dominios de poro en tándem. (Villarreal, 2018).

9.2 Análisis bioinformático de TOK1 y homólogos.

Para verificar la presencia de regiones de similitud de la secuencia biológica en nucleótidos del canal TOK1 en *homo sapiens* se empleó la plataforma NCBI apartado GenBank Overview como base de datos y nucleotide BLAST como herramienta bioinformática de alineamiento local.

De igual forma, se realizó una búsqueda de canales pertenecientes a la familia de genes *KCNK* presentes en *homo sapiens*. La familia *KCNK* codifican canales selectivos de potasio con dos dominios de poro y cuatros segmentos transmembranales altamente regulados, presentes en su mayoría en el sistema nervioso y sistema muscular (Goldstein et al., 2001). La búsqueda se centró en células de interés: mama y cáncer de mama, así como el recuento de cisteínas, aminoácidos con especial relevancia en la sensibilidad a la toxina K1. La alineación fue mediante el empleo de secuencias de aminoácidos y los programas Aling Uniprot, COBALT-NCBI Y Jaview.

9.3 Cultivo celular.

Para el presente experimento se empleó la línea celular MCF-7; MCF-12F (*Michigan Cancer Foundation* clona 7 y clona 12) y HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*, experimento número 293), esta última como cultivo control.

Las líneas celulares Michigan Cancer Foundation son células ductales procedentes de tejido mamario. La línea celular MCF-7 fue adquirida de una mujer caucásica de 69 años de edad mediante una biopsia de neoplasia maligna de tipo adenocarcinoma metastásico epitelial (Número de catálogo ATCC HBT-22, RRID: CVCL_0031). La línea celular MCF-12F fue obtenida de una mujer caucásica de 60 años de edad nulípara mediante una mamoplastia de reducción de tejido epitelial no tumorigénico. La mujer presentaba enfermedad fibroquística de mama que contenía áreas focales de hiperplasia intraductal (número de catálogo ATCC CRL-10783, RRID: CVCL_3745).

Respecto a la línea celular HEK-293, es una línea celular transformada. Procede de un riñón embrionario humano producto de un aborto espontáneo que, posterior al evento fue transformada por la exposición a fragmentos de DNA de adenovirus tipo 5 con el objetivo de producir virus y ciertas proteínas (número de catálogo ATCC CRL-1573; RRID: CVCL 0045).

El cultivo celular fue mediante de acuerdo al manual ATCC. El medio de cultivo fue DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) alto en glucosa y piruvato marca GIBCO formulado por ATCC (número de catálogo 30-2002) suplementado con SBF (Suero Fetal Bovino) al 10% marca GIBCO, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomina. Los parámetros de cultivo fueron: CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C en cajas de 60 mm para cultivos madre marca NEST (Saldaña C ,2009).

El proceso de mantenimiento de las líneas celulares fue el siguiente:

1. Se retiró y desechó el medio DMEM mediante aspiración de la caja que contenían la línea celular.
2. Se realizó un lavado de la capa celular mediante dos fases: la primera, la adición de 1mL de solución de Verseno marca GIBCO (contenido en mM: 136 NaCl, 2 KCl, 8 Na₂HPO₄; 1 KH₂PO₄; 0.6 EDTA) a la caja de cultivo y dejándolo reposar por un periodo de 1 minuto seguido a la aspiración del mismo. La segunda fase fue realizada en la adición de 300 µL de tripsina marca GIBCO seguido de una incubación de 3 minutos en una temperatura de 37°C en conjunto con una disgregación mecánica por medio de un pipeteo repetitivo y continuo.
3. Para la inactivación de la digestión enzimática generada por la tripsina, se adicionó los mL necesarios restantes de medio DMEM para un volumen total de 3 ml.

Se observaron las células bajo un microscopio invertido para asegurar la dispersión homogénea de la monocapa celular.

presentó un sitio único para la enzima de restricción *NotI* y conservó el sitio múltiple de clonación (Swanson et al., 1990).

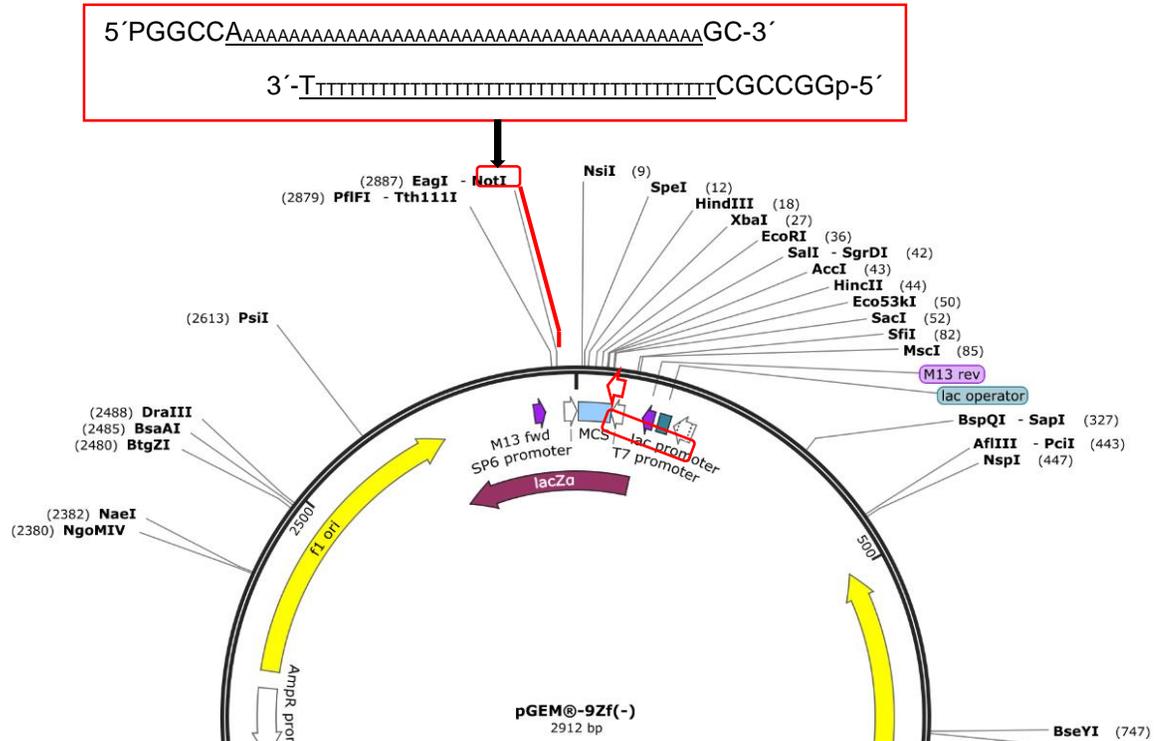


Figura 9. Plásmido pGEMA. Ediciones moleculares dirigidas: adición de una cola de poli-adeninas en los oligonucleótidos (5'pGGCCA₄₀GC-3' y 3'-T₄₀CGCCGGp-5'), cebadores con región de reconocimiento en el sitio *NotI*.

Posterior al diseño del plásmido pGEMA éste fue empleado en la clonación del inserto TOK1, canal rectificador saliente selectivo a potasio. Para ello se diseñaron oligonucleótidos adicionales de cada primer para la construcción de los sitios de resticion de las enzimas: *SalI*, *BamHI* y *BglII*, *HindIII* te (5'-GCCACCGAAGCTTAGATCTGCTTCGGGTGTTTGTATATCAAAGTGTC-3' y 5' -GCCACCGGTTCGACGGATCCATGACAAGGTTTCATGAACAGC-3') incluidas en el gen TOK1. La amplificación y clonación del gen fue dirigido en los sitios de *SalI* y *HindIII* (figura 10). La construcción resultante se denominó pGEMA TOK1 (Ketchum et al., 1995).

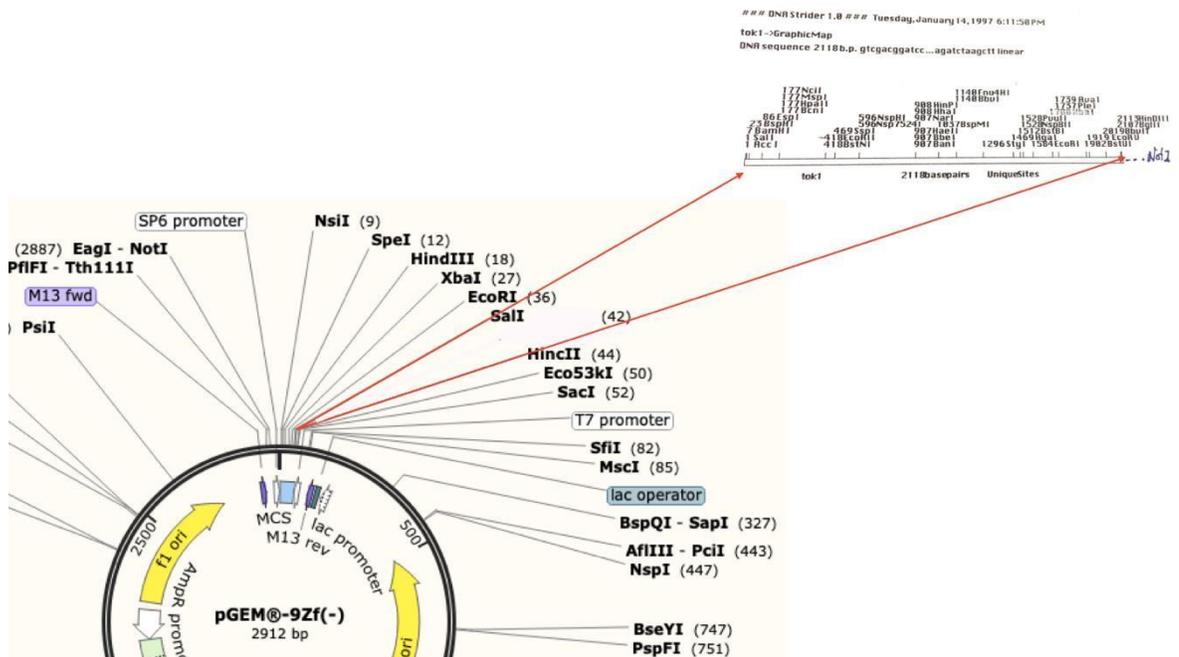


Figura 10. Plásmido pGEMA TOK1. Amplificación y clonación del inserto de interés: gen del canal TOK1 así como los sitios de restricción de las enzimas SalI, BamHI y BglII, HindIII te (5'-GCCACCGAAGCTTAGATCTGCTTCGGGTGTTTGTATATCAAAGTGTC-3' y 5' -GCCACCGTTCGACGGATCCATGACAAGGTTTCATGAACAGC-3'). Los sitios dirigidos de clonación fueron en SalI y HindIII. La secuenciación total de la construcción pGEMA TOK1 generó el resultante de una identidad total a la secuencia de nucleótidos correspondientes al canal TOK1 (procedente del ORFJ0911; NCBI, National Center for Biotechnology Information).

La construcción de TOK1 A y TOK1 B procedió de la mutagénesis del canal TOK1. Con el objetivo comprender la contribución de los dominios de poro (2P) en las propiedades funcionales del canal y mediante su división y expresión por separado de sus dos dominios de poro en tándem (2P) se originaron las estructuras: TOK1 A conformada por 6 segmentos transmembrana (TM) y un dominio de poro; TOK1 B con 2 segmentos transmembrana (TM) y un dominio de poro. Los primers empleados fueron 5'-AGGTCCAAATCG **T A G A TCT** ATTATATGGAT-3' y 5'-ATCCATATAA **T A G A TCT** ACGATTGGACCT-3' directo e inverso, respectivamente. En el primer directo, las bases resaltadas en negritas indican los nucleótidos remplazados, en cursiva se muestra los nucleótidos de término mientras que, en el formato de cursiva se señala el sitio de restricción *BglII*. La amplificación

de los extremos 5´- y 3´ de las construcciones empleo cebadores universales y su clonación fue dirigida en los sitios *Bam*HI y *Bgl*II en el vector pGEMA (Saldaña C, 2002).

Partiendo de los plásmidos: pGEMA TOK1 (donación amablemente realizada por la Dra. Karen Ketchum); pGEMA TOK1 A y TOK1 B (otorgados por el Dr. Carlos Saldaña) se diseñaron las construcciones empleadas en el desarrollo de la presente tesis utilizando el vector pcDNA3 EGFP.

El vector pcDNA3-EGFP (figura 11) fue solicitado a la marca Addgene (número de catálogo 13031) proporcionado por el Dr. Doug Golenbock, Universidad de Massachusetts. Su donación fue en medio LB_{amp}-agar para su posterior almacenamiento en una cámara de congelación a -70°C de temperatura.

