



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Proteínas homólogas del canal *TOK1* de *Saccharomyces cerevisiae*  
en microorganismos patógenos: Su papel como posibles blancos  
moleculares de las toxinas *Killer (K1)*.

Tesis Individual

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

Presenta:

Jessica Gabriela Trujillo Barrientos

Querétaro, Qro.  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología

Proteínas homólogas del canal *TOK1* de *Saccharomyces cerevisiae* en microorganismos patógenos: Su papel como posibles blancos moleculares de las toxinas *Killer (K1)*.

Tesis Individual

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

**Presenta:**

Jessica Gabriela Trujillo Barrientos

**Dirigido por:**

Dr. en IBB. Carlos Saldaña Gutiérrez

**SINODALES**

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez  
Presidente

Firma

Dr. Juan Campos Guillen  
Secretario

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos  
Vocal

Firma

Dra. Verónica Morales Tlalpan  
Suplente

Firma

Dr. Alfredo Varela Echavarría  
Suplente

Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Febrero, 2022  
**México**

## RESUMEN

El creciente y rápido desarrollo de resistencia a agentes antimicrobianos por parte de los microorganismos amenaza la salud e integridad de la población mundial. Es por eso que la OMS y diversas instituciones de investigación apoyan el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas. *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en un modelo prometedor en la investigación y desarrollo de estas nuevas estrategias debido a la presencia del sistema *Killer* en distintas cepas. Este sistema es el resultado de la simbiosis de dos virus de RNAs, *Scv-L-A* y *Scv-M*, que interactúan con la levadura produciendo una toxina que afecta a cepas sensibles de *S. cerevisiae* y otros microorganismos, varios de los cuales, representan una gran relevancia biomédica. Actualmente han sido reconocidas cuatro tipos de estas toxinas, *K1*, *K2*, *K28* y *Klus*. El mecanismo de acción de la toxina *K1*, integrante de la familia de toxinas *Killer*, se da a través del canal de potasio *TOK1*, presente en la membrana celular de las levaduras. Es posible que proteínas homólogas a este canal se encuentren presentes en las membranas celulares de los microorganismos sensibles a la toxina. En este trabajo se probó el efecto *Killer* sobre *Bacillus cereus* de la misma manera que previamente ha sido estudiado en *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Además, se hizo una búsqueda detallada de secuencias homólogas al canal *TOK1* de *S. cerevisiae* en *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans*, sobre las cuales se ha observado un efecto de la toxina *K1*. Se caracterizaron las secuencias encontradas a través de herramientas bioinformáticas, analizando los residuos conservados, particularmente cisteínas, triptófanos, leucinas, fenilalaninas y tirosinas. Los resultados confirman la importancia biomédica del sistema *Killer*, y plantean una propuesta como alternativa a los fármacos actuales.

**Palabras clave:** *Killer*, bioinformática, resistencia antimicrobiana, *TOK1*, biomedicina.

## SUMMARY.

The fast and rising development of new mechanisms of antimicrobial resistance represents a severe threat to the world population health and integrity. Because of this, the WHO and different research institutions support de investigation and development of new antimicrobial strategies. *Saccharomyces cerevisiae* has become an important and promising research model for the development of these new strategies thanks to the *Killer* system in some of the strains of this species. This system is the result from the symbiosis of two RNAds viruses, *Scv-L-A* and *Scv-M*, which interact with yeasts to synthesize a toxin, which affects sensitive strains of *S. cerevisiae* and microorganisms of high biomedical importance. Actually, four types of this toxins have been discovered, *K1*, *K2*, *K28* and *Klus*. The mechanism, by which the *K1* toxin, member of the *Killer* toxins family, attacks the sensitive yeasts, is the disturbance in the functioning of a potassium channel in the cell membrane, *TOK1*. The susceptibility of different microorganisms to the *K1* toxin could be explained by the presence of a homologous protein of *TOK1* in their cell membrane. In this project was tested the *Killer* effect on *Bacillus sp* in the same way it has been done with other microorganisms such as *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. In addition, a detailed search for homologous sequences of the *TOK1* channel of *S. cerevisiae* was made in *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans*, also known to be sensitive to the *Killer* effect. These sequences were analyzed through bioinformatic tools to distinguish the conserved residues, mainly cysteines, tryptophans, leucines, phenylalanines and tyrosines. The obtained results confirm the biomedical importance of the *Killer* system, and suggest a new approach to the alternative for actual drugs.

**Key words:** *Killer, bioinformatics, antimicrobial resistance, TOK1, biomedicine.*

## DEDICATORIAS

A mi familia, que siempre me apoya y motiva.

A mi mamá y mi papá, que me inspiran a ser mejor persona cada día.

A mi hermano Patricio, que me ayuda a salir de mi zona de confort y no me permite rendirme.

A mi hermano Mateo, que me hace querer ser una mejor persona y un mejor ejemplo a seguir.

## AGRADECIMIENTOS

Financiamiento:

- SEP-CONACyT Ciencia Básica, número: A1-S-26966.
- CONACyT-Laboratorios Nacionales de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ).
- FONDEC 2019 por la beca para realizar el presente proyecto.

A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS, UAQ-UNAM) por el apoyo logístico en la realización de los modelos teóricos realizados en el presente proyecto.

Al Laboratorio de Biofísica de Membranas UAQ, dirigido por el Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez por la confianza y el apoyo a lo largo del desarrollo del presente proyecto.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan por el apoyo en el diseño experimental del presente proyecto y por la paciencia para resolver mis dudas a lo largo del trabajo.

Al Dr. Juan Campos Guillen por proveer las cepas de las bacterias utilizadas para los experimentos de la Etapa 1 de este proyecto.

## ÍNDICE.

PORTADA.....	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
DEDICATORIAS.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
1. Saccharomyces cerevisiae, generalidades.....	10
2. Levaduras Killer.....	10
3. Canal TOK1, blanco molecular.....	11
4. Resistencia a Antibióticos.....	14
5. Microorganismos de Importancia Biomédica y Económica con Susceptibilidad a Toxinas Killer.....	16
6. Genes Homólogos y Análogos.....	19
7. Justificación.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	24
METODOLOGÍA.....	25

1. Cultivo.....	25
2. Ensayos de formación de halos de inhibición-Método Kirby-Bauer.....	26
3. Búsqueda de secuencias homólogas.....	29
4. Predicción de estructura secundaria.....	33
5. Modelamiento de estructura tridimensional.....	34
DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	35
1. Susceptibilidad in vivo de <i>B. cereus</i> a K1.....	35
2. Obtención de Homologías a TOK1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	37
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS.....	56
APÉNDICE.....	62
A. Medios de cultivo para levaduras.....	62
B. Medios de cultivo para <i>Bacillus</i> sp.....	62
C. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	63
D. Cepas utilizadas de <i>Bacillus</i> sp.....	63
E. Tabla de resultados de secuencias peptídicas homólogas.....	63
F. Tabla de alineamiento de secuencias completas.....	65
G. Carta de aprobación por parte del comité de Bioética.....	76
H. Carta de aprobación de Titulación por Tesis Individual, Consejo Académico.....	77



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resistencia a Antibióticos en Bacterias.....	15
Tabla 2. Inhibición de las Distintas Especies y Cepas de Bacillus sp. por K1.....	36
Tabla 3. Secuencias Peptídicas Homólogas a TOK1.....	38
Tabla 4. Alineamiento de Regiones de Poro de ScTOK1 con las secuencias peptídicas obtenidas.....	41
Tabla 5. Cisteínas en la Primer Región de Poro.....	43
Tabla 6. Cisteínas en la Segunda Región de Poro.....	43
Tabla 10. Valores de pK de la cisteína, leucina y aminoácidos aromáticos.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura secundaria de TOK1.....	13
Figura. 2. Microorganismos de importancia biomédica versus K1.....	16
Figura 3. Disposición de filtros y botones de células en prueba de inhibición.....	27
Figura 4. Representación esquemática de una subunidad de TOK1.....	32
Figura 5. Estructura Primaria del canal TOK1.....	33
Figura 6. Perfil de hidropatía de TOK1.....	34
Figura 7. Experimento de Inhibición a <i>B. cereus</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	35
Figura 8. Inhibición por K1 y Klus en <i>Bacillus</i> sp.....	37
Figura 9. Porcentaje de Identidad y cobertura con ScTOK1.....	40
Figura 10. Perfiles de Hidropatía.....	44
Figura 11. Modelos 3D de Proteínas que Presentan Identidad con ScTOK1.....	45
Figura 12. Importancia del Triptófano y Leucina en los canales de K <sup>+</sup> .....	52
Figura 13. Estructura química de aminoácidos aromáticos y leucina.....	52
Figura 14. Estructura química de L-cisteína.....	53

## INTRODUCCIÓN

### GENERALIDADES

*Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharo* » azúcar, *myces* » hongo y *cerevisiae* » cerveza) representa uno de los microorganismos más utilizados en la industria y en la investigación. Descrita por *Meyen ex E.C. Hansen en 1882*, es una especie unicelular, de crecimiento rápido y fácil. Es una levadura heterótrofa con una importante capacidad fermentativa. A la fecha se han descrito diversas características de importancia en este organismo y una de las más importantes es el sistema *Killer*, el cual se basa en la producción de péptidos antimicrobianos para asegurar la supervivencia de la levadura en el ambiente (*Suárez-Machín, et. al., 2016*).

### LEVADURAS *KILLER*

Las interacciones virus-hospedero son muy comunes y, contrario a lo que comúnmente se piensa, no siempre son perjudiciales para el organismo receptor (*Ghabrial, S.A., et al., 2015*). Un ejemplo es el caso de las cepas *Killer* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales poseen un fenotipo productor de toxinas tipo *K1, K2, K28* y, la más recientemente descubierta, *Klus*. Todas estas toxinas tienen distintos mecanismos de acción, desde modificaciones en la apertura de canales iónicos hasta la inhibición del proceso de síntesis de ADN. Los responsables del efecto *Killer* en *S. cerevisiae* son en realidad dos virus: el virus *helper ScV-L-A*, que utiliza a la levadura para su proceso replicativo, y alguno de los virus *satélites, ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28* o *ScV-Mlus*, los cuales determinan al tipo de toxina producida (*Schmitt, et. al., 2006; Ghabrial S. A., 1998; Sahin, E., Akata, I., 2018*).

Aún no se entiende muy bien cómo inició esta simbiosis virus-levadura, sin embargo, está claro que beneficia a ambas partes, brindando al virus un ambiente propicio para su replicación, y confiriendo a la levadura la capacidad de dominancia sobre cepas sensibles en un ambiente dado (*Ghabrial S. A., 1998; Sahin, E., Akata, I., 2018*).

Tanto el virus *ScV-L-A helper* como el virus *ScV-M satélite* pertenecen a la familia *Totiviridae* y poseen genomas de ARN de doble cadena bicistrónicos y monosegmentados, de 4.6 y 1.8 kb respectivamente, que se acumulan en el citoplasma fúngico (*Andrew M. Q., et. al., 2012*). Este genoma tiene dos marcos de lectura abierta (*open reading frames*, ORFs), donde el primero, ORF1, codifica a la proteína *Gag*, responsable de la síntesis de cápside y estructura de la partícula viral, así como del proceso conocido como *cap-snatching*, el cual consiste en el robo de la caperuza 5' de los RNAm de la célula para ser utilizados por el ARN viral e iniciar su proceso de traducción. Mientras que la ORF2 codifica a la ARN polimerasa dependiente de ARN, necesaria para el proceso de replicación de genoma. Estas dos proteínas sirven también para el ciclo de replicación del virus *satélite*, que codifica a la preprotoxina responsable del fenotipo *Killer* (*Schmitt, et. al., 2006*).

Cabe destacar que, al poseer el fenotipo *Killer*, la levadura se vuelve inmune a la toxina, es decir, una levadura con el virus *ScV-M1* será inmune a las toxinas *K1* presentes en el medio, ya sean sintetizadas por ella misma o por otras levaduras alrededor. La inmunidad a la toxina se lleva a cabo en el citoplasma de la levadura *Killer* y ocurre a través de la formación de un complejo entre la toxina reinternalizada y de la preprotoxina producida por el virus *ScV-M1*. Este complejo es ubiquitinizado y degradado por medio del proteosoma, eliminando la forma activa de la toxina. Es por eso que es necesaria una mínima cantidad constante de la preprotoxina dentro del citoplasma de la levadura. (*Schmitt, et. al., 2006*)

El sistema *Killer* ha demostrado ser eficaz contra otros microorganismos, algunos de los cuales representan una amenaza en cuestión de salud pública. Sin embargo, el mecanismo a través del cual ejerce efecto la toxina sobre ellos no se ha dilucidado completamente.

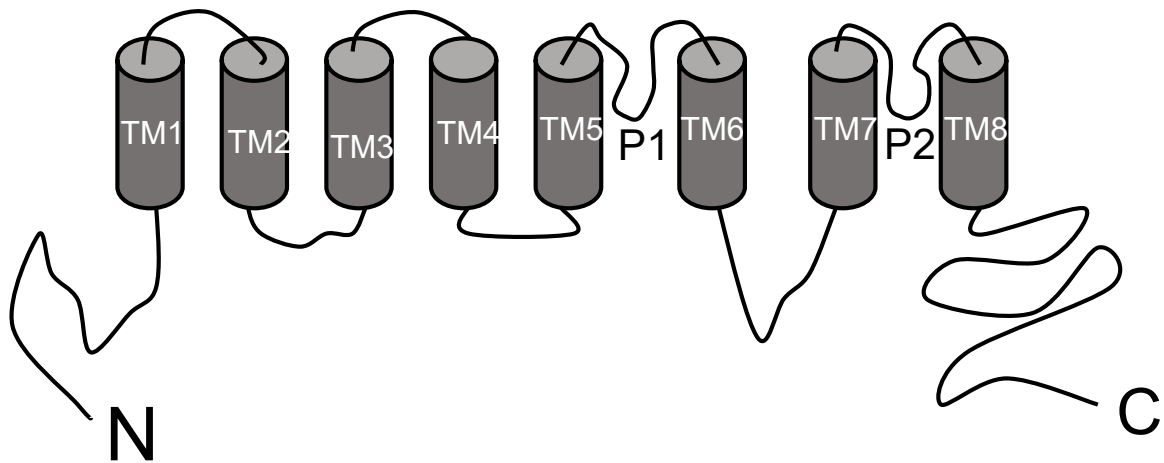
## CANAL TOK1, BLANCO MOLECULAR

Los canales de potasio han sido clasificados en distintos grupos de acuerdo a su estructura. Los primeros en ser descritos fueron los canales Kv (voltage-gated potassium channel), que son tetrámeros de subunidades conformadas por seis

cruces transmembranales y una región de poro (*Dolly, J. O., & Parcej, D. N., 1996; B. Rudy 1988*). Posteriormente se describieron los canales Kir (inwardly rectifying potassium channel), constituidos por subunidades de dos cruces transmembranales y una región de poro, formando de igual manera tetrámeros (*B. Rudy 1988*). En 1995, *Ketchum, et. al.*, describieron al primer canal con dos dominios de poro en tándem, *TOK1*, constituido por dímeros de subunidades de 8 cruces transmembranales y dos dominios de poro. En 1996, el mismo grupo publicó el descubrimiento del canal *KCNK* en *Drosophila melanogaster* (*Goldstein, et. al.*), el cual presenta también dos regiones de poro, pero las subunidades de este dímero presentan solo cuatro cruces transmembranales. A esta nueva familia de canales de potasio con dos poros en tándem se le conoce como Rectificadores Salientes de Potasio (Outwardly rectifying Potassium channels), y su descubrimiento representó un paso importante en el entendimiento del funcionamiento de los canales de  $K^+$ .

Uno de los blancos moleculares de la toxina *K1* es un canal rectificador saliente de potasio, sensible al potencial de membrana, nombrado *TOK1*. Este canal se caracteriza por estar conformado por 8 cruces transmembranales y presentar dos regiones de poro en tándem, ubicadas entre las subunidades S5 y S6 y las subunidades S7 y S8 de la estructura protéica (**Figura 1**) (*Ketchum K., et. al, 1995*).

El efecto que tiene la toxina *K1* sobre la célula es el desequilibrio iónico intracelular, lo cual se cree que es logrado por la interacción de la toxina con el canal *TOK1*. Estudios para probar esta hipótesis han incluido la depleción del gen que codifica a *TOK1*. Los análisis con estas clonas han demostrado que se obtiene una resistencia en las cepas modificadas. De la misma manera, para poder observar el aumento en el flujo iónico provocado por las toxinas se ha demostrado que *TOK1* debe estar presente en la membrana celular (*Ahmed A, et. al., 1999*).



**Figura 1. Estructura Secundaria de TOK1.** Representación esquemática de la estructura de una subunidad del canal *TOK1*, con 8 cruces transmembranales y dos dominios de poro. El dominio de poro 1 se encuentra entre los cruces transmembranales 5 y 6, mientras que el dominio de poro 2 se encuentra entre los cruces transmembranales 7 y 8. TM: cruces transmembranales, P: dominio de poro. Tomado y modificado de *Saldaña, et. al., 2002*.