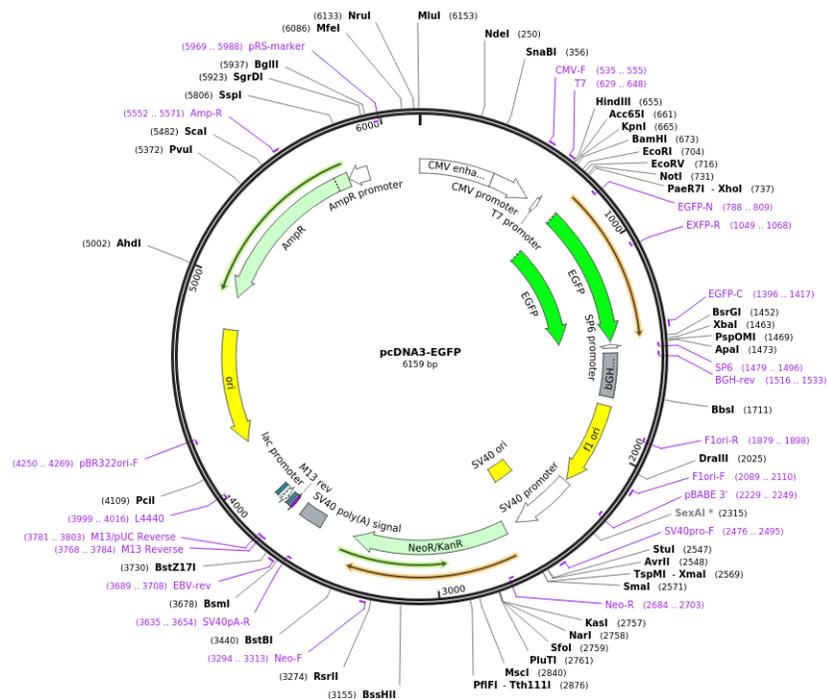


Figura 11. Vector pcDNA 3 EGFP. Vector de expresión en células de mamífero (6159 pb).

9.5 Pre-cultivo de bacterias competente *Escherichia coli* C2925H.

Con la finalidad de una correcta transfección se realizó un pre-cultivo empleando la cepa *E.coli* C2925H, células competentes deficientes en metil-transferasa que

permiten el crecimiento de plásmidos sin metilación *Dam* y *Dcm*, las cuales a su vez generan una producción de resguardo. A partir de un cultivo madre conservado en DMSO (Di-metil-sulfóxido) y en condiciones estériles se tomó una alícuota de células de 50 μ L y se suspendieron en 5 mL de medio LB líquido (Luria-Bertani; pectona, vitaminas B, cloruro de calcio, extracto de levadura) líquido sin antibióticos. Posterior a ello se realizó el crecimiento de cultivo durante un rango de 12-16 horas a 37°C en agitación en 200-225 rpm (Revoluciones por minuto).

9.6 Transformación de células competentes por choque térmico.

Para la transformación bacteriana de la cepa de *E.coli* C2925H se emplearon los plásmidos pGEMA (3015 pb) con los insertos: canal TOK1 (2100 pb), TOK1 A (~1100 pb), TOK1 B (~1150 pb) respectivamente separados y el plásmido pcDNA 3-EGFP.

Previo a la transformación se consideró el cálculo de la proporcionalidad de 50 ng de DNA plasmídico por μ L de células competentes evitando así una dilución alta que comprometiera la concentración del plásmido y con ende la eficacia de transformación.

Se transfirió 100 μ L de suspensión de células competentes en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 2 μ L de DNA plasmídico (no mayor a 50 ng) suspendidos en agua estéril. El choque térmico se realizó en tres fases: la primera, se mezcló el contenido suavemente en forma circular y se incubaron los tubos en un contenedor con hielo por un periodo de tiempo de 30 minutos; segunda fase: se expusieron los tubos Eppendorf a una temperatura de 42 °C por medio de un baño con agua en movimiento e incubó por 2 minutos evitando crear agitación; en la tercera fase, los contenidos de los tubos Eppendorf se trasladaron nuevamente al contenedor con hielo durante 2 minutos. Posterior al choque térmico se le adiciono a cada tubo Eppendorf 1mL de medio líquido LB s/AMP (ampicilina) e incubo a una temperatura de 37°C por un periodo de 25 minutos en agitación. La incubación en medio sin ampicilina (AMP) permitió la recuperación bacteriana y expresión del gen β -lactamasa, antibióticos codificados por el plásmido que confiere resistencia a la

ampicilina. Concluido el tiempo, se centrifugo a 14 rmp por 10 minutos y se decantó el excedente sobre papel absorbente estéril. La centrifugación permitió aislar las bacterias *E.coli* C2925H del medio de manera mecánica.

9.7 Determinación de bacterias transformantes.

El plaqueo de bacterias se realizó posterior y de manera inmediata a la centrifugación y decantación del proceso de choque térmico. Se tomó biomasa de células por medio de asadas previamente esterilizadas por flama y se sembró en placas de medio solido de LB/ AMP / IPTG/X-GAL haciendo con ello la siembra con perlas de vidrio asegurando así, una distribución uniforme y el mayor cuidado de las células. Se incubó por un lapso de 24 horas a una temperatura de 37°C seguido de colocar las células en refrigeración a 4°C para evitar crecimiento de células satélite. La determinación de eficacia de trasformación se llevó mediante conteo de colonias en medio selectivo.

9.8 Purificación de DNA del plásmido por lisis alcalina.

Para el aislamiento y purificación del DNA procedente de los vectores pGEMA TOK1, pGEMA TOK1 A, pGEMA TOK1 B y pcDNA3 EGFP se empleó el protocolo de “Purification of plasmid DNA by precipitation with Polyethylene Glycol” (Sambrook & Russell, 2006). Se inoculó alícuotas de bacterias *E. transformadas*, cada una correspondiente a un vector y se re suspendieron en 25 mL de agua destilada estéril (0.1 mg/mL) en matraces (EM) de 500 mL. La toma de bacterias fue por medio de asa bacteriológica flameada al mechero. Se cultivaron 16-18 horas en 20 mL de medio LB/AMP a una temperatura de 37°C a una velocidad de 150 rpm.

Tras el crecimiento celular los cultivos celulares se transfirieron a tubos falcón de 50 mL y por medio de centrifugación a una velocidad máxima de 7500 rpm, temperatura de 4°C durante 10 minutos se separaron y recolectaron las células decantando el sobrenadante en papel absorbente estéril.

Los pellets de bacterias se re suspendieron en medio LB/AMP restante utilizando vórtex durante 10 segundos, cuidando no dañar las células y con ello causar

contaminación de DNA cromosomal. Después de homogenizar el contenido se le añadieron a cada tubo falcón 2 mL de solución 1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8.0) para generar una lisis celular y se llevaron nuevamente al vórtex por un periodo de 15 segundos. Se incubo a temperatura de 37°C por durante 5 minutos.

Transcurrido el lapso de incubación se agregó a cada tubo 4 mL de solución 2 un buffer de lisis preparado al momento (NaOH 0.2 M, dodecil sulfato de sodio [SDS] 1%). Se mezclaron rápidamente invirtiendo los tubos de 5 a 6 veces hasta lograr un contenido claro y se incubo por un periodo en un baño con hielo por un periodo de 5 minutos.

Para la precipitación de restos celulares se añadieron 3 mL de solución 3 (60 mL acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético, 28 mL de H₂O). Se mezcló de manera homogénea el contenido por inversión del tubo y se incubo por 5 minutos a una temperatura de 37°C. Los tubos se centrifugaron a una velocidad máxima de 9000 rpm por un lapso de 5 minutos a una temperatura de 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Falcón de 15 mL uno por cada sobrenadante mediante el pipeteo evitando así aspirar la película flotante de material desnaturalizado.

La recuperación de los DNA plasmídicos se realizó por precipitado agregando 5.4 mL de isopropanol (0.6 vol.) a los sobrenadantes e invirtiendo los tubos para una mezcla homogénea. Se incubo a una temperatura de 37°C por 10 minutos; transcurrido el lapso de tiempo se centrifugaron a una velocidad máxima de 9000 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4°C y se eliminó los sobrenadantes.

En el lavado del material plasmídico para el retiro de isopropanol se realizó añadiendo a cada pellet 5 mL de etanol al 75% a una temperatura de 37°C y en reposo por 5 minutos para posteriormente centrifugar a 9000 rpm por un tiempo de 3 minutos a una temperatura de 4 ° C. Se eliminó el sobrenadante de cada tubo Falcón mediante un pipeteo cuidadoso.

La re suspensión de cada pellet en 1 mL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) proporciono un ambiente para reacción de RNAasa. Al momento de re suspender se consideró realizarlo en un ambiente iluminado para verificar la ausencia de burbujas en el pipeteo puesto que, su presencia podría ocasionar daño al DNA del plásmido. El contenido de cada tubo Falcón se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL, uno por cada plásmido.

Para la digestión de RNA, se adicono a cada tubo Eppendorf 2 μ L de RNAasa (10 mg/mL de RNAasa libre de DNAasa) y se incubaron a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo establecido, se realizó un precipitado al agregar 1 mL de PEG al 13% en NaCl 1.6 M; se mezcló por inversión de tubos y se dejaron reposar por 15 minutos a una temperatura de 37°C. Posterior a ello, se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos.

Para el último lavado de los pellets y con ello la eliminación del sobrenadante, se les adiconó 1 mL de etanol al 75% para su re suspensión asegurando adiconar el etanol por la pared donde se encontraban los pellets. Se centrifugó cada tubo Eppendorf a 9000 rpm por 1 minuto. Se desecharon los sobrenadantes sobre un papel absorbente estéril y se dejó al aire.

Cada pellet de DNA plasmídico fue rehidratado y recuperado en re suspendido de 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 Mm, EDTA 1mM pH 8.0).

9.9 Observación de la calidad y cuantificación del DNA plasmídico.

Se empleó un espectrofotómetro de UV visible para el análisis en micro volúmenes de las muestras pGEMA-TOK1, pGEMA-TOK1 A, PGEMA-TOK1 B y pcDNA3-EGFP. Se agregó 2 μ L de agua estéril en la superficie óptica para asegurar la limpieza óptica y la estandarización en la lectura. Posterior a ello, se agregó 2 μ L de cada solución de DNA plasmídico en el nanodrop para su cuantificación y relación de calidad.

9.10 Restricción enzimática del DNA plasmídico.

Posterior a la purificación del DNA, el corte enzimático se realizó acorde al protocolo de FastDigest™ restriction enzymes de Thermo Scientific™ (número de catálogo K1991) dirigido a las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I (figura 12). Para la restricción enzimática de cada plásmido (pGEMA: TOK1; TOK1 A; TOK1 B; pcDNA3-EGFP) se preparó un mix de: 1µL de 10X FastDigest™ Green Buffer, 5 µg de DNA plasmídico, 1µL de enzima *Not*I, 1µL de enzima *Bam*HI, 2 µL de agua libre de nucleasas (número de catálogo R0581). La digestión enzimática se realizó en cámara de incubación a 37°C por un periodo de 1 hora. La digestión enzimática linearizó el material genético y proporciono las regiones acordes para dirigir la clonación y marco de lectura.

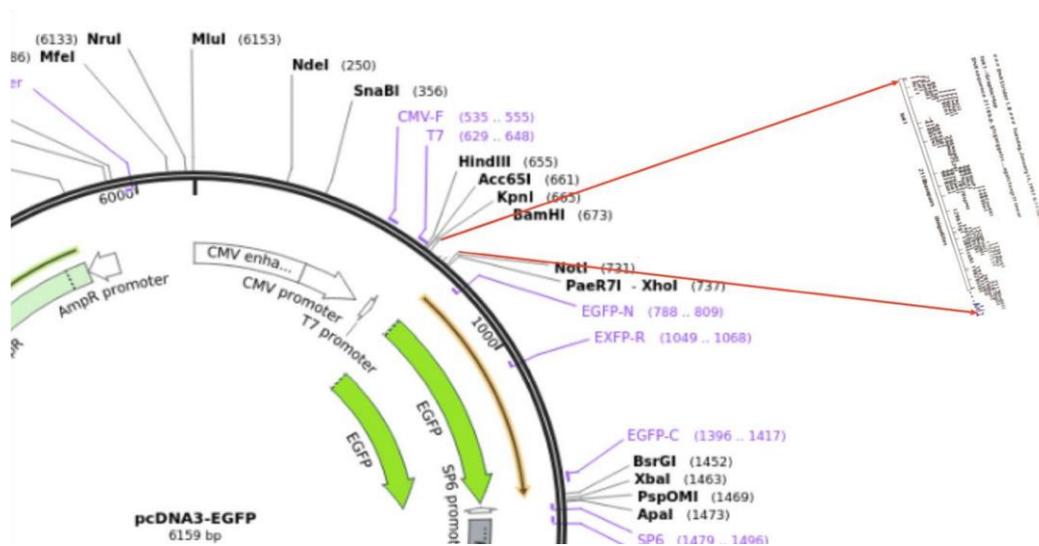


Figura 12. Restricción enzimática del plásmido pc DNA 3-EGFP. En los sitios dirigidos *Bam*HI y *Not*I, mismos sitios dirigidos para el inserto del gen TOK1 las cuales permiten una clonación dirigida.

9.11 Lectura en electroforesis de bandas de DNA digeridos.

La lectura de fragmentos de DNA se realizó en un gel de agarosa al 0.8% previamente preparado. En un matraz de 100 mL se adicionó 60 mL de buffer TEB1X (Tris, Borato, EDTA 0.5 M) y 0.48 gr de agarosa de grado de biología molecular. Se homogenizó la mezcla y se llevó a fundir por medio de calor en el

microondas con pulsos de 30 segundos hasta observar la apariencia translúcida, indicativo de una adecuada disolución. El volumen inicial fue constituido y se vació en un molde de cámara para electroforesis con peines formadores de pozos colocados con anticipación. Al polimerizar el gel se retiraron los peines y se adicionó el buffer TBE Q5X necesario para cubrir en su totalidad el gel. Los pozos fueron cargados en el siguiente orden: el primer pozo se cargó con 3 μ L marcador de peso molecular λ DNA/ Eco RI + Hind III 3 de Thermo Scientific (número de catálogo FD0293), 3 μ L marcador fluorescente y buffer de carga Gel Red SYBER Green, 3 μ L de buffer de carga 6X Loading Dye de Thermo Scientific (número de catálogo R0611), los siguientes pozos fueron cargados con 3 μ L de buffer de carga Gel Red SYBER Green adicionado con 3 μ L de cada DNA plasmídico digerido, cada uno por separado.

El gel se corrió a 120-130 Volts por un periodo de 30 minutos como primera fase en la cual se monitoreó de manera constante la formación de la escalera del marcador de peso molecular y la formación de las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA. Posterior a ello se dejó correr el gel el tiempo suficiente para la formación de bandas separadas y delimitadas de manera correcta lo cual abarcó un tiempo de 45 minutos aproximadamente. En el protocolo de electroforesis fue empleado el transiluminador con luz UV para la mejora de la visualización del marcador fluorescente.

La presencia de una menor concentración del gel facilitó la migración de bandas de los fragmentos de DNA procedentes de la restricción enzimática apoyada por el empleo del buffer TBE Q5X el cual, tiene una menor conductividad en comparativa con otros buffers utilizados y permite utilizar altos voltajes sin aumentar en demasía la temperatura del gel y dañar las muestras.

9.12 Extracción de bandas digeridas de DNA.

La extracción de los fragmentos de DNA procedentes de la restricción enzimática fue realizada mediante el protocolo de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (número de catálogo A9281) procedimiento apto para la recuperación

de fragmentos de DNA de 100 pb a 10 kb en gel de agarosa de bajo punto de fusión en TBE (Tris, Borato, EDTA 0.5 M).

La purificación de DNA se realizó en cuatro fases: la primera fase, preparación previa realizada mediante el empleo del transiluminador con luz UV, el marcador fluorescente y el marcador de peso molecular con los cuales se identificó y cortó las bandas de DNA correspondientes al canal TOK1, TOK1 A, TOK1 B y el plásmido pcDNA3-EGFP digerido del gel de agarosa. Cada banda fue colocada un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente pesado para obtener el peso de cada corte por diferencia. A cada tubo se le añadió 10 μ L de solución “membrane Binding” x 10 mg corte de gel y se colocó en el agitador vórtex hasta homogenizar las mezclas. Una vez logrado una homogenización uniforme se incubaron los tubos Eppendorf a una temperatura de 50°C a 65°C por un lapso de 30 minutos.

La segunda fase fue la unión del DNA a la membrana de adhesión. Esta se realizó mediante dos sets armados (inserción de una mini columna SV a un tubo de tubo de recolección) uno para cada banda de gel. Cada mezcla fue transferida a un tubo de recolección y se incubaron a una temperatura de 37°C por 1 minuto. Posterior a la incubación, se centrifugo a 16,000 rpm x g durante un 1 minuto. Se retiró la mini columna, eliminó el sobrenadante y reinserto la mini columna.

El lavado de la columna, tercera fase del protocolo se realizó mediante la adición de 700 μ L de solución “membrane wash” a cada set de armado. Las mezclas se centrifugaron a 16,000 rpm durante 1 minuto. Se retiró la mini columna, eliminó el sobrenadante y reinserto la columna para posteriormente añadir nuevamente 500 μ L de solución “membrane wash” a cada set; se centrifugo a 16,000 rpm por un lapso de 5 minutos y se eliminó el sobrenadante retirando previamente la mini columna. La fase de lavado finalizó con una última centrifugación a cada set a tapa abierta con una velocidad de 12,000 rpm por 1 minuto lo cual facilito la evaporación del etanol, componente de la solución de “membrane wash”.

La última fase, elución: se llevó a cabo al transferir cada mini columna de los sets a nuevos tubos de Eppendorf de 1.5 mL previamente pesados. En cada tubo se agregaron 50 µL de dH₂O libre de nucleasas y se incubaron por 1 minuto a una temperatura de 37°C. Se centrifugaron a 16,000 rpm x g durante 1 minuto. Las mini columnas fueron desechadas mientras el sobrenadante con el material genético se recuperó y almacenó a una temperatura de -20° C.

9.13 Construcción molecular del vector de transfección pcDNA 3-EGFP- TOK1; TOK1 A; TOK1 B.

La construcción molecular del canal TOK1 y sus segmentos en el vector pcDNA 3-EGFP se realizó mediante el protocolo de Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix de Invitrogen™ (número de catálogo 15535720). El sistema de clonación facilita la ligación de extremos romos y/o cohesivos como el caso del canal TOK1, TOK1 A, TOK1 B y el vector pcDNA 3-EGFP con DNA de doble cadena con extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfatos.

Se preparó un mix en un volumen final de 20 µL en un tubo Eppendorf 1.5 mL de capacidad; el orden de adición fue el siguiente: 2.5 µL de master mix (T4 DNA Buffer ligasa 10X, DNA ligasa T4); 5µL de vector pcDNA 3-EGFP (77 ng DNA); 10 µL de los insertos (79 ng DNA); 2.5 µL dH₂O libre de nucleasas. El mix se mezcló de manera homogénea a través de un pipeteo cuidadoso seguido de un pulso en la micro centrífuga. Se incubó a una temperatura de 27° C por un periodo de 30 minutos. La mezcla de reacción de ligadura fue almacenada a una temperatura de un rango de 0 °C a -4° C.

9.14 Transfección transitoria en células de mamífero.

La transfección se realizó mediante el empleo del plásmido citomegalovirus pcDNA3-EGFP y el método de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.25 M y HBS 2X (Hilliard, 1996) en las líneas celulares MCF-7, MCF-12F y HEK-293.

El vector pcDNA3-EGFP representa un método eficaz para el suministro de genes a células de mamífero, facilitando la velocidad transfección y la expresión de manera

estable. El vector contiene secuencias en su origen de replicación episomal SV40 (*Simian virus 40*) el cual ofrece seguridad y facilidad de la expresión de genes así como una tasa alta de replicación en líneas celulares (Chen, 2014). En relación al promotor citomegalovirus (CMV) contenido en el mismo permite una expresión de alto nivel mientras la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y secuencia de finalización otorga mayor estabilidad al ARNm en la célula a transfectar (Elegheert et al., 2018).

Por su parte el método de cloruro de calcio (CaCl_2) 0.25M y HEPES 2X es un método de transfección seguro y eficaz ante la comparativa de otros como la electroporación. Mediante la generación de precipitados por atracción de cargas entre el material genético y las sales de calcio permite la endocitosis del material protegiéndolo así de las endonucleasas. Es apto para transfecciones transitorias y su variabilidad es mínima ante cambios leves como el pH, temperatura y concentraciones de tapón (Kingston et al., 2001; Kovtun et al., 2009)

La transfección se realizó en vidrios de 1.1 cm² colocados en cajas de 12 multi-pozos marca Falcón® de poliestireno no tratado, fondo plano, capacidad máxima de 4 mL, densidad celular 0.4×10^6 / pocillo. La siembra de las líneas celulares se realizó sobre el vidrio a una confluencia al 50%: línea celular MCF-7 a partir de una siembra de 0.8×10^6 células; línea celular MCF-12F con una siembra inicial de 0.06×10^6 células, ambas contenidas en 100 µL de medio DMEM. El crecimiento celular fue bajo los parámetros de laboratorio: CO₂ 5%, temperatura de 37°C, 12 horas de cultivo.

Posterior al lapso de crecimiento, el medio de cultivo fue sustituido por medio DMEM modificado (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, suplementado al 5% con Suero Fetal Bovino libre de antibióticos) y se incubó nuevamente por un transcurso de 12 horas. La finalidad de la disminución del suministro de SFB fue para la sincronización y retención de los cultivos celulares en la fase G₀ previa a la síntesis de DNA.

La preparación de precipitados de transfección se realizó en tubos Eppendorf de 1.5 mL utilizando diversas concentraciones de material genético: 0.5 µg, 1.0 µg, 2.0 µg y 5.0 µg de DNA (pcDNA 3-EGFP; pcDNA 3-EGFP TOK1; pcDNA 3-EGFP TOK1 A; pcDNA 3-EGFP TOK1 B). El orden de incorporación de reactivos fue el siguiente: X µL DNA, 0.01 mL de CaCl₂ (0.25 mM) adicionado en gota. Las mezclas se homogenizaron en el agitador vórtex por un lapso de 10 segundos y seguido de un reposo por un lapso de 15 segundos para facilitar la formación de agregados. Posterior al tiempo de espera, nuevamente los tubos Eppendorf se colocaron en el agitador vórtex y en movimiento de las mezclas se adiciono 0.01 mL de HEPES 2X de manera lenta en goteo, se incubo por un lapso de 10 minutos y aforó a 0.1 mL con medio DMEM modificado. Una vez obtenido las mezclas de transfección se agregaron al cultivo (previamente aspirado para el retiro de medio de cultivo) en forma de goteo cuidando el movimiento de la placa de siembra al momento de homogenizar. Los cultivos se incubaron por un periodo de 16-20 horas en condiciones de laboratorio: CO₂ 5%, temperatura 37°C. Concluido la incubación el medio de cultivo fue retirado y reemplazado por medio DMEM fresco en el mismo volumen. La observación de las células y con ello la espectrometría de fluorescencia del reportero GFP se realizó en los rangos de excitación de 395 nm esperando emisión de 508 nm y excitación de 475 nm con una espera de emisión de 503 nm mediante el microscopio MVX10, equipo destinado al procesamiento de imágenes macro fluorescentes enfocadas en áreas de estudio de la expresión genética y función proteica a nivel celular y/o niveles complejos como tejidos, órganos y organismos a las 48 horas posteriores a la transfección. (Shimomura, 2009).

Para el análisis y la discriminación de la viabilidad celular se emplearon dos tinciones: DAPI (4', 6 -diamidino-2-fenilindol) de Invitrogen™ (número de catálogo: D1306) en una concentración de 0.05-0.2 µg/mL y PHALLOIDIN de invitrogen™ (número de catálogo A34055). Estos marcadores en cultivos fijos o transitorios permiten a través de la tinción de pares de Adenina-Tiamina del DNA cromosómica-nuclear (DAPI) o la unión a los filamentos de F-actina (PHALLOIDIN) fluorescencia

evaluar tanto la estructura del cultivo como la fase celular. De igual forma, al no requerir un paso de lavado final y ser compatible con la mayoría de marcadores representa un punto clave ya que no agregar tiempo extra de incubación y manipulación del cultivo así como generar toxicidad posterior a la transfección lo cual, en muchos de los experimentos crear un ruido de fondo y puede ser un sesgo al momento de evaluar la transfección transitoria. El reactivo DAPI presenta una excitación en longitudes de onda de 345 a 358 nm y un máximo de emisión de 455 a 461 nm mientras PHALLOIDIN presenta excitación a una onda de 555 nm y una emisión de 565 nm.

Las imágenes obtenidas por el microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axioscope 5 fueron analizadas con el software Image J.

Los experimentos exitosos detectados fueron fijados en solución de 4.0% glutaraldehído diluido en PBS 1X a temperatura de 37°C por un lapso de 15 minutos. La eliminación del fijador se realizó por lavado triple con PBS 1X.

La observación de las preparaciones se realizó mediante contraste de los cultivos celulares. Las estructuras celulares fueron teñidas empleando DAPI (diamidino-2-fenolindol; marca Fisher Scientific, número de catálogo 10116287) colorante altamente puro no permeable con unión específica en núcleo y DNA orgánular en las bases A-T en surcos menores de DNA de doble cadena; su detección fluorescente es en la región azul del espectro de luz; PHALLOIDIN colorante (marca Fisher Scientific, número de catálogo 10063052) conjugado fluorescente de un péptido bicíclico producido como toxina en el hongo *Amanita phalloides* el cual, presenta una selectividad de unión a filamentos de f-actina presente en citoesqueleto y la combinación con el colorante fluorescente rojo anaranjado tetrametilrodamina (TRITC).

El contraste de muestras fue en el orden siguiente: se permeabilizaron las muestra con preparaciones de 0.1% Triton X-100 (TX-100) en PBS 1X seguido de por un lavado triple con PBS 1X. Posterior a la formación de micro canales o poros

temporales en las membranas celulares por el agente químico TX-100 se añadieron 100 μL de la preparación de sondas fluorescentes (5.0 μL de DAPI $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI diluido en 94 μL PBS; 1.0 μL Phalloidine-TRIC 400X) por un periodo de 15 minutos de incubación. Al término del lapso de tiempo, se retiró la solución y se realizó un lavado tripe con PBS 1X con la finalidad de eliminar el excedente.