La resistencia a antibióticos se ha convertido en una emergencia mundial, dejando consigo la necesidad de desarrollar nuevas alternativas a los antibióticos ya existentes. Bacterias como *Bacillus sp.*, han incrementado su incidencia con el paso de los años y han desarrollado mecanismos de resistencia contra los antibióticos comúnmente usados, principalmente hacia  $\beta$ -lactámicos.

El Sistema *Killer* ha demostrado ser efectivo como agente antimicrobiano sobre distintos microorganismos y ha abierto una ventana de posibilidades para futuras estrategias de control sobre organismos patógenos. El mecanismo de acción de la toxina *K1* se da sobre el canal de potasio *TOK1* presente en la membrana celular. La búsqueda y caracterización de blancos moleculares homólogos a *TOK1* en células bacterianas es necesaria para poder desarrollar una estrategia de tratamiento contra estos organismos y poder prever mecanismos de resistencia por parte de la bacteria de manera que se puedan contrarrestar en un futuro. Así mismo,

es posible que las bacterias presenten nuevos blancos moleculares de la toxina *K1*, siendo una nueva oportunidad de entender los mecanismos citotóxicos del sistema *Killer*.

## RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

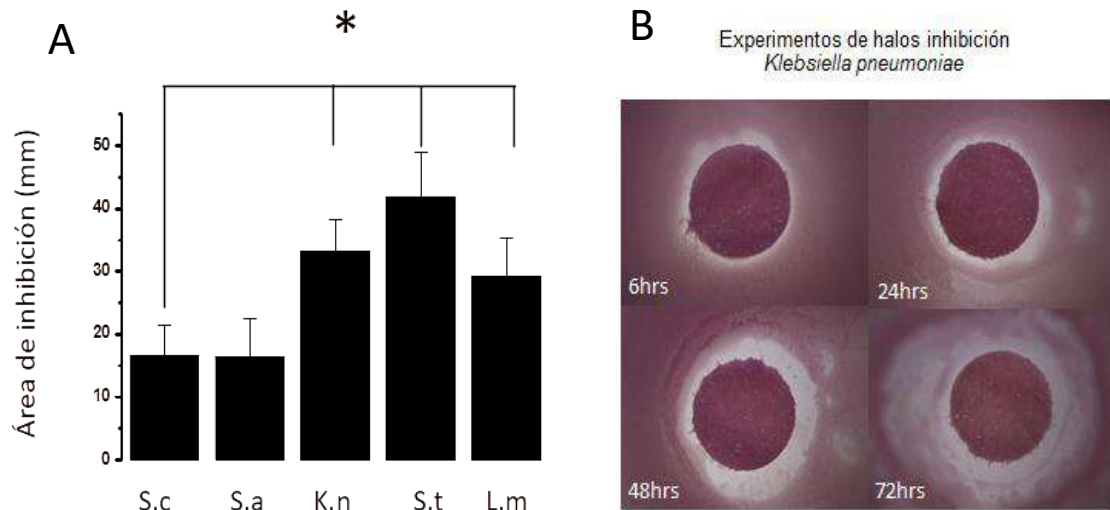
En 2013, la CDC (Centers for Disease Control) publicó el primer reporte sobre la resistencia a antibióticos, donde se estimó que aproximadamente 23,000 muertes al año fueron causadas por la resistencia a antibióticos en Estados Unidos, mientras que en la Unión Europea fue responsable de 25,000 muertes anuales (*Centers for Disease Control and Prevention, 2013*). En 2019, se publicó un nuevo reporte donde se demostró que en realidad cada año hubo más de 2.6 millones de infecciones por organismos resistentes a antibióticos y casi 44,000 muertes debido a ellas cuando se publicó el primer reporte en 2013, sin embargo, en los años siguientes, aunque las infecciones aumentaron a 2.8 millones por año, las muertes se redujeron un 18%, siendo aproximadamente 35,000 muertes al año, lo que demuestra que las medidas de prevención tomadas por el sector salud fueron efectivas (*Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*). Además, en Estados Unidos se calcula que hay una pérdida económica de \$55 mil millones de dólares anuales debido a este mismo fenómeno (*Smith R., Coast J., 2013*). En México, la ineficiencia de regulación sobre el uso y venta de antibióticos así como la automedicación y prescripciones inadecuadas de los mismos, son los principales factores que se deben de tomar en cuenta para manejar el creciente problema de resistencia a antibióticos, el cual está poco documentado. Según un reporte publicado por el Programa Universitario de Investigación de la Salud (*Ponce de León, S. et al. Plan Universitario De Control De La Resistencia Antimicrobiana, PUCRA 2018*) de la UNAM, se encontraron niveles importantes de resistencia antimicrobiana en diferentes bacterias de relevancia médica aisladas de distintos hospitales de la República Mexicana (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Resistencia a Antibióticos en Bacterias. Se muestra el porcentaje de colonias aisladas que presentan resistencia a antibióticos (PUCRA, UNAM 2018). NA: no aplica. ND: información no disponible.

Antimicrobiano	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicilina	87%	99%	75%	NA
Ceftriaxona	60%	62%	ND	ND
Amikacina	3%	13%	92%	15%
Metropenem	1.6%	15%	67%	33%

El mal manejo de los antibióticos, así como la automedicación que se llevaba a cabo en años pasados por la población mundial, han provocado rápidos cambios en el genoma de diversas bacterias, ocasionando la aparición de genes de resistencia y adaptaciones nuevas que impiden el funcionamiento correcto de los fármacos actuales. La resistencia antimicrobiana se puede deber a diversos factores como mutaciones en el receptor al cual se adhiere el antibiótico, presencia de enzimas específicas que lo catalizan o modifican, presencia de bombas de expulsión, disminución de la permeabilidad de la membrana o modificaciones en el sitio de acción del antibiótico. La diversidad de mecanismos de resistencia a antibióticos es muy grande en las comunidades microbianas (*Renwick, M., Brogan, D. & Mossialos, E., 2016*). Se han estudiado varios de los genes responsables, tanto en patógenos actuales, como en organismos colectados del *permafrost* (*Rascovan N, et. al., 2016*). La prevalencia de dichos genes en el ambiente es enorme y han estado presentes en los organismos desde mucho antes del descubrimiento de los antibióticos. Debido a esto es necesario que se desarrollen nuevas tecnologías antimicrobianas que no sean afectadas por estos mecanismos de resistencia.





**Figura 2.** Microorganismos de importancia biomédica versus *K1*. A. Gráfica del área de inhibición provocada por *K1* sobre organismos de importancia biomédica. S.c. *Saccharomyces cerevisiae*, S.a *Staphylococcus aureus*, K.n *Klebsiella pneumoniae*, S.t *Salmonella typhimurium*, L.m *Listeria monocytogenes*. Halo de inhibición de *K1* sobre *Klebsiella pneumoniae*. Representación del crecimiento de halo de inhibición provocado por la toxina *K1* sobre la bacteria patógena *K. pneumoniae*. Ambas imágenes tomadas de Ramírez Villareal J., 2018.

## MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA BIOMÉDICA Y ECONÓMICA CON SUSCEPTIBILIDAD A TOXINAS *KILLER*

En la actualidad existen diversos microorganismos que representan un reto en el campo de la biomedicina y de la economía. Una de las características más importantes de las bacterias es la estructura de su pared celular, lo cual nos ha permitido clasificarlas en dos grupos, las *gram positivas* y las *gram negativas*. Las bacterias más resistentes a las condiciones ambientales son las *gram positivas* debido a que presentan una pared de peptidoglucano más gruesa y por lo general son las más problemáticas en cuestión de virulencia.

Las bacterias que frecuentemente son relacionadas con enfermedades y que han presentado cierto nivel de susceptibilidad a las toxinas *Killer* (**Figura 2**) se describen a continuación, así como la levadura *C. albicans* y el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*, microorganismo de importancia económica.

### *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* es un bacilo *gram positivo*, anaerobio facultativo, frecuentemente asociado a intoxicación por alimentos. Se encuentra presente en el suelo, superficies, comida, larvas e incluso en la piel de los humanos, lo que la hace presente en varios ambientes, incluidos los hospitales. Debido a la posesión de flagelos peritricos y a la formación de esporas, es una bacteria muy resistente en ambientes extremos además de ser persistente dentro del sistema gastrointestinal de sus hospederos.

El éxito de esta bacteria se basa en su variedad de factores de virulencia, entre los que destacan la producción de varios tipos de toxinas, entre ellas las toxinas NHE (non-hemolytic enterotoxin) y HBL (Hemolysin BL), así como la toxina emética y la citotoxina K, además de tener una resistencia natural a los  $\beta$ -lactámicos (*Glasset B., et. al., 2018*).

### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es una bacteria *gram positiva*, que representa al grupo de patógenos oportunistas que más comúnmente causan enfermedades nosocomiales. Comúnmente se encuentra en las narinas anteriores de los animales y humanos, pero puede causar infecciones en la piel (ej. *dermatitis exfoliativa*), en las válvulas cardiacas (ej. *endocarditis*) e incluso en los huesos (ej. *osteomielitis*), así como un cuadro clínico de *neumonía*, *sepsis*, fascitis necrotizante y síndrome estafilococal de shock tóxico. Tiene diversos factores de adhesión y receptores a las células epiteliales, características que funcionan como algunos de sus principales factores de virulencia junto con la producción de toxinas (*Mehraj J., et. al., 2016; Bush y Vazquez-Pertejo, 2019*).

### *Klebsiella pneumoniae*

Este organismo es una bacteria *gram negativa* que, al igual que *S. aureus*, representa al grupo de bacterias oportunistas que más comúnmente causan problemas a la población humana. Generalmente se encuentra en la superficie de las mucosas de animales, en el agua y en el suelo. En los humanos está presente principalmente en el tracto gastrointestinal pero también se puede encontrar en la nasofaringe, a través de la cual puede entrar al torrente sanguíneo y demás tejidos del cuerpo. Es de las principales bacterias en causar enfermedades nosocomiales y puede causar infecciones graves incluso en la comunidad joven, generando, además de la neumonía, complicaciones como absceso hepático, meningitis y endoftalmitis. Presenta diversos factores de virulencia, entre los cuales destacan la eficiencia de acarreadores de  $Fe^{2+}$  y su cápsula, además de los lipopolisacáridos y el pili (Alyssa S., et. al., 2013; Wang G., et. al., 2020). En 2018, Ramírez Villareal J. observó el efecto *Killer* de las toxinas *K1* de *S. cerevisiae* sobre cepas de *K. pneumoniae*.

### *Salmonella typhimurium*

Otra bacteria *gram negativa* de gran interés, no solo por su patogenicidad sino por su resistencia a antibióticos, es *S. typhimurium* (Yang C., et. al., 2020)). El cuadro clínico por el que se caracteriza es una salmonelosis no tifoidea (SNT) con gastroenteritis localizada y, a diferencia de *S. typhi*, esta bacteria es generalista, con un periodo menor de incubación (6-24h) y se encuentra generalmente en el lumen intestinal. Se ha observado que parte de los pacientes afectados por SNT se vuelven portadores temporales (1 a 12 meses) del patógeno, incluso se ha observado que, en casos extremos, algunos pacientes pueden ser portadores por varios años (Gal-Mor O. 2019).

### *Candida albicans*

Otro microorganismo oportunista es el hongo ascomiceto *C. albicans*, perteneciente a la misma familia que *S. cerevisiae*, *Saccharomycetaceae*. Este hongo comensal se encuentra específicamente en el área vaginal, tracto digestivo y tracto

respiratorio de humanos y solo causa enfermedad en hospederos inmunosuprimidos. Puede causar infecciones superficiales de las mucosas, entre los cuales se destacan las infecciones vaginales, que afectan a alrededor del 75% de las mujeres por lo menos una vez en su vida. Sin embargo, este hongo también puede desencadenar infecciones sistémicas que presentan una alta tasa de mortalidad (Poulain D., 2015). El factor de virulencia que le permite convertirse a patógeno es la transición de levadura a hifa, la cual es controlada por diversas cascadas reguladoras como la vía de la adenosina monofosfato cíclica (AMPc) y la proteína cinasa A (PKA). La adenilil ciclasa Cyr1 de *C. albicans* cataliza la síntesis de AMPc, por lo tanto, es uno de los principales componentes de la vía AMPc/PKA (Wang Y. 2015).

### *Ustilago maydis*

Este hongo es patógeno específico del maíz, afectando a toda la planta, desde las semillas hasta las hojas. Caracterizado por un cambio de coloración y por la hipertrofia e hiperplasia de las células que terminan formando tumores en la planta, el “huitlacoche”, nombre que se le da al maíz infectado, ha sido considerado como riqueza gastronómica en México desde la época prehispánica. Sin embargo, en otros lugares como Estados Unidos y Europa se considera una plaga de importancia económica que requiere de alternativas no químicas para su control biológico.

Se ha observado el efecto de inhibición de las toxinas *Killer* de la levadura *Williopsis mrakii* sobre *Candida albicans* (Hodgson, V. J., et. al., 1995) y es posible que las toxinas *Killer* de *S. cerevisiae* también presenten este efecto tanto en *C. albicans* como en *U. maydis*, ya que previamente se ha observado que afectan a otros hongos patógenos como *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* (G. M. Walker, et. al., 1995).

## GENES HOMÓLOGOS Y ANÁLOGOS

Cuando hablamos de la evolución se emplean muchos términos entre los cuales se destacan dos principales para describir las similitudes en estructuras, genes o funciones: ANÁLOGOS Y HOMÓLOGOS. Los genes análogos son aquellos que no

proviene de un ancestro en común pero que presentan funciones o características similares, generadas a través de la convergencia evolutiva. En contraste, los genes homólogos son aquellos que provienen de un mismo ancestro en común y que pueden o no presentar funciones y características similares. A su vez, los genes homólogos se pueden dividir en dos categorías: Parálogos y Ortólogos. Los ortólogos son genes homólogos equivalentes en especies distintas, como sería el caso de estructuras homólogas que funcionan como blancos moleculares de *K1* en diversas bacterias y hongos, mientras que los parálogos son genes homólogos dentro de una misma especie.

## JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Biofísica de Membranas se ha observado un efecto antimicrobiano importante de la toxina *Killer (K1)* sobre microorganismos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* (**Figura 2**) y algunos hongos como *Ustilago maydis*. Esto ha mostrado que la susceptibilidad a esta toxina no es una característica única de las levaduras, sino que también la presencia de blancos moleculares a *K1* se encuentra en otros tipos de células. Como ya se explicó previamente en la introducción, *Bacillus cereus* es una bacteria patógena, que también representa una amenaza biomédica debido a características que la hacen resistente a diversas condiciones ambientales. Hasta el momento no se encuentra en la literatura algún estudio donde se haya probado el efecto *Killer* sobre esta bacteria, por lo que es importante determinar si presenta susceptibilidad a la toxina *K1*, así como los demás organismos que ya fueron estudiados en el laboratorio.

Como se explicó en la introducción, el blanco molecular de la toxina *K1* es un canal de potasio, TOK1. Este canal es un rectificador saliente de potasio de dos dominios de poro en tándem, y desde su descubrimiento se han descrito más integrantes de esta familia, tanto en procariontes como eucariontes, ejemplos de ellos son los canales TWIK-1 y TREK-1 presentes en mamíferos. Por lo tanto, es posible que la susceptibilidad de los organismos enlistados en la introducción del presente trabajo se deba principalmente a dos potenciales alternativas: 1) a la presencia de estos

canales de potasio, o bien de otras familias de canales de potasio como *Kir* y *Kv* que conserven estructuras o secuencias de aminoácidos esenciales para la interacción canal-toxina; 2) que la interacción entre *K1* y diversos microorganismos se deba a la presencia de dominios estructurales que posean aminoácidos aromáticos y cisteínas que permitan que la toxina pueda interactuar.

Creemos, sin lugar a duda, que cualquiera de estas dos alternativas que logremos demostrar en el Laboratorio de Biofísica de Membranas, permitirá dar un paso en el conocimiento de los mecanismos de acción alternos que pudieran explicar la forma en que se da la interacción canal-toxina (*K1*) en los diversos microorganismos. Incluso, poder explicar el mecanismo biológico que permita entender porque es tan estable la existencia de la toxina *Killer*.

## HIPÓTESIS

***Bacillus sp*** es vulnerable al efecto *Killer* ejercido por cepas productoras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversas bacterias patógenas, entre las que se encuentran ***Klebsiella pneumoniae***, ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella typhimurium*** y ***Bacillus cereus***, así como las especies de hongos patógenos, ***Candida albicans*** y ***Ustilago maydis*** (huitlacoche), presentan proteínas homólogas al canal *TOK1*, en las que se conservan estructuras importantes, tales como el filtro de selectividad al ión potasio TIGYGD y TVGLGD, así como algunos aminoácidos importantes para la estructura y conducción del canal como las ***cisteínas***, ***fenilalaninas***, ***tirosinas*** y ***triptófanos***, permitiendo de esta manera la actividad citotóxica de las toxinas *Killer* (específicamente *K1*) sobre las células bacterianas y fúngicas.

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *in silico* las interacciones entre la toxina *K1* de *Saccharomyces cerevisiae* y diversos organismos patógenos (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *B. cereus (in vivo)*, *C. albicans* y *U. maydis*), así como los mecanismos de acción de *K1* sobre la célula bacteriana o fúngica.