Para el montaje de las muestras teñidas se les fue añadida 3 μL de DAPCO (polivinil alcohol) como medio de montaje. Se cubrió sobre un porta objetos con vidrio, prestando especial atención en evitar o eliminar burbujas de aire y nivelando las irregularidades de superficies; por último se sellaron con barniz. Las preparaciones se almacenaron en el refrigerador hasta su observación y captura de imágenes por medio del microscopio MVX10. Las imágenes fueron analizadas con el software Imagen J.

9.15 Obtención de la toxina *K1* de la cepa 42300 para ensayos de viabilidad celular.

La obtención de la toxina *K1* de la cepa *Killer* 42300 se realizó mediante tres fases: la primera, se inoculo en un matraz 3 mL cepa saturada fresca K^{ill+} en 20 mL medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*; extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) a un pH 4.5 b bajo parámetros de laboratorio (incubación de 18 a 24 horas, temperatura de 28 °C, agitación a 130 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

La segunda fase consto en un crecimiento en Medio inductor (MI). Posterior al alcance del pico máximo de crecimiento, se recolecto y transfirió la biomasa generada a un matraz con 5 mL de Medio Inductor, relación de 20-30 mg/mL para su crecimiento por un periodo de 12-16 horas a una temperatura de 28°C y una agitación constante de 150 rpm. Al termino de la incubación, se centrifugó el cultivo y recolecto el sobrenadante, medio de contención de la toxina *K1*.

La filtración de la toxina y con ello su uso en cultivos celulares de mamifero marco la tercera fase. El sobrenadante producto del crecimiento en medio inductor y el cual

contenía la toxina K1 se esterilizó por medio de filtración en jeringa empleando como filtro membranas de Polietersulfona (PES) de 0.45 μm (marca NEST, número de catálogo: 380211) dentro de una cámara de ventilación.

9.16 Determinación de la viabilidad del cultivo MCF-7.

Los ensayos sobre la actividad de la toxina se realizaron en el cultivo de la línea celular de mamífero MCF-7 no transfectada con la finalidad de evaluar la sensibilidad de este frente a la toxina sin un blanco molecular presente.

La viabilidad celular y salud celular fue determinada mediante el protocolo de Alamar Blue de Thermo Fisher (Número de catálogo DAL1025). El protocolo es empleado para bioensayo de citosinas, el análisis cuantitativo de la proliferación y crecimiento celular, la viabilidad celular así como determinaciones de citotoxicidad *in vitro*. Su uso es confiable y ha sido establecido de manera segura para diversas líneas celulares: animal y humana, así como diversos organismos: hongos, bacterias y plantas. El fundamento del protocolo es basado en el monitoreo del ambiente reductor de las células metabólicamente activas.

En el ensayo de viabilidad celular el reactivo Alamar Blue monitorea el entorno reductor de células vivas mediante su principio activo, la resazurina. La resazurina (conocido también como azoresorcina; resazoína; diazo-resorcinol; nombre IUPAC: 7-hidroxy-10-oxidofenoxazin-10-ium-one) es un activo no tóxico, hidrosoluble, permeable en las membranas plasmáticas celulares y estable en los medios de cultivo. En su forma oxidada presenta un color azul no fluorescente que posteriormente al estar en contacto con las células, al atravesar su membrana plasmática y participar como aceptor intermedio en la cadena transportadora de electrones (e^-) se reduce a resorufina, compuesto de color índigo altamente fluorescente. La reducción del activo está generada por las reductasas mitocondriales, diaforasas, flavina reductasas y NAD (P) H: quinona reductasa enzimas presentes a nivel mitocondrial y del citoplasma. La reducción de resazurina no interrumpe la transferencia normal de los electrones, por lo cual la reducción de compuesto determina un deterioro del metabolito celular y más que uno en la

cadena respiratoria. El análisis de los resultados a partir del protocolo de Alamar Blue puede ser cualitativo, como un cambio visible de color en la placa que indican la presencia o ausencia de células viables o bien cuantitativo dado por lecturas colorimétricas o de fluorescencia en longitud de ondas de excitación de 530-560 nm y longitud de onda de emisión de 590 nm en un espectrofotómetro Varioskan (Rampersad, 2012)

El ensayo utilizó una caja de 96 pozos para la línea celular. En cada pocillo se colocó 100 µL de medio de cultivo DMEM y diversas concentraciones de toxina filtrada (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0 µL) y 10% de Alamar Blue; los controles fueron Capsaicina (CAP), Tapsigargina 1mM (TG), Triton 100 (Tx), vehículo.

Las mediciones se realizaron por medio de señales de fluorescencia registrando sus lecturas en un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific, LUX multimode reader) a una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y una longitud de onda de 590 nm de emisión. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la intensidad de fluorescencia *versus* las concentraciones de toxina *Killer 1* y se expresaron en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UFA) mediante un análisis de correlación lineal.

9.17 Desecho de residuos biológicos.

Los residuos biológicos generados a lo largo de desarrollo de la investigación fueron primeramente inactivados por el tratamiento con hipoclorito de sodio y posteriormente recolectados y eliminados en contenedores de desecho. En cuanto al material de plástico fue inactivado por tratamiento con hipoclorito de sodio seguido de su desecho es bolas de plástico RPBI de color rojo calibre 20 certificadas por la NOM-087. El material de vidrio de igual forma se trató con hipoclorito de sodio seguido de un lavado con sal sódica o potásica para su posterior esterilizado por el uso de la autoclave. Todo proceso se realizó mediante la aplicación de protocolos de seguridad establecidos por parte de la Universidad autónoma de Querétaro y la Unidad de Proteogenómica de la UNAM, campus Juriquilla.

X. RESULTADOS.

10.1 Modelamiento estructural del canal TOK1p.

Para un mejor entendimiento de la posible conformación espacial del canal TOK1p se realizó un modelamiento por minimización empleando la secuencia del canal *TREK 1* como modelo guía. En la figura 13 se presenta el modelo de predicción del canal TOK1 y la estructura cristalográfica del canal *TREK 1* (PDB 4TWK).

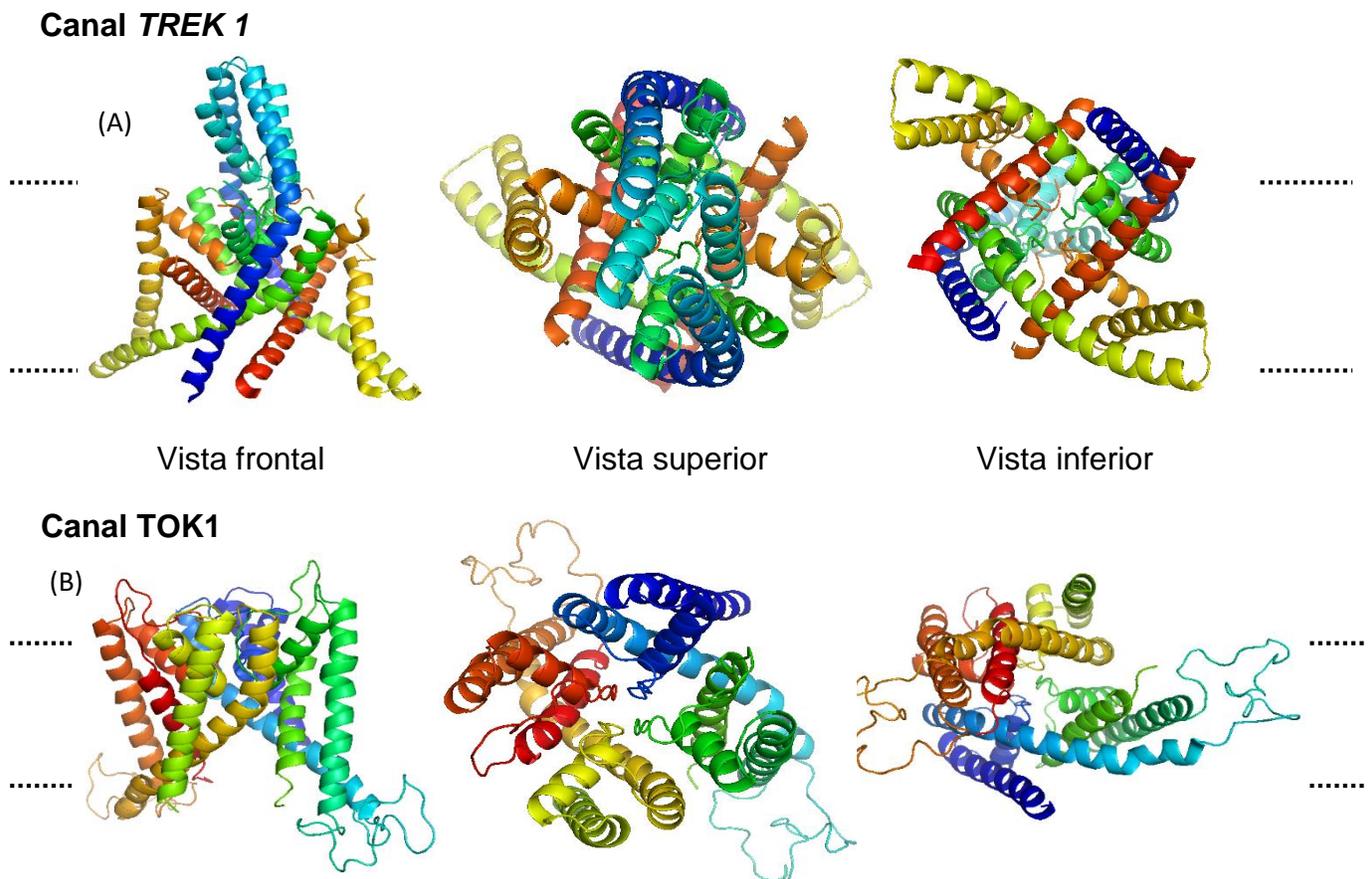


Figura 13. Modelamiento estructural del canal TOK1p. Estructura cristalográfica del canal *TREK 1* procedente del organismo *Homo sapiens* (A); Modelo de predicción *in silico* del canal TOK1p presente en *S.cerevisiae* (B). En líneas punteadas se delimita los planos de la membrana plasmática. Estructuras modificadas en PyMol V0.99

10.2 Homólogos del canal TOK1 en *Homo sapiens*.

En la figura 14 se muestran regiones homólogas y de similitud de la secuencia del canal TOK1 en el organismo *Homo sapiens*. Se empleó la base de datos NCBI para la obtención de secuencias en formato FASTA y nucleotide BLAST como herramienta bioinformática de alineación local. Los resultados verifican la existencia de similitud entre el canal de estudio TOK1 selectivo a potasio presente en la levadura *S.cerevisiae* y el organismo de interés *Homo sapiens*.

The screenshot displays the NCBI BLAST search results interface. At the top, the NIH logo and 'National Library of Medicine' are visible. The search parameters are: BLAST® » blastn suite » results for RID-4TMVZPDP013. The search criteria include: Job Title: ref|NC_001142.9|, RID: 4TMVZPDP013, Program: Citation, Database: nt, Query ID: NC_001142.9, Description: Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome X, compl ..., Molecule type: dna, and Query Length: 2076. A 'Filter Results' box is present with fields for Percent Identity, E value, and Query Coverage, and buttons for 'Filter' and 'Reset'. A yellow warning banner at the bottom states: 'No significant similarity found. For reasons why, click here'.

Figura 14. Regiones de similitud del canal TOK1. Se muestra la presencia de regiones de similitud de la secuencia biológica de nucleótidos del canal TOK1 en el organismo *Homo sapiens*.

Del mismo modo, mediante las plataformas PubMed y NCBI apartado GenBank se realizó la búsqueda de canales selectivos de potasio presentes en la patología de cáncer en *Homo sapiens* mostrados en la tabla 2.

Expresión de canales de la familia KCNK como marcadores en diversos carcinomas en homo sapiens.			
Gen.	Canal.	Nivel de expresión.	Carcinoma.
KCNK-2	TREK-1	↑	Cáncer de ovario epitelial.
		↓	Cáncer hepatocelular.
KCNK-9	TASK-3	↓	Cáncer hepatocelular.
		↑	Melanoma. Cáncer de mama.
KCNK-15	TASK-5	↓	Cáncer hepatocelular.
KCNK-17	TASK-4	↓	Cáncer hepatocelular.
KCNK-18	TRESK	↑	Cáncer oral de células escamosas.

Tabla 2. Canales de la familia *KCNK*. Canales pertenecientes a la familia de genes *KCNK* los cuales presentan dos dominios de poro y cuatros segmentos transmembranales. Se reporta una sobre y/o sub expresión en diversos canceres.

10.3 Alineamiento de canales de potasio: *TOK1-TASK3*.

Con el objetivo de verificar la presencia de regiones conservadas y de similitud del canal TOK1 *versus* los canales expresados en cáncer de mama se realizó un alineamiento global mostrado en la figura 15.