Determinar la identidad y similitud como estimadores de homologías entre diversas secuencias peptídicas de bacterias y hongos de importancia biomédica con el canal *TOK1*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la citotoxicidad de la toxina *K1* sobre diferentes cepas de *Bacillus sp.*
2. Llevar a cabo un análisis bioinformático de posibles blancos moleculares presentes en el genoma de *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ustilago maydis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*.
3. Determinar la proporción de residuos conservados, específicamente de *fenilalaninas*, *cisteínas*, *triptófanos* y *tirosinas*.
4. Hacer un análisis teórico sobre las implicaciones que tienen dichas homologías de secuencias de aminoácidos para la función del canal o proteínas homólogas como blancos moleculares de la toxina *K1* de *S. cerevisiae*.



## ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Los resultados de esta tesis se determinaron a partir de dos etapas. La etapa 1 se basó en experimentos *in vivo* con *Bacillus cereus*. La etapa 2 se basó en experimentos *in silico*, basándose en la búsqueda bioinformática de secuencias homólogas en los microorganismos previamente mencionados en la sección de objetivos.

La primera etapa consistió en determinar si *Bacillus sp.* es sensible o resistente a la toxina *Killer K1*, de la misma manera en que se ha comprobado la sensibilidad de otras bacterias y hongos patógenos como *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ustilago maydis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, organismos en los cuales se centró la **Etapa 2** del presente trabajo. Debido a que aún no se había probado el efecto antimicrobiano de la toxina sobre *Bacillus cereus*, bacteria que posee características similares a bacterias que han sido previamente determinadas como sensibles a *K1*, se esperaba observar un efecto importante de la toxina contra el crecimiento bacteriano.

Los primeros experimentos consistieron en la formación de halos de inhibición por competencia, para observar el efecto *Killer* sobre las cepas sensibles de *S. cerevisiae* y sobre las cepas de *Bacillus sp.* Esto con el propósito de cuantificar el nivel de inhibición que ejerce la toxina *K1* sobre las bacterias, y, como experimento control, el efecto en las cepas sensibles de *S. cerevisiae*. Estos experimentos se basan en los experimentos de *Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. 1990*, donde probaron el efecto *Killer* sobre cepas sensibles de *S. cerevisiae* y en el trabajo de *Ramírez Villareal J, 2018*, donde se probó el efecto *Killer* sobre *K. pneumoniae*.

La segunda etapa consistió en el uso de herramientas bioinformáticas para la identificación de posibles blancos moleculares de *K1* en microorganismos de importancia biomédica y económica: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* y *Ustilago maydis*. Esta búsqueda de homologías se hizo a partir de la secuencia de *TOK1* (U28005.1) completa, así como por secciones de esta que se determinaron a partir

de la presencia del filtro de selectividad a potasio 1 (TVGLGD) y el filtro de selectividad a potasio 2 (TLGYGD) y los cruces transmembranales dentro del canal. Una vez obtenidas las secuencias homólogas se hicieron análisis de hidropatía y modelamiento 3D de las estructuras, así como un análisis teórico de los dominios de aminoácidos conservados a lo largo de las secuencias.

## METODOLOGÍA

### ETAPA 1

Se prepararon varios tipos de medios para los diferentes organismos y en condiciones específicas para el objetivo del experimento. Las recetas para la preparación de Medio YPD Agar, Medio YPD Caldo, Medio YPD inductor se encuentran en el Apéndice A, Medios de Cultivo para Levaduras. Las recetas para la preparación de Medio TCA, Agar LB y Caldo LB se encuentran en el Apéndice B, Medios de Cultivo para *Bacillus sp* (Hana Flegelová, et. al., 2002).

#### Cultivo

Para mantener la integridad de nuestras células se congelaron alícuotas de todas las cepas utilizadas. Las cepas de *Bacillus cereus* fueron congeladas en medio LB con glicerol, de manera que garantizamos que las cepas con las cuales se hizo el experimento no se contaminen. El glicerol se utiliza para evitar que la congelación dañe a las células. Estas permanecerán guardadas como resguardo en caso de contaminación de las cepas utilizadas que serán guardadas en refrigeración (Ávila-Portillo LM, et. al., 2006).

Cultivos de las mismas cepas a utilizar fueron guardados en refrigeración a 4° C en medio YPD para levaduras y medio LB para bacterias, de donde se estuvieron tomando células para llevar a cabo los experimentos. Los medios utilizados se basan en experimentos anteriores realizados por Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. 2017, así como los métodos de cultivo, complementados con Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. 1990 y Hana Flegelová, et. al., 2002.

*Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas son mantenidas en medios YPD agar (2.5%) y guardadas a 4° C. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (42300: productora de *K1*, 1085: productora de *Klus*, 5x47: sensible) se cultivan 24 horas en medio YPD (1% peptona de gelatina, 1% extracto de levadura, 2% glucosa/dextrosa, pH 4.7) a 28° C en agitación (150rpm) (Hana Flegelová, et. al., 2002).

Posteriormente, las células de las cepas *Killer* (42300, 1085) se transfirieron a medio inductor (YPD enriquecido (FeCl<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl) pH 4.7) para aumentar la producción de toxina y se cultivaron en agitación durante 24 horas (Hana Flegelová, et. al., 2002).

*Bacillus sp.*

Para las cepas de *Bacillus sp.* se sembraron placas de Agar de Soya Tripticaseína por medio del método de estriado por cada cepa (8 cajas/placas) y se mantuvieron a 37° C. Una vez que hubo crecimiento se cultivaron en caldo LB en agitación durante 48 horas a 37° C. Este cultivo se hizo sincronizado con el de las cepas de *S. cerevisiae* de manera que el día del experimento tanto las cepas de *S. cerevisiae* como las de *Bacillus sp.* tuvieran 48 horas de crecimiento en sus respectivos medios. El experimento de inhibición en *Bacillus sp.* está basado en los experimentos previamente hechos con *S. cerevisiae* (Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. 1990, Hana Flegelová, et. al., 2002) y en el método de Kirby-Bauer (Aw, B., Ce, R., & Wm, K., 1959).

#### Ensayos de Formación de Halos de Inhibición-Método Kirby-Bauer

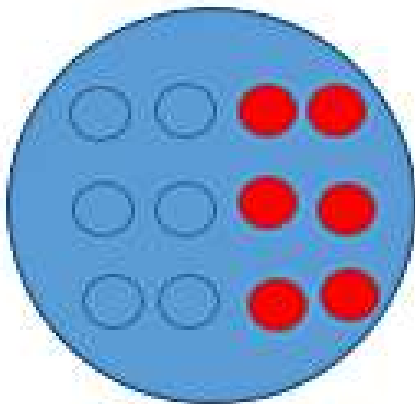
El diseño de estos experimentos se basa en el *Método de Kirby-Bauer* (Aw, B., Ce, R., & Wm, K., 1959), con modificaciones de acuerdo a las características específicas de los microorganismos utilizados.

De los cultivos en caldo LB de *Bacillus sp.* homogeneizados, se tomaron alícuotas de 1000 µl y se depositaron en tubos de microensayo previamente pesados y marcados con el número de la cepa. Estas alícuotas se centrifugaron a 20798.5 xg

durante 5 minutos para separar las células del sobrenadante, el cual se depositó en nuevos tubos de microensayo previamente marcados con el número de la cepa, evitando tomar células. El botón de células que quedó en los primeros tubos utilizados se pesó para determinar los miligramos obtenidos por cada 1000  $\mu$ l de medio. Una vez obtenido el peso de las células se agregó el volumen necesario de agua destilada estéril para que por cada 50  $\mu$ l hubiera 3 mg de células (Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. 2017).

Este mismo proceso se repitió con las células de la cepa sensible de *S. cerevisiae* 5x47.

En placas de Agar de Soya Trypticaseína y de Agar LB (caja Petri de 90x15 mm) se sembró un césped de 3 mg de células de cada cepa de *Bacillus sp*, asegurándose que las células se extendieran de manera uniforme en la placa. De esta manera quedaron dos cajas para cada cepa (una de Agar Soya Trypticaseína y una de Agar LB) (Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. 2017). Este mismo proceso se repitió con la cepa 5x47 de *S. cerevisiae* pero en una caja de medio YPD agar. Posteriormente se colocaron círculos de papel filtro uniformemente en las placas. Por cada cepa de *Bacillus sp*. se hicieron 2 cajas (2 réplicas). Debido a que en cada caja se hicieron 3 botones por cada cantidad de toxina (0.2 mg/0.5 mg) y células (1  $\mu$ g/10  $\mu$ g) se obtuvieron 6 pseudoréplicas de cada variable (**Figura 3**).



**Figura 3.** Disposición de filtros y botones de células en prueba de inhibición. Azul: sobrenadante, Rojo: células.

Se repitió el proceso para las cepas *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae*. Las células fueron separadas del sobrenadante después de 24 horas en medio inductor por medio de centrifugación a 20798.5 xg. Se aislaron alícuotas de sobrenadante en tubos de microensayo de 1.5 ml y se desecharon los botones de células al fondo de los tubos originales. En cada filtro se agregaron distintas cantidades de toxina (0.2mg, 0.5mg) (Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. 2017).

Los cultivos en Medio Inductor YPD enriquecido de *S. cerevisiae* (cepas 42300 y 1085) se homogenizaron y se tomaron alícuotas de 1000 µl las cuales se depositaron en tubos de microensayo previamente pesados y marcados con el nombre de la cepa. Estas alícuotas también se centrifugaron a 20798.5 xg por 5 minutos para separar las células del sobrenadante, el cual se depositó en nuevos tubos de microensayo previamente marcados con el nombre de la cepa, evitando tomar las células que se encuentran en el botón al fondo del tubo. El botón de células que quedó en los primeros tubos utilizados fue pesado para determinar los miligramos obtenidos en 1000µl. Una vez obtenido el peso de las células se determinó la cantidad de sobrenadante que se debía inocular para obtener 0.2mg y 0.5mg de toxina. Esto tomando en cuenta que **1mg de célula ~ 1mg de toxina** (Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. 2017).

Fórmulas para Determinar Volumen Aproximado de Sobrenadante que Contiene 0.2mg y 0.5mg de Toxina Respectivamente:

$$\frac{X \text{ mg de células} - 1000 \mu\text{l}}{0.2\text{mg de toxina} - X \mu\text{l}} \sim \frac{0.2\text{mg} \times 1000 \mu\text{l}}{X \text{ mg}} = X \mu\text{l}$$

$$\frac{X \text{ mg de células} - 1000 \mu\text{l}}{0.5\text{mg de toxina} - X \mu\text{l}} \sim \frac{0.5\text{mg} \times 1000 \mu\text{l}}{X \text{ mg}} = X \mu\text{l}$$

Una vez obtenido el volumen que se debe inocular para obtener 0.2 y 0.5mg respectivamente se procedió a inocular los filtros colocados en las cajas Petri,

manteniendo constante la posición que se asignó a cada cantidad de toxina para poder observar y comparar de manera fácil los resultados por cada cepa. Las células *Killer* que permanecieron en el botón originalmente pesado en el tubo de microensayo se prepararon de manera que quedó 1g/1ml de células en agua destilada estéril. Esta mezcla homogeneizada se utilizó para poner botones de células, y comparar el efecto de la toxina inducida y el de las células vivas. Se colocaron botones de 1µl y de 10µl respectivamente para observar una curva de crecimiento. El efecto de inhibición debe de aparecer entre las 8 y las 24 horas después de las inoculaciones de toxina en los filtros. La medición de reversibilidad del efecto se midió previo a las 24 horas, a partir de la disminución del halo de inhibición. La medición del halo de inhibición se realizó por medio del software *Image\_J* (NIH-USA), el cual permite obtener la medida exacta del área por cada filtro (Suzuki, Y., Schwartz, S. L., Mueller, N. C., & Schmitt, M. J. 2017).

Los halos de inhibición se midieron utilizando el software *Image\_J* (NIH-USA) para obtener el diámetro y área de cada halo a partir de su aparición (8-10hrs) y a lo largo de las 48 horas siguientes, para poder hacer un seguimiento del efecto de la toxina.

## ETAPA 2

### Búsqueda De Secuencias Homólogas

A partir de la secuencia de aminoácidos arrojada por el gen *TOK1* (U28005.1) del NCBI Nucleotide DataBase (GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> ) se hizo una búsqueda de las secuencias homólogas en *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* y *Ustilago maydis* utilizando el programa Protein Blast del NCBI (*blastp*): [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), de manera que se obtuvo un análisis más certero de dichas secuencias. (Ketchum, K. A., et. al., 1995).

Los parámetros que se utilizaron como estándar dentro del algoritmo fueron:

- Máximo de secuencias blanco: 100
  - Valor e: 0.05
  - Matriz: BLOSUM62
- Longitud de secuencia iniciadora: 6

En vez de hacer una búsqueda general, se hizo para cada organismo objetivo. De esto se obtuvieron los alineamientos y los códigos de GenBank de cada blanco encontrado.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas que presentaron porcentajes de identidad y cobertura contra *TOK1* se utilizaron posteriormente para hacer los análisis de hidropatía y los modelos 3D de las proteínas obtenidas.

Criterios para Aceptar Homologías:

Ya que estamos buscando homologías entre filos distintos (Bacterias y Hongos) es probable que los porcentajes de cobertura e identidad sean bajos, así como la longitud de las secuencias encontradas. Debido a que buscamos dominios de aminoácidos específicos, el porcentaje de cobertura e identidad dentro de las homologías no son tan importantes como encontrar los dominios conservados, donde aparezcan los filtros de selectividad a potasio y los aminoácidos aromáticos y cisteínas.

Las secuencias utilizadas para el BLAST fueron las siguientes:

*TOK1* (U28005.1):

**MTRFMNSFAKQTLGYGNMATVEQESSAQAVDSHSNNTPKQAKGVLAEEELKDALRFRDERVS  
 IINAEPSSTLFFVFWFVSCYFPVITACLGPVANTISIACVVEKWRSLKNNVVTNPRSNDT  
 DVL MNQVKT VFDPPGIFAVNIISLVLGFTSNIILMLHFSKKLTYLKSQ LINITGWTIAGGM  
 LLVDVIVCSLNDMP SIYSKTIGFWFACISSGLYLVCTIILTIHFIGYKLGKYPPTFNLLPN  
 ERSIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLHITYGNALYFC TVSLLTVGLGDILPKSVGAKIMVL  
 IFSLSGVVMGLIVFMTRSIIQKSSGPIFFFHRVEKGRSKSWKHYMDSSKNLSEREAFDLM  
 KCIRQTASRKQHWFSLSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYGDY**

APRTGAGRAFFVIWALGAVPLMGAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGESFNKVKKSIVFNGRQ  
RALSFVNTGEIFEESDTADGDLEENTTSSQSSQISEFNDNNSEENDSGVTSPPASLQESF  
SSLKASSPEGILPLEYVSSAEYALQDSGTCNLRNLQELLKAVKKLHRICLADKDYTLSFS  
DWSYIHKLHLRNITDIEEYTRGPEFWISPDTPFKFPLNEPHFAFMMLFKNIEELVGNLVED  
EELYKVISKRKFLGEHRKTL

pTOK1-TM5:TM8 (contiene TM5, poro y filtro de selectividad 1, TM6, LC (Loop citoplasmático) 3, TM7, poro y filtro de selectividad 2 y TM8):

SIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLHITYGNALYFCTVSLLTTVGLGDILPKSVGAKIMVLIF  
SLSGVVMGLIVFMTRSIIQKSSGPIFFFHRVEKGRSKSWKHYMDS SKNLSEREAFDLMKC  
IRQTASRKQHWFSLSVTIAIFMAFWLLGALVEKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTTIGYGDYAP  
RTGAGRAFFVIWALGAVPLMGAILSTVGDLL

pTOK1-TM5:LC3 (contiene TM5, poro y filtro de selectividad 1, TM6 y LC3):

SIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLHITYGNALYFCTVSLLTTVGLGDILPKSVGAKIMVLIF  
SLSGVVMGLIVFMTRSIIQKSSGPIFFFHRVEKGRSKSWKHYMDS

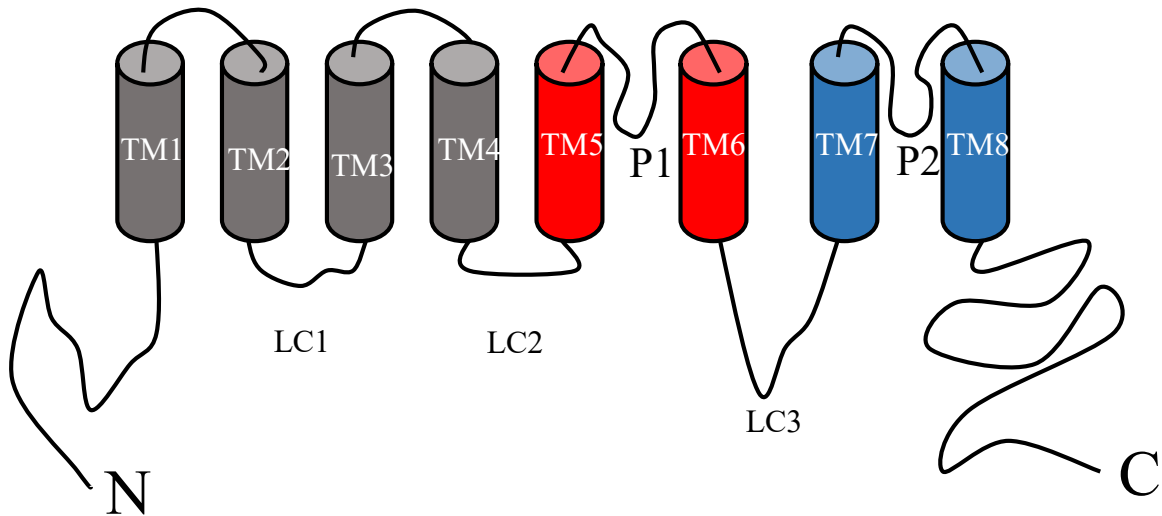
pTOK1-LC3:TM8 (contiene LC3, TM7, poro y filtro de selectividad 2 y TM8):

SKNLSEREAFDLMKCIRQTASRKQHWFSLSVTIAIFMAFWLLGALVEKFAENWSYFNCIYF  
CFLCLLTTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLMGAILSTVGDLL

En la **figura 4** y **5** se encuentran representadas los fragmentos de cada secuencia, en rojo la secuencia pTOK1-TM5:LC3 y en azul la secuencia pTOK1-LC3:TM8. La **figura 4** muestra la estructura de los cruces transmembranales y la **figura 5** muestra la secuencia de aminoácidos de TOK1 indicando los dominios estructurales de los filtros de selectividad y las cisteínas y aminoácidos aromáticos.