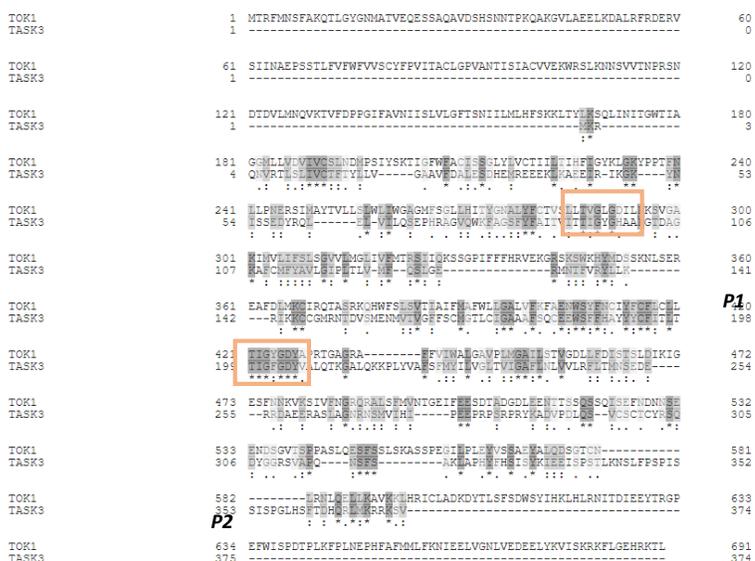


Figura 15. Alineamiento global: TOK1, TASK 3. Se muestra el análisis entre secuencias procedente de canales de potasio realizado para determinar las regiones de identidad y similitud. Mediante caracteres se indican: identidad exacta de residuos en dicha posición (*); sustituciones conservativas similares (:); sustituciones menos conservativas (.). Los caracteres coinciden con la escala en grises, la cual indica el nivel de similitud de mayor grado proporcional a mayor saturación de color. Enmarcado se muestra las firmas de selectividad de regiones de poro (**TXGXGD**) de ambos canales. Ambos canales muestran un 24.62 % de identidad.

10.4 Modelamiento del canal TOK1 *versus* TASK 3

Con la finalidad de evaluar la similitud estructural del canal TOK1p respecto al canal *TASK 3* presente en una alta expresión en célula cancer de mamá, se realizó la comparativa del modelamiento de ambos canales mostrados en la figura 16.

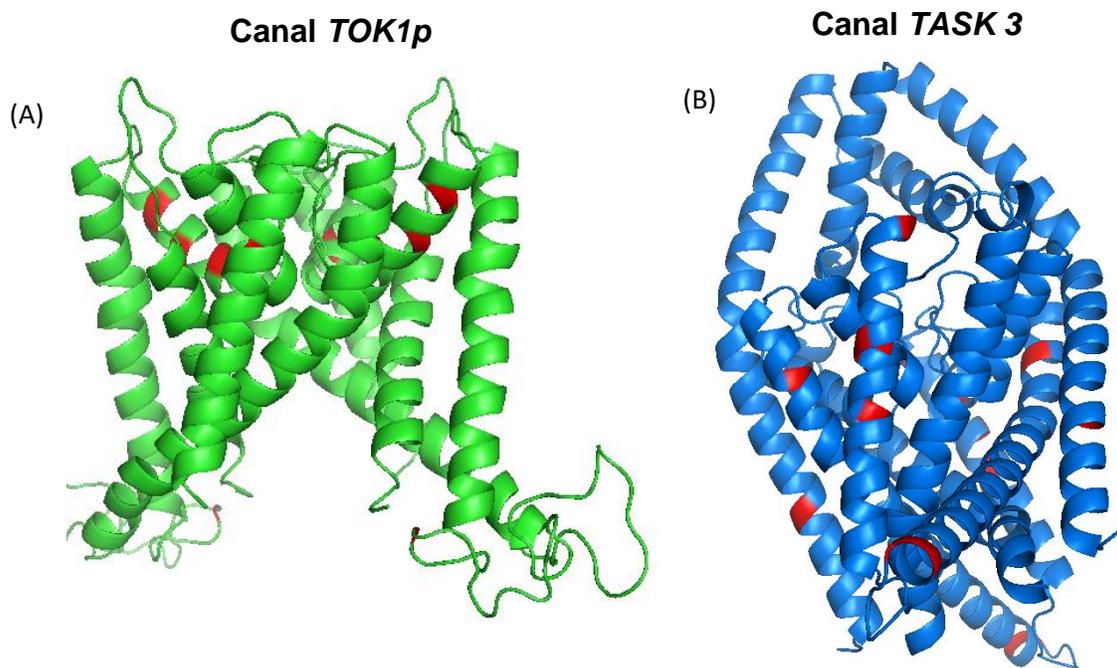


Figura 16. Modelaje de canales selectivos a potasio. Modelo *in silico* del canal TOK1p, resaltado en color rojo los residuos de las 13 cisteínas (Cys) presentes en sus estructuras (A). Modelo de predicción del canal TASK 3 (modelo 6rv2.1. A; 75% de identidad) mostrando en color rojo los residuos de las 11 cisteínas presentes su estructura (B). Los canales presentan un 24.62 % de identidad en sus secuencias. Los modelos fueron representados es estructuras secundarias; generados en SWISS-MODEL y visualizados en PyMol.

10.5 Transfección transitoria del canal TOK1p, TOK1 A, TOK1 B en células de mamífero.

El inicio de la caracterización del sistema *Killer* procedente de levaduras *K^{ll+}* tuvo lugar mediante la expresión heteróloga de uno de sus componentes: el canal TOK1p en células de mamífero de manera transitoria. La transfección del canal así como sus segmentos se muestran en la figura 17, panel segmentado por cada línea celular posterior a las 48 horas posteriores a la transfección.

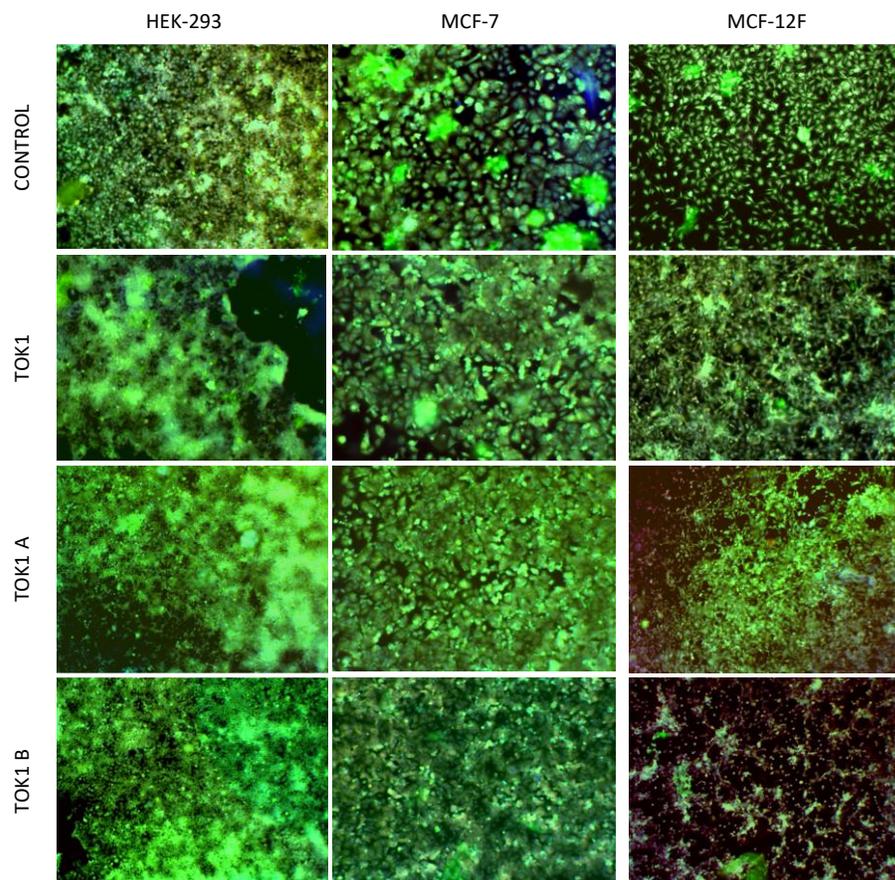


Figura 17 . Expresión heteróloga del canal TOK1p. El panel de imágenes muestra la transfección transitoria de las líneas celulares MCF-7 y MCF-12F mediante el vector pcDNA3-EGFP con el inserto TOK1p y sus segmentos TOK1 A y TOK1 B, como control se empleó la línea celular HEK-293. La transfección se observó por medio del reportero GFP y los marcadores DAPI y PHALLOIDIN en contraste mediante el microscopio MXV10 y la técnica de espectrometría de fluorescencia. Las imágenes se analizaron con el software Imagen J.

10.6 Viabilidad del cultivo celular MCF-7 frente a la toxina K1.

Con el objetivo de verificar la sensibilidad del cultivo de la línea celular MCF-7 frente a la toxina K1 sin el blanco molecular se realizó un ensayo de viabilidad celular. La elección de esta línea fue determinada por los dos siguientes criterios: la línea celular MCF-7 crea un ambiente ácido mediante un pH bajo, característica presente en los carcinomas y elemento clave en el efecto *Killer* de la toxina K1 de *S. cerevisiae* ya que sea registrado que se ve potencializado por un medio ácido. Ahora bien, si bien la finalidad del proyecto es el estudio del sistema y establecer las bases de su comprensión se plantea a largo plazo que el conocimiento generado sea empleado como base de posibles terapias biomédicas dirigidas con un blanco molecular y con ello uno de las posibles aplicaciones sea el tratamiento de cáncer de mama.

En la figura 18 se muestra la viabilidad celular del cultivo celular MCF-7 expresada en UFA (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia) frente a diversos volúmenes de la toxina K1 suspendida en el vehículo (μL) así como la comparación con respecto a capsaicina- CAP ($20 \mu\text{M}$), Tapsigargina-TG (0.01M) y Triton-Tx ($1.0, 0.5\%$) como controles.

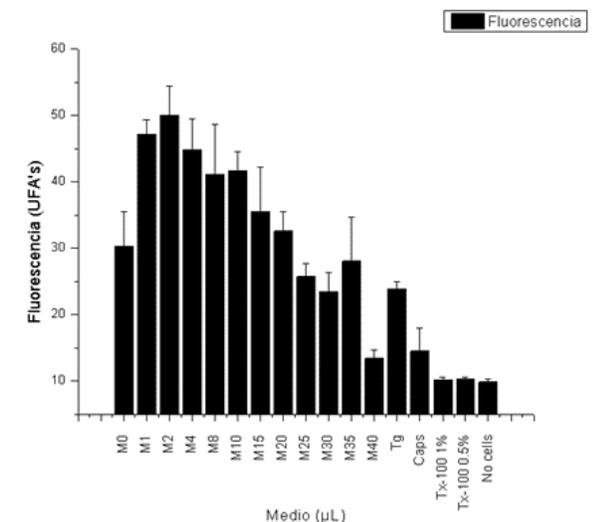


Figura 18. Viabilidad celular de la línea MCF-7. Fluorescencia emitida por el cultivo celular en respuesta de la presencia de diferentes volúmenes de la toxina K1 contenida en vehículo (0, 1, 2, 4,

8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 μ L). Como controles se presenta capsaicina- CAP (20 μ M), Tapsigargina-TG (0.01M) y Triton-Tx (1.0, 0.5%). Se registra la disminución de la fluorescencia conforme aumenta la concentración del vehículo con o sin presencia de toxina. Grafica elaborada mediante el software GraphPad Prism; ajuste de valores mediante el valor promedio de los pozos únicamente con medio, modelo estadístico: regresión logística de 4 parámetros.

XI. DISCUSIÓN.

En la actualidad los microorganismos han tomado protagonismo en numerosos sectores de la actividad humana abarcando desde el control biológico de fitopatógenos, la elaboración de productos alimenticios hasta su uso como agentes terapéuticos.

La levadura *S.cerevisiae* no es la excepción; gracias a sus capacidades altamente competitivas como lo es el sistema *Killer* presente en ejemplares denominados *Killer yeast* ha logrado centrar la atención para su estudio a través de la investigación (Magliani et al., 1997a; Schmitt 2002).

El sistema *Killer* pese a su primera observación en 1963 e identificación como un sistema de supervivencia por medio de la aniquilación en 1997 hasta el momento no se ha determinado la comprensión del mecanismo en su totalidad (de la Pena et al., 1981; Magliani et al., 1997b). Con ende a lo anterior, en el presente proyecto se logró la expresión de manera transitoria de uno de sus componentes claves: el blanco molecular, el canal TOK1. Nuestra principal finalidad fue estudiarle de manera aislada eliminando con ello factores intrínsecos propios del organismo innato.

De inicio, se realizó un modelamiento predictivo *in sillico* del canal TOK1 de *S. cerevisiae* empleando como molde el canal TREK 1, logrando así una mejor comprensión estructural del mismo. El canal TREK 1 es un canal de la familia *KCNK* conformado con 4 cruces transmembranales y 2 regiones de poro en tándem (K2P).