Al probar todas estas secuencias con el algoritmo, aseguramos que se obtengan todos los resultados posibles de homologías en nuestros diferentes organismos probados.





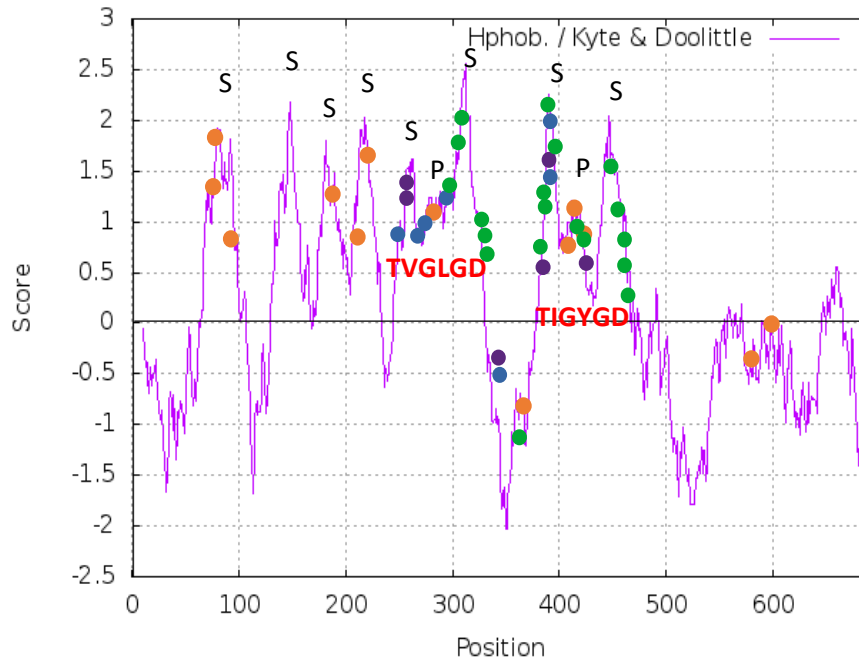
**Figura 4. Representación esquemática de una subunidad de TOK1.** Se muestran 8 cruces transmembranales, dos regiones de poro y 3 loops citoplasmáticos. En rojo se representa la zona que es codificada por la secuencia pTOK1-TM5:LC3 utilizada para el BLAST, mientras que en azul se muestra la zona codificada por la secuencia pTOK1-LC3:TM8 utilizada para el BLAST. TM: cruces transmembranales, P: región de poro, LC: Loop citoplasmático. Tomado y modificado de *Saldaña, et. al., 2002*.

```

1   MTREMNSFAK QTLGYGNMAT VEQESSAQAV DSHSNNTPKQ AKGVLAEEELK
                                     TM1
51  DALRERDERV SIINAEPSST LVFWFVVSC YFPVITACLG PVANTISIAC
                                     TM2
101 VVEKRSLKN NSVVTNPRSN DTDVLMNQVK TVFDPPGEFA VNIISLVLGF
                                     TM3
151 TSNIILMLHE SKKLTYLKSQ LINITGWTIA GGMLLDVIV CSLNDMPSIY
                                     TM4
201 SKTIGFWFAC ISSGLYLVCT IILTIHFIGY KLGKYPPTEN LLPNERSIMA
                                     TM5                                P1 (Filtro de selectividad L)
251 FTVLLSLWLI WGAGMFSGLL HITGNALYE CTVSLLTVGL GDILPKSVGA
                                     TM6
301 KIMVLIESLS GVVLMGLIVE MTRSIIQKSS GPIIFFHRVE KGRSKSKHY
                                     Loop citoplasmático                                TM7
351 MDSSKNLSER EADLMKCIR QTASRKQHE SLSVTIAIM ASVLLGALVE

```





**Figura 6. Perfil de hidropatía de TOK1.** Se utilizó el modelo de *Kyte & Doolittle*. Cisteínas: naranja, Triptófanos: morado, Tirosinas: azul, Fenilalaninas: verde. Window: 20.

### Modelamiento de Estructura Tridimensional

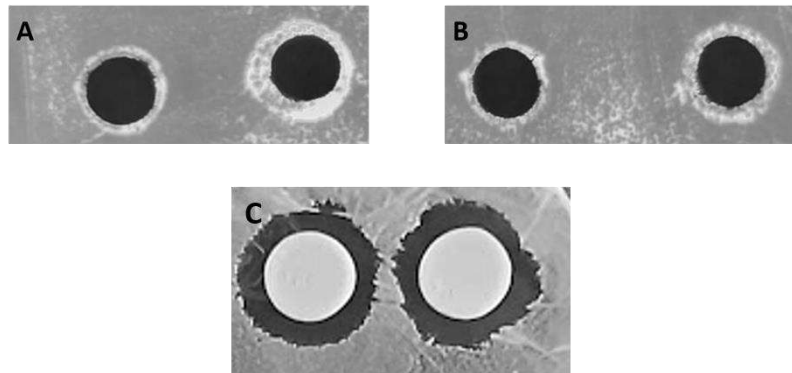
Para obtener los modelos 3D se utilizó la plataforma de libre acceso SWISS MODEL: <https://swissmodel.expasy.org/>, la cual obtiene los modelos en base a un análisis comparativo de homología de las estructuras proteicas y sus modelos dentro de UniProtKB. Una vez obtenidos los modelos dentro de la plataforma, se descargaron los archivos en formato PDB.

PyMol es una herramienta de visualización molecular de libre acceso. Con ayuda de este software se editó la estructura 3D de las proteínas obtenidas a través de las homología con TOK1. Los aminoácidos aromáticos dentro de la secuencia, así como las cisteínas y los filtros de selectividad específicos: TxGLGD y TxGxGD fueron marcados dentro del modelo para poder identificarlos fácilmente.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS.

### Susceptibilidad *in vivo* de *B. cereus* a *K1*

*TOK1* en *S. cerevisiae* presenta dos filtros de selectividad a potasio ( $K^+$ ), TVGLGD y TIGYGD, así como 13 cisteínas a lo largo de su secuencia, las cuales se han hipotetizado como esenciales para la interacción de la proteína *Killer* con el canal de voltaje (Gier, S., Lermen, M., Schmitt, M.J. et al. 2019). Estas cisteínas interaccionan con las propias cisteínas de la toxina *K1* formando puentes disulfuro, lo que permite la unión toxina-canal. Los experimentos de inhibición demostraron que existe un efecto inhibitorio por parte de la toxina *K1* hacia las especies y cepas de *Bacillus sp.* utilizadas (**Figura 7A y 7B, Tabla 2**). Sin embargo, el efecto no es de la misma magnitud que el que se puede observar cuando se prueba la toxina contra cepas sensibles de *S. cerevisiae* (**Figura 7C, Tabla 2**), ya que los halos de inhibición que presenta *Bacillus sp.* son de menor diámetro.



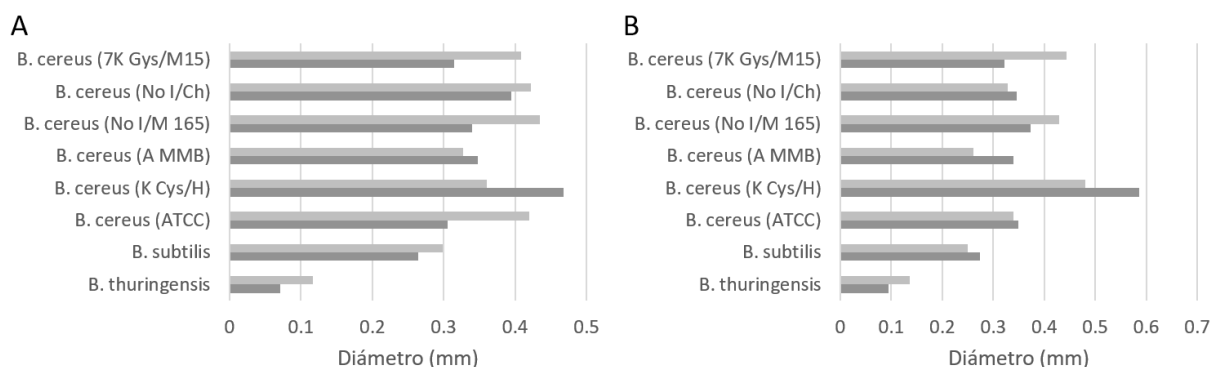
**Figura 7. Inhibición por *K1* a *B. cereus* y *S. cerevisiae*.** Se presenta el resultado de un experimento de inhibición basado en el método de Kirby-Bauer. En las condiciones A, B se inoculó un césped de *Bacillus sp.* (3mg/50 $\mu$ l) y se colocaron filtros de papel a los cuales se les inoculó 0.2mg y 0.5mg del sobrenadante con toxina *K1* de la cepa de *S. cerevisiae* 1085 (A) y 42300 (B). Efecto de inhibición de la toxina *K1* sobre 5x47 (*S. cerevisiae*) (C). Fotos obtenidas a 19 horas posteriores de incubación con la toxina.

<b>TABLA 2.</b> Inhibición de las Distintas Especies y Cepas de <i>Bacillus sp.</i> por <i>K1</i> .				
	N=1		N=2	
Medición a las 20 hrs	(Klus) 1085	(K1) 42300	(Klus) 1085	(K1) 42300
<i>Bacillus thuringensis</i>	0.0147	0.037	0.338	0.361
<i>Bacillus subtilis</i>	0.1567	0.176	0.445	0.503
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC)	0.2	0.288	0.466	0.611
<i>Bacillus cereus</i> (K Cys/H)	0.3682	0.233	0.594	0.558
<i>Bacillus cereus</i> (A MMB)	0.239	0.202	0.506	0.528
<i>Bacillus cereus</i> (No I/M 165)	0.236	0.303	0.49	0.622
<i>Bacillus cereus</i> (No I/Ch)	0.287	0.289	0.54	0.614
<i>Bacillus cereus</i> (7K Gys/M15)	0.205	0.281	0.482	0.593
Medición a las 24 hrs	1085	42300	1085	42300
<i>Bacillus thuringensis</i>	0.026	0.050	0.345	0.372
<i>Bacillus subtilis</i>	0.165	0.136	0.452	0.456
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC)	0.246	0.206	0.495	0.558
<i>Bacillus cereus</i> (K Cys/H)	0.501	0.345	0.687	0.67
<i>Bacillus cereus</i> (A MMB)	0.231	0.145	0.499	0.469
<i>Bacillus cereus</i> (No I/M 165)	0.273	0.297	0.511	0.619
<i>Bacillus cereus</i> (No I/Ch)	0.236	0.205	0.504	0.527
<i>Bacillus cereus</i> (7K Gys/M15)	0.213	0.312	0.488	0.631
<b><i>S. cerevisiae</i> (5x47)</b>	<b>0.574</b>	<b>0.579</b>	<b>0.55</b>	<b>0.579</b>

Se presentan los valores de la media geométrica de los datos obtenidos a las 20 y 24 horas, n=4 (filtros). En dos replicas distintas (N=1 y N=2). Se encuentran señaladas en escala de grises la cepa más sensible (*B. cereus* K Cys/H) y la cepa menos sensible (*B. thuringensis*). En negritas se indican los valores obtenidos a las 24 horas con *K1* sobre la cepa 5x47 de *S. cerevisiae*.

Se pudo observar que durante las 24 horas post inoculación de la toxina hay un crecimiento exponencial del halo de inhibición (**Figura 8**), sin embargo, después de este periodo de tiempo empieza a haber un decrecimiento del diámetro del halo, lo que podría indicar que el efecto inhibitorio no es tan eficaz debido a que las bacterias presentan una afinidad menor a la toxina que la que presenta el canal *TOK1* en *S. cerevisiae*. Sin embargo, el efecto existe, y confirma una vez más que el sistema

*Killer* es una interesante promesa para el futuro desarrollo de estrategias para controlar brotes de bacterias patógenas.



**Figura 8. Inhibición por K1 y Klus en *Bacillus* sp.** Gráficas de la media del diámetro de inhibición observada para cada cepa de *Bacillus* sp. a las 20 horas (A) y las 24 horas (B). En gris oscuro se muestran los resultados con la toxina Klus y en gris claro los resultados con la toxina K1. Unidades: milímetros (mm).

#### Obtención de Homologías a TOK1 de *S. cerevisiae*

A partir de la búsqueda bioinformática para identificar marcos de lectura homólogos a TOK1 se encontraron 32 secuencias homólogas, correspondientes tanto a especies como cepas específicas de los organismos sometidos al estudio, tal como muestra la **Tabla 3 (Tabla E y F de la sección APÉNDICE)**. Las proteínas obtenidas, en su mayoría pertenecen a canales de potasio, entre los cuales se encuentra el canal TOK1 de *C. albicans*, así como diversos canales de dos dominios de poro de *K. pneumoniae* y *S. typhimurium*. Otros en cambio son canales de un solo dominio de poro y proteínas hipotéticas de organismos, como UMAG\_05925, proteína hipotética de *Ustilago maydis* que fue descrita en el trabajo de Kämper J. et. al., 2006, en el que describen un cluster de proteínas secretadas sin ninguna función conocida. En ese trabajo, proponen que estas proteínas pueden tener un papel importante en la virulencia de *U. maydis*. De acuerdo a la secuencia encontrada, no se determina si se trata de un canal iónico o el tipo de proteína que realmente sea.

Sin embargo, debido a la presencia de ambos filtros de selectividad, consideramos que se trata de un canal de K<sup>+</sup>.

Las regiones alineadas presentan, en algunos casos, altos porcentajes de identidad (**Figura 9, Tabla E** de la sección **APÉNDICE**). Además de esto, podemos considerarlas identidades significativas debido a que las estructuras conservadas incluyen, en todos los casos, la secuencia del filtro de selectividad.