A pesar que el canal TREK 1 procede de *Homo sapiens* (células musculares y nerviosas mayormente) y no pertenecer a la misma familia que el canal TOK1p,

existen un alto grado de similitud entre ambos canales (Villarreal, 2018). Contrario a lo que se podría inferir de una evidentemente diferencial, nuestro grupo de trabajo ha identificado y reportado una identidad alta entre ambas secuencias, la cual abarca los cruces transmembranales de los mismos incluyendo los dominios de poro. Este hallazgo respalda la evidencia de que los canales de potasio conservan dominios funcionales a través de la evolución.

La estructura cristalográfica del canal *TREK 1* aseguró una predicción acertada de la posible conformación estructural del canal TOK1p. Semejanzas observadas en ambos modelos en especial en la región de poro de selectividad corroboran el modelo mostrado en la figura 13. Las secuencias empleadas para el análisis bioinformático se encuentran en el anexo 1.

Si bien el objetivo del proyecto fue el estudio del blanco molecular del sistema *Killer* de manera aislada, a largo plazo el equipo de trabajo ha propuesto como vertiente el estudio de un posible tratamiento biotecnológico mediado en por un blanco molecular frente a la toxina en células de cancer, claramente en una proyección a largo plazo. Por lo anterior, se realizó una búsqueda de homólogos del canal TOK1p en *Homo sapiens* para descartar la existencia un posible blanco del efecto de la toxina. Como resultado se obtuvo la ausencia de alguna estructura que comparta alguna similitud con el canal (figura 14).

De manera más detallada, la búsqueda fue extendida a identificar los diversos canales pertenecientes a la familia KCNK en células cancerígenas. Los canales K2P, comparten dominios conservados con respecto al canal TOK1p y basado en esto se realizó el análisis de aquellos presentes en diversos cancers, así como la identificación del nivel de expresión. Los resultados fueron condesados en la tabla 2.

El análisis proporcionó el identificar la presencia del canal TASK 3 en células de carcinoma de mama la cuales son células de especial interés en el proyecto. El canal se encuentra en una sobre expresión y evidencia sugiere ser un factor

presente de desregulación del ciclo celular con un efecto sobre la inactivación de apoptosis celular, cambio ya bien identificado en los carcinomas para evitar su senescencia (Mu et al., 2003; Dookeran, Zhang, Stayner, & Argos, 2017; Skaar et al., 2021) .

A través de un alineamiento global de secuencias (figura 15) entre los canales TOK1-TASK 3 se observó un 24.62% identidad y a pesar de la baja identidad se pudo observar que en ambos existe conservación de las regiones de poro de selectividad (**TXGXGD**). De igual forma, el gran número de residuos de Cisteínas (Cys) destacó y coincidió en ambos canales, siendo el canal TOK1p con 13 residuos y TASK 3 con 11 residuos.

La presencia de cisteínas en el canal TOK1p, sobre todo aquellas cercanas a los poros de selectividad se han relacionado como un posible factor intermediario del efecto de la toxina *K1*. En el grupo de trabajo se plantea la posible hipótesis que una vez que la toxina es secretada hacia el medio extracelular y procede a ser su efecto *Killer*, esta se disocia en sus dos subunidades α y β para así forman puentes disulfuro con los residuos de cisteína cercanos en el poro de selectividad presentes en el canal, causar una despolarización de la membrana y salida en descontrol de moléculas de iones de potasio, ATP entre otras moléculas de vital importancia.

En un intento por localizar en un plano espacial los residuos de cisteína de ambos canales se realizó un modelamiento estructural con la identificación de color para los residuos de cisteínas (figura 16). En ambos modelos se observan cisteínas cercanas al poro de selectividad, sin embargo, es necesario mayor profundidad en su estudio para establecer la relación debido a que experimentos realizados en el laboratorio ha demostrado la presencia de cisteínas en diversos organismos sensibles a la toxina son en un número reducido o nulo (Polonelli et al., 1983) .

Una posible hipótesis a discutir es la presencia de algunos aminoácidos con los cuales la toxina *K1* pudiera establecer nuevos puentes disulfuro entre el canal TOK1p. Los aminoácidos: fenilalanina, Tirosina y triptófano pertenecientes al grupo

aromático apolares son capaces formar puentes disulfuros a través sus electrones π localizados en su anillo aromático y los cuales actúan como nucleófilos (átomo de O nucleófilo) en cercanía al grupo sulfhidrilo de azufre de una cisteína y ambos son capaces de establecer puentes disulfuro por la interacción electrófilo-nucleófilo covalente diferente al establecido entre dos cisteínas, en donde por una reacción de oxidación reversible entre los grupos sulfhidrilo (SH) perteneciente genera una cistina, molécula con un enlace disulfuro relacionado con la estabilización de la proteína (Marques et al, 2010). A pesar de esto, es necesario mayor diseño análisis bioinformático seguido de experimentación *in vitro*.

Ahora bien, en el presente proyecto se presenta por primera vez la expresión heteróloga de uno componente del sistema *Killer* encontrado en levadura a células procedentes de un humano. La mayor evidencia hasta el momento relacionado a la expresión heteróloga es escasa y se dispone en organismos de la misma especie regularmente procariontes. Esto conlleva a una limitación en el estudio de proteínas complejas como las procedentes de organismos eucariontes, debido a su elaborado ensamble y plegamiento. Aunado a esto, la respuesta del organismo o propiedades del objetivo una vez transfectado y expresado se ve comprometido (Chapple & Dyson, 2021).

La transfección transitoria del canal TOK1p así como sus segmentos TOK1 A y TOK1 B se realizó en líneas celulares MCF-7, MCF-12F y HEK-293 (esta última como línea control) mediante el vector de transfección pcDNA 3-EGFP y el método de cloruro de calcio. Los resultados observados en la figura 17 describen una eficacia alta de transfección en las diversas construcciones (vector-canal; vector-segmentos) así como para el control (vector sin inserto). Acorde a la expresión del reportero GFP de manera general en las tres líneas celulares se generan las siguientes afirmaciones: el vector pcDNA-3EGFP no representa ser tóxico para las líneas celulares de mamífero; el método empleado para la transfección celular resulta viable, no invasivo y eficaz para los tres cultivos celulares.

La eficacia de una transfección mediante vectores plasmídicos está relacionada con el método empleado y su factibilidad, la ventana de tiempo en la espera de la expresión, el blanco molecular, así como la línea celular.

Dentro de nuestro proyecto fue la adecuada selección del vector compatible con nuestras diversas líneas celulares. El vector pcDNA 3-EGFP es un vector con un sitio de origen (Ori) de alto número de copias, control relajado de replicación y sus procesos de replicación no están sujetos a proteínas de iniciación procedentes de la célula huésped. De igual forma su promotor de múltiples sitios de clonación (MCS) asegura la clonación del DNA apoyado con la presencia de la secuencia de Kozakla, la cual aumenta las características de expresión (Guo et al, 2000)

Por otra parte, el método de cloruro de calcio resulta ser un método eficaz para casi todo tipo de líneas celulares en comparativa con otros como lipofección o micro inyección los cuales no son realizables a un alto grado de selectividad espacial además de ser invasivos, aumenta la probabilidad de contaminación logrando daño celular y baja eficacia, así como poco especificidad espacial y temporal (Hilliard et al., 1996; Kingston et al., 2001).

Como complementariedad a nuestro análisis las células se tiñeron con los colorantes DAPI y PHALLOIDIN. El colorante DAPI es un marcador del núcleo celular tanto de células vivas como muertas, están últimas fijadas. Su marcaje esta dado a la unión del DNA de doble hélice específicamente con afinidad a las bases nitrogenadas Adenina y Timina en el surco menor mientras a nivel plasmático deja poco fondo. Con relaciona lo anterior, nuestros cultivos celulares indican una alta viabilidad celular posterior a la transfección denotado por el alto grado de coloración lo cual puede deducirse que al menos el material genético de DNA se encuentra integro pues no existe fragmentos del mismo o segmentación nuclear (Anexo 3). Ahora bien, el marcador DAPI presenta afinidad al RNA pero esto no representa un sesgo en los resultados debido a que, el mayor grado de emisión para RNA es de 500 nm (onda no registrada en la fluorescencia de cultivos) y la intensidad de unión es solo de ~20 % mientras que, para el DNA la emisión de fluorescencia aumenta

~20 veces dando un azul brillante. Al ser un colorante indólico presenta una mayor sensibilidad al DNA. Para asegurar que el colorante fuera permeable a la membrana plasmática la concentración del mismo fue mayor debido a que presenta poca permeabilidad en células vivas en cantidades pequeñas de adicción (Kapuscinski, 1995; Banerjee & Pal, 2008).

Con respecto al colorante PHALLOIDIN es un marcador selectivo a filamentos de F-actina presentes en el citoesqueleto de las células fijadas o no y resulta impermeable en membranas celulares integra. En la observación de la tinción fluorescente posterior a la inserción selectiva del vector pcDNA 3-EGFP se observa tinción de filamentos de actina. Este resultado procedería de un daño a la membrana para así permitir la permeabilidad del colorante, sin embargo, al contrastar con un núcleo integro reportado por el colorante DAPI se puede deducir que el método de transfección resulta de igual forma factible para transferir marcadores fluorescentes como lo fue en este caso puesto que la transfección fue en continuidad con la tinción de un color rojo intenso que la tinción de actina filamentosa demuestra la dinámica del citoesqueleto en las células vivas y con ello la integridad de la célula. Por lo anterior se puede asumir la presencia de viabilidad y salud celular en el método de transfección (Pospich et al, 2020; Gao & Nakamura, 2022)

La expresión de los segmentos TOK1 A y TOK1 B generados por mutación dirigida del canal TOK1 y con ello la creación de dos proteínas (biogénesis) no presentes en la naturaleza fue con el objetivo de evaluar si era viable la expresión de manera segmentada. Al ser viable, la premisa que ahora surge para el estudio es, evaluar si los segmentos se comportan diferente como lo reporta C. Saldaña y colaboradores en el 2002 al expresar por separado cada segmento (TOK1 A, 6 cruces transmembranales, 1 dominio de poro; TOK1 B, 2 cruces transmembranales, 1 dominio de poro) y presentar una selectividad baja al potasio, una rectificación entrante y una conformación tetramérica y no un dimérico como lo es el canal TOK1p (Saldaña et al., 2002)

Para el estudio de la sensibilidad del cultivo de la línea celular MCF-7 frente a la toxina *K1* sin el blanco molecular se realizó un ensayo de viabilidad celular. Mediante la exposición a diversas concentraciones de la toxina suspendida en el sobrenadante se estudió si la línea celular presentaba respuesta a la toxina en ausencia del canal TOK1p. En la figura 18 se observa que el vehículo más la toxina si ejerce un efecto tóxico en las células y el cual compromete la viabilidad celular y es proporcional conforme se aumenta el volumen. El mismo efecto es observable en presencia del vehículo con lo cual se puede inferir que posiblemente el efecto *Killer* sea por toxicidad o choque osmótico.

La viabilidad no es comparable con la ejercida en los controles: Capsaicina-CAP la cual ocasiona la muerte celular por medio de receptores de potenciales transitorios (TRPV) unidos a Capsaicina provocando daño mitocondrial que a su vez liberan calcio de reservorios y citocromo C e induce actividad pro apoptótica; taspigargina-TG, inhibidor competitivo de la Ca²⁺ ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA), evento el cual induce a un aumento de la concentración de calcio en el citosol adjunto al bloqueo del bombeo del excedente a reservorios, generando estrés del retículo y muerte celular. Respecto al tritón su efecto de muerte celular es mediante su uso como emulsificante de membranas y desintegración de proteínas.

XII. CONCLUSIONES

Es evidente de que los organismos compartimos similitudes de dominios conservados a lo largo de la evolución como es el caso de la firma de selección de poro presente en el canal TOK1p y los canales pertenecientes a la familia *KCNK*.

La expresión heteróloga por medio de uso de vectores y cloruro de calcio como reactivo de transfección es un método eficaz, viable y accesible que permite el estudio de elementos de manera aislada pertenecientes a sistemas conservados y altamente competitivos como lo es el *sistema Killer*.

La expresión heteróloga del canal TOK1p y sus segmentos (TOK1 A; TOK1 B) es posible desde un organismo unicelular del cual proceden a un organismo pluricelular.

Se observa comprometida la viabilidad celular de la línea MCF-7 ausentes del blanco molecular en presencia de los diversos volúmenes de toxina K1, lo cual puede ser debido a un efecto tóxico o de choque osmótico presente en el vehículo.

La ciencia básica si bien no conlleva una aplicación inmediata en el campo, es de carácter obligatorio puesto que, otorgar la importancia como piedra angular para toda evidencia que se escale hasta su aplicación. El estudio de organismos vivos, así como el entorno en el que nos desarrollamos y relacionamos debe aplicarse en cualquier rama de especialidad y no conjeturar a que está limitada solo a profesiones que emergen de la rama de la biología. El trabajo multidisciplinar y una simbiosis entre las mismas siempre enriquecerán el conocimiento adquirido.