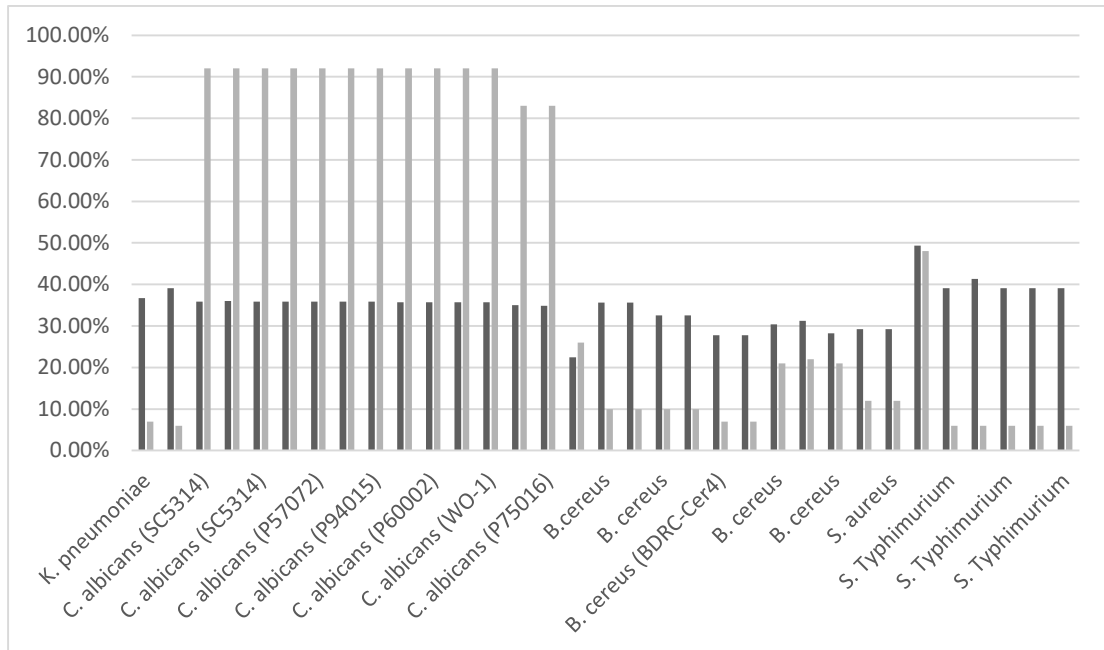
<b>Tabla 3. Secuencias Peptídicas Homólogas a TOK1</b>		
DESCRIPCIÓN	% Identidad	% Cobertura
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Transportador iónico	36.73%	7%
Familia de canales de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	39.13%	6%
<i>Candida albicans</i>		
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.84%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.99%	92%
Tok1p	35.84%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.84%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.84%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.84%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.84%	92%
Proteína hipotética L150_03278	35.69%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.69%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.69%	92%
Proteína hipotética conservada	35.69%	92%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	35.05%	83%
Subfamilia de canales de K <sup>+</sup> otro eucariota	34.88%	83%
<i>Bacillus cereus</i>		
Canal K <sup>+</sup>	22.43%	26%
Canal K <sup>+</sup>	35.63%	10%
Canal K <sup>+</sup>	35.63%	10%
Canal K <sup>+</sup>	32.56%	10%
Canal K <sup>+</sup>	32.56%	10%
Estudios de transporte iónico en canales de K <sup>+</sup>	27.78%	7%
Estructura de una mutante NaK selectiva a K <sup>+</sup>	27.78%	7%
Estructura de canal iónico selectivo a K <sup>+</sup>	30.43%	21%
MULTIESPECIE: Canal K <sup>+</sup>	31.25%	22%
Estructura cristalográfica de canal NaK <sub>2</sub> K mutante Y55F	28.26%	21%
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Proteína hipotética	29.21%	12%
<i>Ustilago maydis</i>		
Proteína hipotética UMAG_05925	49.35%	48%

<i>Salmonella Typhimurium</i>		
Familia de canales de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	39.13%	6%
Familia de canales de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	41.30%	6%
Familia de canales de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	39.13%	6%
Familia de canales de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	39.13%	6%
Proteína de membrana	39.13%	6%

De acuerdo a los resultados de *Roller, et. al. 2008*, a través de comparación de secuencias dentro del grupo *Ascomycetales*, el segundo filtro de selectividad (TIGYGD) es más estable que el primero (TVGLGD), lo cual podemos confirmar con los resultados presentados en la **Tabla 4**. Además, en este mismo trabajo demostraron que al hacer mutaciones en la tirosina (Y424) y en la leucina (L290) respectivas a cada filtro de selectividad de *TOK1* en *S. cerevisiae* observaron que al mutar únicamente la leucina del primer filtro de selectividad (L290) la apertura del canal en respuesta a cambios en el voltaje de despolarización es tres veces más rápida que el genotipo original. En cambio, al mutar al mismo tiempo ambos filtros de selectividad (dobles mutantes L290-P<sub>1</sub> y Y424-P<sub>2</sub>), es decir, intercambiar el orden de los residuos, se reduce la conductancia del canal 20 veces más que en cepas *wild type*. En el caso de las secuencias obtenidas en nuestro estudio observamos que tanto L290 como Y424 se encuentran conservadas en la mayoría de péptidos. Sin embargo, en algunos casos como *K. pneumoniae* (F en vez de Y424), *U. maydis* (F en vez de L290) y *S. typhimurium* (F en vez de Y424) se observa la sustitución por una fenilalanina en los filtros de selectividad (**Tabla F** de la sección **APÉNDICE**). Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado ya que la fenilalanina es un aminoácido aromático (benceno) al igual que la tirosina (fenol). Los compuestos aromáticos presentan nubes electrónicas de tipo  $\pi$ , las cuales tienen el potencial de formar interacciones no covalentes con cationes (K<sup>+</sup>), además de ser aceptoras de puentes de hidrógeno (*Rosselló C. G., 2006*). Por otro lado, tanto la fenilalanina como la leucina son residuos apolares, mientras que la tirosina es ligeramente polar. Todo esto les da la propiedad de atraer cargas positivas, fungiendo como filtro de selectividad a K<sup>+</sup>. En el caso de otros canales salientes de potasio como *Shaker*, el cambio de la tirosina por una fenilalanina o una valina en el filtro de selectividad 2



permite la conductancia de potasio, pero en voltajes reversibles biiónicos (biionic reversal voltages) aumenta la permeabilidad a sodio ( $\text{Na}^+$ ) (Roller, et. al., 2008). En el caso de *B. cereus*, el único filtro de selectividad que se encuentra conservado es el segundo filtro, lo cual se debe a que las proteínas encontradas son canales de un solo dominio de poro.



**Figura 9. Porcentaje de Identidad y Cobertura con ScTOK1 (TOK1 de *S. cerevisiae*).** En gris oscuro se muestra el porcentaje de identidad y en gris claro el porcentaje de cobertura.

En *S. aureus*, la región alineada coincide con la región de poro 1, sin embargo, en el filtro de selectividad se observa que en vez de la L290 se encuentra una tirosina, esto se puede atribuir a que la tirosina representa un aminoácido más apto para la correcta funcionalidad del filtro de selectividad, lo que además de ser propuesto por las características intrínsecas del aminoácido, se ha basado en el hecho de que esta conformación con tirosinas en el filtro de selectividad se encuentra más conservada en diferentes secuencias anteriormente analizadas por otros grupos de investigación (Roller, et. al. 2008). En levaduras, hongos y en células animales, la tirosina y el aspartato de los poros que se intercalan en el canal ensamblado parecen interactuar para estabilizar la estructura y la selectividad a  $\text{K}^+$ . Se ha propuesto que los aspartatos que se encuentran en la proximidad de los filtros de

selectividad fungen como sensores de pH y contribuyen a la conductancia y cinética del canal (Roller, et. al., 2005, Saldaña C., 2002).

De acuerdo con Roller, et. al., 2005, hay dos residuos de aspartato: Asp292 y Asp426 que modulan la cinética y la conductancia del canal, ya que se encuentran en el poro del canal ensamblado. A niveles altos de K<sup>+</sup> extracelular la activación es más lenta ( $\tau_a=90ms$  a 150mM) y la inactivación del canal es débil durante una despolarización constante. Esto se debe a que existe también la participación de la bomba H<sup>+</sup> ATPasa, la cual introduce K<sup>+</sup> al interior de acuerdo al voltaje de la membrana y saca H<sup>+</sup> acidificando el medio extracelular, lo cual eventualmente es detectado (aparentemente por los aspartatos presentes en las regiones de poro de TOK1) y activa al canal, permitiendo su actividad saliente, de manera que empieza a equilibrar la concentración de K<sup>+</sup> intracelular (Saldaña C., Peña A., 1999).

**Tabla 4.** Alineamiento de Regiones de Poro de ScTOK1 con las Secuencias Peptídicas Obtenidas.

Región de Poro 1 (aa247-aa353)

*Candida albicans*

ScTOK1	SIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLH-ITVGNALYFCIVSLLTVGLGDIIPKSVGAKIMVLIIFSLSGVVIMGLIVFMTRSIQKSSGPIFFHFRVKEGRSKSWKHYMDS
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
CaTOK1	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
PH L150_03278	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
PH conservada	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal K <sup>+</sup>	TLMLFTILFSTWIVIGAFPTMGLIDDISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGVIMGLIVATLRSVILSSAAPAFWNVDVENTRIALLAQLDKE
Canal iónico	VIGAFPT-----MSSLIDD-ISVGSALYCIIVSFLITIGLGDILPETS GARVAVLVFSLGGCLV
	F I F T I I M I I I Y I F I I I I I I A I W L L
	G I D I I I I V

*Staphylococcus aureus*

ScTOK1	SIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLH-ITVGNALYFCIVSLLTVGLGDIIPKSVGAKIMVLIIFSLSGVVIMGLIVFMTRSIQKSSGPIFFHFRVKEGRSKSWKHYMDS
Canal K <sup>+</sup>	GLMNALVFIITVITISLSEVFLVEPNIRKTYGDALWAVVTTITVYGDLSSTIVGRVIGFILMISGIGVIGLL
PH	GLMNALVFIITVITISLSEVFLVEPNIRKTYGDALWAVVTTITVYGDLSSTIVGRVIGFILMISGIGVIGLL
	A F I V T I L Y E P I I W A T T Y I S F L I V I

*Ustilago maydis*

ScTOK1	SIMAYTVLLSLWLIWGAGMFSGLLHITVGNALYFCIVSLLTVGLGDIIPKSVGAKIMVLIIFSLSGVVIMGLIVFMTRSIQKSSGPIFFHFRVKEGRSKSWKHY
PH UMAG_05928	GLVLGAGMGLVLSLGLSLEFVIVKIDFITALVFCATVLLVYGGVVFVSPGARVLLVLTATGI
	A G I Y I L I V I F I I I S V I F I V I Y P

Región de Poro 2 (aa354-aa467)

*Klebsiella pneumoniae*

ScTOK1	SFNLSREAECLMKIRQTASRKHWFSLSVTIAIEMAFNLGALVFKFAENSVFNCIYFCFLCLLITIGYDVFAPRTGAGRAFFVINALGAVPIMGAILSTVGDLL
Transportador iónico	SNHEGVVWAVVMTITVYSGEKTKFKTHLGRALAVLMLVSLVIV-SLETT
Canal de K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	IHYCVVSGSTLFGSGLSQTAPGRLEFALWQIFVSVGLFGLMGKV
	WH G I W A V V M T I K L A I V I I Y I S V G S F L I T I G

*Candida albicans*

ScTOK1	SRNLSEREAFLDMKCIQRTASRRKQHWFSLSVTIAIEMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLITIGYGDYAPRTGAGRAFFVINALGAVPLMGAILSTVGDLL
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
CaTOK1	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
PH L150_03276	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
PH conservada	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal K <sup>+</sup>	NRHLTSESEFHEMRVLRKRVSRHKVSLALTIAVEMIFWLLGALIFQKIERKWSYFNAMYFCFLCLITIGYGDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTILVSNVGDTE
Canal iónico	MGSLI---DDISYGSALYVCIVSFLITGLGDLLEETSGAKVAVLVSFSLGGCLVSTWMTSTREYY
	E V     RV     IIII         A   IIIIII             V   V   T
	I G Y IVSF   L I   AV F   V F Y-

**Bacillus cereus**

ScTOK1	DLMKCIQRTASRRKQHWFSLSVTIAIEMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLITIGYGDYAPRTGAGRAFFVINALGAVPLMGAILSTVGDLL
Canal K <sup>+</sup>	ARKQLW---IAVICMISVV-ILGALGEMTIEEISFFQAFWMTMITVLTIGYGDYAVLTHAGVFPALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM---AAMVEGNLF
Canal K <sup>+</sup>	ARKQLWIAV---ICMTEVVLGTLGEMAEIEISLQAFWMTMITVLTIGYGDYAVLTHAGVFPALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM
Canal K <sup>+</sup>	ARKQLWIAV---ICMTEVVLGTLGEMAEIEISLQAFWMTMITVLTIGYGDYAVLTHAGVFPALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM
Canal K <sup>+</sup>	ARKQ---LGIIVICMISVV-ILGALGEMTIEEISFFQAFWMTMITVLTIGYGDYAVLTHAGVFPALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM
Canal K <sup>+</sup>	ARKQ---LGIIVICMISVV-ILGALGEMTIEEISFFQAFWMTMITVLTIGYGDYAVLTHAGVFPALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM
	-- V   M VV I     T   I P   A WMTMITV     A     I Y I A M   F
	C     A L     V
ScTOK1	DLMKCIQRTASRRKQHWFSLSVTIAIEMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLITIGYGDYAPRTGAGRAFFVINALGAVPLMGAILSTVGDLL
Canal K <sup>+</sup>	GTIFYSTVEGLRPIDALYESVVTLTIGYGDYFSPQTDGPKIIFTILYIFIGIGLV
Mutante NaK selectiva a K <sup>+</sup>	GTIFYSTVEGLRPIDALYESVVTLTIGYGDYFSPQTDGPKIIFTILYIFIGIGLV
Canal iónico selectivo a K <sup>+</sup>	GTIFYSTVEGLRPIDALYESVVTLTIGYGDYFSPQTDGPKIIFTILY
Canal K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	LSGTIFYSTVEGLRTIDALYESVVTLTIGYGDYFSPQTDGPKIIFTIF
poro	GTIFYSTVEGLRPIDALYESVVTLTIGYGDYFSPQTDGPKIIFTILY
Canal NaK2K (Y55F mutante)	IS I Y T L P I A     SVVT   T   F     L
	T F

**Ustilago maydis**

ScTOK1	SRNLSEREAFLDMKCIQRTASRRKQHWFSLSVTIAIEMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLITIGYGDYAPRTGAGRAFFVINALGAVPLMGAILSTVGDLL
PH UMRQ_05925	LALAAVSVTAGFWLLGALAEPTVAESWSYGGAMWFCFIAMIITIGYGDYHPATQLGRAIFVIM
	T   IIII     Y     G A W     IAMI       I

**Salmonella typhimurium**

ScTOK1	SKNLSEREAFLDMKCIQRTASRRKQHWFSLSVTIAIEMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLITIGYGDYAPRTGAGRAFFVINALGAVPLMGAILSTVGDLL
Canal K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	IYYCSVVGSTLGFGLSPEQAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV
Canal K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	IYYCSVVGSTLGFGLSPEQAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV
Canal K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	IYYCSVVGSTLGFGLSPEQAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV
Canal K <sup>+</sup> de dos dominios de poro	IYYCSVVGSTLGFGLSPEQAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV
Proteína de membrana	IYISVVGSTLGFGLSPEQAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV
	Y   SVVGS F L   T   I G
	F

PH: proteína hipotética, Canal K<sup>+</sup>: subfamilia K otro eucariota, CaTOK1: canal TOK1 de *Candida albicans*, ScTOK1: Canal TOK1 de *S. cerevisiae*, Canal iónico: selectivo a K<sup>+</sup>. |:conservada, -:delección.

De acuerdo a nuestros resultados en el alineamiento de secuencias, podemos observar que en todas las secuencias obtenidas los aspartatos (D) se encuentran conservados, lo que nos permite inferir una importancia clave de este aminoácido para el funcionamiento y estructura del canal.

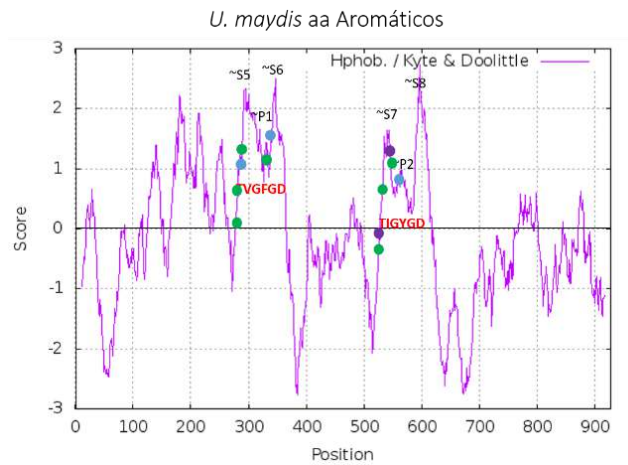
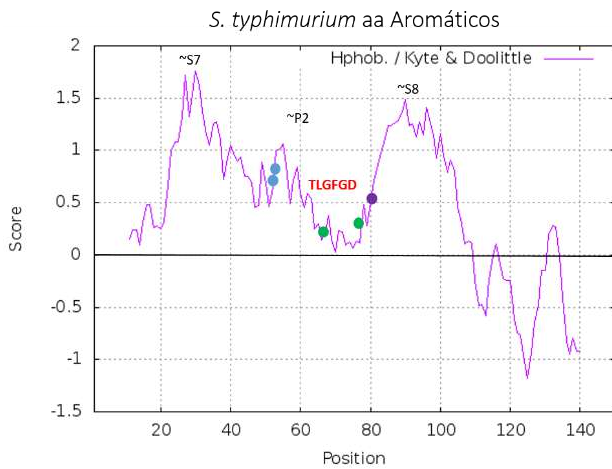
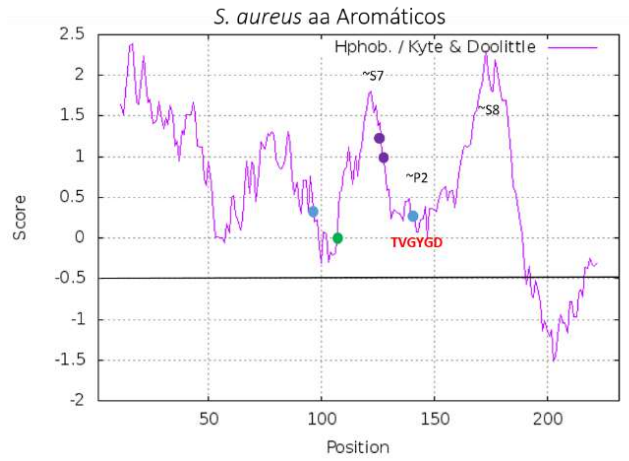
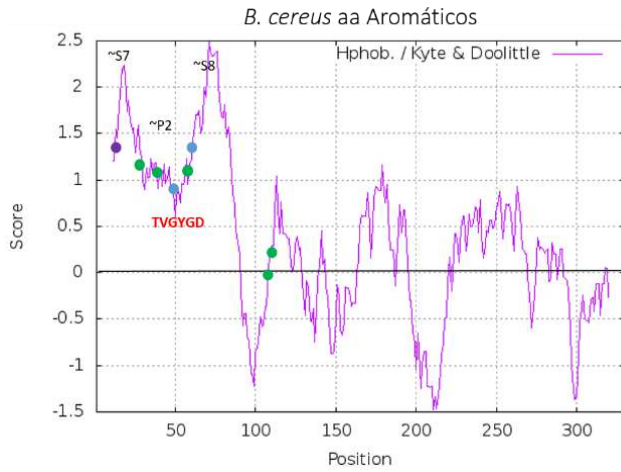
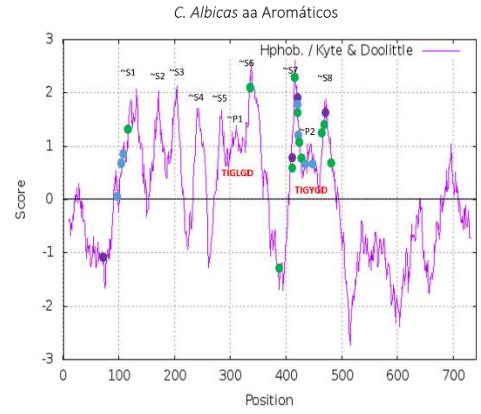
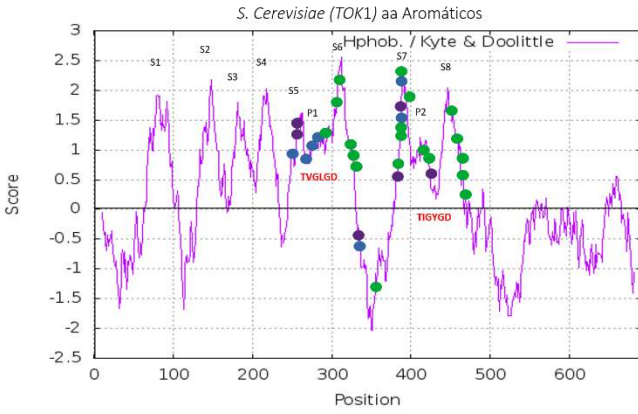
Otro punto importante a destacar es el de las cisteínas. Debido a su capacidad de formar puentes disulfuro, es posible que estos residuos jueguen un papel fundamental en la interacción canal-toxina. De acuerdo a los resultados obtenidos con *C. albicans*, dentro de la primera región de poro, la única cisteína presente (C281) está conservada en todas las secuencias. En el caso de *S. aureus* es