XIII. PERSPECTIVAS.

- Realizar experimentos *in silico* e *in vitro* para validar similitud entre el canal TOK1p y el canal TASK 3 sobre expresado en cancer de mama con enfoque al poro de selectividad, la presencia de cisteínas así como relación con aminoácidos aromáticos.
- Determinar las propiedades funcionales del canal TOK1, TOK1A, TOK1B segmentos del canal en células de mamífero con respecto a la presencia de la toxina K1.
- Estandarizar y valorar el efecto osmótico del vehículo en el cual se encuentra la toxina K1 sobre la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto de diversos pH de entornos celulares sobre la sensibilidad y acción de la toxina K1.
- Realizar estudios comparativos del reconocimiento de la toxina K1 frente la expresión del canal TASK 3 en células de cancer de mama.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L., & Goldstein, S. A. N. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, 99(3), 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81659-1)
- Alberts, Bruce; Johnson, A; Lewis, J; Morgan, D; Raff, M; Roberts, k; Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed.; Garland Science, Ed.). New York.
- Alijo, R., & Ramos, J. (1993). Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1179(2), 224–228. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(93\)90145-F](https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90145-F)
- Ariño, J., Aydar, E., Drulhe, S., Ganser, D., Jorrín, J., Kahm, M., ... Sychrová, H. (2014). Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: the translucent contribution. *Advances in Microbial Physiology*, 64, 1–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800143-1.00001-4>
- Aydin, H., Azimi, F. C., Cook, J. D., & Lee, J. E. (2012). A convenient and general expression platform for the production of secreted proteins from human cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (65). <https://doi.org/10.3791/4041>
- Backus, K. M. (2019). Applications of reactive cysteine profiling. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 420, pp. 375–417). https://doi.org/10.1007/82_2018_120
- Banerjee, D., & Pal, S. K. (2008). Dynamics in the DNA recognition by DAPI: exploration of the various binding modes. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(3), 1016–1021. <https://doi.org/10.1021/JP077090F>
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., & Slayman, C. L. (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *Journal of Membrane Biology*, 162(1), 67–80. <https://doi.org/10.1007/s002329900343>

- Bertl, Adam, Slayman, C. L., & Gradmann, D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Membrane Biology*, 132(3), 183–199. <https://doi.org/10.1007/BF00235737>
- Bevan, E. A., and M. M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. XIth Int. Congr. Genet.* 1, 202–203. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=9653841&pid=S0001-3714199900030001200001&lng=en
- Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., & Bussey, H. (1990). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *Journal of Cell Biology*, 110(5), 1833–1843. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.5.1833>
- Bostian, K. A., Sturgeon, J. A., & Tipper, D. J. (1980). Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: Dependence of M on L. *Journal of Bacteriology*, 143(1), 463–470. <https://doi.org/10.1128/jb.143.1.463-470.1980>
- Bostian, Keith A., Elliott, Q., Bussey, H., Bum, V., Smith, A. I., & Tipper, D. J. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: Multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*, 36(3), 741–751. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90354-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90354-4)
- Breinig, F., Tipper, D. J., & Schmitt, M. J. (2002a). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*, 108(3), 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00634-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00634-7)
- Breinig, F., Tipper, D. J., & Schmitt, M. J. (2002b). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*, 108(3), 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00634-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00634-7)
- Bruenn, J. A. (1991). Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 19(2), 217–226. <https://doi.org/10.1093/nar/19.2.217>

- Buck, K. W., and S. A. G. (1991). *Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (R. I. B. Francki, C. M. Fauquet, D. L. Knudson, & F. Brown, Eds.).
<https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9163-7>
- Buckholz, R. G., & Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology*, 9(11), 1067–1072.
<https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>
- Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Molecular Microbiology*, 5(10), 2339–2343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02079.x>
- Bussey, H., Boone, C., Zhu, H., Vernet, T., Whiteway, M., & Thomas, D. Y. (1990, February). Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia*, Vol. 46, pp. 193–200.
<https://doi.org/10.1007/BF02027313>
- Canadell, D., & Ariño, J. (2016). Interactions between monovalent cations and nutrient homeostasis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 892, pp. 271–289). https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_11
- Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S., & Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *Journal of Cell Biology*, 138(5), 975–985. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.5.975>
- Chapple, S. D., & Dyson, M. R. (2021). High-Throughput Expression Screening in Mammalian Suspension Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2199, 117–125. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_7
- Chen, R., & Yushan, Z. (2014). SV40 promoter+SV40 PolyA.
- Clark, G. C., Casewell, N. R., Elliott, C. T., Harvey, A. L., Jamieson, A. G., Strong, P. N., & Turner, A. D. (2019, April 1). Friends or Foes? Emerging Impacts of

- Biological Toxins. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 44, pp. 365–379.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.004>
- Comitini, F., Di Pietro, N., Zacchi, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004).
Kluyveromyces phaffii killer toxin active against wine spoilage yeasts:
Purification and characterization. *Microbiology*, 150(8), 2535–2541.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27145-0>
- Crabtree, H. G. (1928). The carbohydrate metabolism of certain pathological
overgrowths. *Biochemical Journal*, 22(5), 1289–1298.
<https://doi.org/10.1042/bj0221289>
- de la Pena, P., Barros, F., Gascon, S., Lazo, P. S., & Ramos, S. (1981). Effect of
yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of
Biological Chemistry*, 256(20), 10420–10425. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)68636-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)68636-9)
- Dinman, J. D., Icho, T., & Wickner, R. B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a
double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein.
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America*, 88(1), 174–178. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.1.174>
- Dookeran, K. A., Zhang, W., Stayner, L., & Argos, M. (2017). Associations of two-
pore domain potassium channels and triple negative breast cancer subtype in
The Cancer Genome Atlas: systematic evaluation of gene expression and
methylation. *BMC Research Notes*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-017-2777-4>
- Elegheert, J., Behiels, E., Bishop, B., Scott, S., Woolley, R. E., Griffiths, S. C., ...
Aricescu, A. R. (2018). Lentiviral transduction of mammalian cells for fast,
scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nature
Protocols*, 13(12), 2991–3017. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0075-9>
- Esteban, R., & Wickner, R. B. (1986). Three Different M1 RNA-Containing Viruslike

Particle Types in *Saccharomyces cerevisiae* : In Vitro M1 Double-Stranded RNA Synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 6(5), 1552–1561.

Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & Garcia-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1258, 1–24.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>

Ganter, P. F., Starmer, W. T., Lachance, M. A., & Phaff, H. J. (1986). Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern arizona: new isolations and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. *Oecologia*, 70(3), 386–392.
<https://doi.org/10.1007/BF00379501>

Gao, J., & Nakamura, F. (2022). Actin-Associated Proteins and Small Molecules Targeting the Actin Cytoskeleton. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS23042118>

Gier, S., Lermen, M., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2019). Substitution of cysteines in the yeast viral killer toxin K1 precursor reveals novel insights in heterodimer formation and immunity. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49621-z>

Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2020). Analysis of Yeast Killer Toxin K1 Precursor Processing via Site-Directed Mutagenesis: Implications for Toxicity and Immunity. *MSphere*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.00979-19>

Giesselmann, E., Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Production of fluorescent and cytotoxic K28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/S12934-017-0844-0/TABLES/3>

Goldstein, S. A. N., Bockenbauer, D., O'Kelly, I., & Zilberberg, N. (2001).

Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits.

Nature Reviews. Neuroscience, 2(3), 175–184.

<https://doi.org/10.1038/35058574>

Goto, Kimiyasu, Iwase, T., Kichise, K., Kitano, K., Totuka, A., Obata, T., & Hara, S.

(1990). Isolation and Properties of a Chromosome-dependent KHR Killer

Toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*,

54(2), 505–509. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.505>

Goto, Kuniyasu, Fukuda, H., Kichise, K., Kitano, K., & Hara, S. (1991). Cloning and

Nucleotide Sequence of the KHS Killer Gene of *Saccharomyces cerevisiae*.

Agricultural and Biological Chemistry, 55(8), 1953–1958.

<https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.1953>

Goto, Kuniyasu, Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T., & Kara, S. (1990). Cloning and

Nucleotide Sequence of the KHR Killer Gene of *Saccharomyces cerevisiae*.

Agricultural and Biological Chemistry, 54(4), 979–984.

<https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.979>

Grillberger, L., Kreil, T. R., Nasr, S., & Reiter, M. (2009). Emerging trends in

plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal*, Vol. 4, pp. 186–201.

<https://doi.org/10.1002/biot.200800241>

Guo, L., Liu, T., & Yang, J. (2000). [Expression of eukaryotic expression plasmid

pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP in mammalian cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi*

Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of

Stomatology, 18(6), 412–415. Retrieved from

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12539474/>

Heintel, T., Zagorc, T., & Schmitt, M. J. (2001). Expression, processing and high

- level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s002530100633>
- Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal*, 22(2), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85489-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85489-7)
- Hilliard, C. M., Fletcher, S., & Yeoh, G. C. T. (1996). Calcium phosphate transfection and cell-specific expression of heterologous genes in primary fetal rat hepatocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(6), 639–650. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(96\)00007-6](https://doi.org/10.1016/1357-2725(96)00007-6)
- Jane Lombardi, S., De Leonardis, A., Lustrato, G., Testa, B., & Iorizzo, M. (2016). Yeast Autolysis in Sparkling Wine Aging: Use of Killer and Sensitive *Saccharomyces cerevisiae* Strains in Co-Culture. *Recent Patents on Biotechnology*, 9(3), 223–230. <https://doi.org/10.2174/1872208310666160414102015>
- K A Ketchum, W. J. J. et al. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. 376(6542), 690–695. <https://doi.org/10.1038/376690a0>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., & Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542), 690–695. <https://doi.org/10.1038/376690a0>
- Kingston, R. E., Chen, C. A., & Okayama, H. (2001). Calcium phosphate transfection. *Current Protocols in Immunology, Chapter 10*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM1013S31>

- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and killer yeasts. In *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology* (pp. 229–275). https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9
- Kovtun, A., Heumann, R., & Epple, M. (2009). Calcium phosphate nanoparticles for the transfection of cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19(2–3), 241–247. <https://doi.org/10.3233/BME-2009-0586>
- Kyoung, S. H., Seo, I. K., Seong, I. C., & Seong, B. L. (2005). N-Glycosylation of secretion enhancer peptide as influencing factor for the secretion of target proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.089>
- Lee, D. S., Kim, Y. C., Kwon, S. J., Ryu, C. M., & Park, O. K. (2017). The arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase crk36 regulates immunity through interaction with the cytoplasmic kinase BIK1. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01856>
- Lee, J., Choi, S. Il, Jang, J. S., Jang, K., Moon, J. W., Bae, C. S., ... Seong, B. L. (1999). Novel secretion system of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using an N-terminus residue of human IL-1 β as secretion enhancer. *Biotechnology Progress*, 15(5), 884–890. <https://doi.org/10.1021/bp9900918>
- Liu, G. L., Chi, Z., Wang, G. Y., Wang, Z. P., Li, Y., & Chi, Z. M. (2015, June 1). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 35, pp. 222–234. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>
- Liu, M., Weiss, M. A., Arunagiri, A., Yong, J., Rege, N., Sun, J., ... Arvan, P. (2018, September). Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Vol. 20, pp. 28–50. <https://doi.org/10.1111/dom.13378>

- Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M., & Spencer-Martins, I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1165–1167. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.1165-1167.1997>
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997a). 1997 *Magliani*. 10(3), 1–32. Retrieved from papers2://publication/uuid/62B58F7E-B92D-4F27-93A1-8D4ABD243219
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997b). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 10, pp. 369–400. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.369>
- Makower, M., & Bevan, E. A. (1963). The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, 1, 202.
- Marques, J. R. F., da Fonseca, R. R., Drury, B., & Melo, A. (2010). Amino acid patterns around disulfide bonds. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4673–4686. <https://doi.org/10.3390/IJMS11114673>
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. M. (2002a). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. M. (2002b, May 29). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, Vol. 5, pp. 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
- Martin-Eauclaire, M. F., & Bougis, P. E. (2012). Potassium channels blockers from the venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Journal of Toxicology*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/103608>
- Mayer, J. P., Zhang, F., & DiMarchi, R. D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers*, 88(5), 687–713. <https://doi.org/10.1002/BIP.20734>

- Mercier, J., & Wilson, C. I. (1994). Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control*, 4(2), 138–144. <https://doi.org/10.1006/bcon.1994.1022>
- Morace, G., Archibusacci, C., Sestito, M., & Polonelli, L. (1984). Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. *Mycopathologia*, 84(2–3), 81–85. <https://doi.org/10.1007/BF00436517>
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012, October 1). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, Vol. 26, pp. 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Mu, D., Chen, L., Zhang, X., See, L. H., Koch, C. M., Yen, C., ... Powers, S. (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*, 3(3), 297–302. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00054-0)
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588–611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>
- Murray; PatrickK, Rosenthal ;Ken, P. M. (2021). Virología. In Elsevier (Ed.), *Microbiología Médica* (9th ed., p. 868). Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/microbiologia-medica/murray/978-84-9113-808-2>
- Niswender, K. D. (2011). Basal insulin: physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgraduate Medicine*, 123(4), 17–26. <https://doi.org/10.3810/PGM.2011.07.2300>
- Novotná, D., Flegelová, H., & Janderová, B. (2004). Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 803–813.