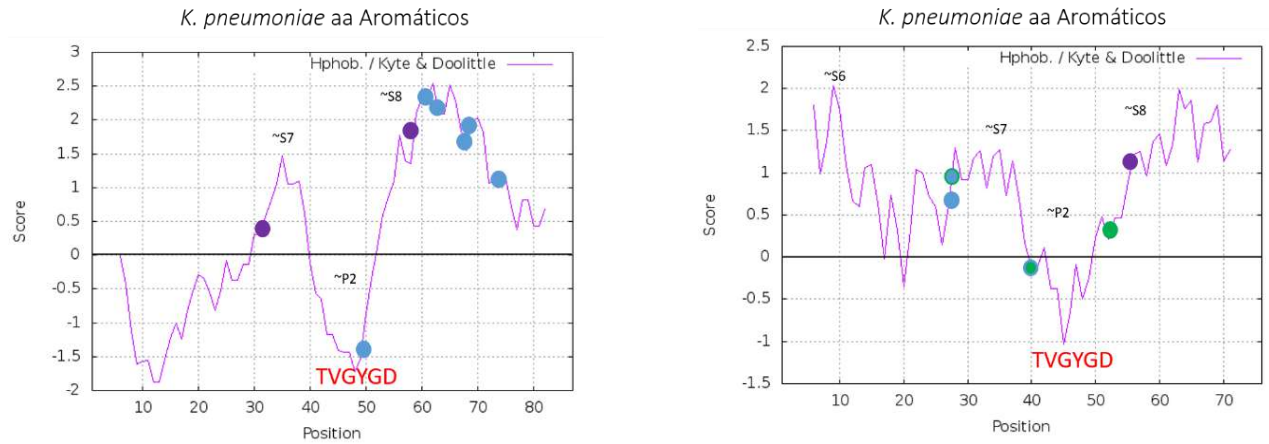
sustituida por una alanina y en *U. maydis*, la C281 es sustituida por una serina (**Tabla 5**). Por lo tanto, es posible que esta cisteína no represente un papel fundamental en la interacción con la toxina y el canal.

<b>Tabla 5.</b> Cisteínas en la Primer Región de Poro			
<b>1a región de poro</b>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>U. maydis</i>
C281	Conservada	Alanina	Serina

En la segunda región de poro, en *K. pneumoniae*, solo se encuentra la C415 conservada en una secuencia correspondiente a un canal de dos dominios de poro. En el caso de *C. albicans*, tanto la C415 y la C418 se encuentran conservadas. En *B. cereus* ninguna cisteína está conservada, sin embargo, en todas las secuencias se observan cisteínas cercanas a la región de poro, en sustitución de otros aminoácidos como fenilalanina e isoleucina. En *U. maydis* la C415 está conservada al igual que en *S. typhimurium*, donde solo la C415 está conservada. Estos resultados sugieren que la C415 puede ser de los residuos más importantes que interactúen con la toxina, ya que en todas las secuencias alineadas se encuentra presente (**Tabla 6**).

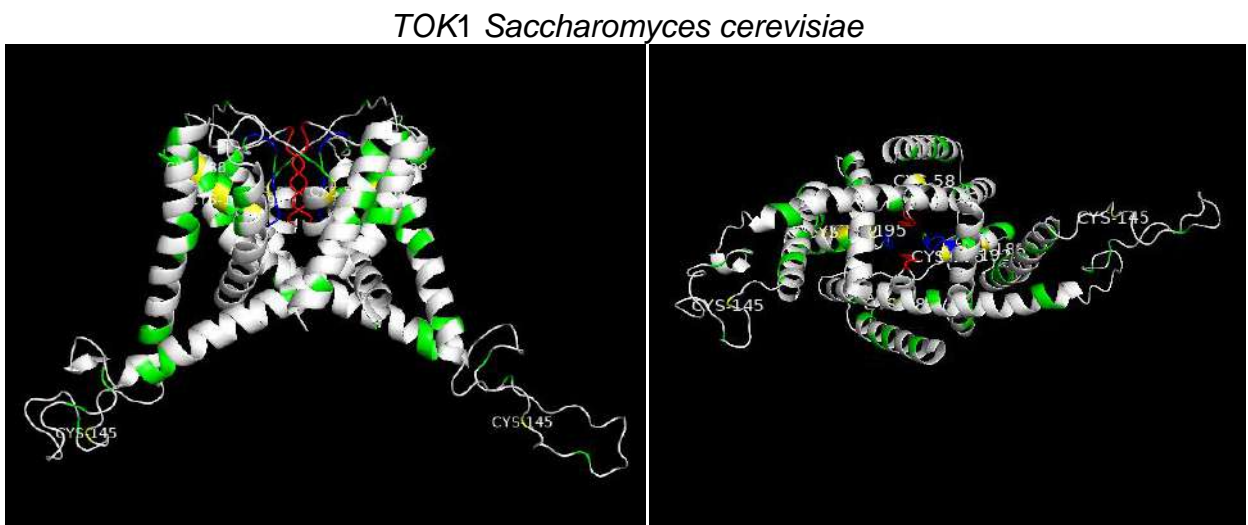
<b>Tabla 6.</b> Cisteínas en la Segunda Región de Poro					
<b>2nda región de poro</b>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>U. maydis</i>	<i>S. typhimurium</i>
C368	-	Valina	-	-	-
C411	Transportador iónico: Glicina Dos dominios de poro: -	Alanina	Alanina	Alanina	-
C415	Transportador iónico: Alanina Dos dominios de poro: conservada	Conservada	Treonina y Serina	Conservada	Conservada
C418	Transportador iónico: Treonina Dos dominios de poro: Valina	Conservada	Treonina	Alanina	Valina



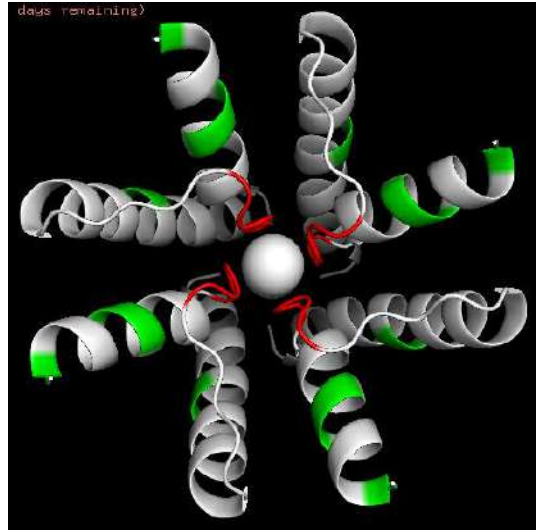
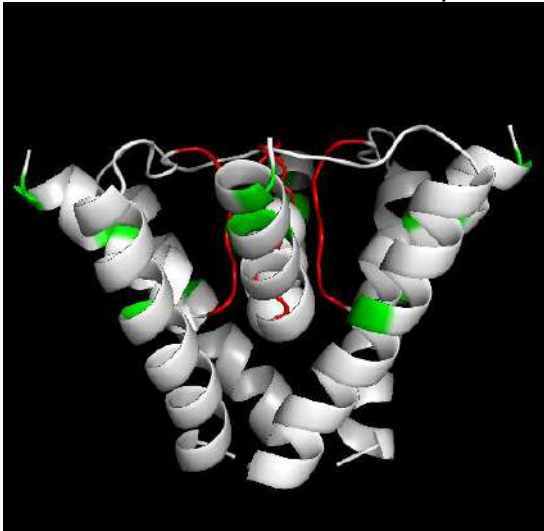


**Figura 10. Perfiles de Hidropatía.** Se marcan los aminoácidos aromáticos en las regiones de poro. Verde: fenilalaninas. Azul: tirosinas. Morado: triptófano.

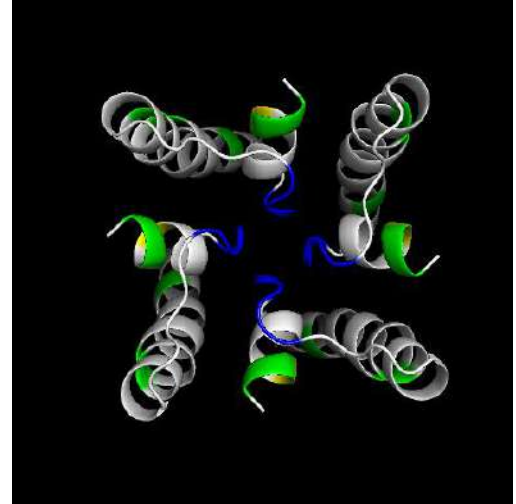
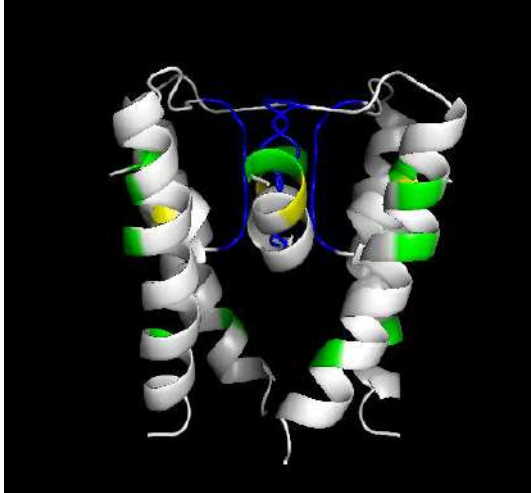
Los perfiles de hidropatía analizados (**Figura 10**) demuestran que la estructura secundaria de los segmentos homólogos analizados comparados con *S. cerevisiae* son muy similares en cuanto a topología, y la posición de los aminoácidos tanto aromáticos como cisteínas se encuentran ubicados en regiones cercanas a los dominios de poro y muchos se encuentran conservados en posiciones clave dentro del mismo ScTOK1.



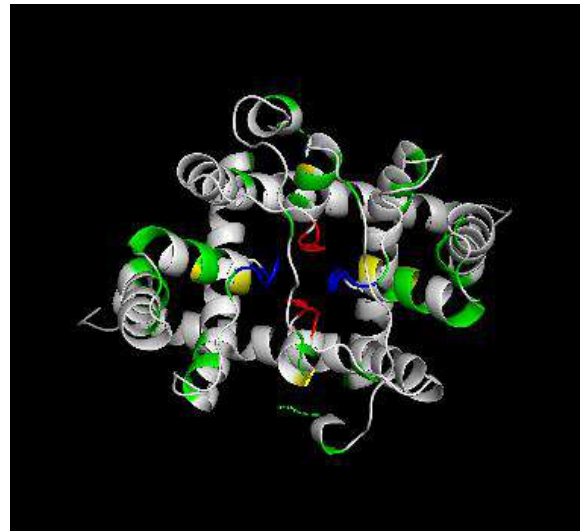
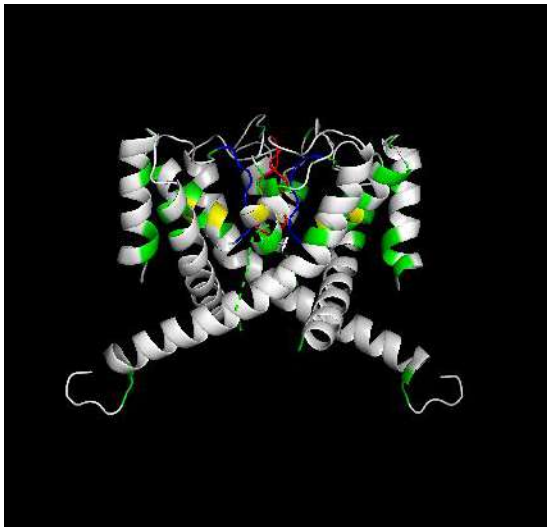
*Klebsiella pneumoniae* WP\_163602546.1



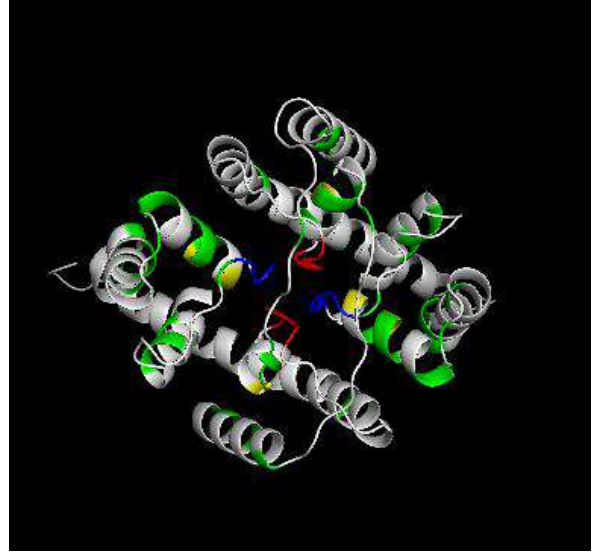
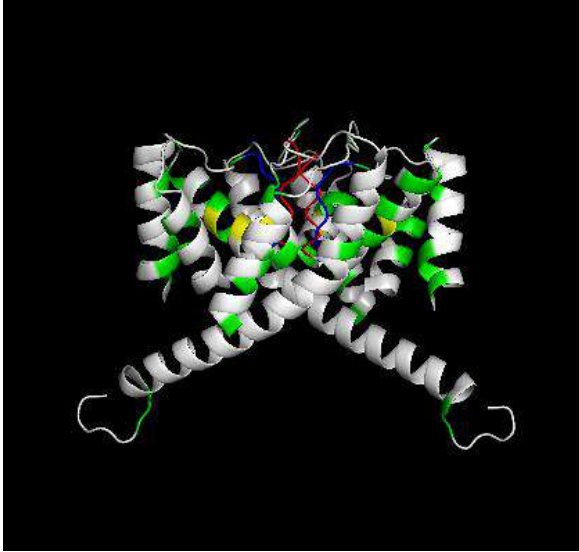
*Klebsiella pneumoniae* WP\_200850179.1