<https://doi.org/10.1016/J.FEMSYR.2004.04.007>

- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*, 63, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.021>
- Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G., & Hänel, H. (1988). Effect of a Killer Toxin of Yeast on Eucaryotic Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4), 1068–1069. <https://doi.org/10.1128/aem.54.4.1068-1069.1988>
- Pieczynska, M. D., Korona, R., & De Visser, J. A. G. M. (2017). Experimental tests of host–virus coevolution in natural killer yeast strains. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(4), 773–781. <https://doi.org/10.1111/jeb.13044>
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006, April 1). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, Vol. 22, pp. 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., & Morace, G. (1983). Killer system: A simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(5), 774–780. <https://doi.org/10.1128/jcm.17.5.774-780.1983>
- Pospich, S., Merino, F., & Raunser, S. (2020). Structural Effects and Functional Implications of Phalloidin and Jasplakinolide Binding to Actin Filaments. *Structure (London, England : 1993)*, 28(4), 437-449.e5. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2020.01.014>
- Price, W. S., Tsuchiya, F., Suzuki, C., & Arata, Y. (1999). Characterization of the solution properties of *Pichia farinosa* killer toxin using PGSE NMR diffusion measurements. *Journal of Biomolecular NMR*, 13(2), 113–117. <https://doi.org/10.1023/A:1008394716710>
- Ramos, J., Haro, R., Alijo, R., & Rodriguez-Navarro, A. (1992). Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Bacteriology, 174(6), 2025–2027.

<https://doi.org/10.1128/jb.174.6.2025-2027.1992>

Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 12347. <https://doi.org/10.3390/S120912347>

Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1822–1832. <https://doi.org/10.1128/AEM.02501-10>

Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488. <https://doi.org/10.1002/yea.320080602>

Saldaña, C., Naranjo, D., Coria, R., Peña, A., & 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107957200>

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of plasmid DNA by precipitation with polyethylene glycol. *CSH Protocols*, 2006(1), pdb.prot3907. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT3907>

Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>

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

Schmitt, M. J., & Reiter, J. (2008, July). Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1783, pp. 1413–1417.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.017>

Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast*, *8*(5), 373–384. <https://doi.org/10.1002/yea.320080505>

Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., & Goldstein, S. A. N. (2001). Immunity to K1 killer toxin: Internal TOK1 blockade. *Cell*, *105*(5), 637–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00376-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00376-2)

Sheppard, S., & Dikicioglu, D. (2019). Dynamic modelling of the killing mechanism of action by virus-infected yeasts. *Journal of the Royal Society Interface*, *16*(152). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0064>

Shimomura, O. (2009). Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *48*(31), 5590–5602. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200902240>

Skaar, D. A., Dietze, E. C., Alva-Ornelas, J. A., Ann, D., Schones, D. E., Hyslop, T., ... Seewaldt, V. L. (2021). Epigenetic Dysregulation of KCNK9 Imprinting and Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, *13*(23). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13236031>

Skipper, N., Thomas, D. Y., & Lau, P. C. (1984). Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the yeast M1 double-stranded RNA. *The EMBO Journal*, *3*(1), 107–111. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01769.x>

Sleep, D., Belfield, G. P., & Goodey, A. R. (1990). The secretion of human serum albumin from the yeast *saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. *Bio/Technology*, *8*(1), 42–46. <https://doi.org/10.1038/nbt0190-42>

Smith, R. A., Duncan, M. J., & Moir, D. T. (1985). Heterologous protein secretion from yeast. *Science*, *229*(4719), 1219–1224. <https://doi.org/10.1126/science.3939723>

- Somers, J. M., & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetical Research*, 13(1), 71–83.
<https://doi.org/10.1017/S0016672300002743>
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010, July 1). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 109, pp. 13–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A., & Phaff, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(9), 783–796.
<https://doi.org/10.1139/m87-134>
- Suzuki, C., & Nikkuni, S. (1994). The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 3041–3046. Retrieved from
<https://europepmc.org/article/med/8300637>
- Swanson, R., Marshall, J., Smith, J. S., Williams, J. B., Boyle, M. B., Folander, K., ... Kaczmarek, L. K. (1990). Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron*, 4(6), 929–939. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90146-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90146-7)
- Tang, J., Naitow, H., Gardner, N. A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R. B., & Johnson, J. E. (2005). The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G “caps” by a viral capsid protein: A unique viral response to host defense. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 158–168.
<https://doi.org/10.1002/jmr.724>
- Tilocca, B., Balmas, V., Hassan, Z. U., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2019). A proteomic investigation of *Aspergillus carbonarius* exposed to yeast volatilome or to its major component 2-phenylethanol reveals major shifts in fungal metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108265.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108265>

- Tuite, Michael & Oliver, S. (1991). *BIOTECHNOLOGY HANDBOOKS 4*. *Saccharomyces cerevisiae* (1st ed.; S. S. B. M. N. York, Ed.). New York.
- Vakilian, M., Tahamtani, Y., & Ghaedi, K. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene*, 706, 52–61. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.04.063>
- Vališ, K., Mašek, T., Novotná, D., Pospíšek, M., & Janderová, B. (2006). Immunity to killer toxin K1 is connected with the Golgi-to-vacuole protein degradation pathway. *Folia Microbiologica*, 51(3), 196–202. <https://doi.org/10.1007/BF02932122>
- Van Der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, Vol. 59, pp. 304–322. <https://doi.org/10.1128/membr.59.2.304-322.1995>
- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M., Álvarez, M. L., & Ramírez, M. (2016). Using mixed inocula of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiology*, 59, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.006>
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., & Hodgson, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127(3), 213–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x>
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 611–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>
- Wang, W., Chi, Z., Liu, G., Buzdar, M. A., Chi, Z., & Gu, Q. (2009). Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. *BioMetals*, 22(6), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9248-x>

- Wang, X. X., Chi, Z., Peng, Y., Wang, X. H., Ru, S. G., & Chi, Z. M. (2012). Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiological Research*, 167(9), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.12.001>
- Wickner, R. B. (1992). Double-Stranded and Single-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annual Review of Microbiology*, 46(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002023>
- Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 51(1), 115–126.
- Yenush, L. (2016). Potassium and sodium transport in yeast. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 892, pp. 187–228). https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_8
- Yokoyama, S. (2003, February 1). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 7, pp. 39–43. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00019-4)
- Zhu, Y.-S., Zhang, X.-Y., Cartwright, C. P., & Tipper, D. J. (1992). Kex2-dependent processing of yeast K¹ killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Molecular Microbiology*, 6(4), 511–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01496.x>

ANEXOS.

ANEXO 1. Cuadro de identificación de secuencias.

El cuadro muestra las secuencias empleadas para los diversos análisis bioinformáticos del presente proyecto. Se presenta el nombre del microorganismo, la secuencia objetivo y su No. De identificación procedente de la plataforma NCBI.

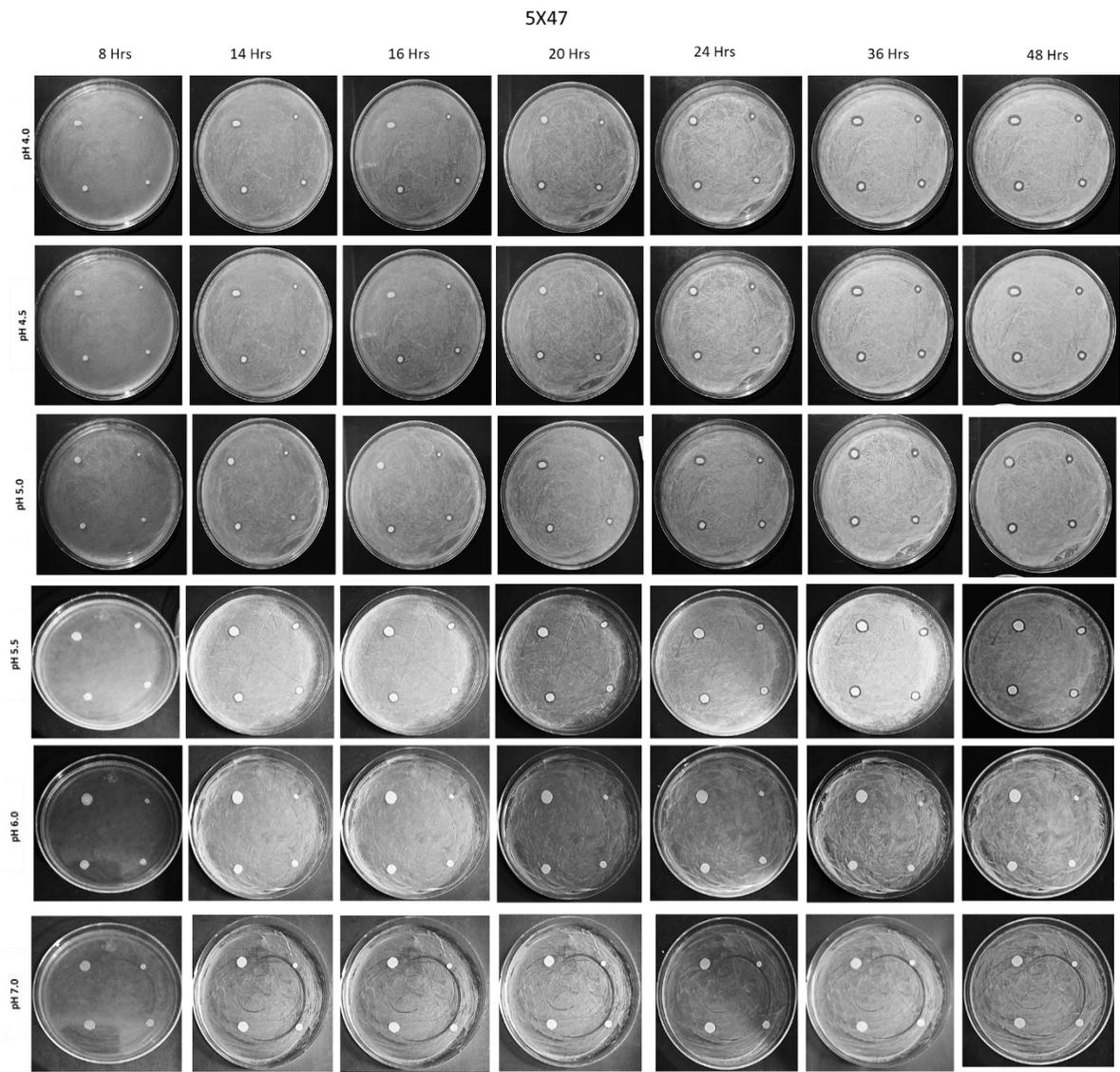
Secuencias empleadas en los análisis bioinformáticos		
Especie	Secuencia	ID
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canal TOK1_nucleotidos	NC_001142.9
	Canal TOK1p	CAA89386.1
<i>Homo sapiens</i>	Canal TASK3	NP_001269463.1
	Canal TREK 1	PDB 4TW

ANEXO 2. Cuadro de microorganismos empleados y su fenotipo.

Levadura			
Cepa	Característica	Fenotipo	Fuente
BY4742	Wilde type	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0	Soledad Funes. Instituto de Fisiología celular. UNAM
Δ TOK1	Resistente	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Tok1 Δ 0	Soledad Funes. Instituto de Fisiología celular. UNAM
5X47	Sensible	MAT α / α his1/+ trp1/+ura3/+ [K10 K20 K280 Klus0]	Dra. Rosa Esteban. Universidad de Salamanca.
42300	Súper <i>Killer</i>	MAT α Ade 2/ +Thr1/+Ski2-1/+ [KIL-K1]	ATCC American Type Culture Collection
Bacteria			
C2925H	Libre de Dam y Dcm metilación.	Ara-14 leuB6 fhuA13 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) tet ^s endA1 rspL136 (Str ^R) dam13::Tn9 (Cam ^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	New England BioLabs Inc.

ANEXO 3. Mosaico de los efectos de la toxina K1.

Botones de levadura 42300 (cepa K^{ill+} productora de la toxina K1) sobre césped de levadura 5x47 (cepa K^{ill-} sensible a la toxina). El efecto de la toxina se observa mediante la aparición de un halo de inhibición de crecimiento alrededor del botón a diversos pH sobre la línea del tiempo (Tomado y modificado del método Kirby-Bauer, 1966). El halo es reportado en mayor diámetro a escala de pH ácidos y el efecto tiende a ser permanente e irreversible, contrario a lo observado en pH básicos.



ANEXO 4. Mosaico de los cultivos celulares.

Apreciación de las estructuras celulares marcadas: verde fluorescente (GFP) indica expresión del canal TOK1p y sus segmentos TOK1 A y TOK1B; azul intenso (DAPI) marca los núcleos celulares; rojo brillante (PHALLOIDIN) marcaje de los filamentos de F-actina. Cada línea celular se encuentra en un mosaico diferente.