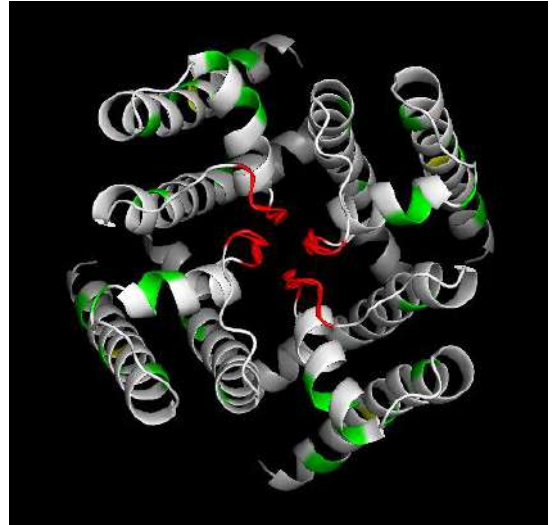
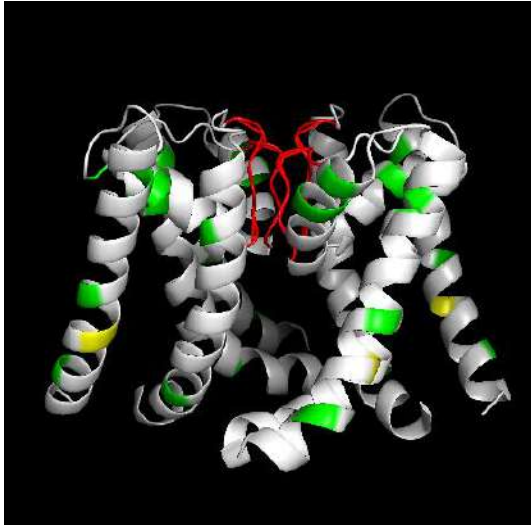
*Candida albicans* KGR09827.1



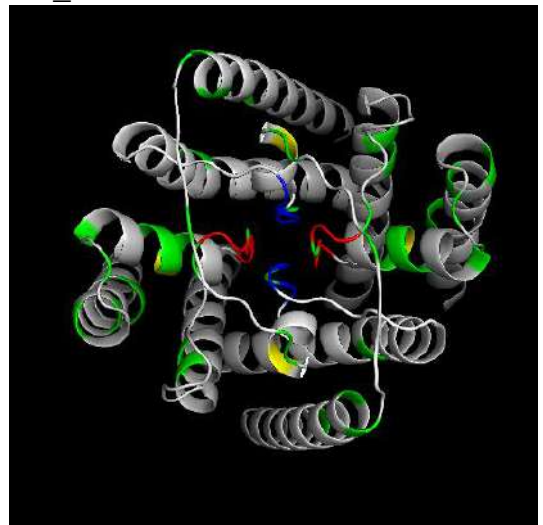
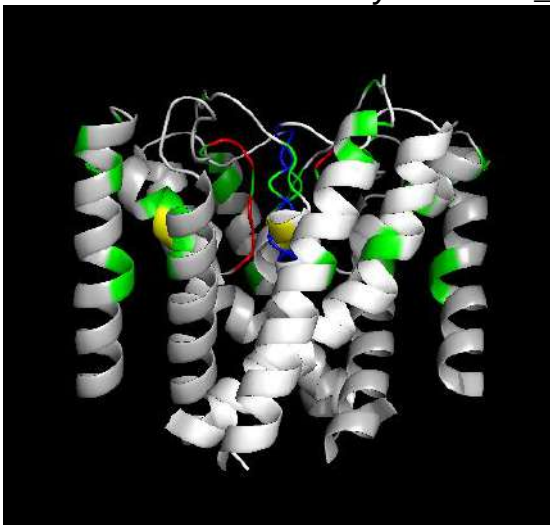
*Candida albicans* TOK1p XP\_712629.2



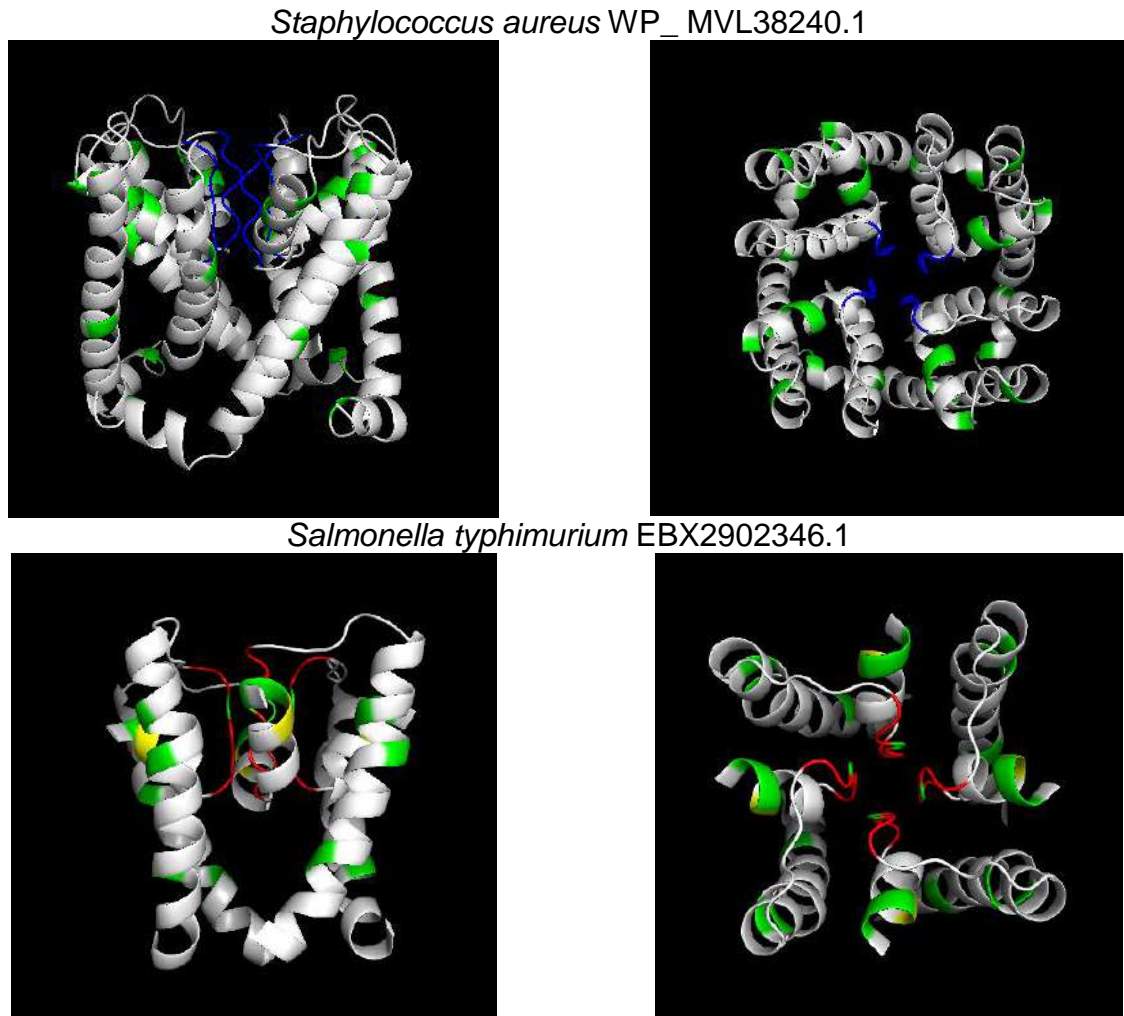
*Bacillus cereus* PFS60334.1



*U. maydis* UMAG\_05925 XP\_011392261.1







**Figura 11. Modelos 3D de Proteínas que Presentan Identidad con ScTOK1.** Se marcan en color los dominios importantes. Verde: aminoácidos aromáticos, amarillo: cisteínas, primer filtro de selectividad: azul, segundo filtro de selectividad: rojo, regiones ortólogas a ScTOK1: blanco.

Analizando en conjunto las secuencias obtenidas representadas en la **Tabla 4**, los perfiles de hidropatía (**Figura 10**) y los modelos de estructura terciaria (**Figura 11**) podemos resumir los siguientes resultados:

Ambos filtros de selectividad se encuentran conservados en *U. maydis* (TVGFGD y TIGYGD) y *C. albicans* (TIGLGD y TIGYGD), lo que sugiere que la presencia de ambos filtros en los dominios de poro es una propiedad emergente en eucariotas, ya que ninguna de las bacterias analizadas conserva ambos. En el caso del **primer**

**filtro de selectividad TVGLGD** se conserva en *S. aureus* (TVGYGD) y en un canal de dos dominios de poro de *K. pneumoniae* (WP\_200850179.1) (TLGFGD) mientras que el **segundo filtro de selectividad TIGYGD** se encuentra conservado en *S. typhimurium*, *B. cereus* y en un transportador iónico de *K. pneumoniae* (WP\_163602546.1).

El hongo levaduriforme *C. albicans* tiene distintas proteínas que presentaron porcentajes de identidad importantes con ScTOK1 (n=13), además de un canal TOK1p propio de este organismo. En las diversas secuencias se conservan ambos filtros de selectividad, TIGLGD y TIGYGD, 8 aminoácidos aromáticos conservados en la primera región de poro y 16 en la segunda región de poro. Además, las cisteínas C281, C415 y C418 se encuentran conservadas de acuerdo a ScTOK1.

En el caso de *S. aureus* se encontraron dos secuencias homólogas, pertenecientes a un canal de K<sup>+</sup> y a una proteína hipotética. En ellas se conserva principalmente la región de poro 1 por porcentaje de identidad, sin embargo, el filtro de selectividad presenta una tirosina (Y) en vez de la leucina (L) siendo TVGYGD en vez de TVGLGD, 4 aminoácidos aromáticos conservados y ninguna citosina conservada o presente en la región.

Para *U. maydis* se encontró una sola homología con la proteína hipotética UMAG05925, la cual presenta una sustitución de la leucina (L) por una fenilalanina (F) en el filtro de selectividad de la primera región de poro, 6 aminoácidos aromáticos conservados y presenta una inserción de serina (S) entre la fenilalanina F315 y la cisteína C317, estando esta última en una posición homóloga a ScTOK1 (C281). Así mismo, en la segunda región de poro, se encuentran conservados el segundo filtro de selectividad TIGYGD, 13 aminoácidos aromáticos y la citosina C415.

En *K. pneumoniae* se encontraron dos secuencias con distintos filtros de selectividad, una homóloga al filtro de selectividad 1 pero con la sustitución de la leucina (L) por fenilalanina (F), y una al filtro de selectividad 2. Sin embargo, ambas secuencias tienen mayor porcentaje de identidad con la región de poro 2, sin importar el filtro de selectividad que presenten. El transportador iónico presenta 4

aminoácidos aromáticos conservados pero ninguna cisteína, y el canal de K<sup>+</sup> de dos dominios de poro presenta 4 aminoácidos aromáticos conservados y la cisteína C415 conservada.

*B. cereus* solo conserva el segundo filtro de selectividad TVGYGD (Sustitución de isoleucina (I) por una valina (V)) y por porcentaje de identidad es más similar a la segunda región de poro. Se encontraron dos grupos de secuencias similares entre sí, en el primer grupo podemos ver al segundo filtro de selectividad, 7 aminoácidos aromáticos conservados, algunos siendo exactamente el mismo aminoácido o en su caso siendo sustituido por otro aminoácido aromático, y la sustitución de una fenilalanina por una citosina, siendo esta última la única citosina encontrada en la secuencia alineada. En el segundo grupo de secuencias se conserva de igual manera el segundo filtro de selectividad y 6 aminoácidos aromáticos pero ninguna citosina se encuentra presente. Se obtuvieron 10 secuencias con homologías en este organismo, aunque solo fuera con un porcentaje de cobertura mínimo.

Para *S. typhimurium*, se encontraron 5 secuencias homólogas, de las cuales 4 son canales de dos dominios de poro. Estas secuencias se alinearon con la segunda región de poro, conservando el segundo filtro de selectividad pero sustituyendo a la tirosina por una fenilalanina. Se encuentran conservados 6 aminoácidos aromáticos y la citosina C415.

De acuerdo a los porcentajes de identidad y cobertura (**Tabla 3, Figura 9**) se observa una relación más estrecha entre ScTOK1 y las proteínas encontradas en los eucariotas *U. maydis* y *C. albicans*. De acuerdo a los porcentajes obtenidos este es el orden de identidades: *C. albicans* (92-83%), *U. maydis* (48%), *B. cereus* (10-26%), *S. aureus* (12%), *S. typhimurium* (6%) y *K. pneumoniae* (6%). Esto tomando en cuenta también los porcentajes de identidad.

Podemos observar que los aminoácidos aromáticos son esenciales en el filtro de selectividad, siendo tirosinas o fenilalaninas las que dominan la cuarta posición en esta región. Las leucinas que también están presentes en algunos filtros de selectividad se han ido sustituyendo por fenilalaninas o por las mismas tirosinas a

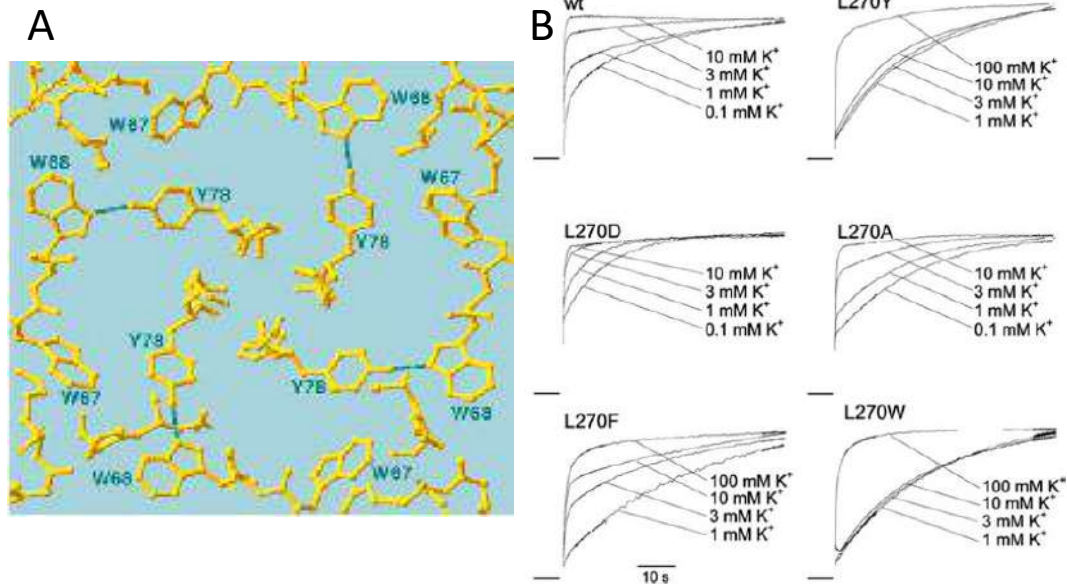
lo largo de la evolución. Esto lo podemos observar en *U. maydis*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. En *S. typhimurium* se observa la sustitución de una tirosina por una fenilalanina, lo que apoya la hipótesis de la importancia de los aminoácidos aromáticos en los filtros de selectividad a K<sup>+</sup>. También se observa que en diversas secuencias hay leucinas sustituyendo a diversos aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, la relación entre leucinas y aminoácidos aromáticos o su función sustituyente surgen como un nuevo enfoque a estudiar para entender el efecto que tienen en la cinética y funcionamiento normal de TOK1 y otros canales de potasio. Una similitud es que tanto los aminoácidos aromáticos como la leucina, que pertenece al grupo de los aminoácidos alifáticos, se caracterizan por ser hidrofóbicos además de presentar valores de pK<sub>1</sub> y pK<sub>2</sub> similares (**Tabla 10**), la tirosina es la única que se puede considerar *ligeramente* hidrofílica debido al grupo OH dentro de su anillo fenol (*Rodwell, V. W., 2015*).

**Tabla 10.** Valores de pK de la cisteína, leucina y aminoácidos aromáticos (*Rodwell, V. W., 2015*).

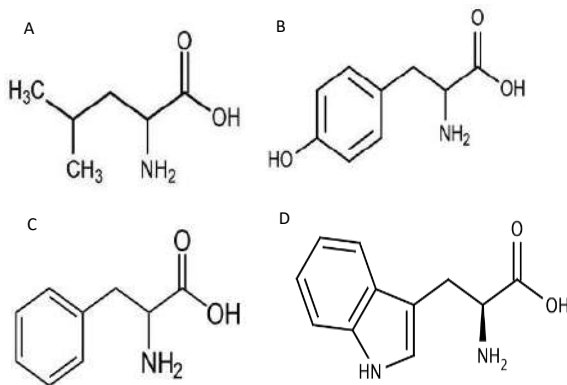
Aminoácido	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
Cisteína	1.9	10.8
Leucina	2.3	9.7
Tirosina	2.2	9.1
Fenilalanina	2.2	9.2
Triptófano	2.4	9.4

Es posible que las leucinas tengan un impacto específico en la conformación estructural del canal, pudiendo tener una interacción similar a los puentes de hidrógeno que se forman entre la tirosina Y424 y el triptófano W393 de la región TM7-P2 de TOK1, los cuales dan estabilidad a la región del poro (**Figura 12A**) (*Doyle, D. A., et. al., 1998*). Además, de acuerdo a *Johansson, I., & Blatt, M. R., 2006*, la leucina (L270) presente en el primer filtro de selectividad (P1) tiene un papel fundamental en la sensibilidad a K<sup>+</sup> del canal, ya que permite que se active de manera correcta la corriente del canal, por lo que mutaciones en este residuo hacen

necesaria mayor concentración de  $K^+$  para poder activar el canal y la activación es más lenta (**Figura 12B**).

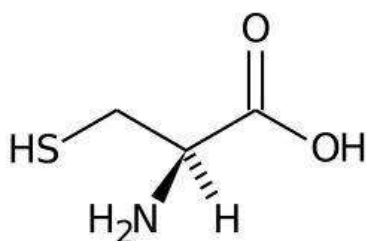


**Figura 12. Importancia del Triptófano y Leucina en los canales de  $K^+$ .** A. Interacción entre la tirosina Y424 y el triptófano W393 formando puentes de hidrógeno, confirmando la importancia de los aminoácidos aromáticos en la vecindad del poro. Tomada de *Doyle, D. A., et. al., 1998*. B. Corrientes obtenidas de ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) inyectados con cDNA de wt, L270Y, L270D, L270A, L270F y L270W a diferentes concentración de  $K^+$  extracelular. Tomada de *Johansson, I., & Blatt, M. R., 2006*.



**Figura 13. Aminoácidos aromáticos y Leucina.** Comparación de la estructura química de los aminoácidos aromáticos y la leucina, que se sustituyen dentro de los filtros de selectividad a  $K^+$ . A) Leucina B) Tirosina (fenol) C) Fenilalanina (benceno) D) Triptófano (indol).

Debido al grupo sulfhidrilo en las cisteínas, estas pueden formar múltiples enlaces, entre los cuales están los enlaces disulfuro entre dos cisteínas, característica que parece favorecer la unión de la toxina *K1* con el canal *TOK1* en *S. cerevisiae*. Así mismo, el átomo de azufre (S) en las cisteínas interactúa con los carbonos (C) en la cara de los anillos aromáticos en los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina (**Figura 13, Figura 14**). El grupo sulfhidrilo forma puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo de los residuos aromáticos (*Debnath Pal & Pinak Chakrabarti, 1998*). De acuerdo a esta información podemos deducir que los aminoácidos aromáticos que se encuentran altamente conservados en las secuencias homólogas a *TOK1* representan un papel fundamental en la interacción toxina-canal, y que por lo tanto podrían estar compensando la ausencia de las diversas cisteínas en las regiones de poro, siendo las cisteínas conservadas las que forman enlaces disulfuro con las cisteínas de la toxina *K1* y los aminoácidos aromáticos los que forman enlaces sulfhidrilo con las cisteínas presentes en la toxina *K1*. Es probable que si se eliminaran tanto cisteínas como aminoácidos aromáticos se inhibiría el efecto *Killer*. Inclusive, como se observa la sustitución de diversas cisteínas por aminoácidos aromáticos y viceversa en las secuencias obtenidas, se puede corroborar la similitud que presentan en comportamiento hidrofóbico estos aminoácidos (estando las cisteínas en su conformación SH- y sin formar puentes disulfúro) (*Nagano, N., Ota, M., & Nishikawa, K., 1999*).



**Figura 14.** Estructura química de L-cisteína.

## CONCLUSIONES.

*Bacillus cereus* es efectivamente vulnerable al efecto *Killer* de la toxina *K1*, lo cual representa un excelente resultado para este trabajo y mejora la perspectiva que se tiene en cuanto al sistema *Killer* y su posible función como péptido antimicrobiano. Sin embargo, el efecto que *K1* tiene sobre este organismo es menor que el que presenta sobre el mismo *S. cerevisiae* y se necesita de una mayor concentración de toxina para ver un efecto similar al que se observa en la levadura. En cuanto a la búsqueda de secuencias homólogas, se puede determinar que en efecto, el canal *TOK1* presenta distintas proteínas ortólogas en los microorganismos estudiados y que previamente han demostrado ser vulnerables a las toxinas *K1*. Estas similitudes encontradas arrojaron datos muy interesantes sobre la función de algunos residuos presentes en el canal. En los filtros de selectividad de las regiones de poro en los canales de potasio, las glicinas parecen ser muy importantes como parte de la estructura principal, pudiendo estar combinadas con una leucina, tirosina o una fenilalanina. El cambio entre la tirosina y la fenilalanina es probablemente poco significativo, debido a que ambos poseen características similares al ser parte del grupo de los aminoácidos aromáticos, contrario al caso de la leucina. Junto con la leucina poseen la capacidad de atraer cargas positivas, lo cual explicaría la afinidad por el catión  $K^+$  en esta región. Los aspartatos D292 y D426 se encuentran conservados en todas las secuencias alineadas de todos los microorganismos, al igual que la cisteína C415, lo cual sugiere que estos residuos son de fundamental importancia para la interacción entre el canal *TOK1* y la toxina *K1*. Se puede deducir una posible compensación de la función de las cisteínas no conservadas por los aminoácidos aromáticos debido a sus similitudes en cuanto a funciones e interacciones, explicadas previamente en el apartado de DISCUSIÓN Y RESULTADOS. Al observar que los porcentajes de cobertura obtenidos entre el canal *TOK1* de *S. cerevisiae* y los microorganismos estudiados no presentan valores altos, podemos concluir que *la función del canal se basa en la conservación de dominios específicos y no en una secuencia completa determinada*. Se observa que todas las regiones alineadas pertenecen a las regiones de poro, tanto P1 como P2, por lo tanto, estas son las regiones que se pueden considerar fundamentales

para la interacción canal-toxina y debido a que se encuentran diversos residuos conservados, podemos inferir que la importancia de estos, en especial de los aspartatos, cisteínas y glicinas, así como los residuos aromáticos, es debido a que funcionan como principales reguladores de la función del canal y de la interacción toxina-canal. Algunos, como los aspartatos D292 y D426, representan posiblemente una función relacionada con el pH del medio, y otros como la C415 y los aminoácidos aromáticos representan un punto de unión con la toxina *K1* formando enlaces, disulfuro o sulfhidrilo respectivamente, con las cisteínas presentes en la toxina.

Los resultados obtenidos son de gran ayuda para esclarecer el funcionamiento de los canales de potasio y la dinámica que se da entre la toxina *K1* y sus blancos moleculares. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios sobre los residuos presentes en el canal, como mutaciones específicas y cambios de las condiciones extracelulares para poder caracterizar de manera experimental cómo se da la interacción con la toxina, además de nuevas funciones del canal *TOK1*.



## REFERENCIAS.

- *Antibiotic resistance threats in the United States*. (2013). Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- *Antibiotic resistance threats in the United States*. (2019). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
- Aw, B., Ce, R., & Wm, K. (1959). Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics*, 7, 574-580.
- Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. T. (2021, 10 diciembre). *Infecciones por estafilococos*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>
- Dolly, J. O., & Parcej, D. N. (1996). Molecular properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(3), 231–253. <https://doi.org/10.1007/bf02110698>
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360), 69–77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>
- Ferris, A. C., & Walbot, V. (2020). Understanding *Ustilago maydis* Infection of Multiple Maize Organs. *Journal of Fungi*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.3390/jof7010008>
- Flegelová, H., Novotná, D., Vojtísková, K., & Janderová, B. (2002). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different

- degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Research*, 2(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00070.x>
- Gal-Mor, O. (2018). Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonellae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(1). <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-18>
  - Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16(1), 119–131. <https://doi.org/10.1023/a:1007966229595>
  - Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479-480, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
  - 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., & Breinig, F. (2017). Expression of K1 Toxin Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* Mimics Treatment with Exogenous Toxin and Provides a Useful Tool for Elucidating K1 Mechanisms of Action and Immunity. *Toxins*, 9(11), 345. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>
  - Glasset, B., Herbin, S., Granier, S. A., Cavalié, L., Lafeuille, E., Guérin, C., Ruimy, R., Casagrande-Magne, F., Levast, M., Chautemps, N., Decousser, J. W., Belotti, L., Pelloux, I., Robert, J., Brisabois, A., & Ramarao, N. (2018). *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLOS ONE*, 13(5), e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>
  - Hodgson, V. J., Button, D., & Walker, G. M. (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141(8), 2003–2012. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-8-2003>
  - Johansson, I., & Blatt, M. (2006). Interactive domains between pore loops of the yeast K<sup>+</sup> channel TOK1 associate with extracellular K<sup>+</sup> sensitivity. *Biochemical Journal*, 393(3), 645–655. <https://doi.org/10.1042/bj20051380>

- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., . . . Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, *444*(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., & Goldstein, S. A. N. (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>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, *157*(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M. K., Layer, F., Werner, G., & Krause, G. (2016). Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 55–87. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_497](https://doi.org/10.1007/82_2016_497)
- Nagano, N., Ota, M., & Nishikawa, K. (1999). Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins. *FEBS Letters*, *458*(1), 69–71. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01122-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01122-9)
- Pal, D., & Chakrabarti, P. (1998). Different Types of Interactions Involving Cysteine Sulfhydryl Group in Proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *15*(6), 1059–1072. <https://doi.org/10.1080/07391102.1998.10509001>
- Poulain, D. (2013). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, *41*(2), 208–217. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.813904>
- Programa Universitario de Investigación en Salud. (2018). *Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos*.

Universidad Nacional Autónoma de México.

[http://www.puis.unam.mx/slider\\_docs/reporte-ucradigital.pdf](http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reporte-ucradigital.pdf)

- Ramírez Villareal Jimena, (2018). Estudio de la relación estructura-función de la toxina *Killer (K1)* de *Saccharomyces cerevisiae* en el canal de potasio TOK1 y sus posibles homólogos en microorganismos de importancia biomédica. *Tesis de Licenciatura en Microbiología*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rascovan, N., Telke, A., Raoult, D., Rolain, J. M., & Desnues, C. (2016). Exploring divergent antibiotic resistance genes in ancient metagenomes and discovery of a novel beta-lactamase family. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 886–895. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12453>
- Renwick, M. J., Brogan, D. M., & Mossialos, E. (2015). A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 69(2), 73–88. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.98>
- Rodwell, V. (2018). *Harper bioquímica ilustrada* (30.<sup>a</sup> ed.). MCGRAW HILL.
- Roller, A., Natura, G., Bihler, H., Slayman, C. L., & Bertl, A. (2008). Functional consequences of leucine and tyrosine mutations in the dual pore motifs of the yeast K<sup>+</sup> channel, Tok1p. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 456(5), 883–896. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0446-0>
- Roller, A., Natura, G., Bihler, H., Slayman, C. L., Eing, C., & Bertl, A. (2005). In the yeast potassium channel, Tok1p, the external ring of aspartate residues modulates both gating and conductance\*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 451(2), 362–370. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1418-2>
- Rosselló C. G. (2006). Estudio Teórico de las Interacciones Entre Aniones y Sistemas π. *Tesis Doctoral*. Universitat de les Illes Balears, Departamento de Química.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*, 25(3), 729–749. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90033-4)

- *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C.Hansen, 1883 in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2021-05-23.
- Sahin, E., & Akata, I. (2018). Viruses infecting macrofungi. *VirusDisease*, 29(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0434-8>
- Saldaña Carlos, Peña Antonio (1999). La Regulación de los Niveles de Iones en la Levadura. Las Proteínas de la Membrana Plasmática Involucradas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 41:193-203.
- Saldaña Gutierrez, Carlos. (2002). Estructura y función de las proteínas *TRK* y *TOK1* de la membrana plasmática de la levadura. *Tesis de Doctorado*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/63344>
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
- Schmitt, M. J., & Tipper, D. J. (1990). K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(9), 4807–4815. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.9.4807>
- Shon, A. S., Bajwa, R. P., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
- Smith, R., & Coast, J. (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*, 346(mar11 3), f1493. <https://doi.org/10.1136/bmj.f1493>
- Suárez-Machín, Caridad; Garrido-Carralero, Norge Antonio; Guevara-Rodríguez, Carmen Amarilys. (2016) Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 50, núm. 1, pp. 20-28.
- Suzuki, Y., Schwartz, S. L., Mueller, N. C., & Schmitt, M. J. (2017). Cysteine residues in a yeast viral A/B toxin crucially control host cell killing via pH-triggered disulfide rearrangements. *Molecular Biology of the Cell*, 28(8), 1123–1131. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-12-0842>

- Totiviridae. (2012). *Virus Taxonomy*, 639–650. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384684-6.00052-5>
- 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>
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Wang, Y. (2015). Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*, 6(4), 307–308. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000752>
- Yang, C., Li, H., Zhang, T., Chu, Y., Zuo, J., & Chen, D. (2020). Study on antibiotic susceptibility of *Salmonella typhimurium* L forms to the third and forth generation cephalosporins. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59456-8>

## APÉNDICE.

### A. Medios de cultivo para levaduras.

#### 1. Medio YPD AGAR

- 1% peptona de gelatina
- 1% extracto de levadura
- 2% glucosa/dextrosa
- 2.5% agar
- 1.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ajustar pH a 4.7 con ácido cítrico.

#### 2. Medio YPD CALDO

- 1% peptona de gelatina
- 1% extracto de levadura
- 2% glucosa/dextrosa
- 1.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ajustar pH a 4.7 con ácido cítrico.

#### 3. Medio inductor (100ml)

- 0.75g Extracto de levadura
- 0.5g Peptona de gelatina
- 1g Glucosa
- 0.0005g  $\text{FeCl}_3$
- 0.0005g  $\text{MnSO}_4$
- 0.05g  $\text{MgSO}_4$
- 0.4g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.08g KCl
- 0.03g  $\text{CaCl}_2$
- 5.2g Glicerol
- 1.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ajustar pH a 4.7 con ácido cítrico.

### B. Medios de cultivo para *Bacillus sp.*

#### 1- AGAR de soya tripticaseina

## 2- AGAR LB

- 1.5% agar
- 1% Triptona
- 1% NaCl
- 0.5% Extracto de levadura

## 3- Caldo LB

- 1% Triptona
- 1% NaCl
- 0.5% Extracto de levadura

### C. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

1. 1085 Ski $\Delta$  L-A0 L-A-lus+ Mlus+ [superproductora KLU5].  
Cepa donada por la Dra. Rosa Esteban de la *Universidad de Salamanca España*.
2. 42300 MAT  $\alpha$  Ade2/+Thr1/+sKi2-1/+ [KIL-K1].
3. 5x47 MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ his1/+ trp1/+ +/ura3 [KIL-o] ATCC 38527.

### D. Especies y cepas utilizadas de *Bacillus sp.*

1. *Bacillus thuringiensis* [No. I/M 155].
2. *Bacillus subtilis* [PY79].
3. *Bacillus cereus* [ATCC].
4. *Bacillus cereus* [K Cys/H].
5. *Bacillus cereus* [A MMB]
6. *Bacillus cereus* [No. I/M 165].
7. *Bacillus cereus* [No. I/Ch].
8. *Bacillus cereus* [7K Gys/M 15].

### E. Tabla de Resultados de Secuencias Peptídicas Homólogas.

Descripción	Especie	Puntaje Max	Puntaje Total	% Cobertura	Valor E	% Identidad	Longitud	# Acceso
Ion transporter	K. pneumoniae	40.8	40.8	7%	0.007	36.73%	87	WP_163602546.1
Two pore domain potassium channel family protein	K. pneumoniae	40.0	40.0	6%	0.013	39.13%	76	WP_200850179.1
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	C.albicans (SC5314)	395	395	92%	5e-127	35.84%	741	KHC78002.1
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	C. albicans (12 C)	395	395	92%	6e-127	35.99%	741	KGT68297.1
Tok1p	C. albicans (SC5314)	394	394	92%	7e-127	35.84%	741	XP_712629.2



<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P76055)	394	394	92%	7e-127	35.84%	741	KHC34938.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P57072)	394	394	92%	8e-127	35.84%	741	KGR07998.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P78048)	393	393	92%	2e-126	35.84%	741	KGR09827.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P94015)	393	393	92%	2e-126	35.84%	741	KGQ86323.1
<b>Hypothetical protein L150_03278</b>	C. albicans (Ca529L)	393	393	92%	3e-126	35.69%	741	RLP64529.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P60002)	393	393	92%	3e-126	35.69%	741	KHC51154.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P78042)	391	391	92%	1e-125	35.69%	741	KHC77368.1
<b>Conserved hypothetical protein</b>	C. albicans (WO-1)	391	391	92%	1e-125	35.69%	741	EEQ45406.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (Ca6)	342	342	83%	3e-108	35.05%	607	KHC41533.1
<b>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</b>	C. albicans (P75016)	340	340	83%	1e-107	34.88%	607	KHC69089.1
<b>Potassium channel protein</b>	B. cereus	51.6	51.6	26%	2e-05	22.43%	330	WP_000994008.1
<b>Potassium channel protein</b>	B. cereus	50.4	50.4	10%	5e-05	35.63%	334	PFS60334.1
<b>Potassium channel protein</b>	B.s cereus	50.4	50.4	10%	5e-05	35.63%	330	WP_142332080.1
<b>Potassium channel protein</b>	Bacillus cereus	49.3	49.3	10%	1e-04	32.56%	334	PFN28206.1
<b>Potassium channel protein</b>	Bacillus cereus	49.3	49.3	10%	1e-04	32.56%	330	WP_141537981.1
<b>Studies of Ion Transport in K<sup>+</sup> channels</b>	Bacillus cereus (BDRC-Cer4)	38.5	38.5	7%	0.041	27.78%	95	6DZ1_A
<b>Structure of a K<sup>+</sup> selective NaK mutant</b>	Bacillus cereus (m1550)	38.5	38.5	7%	0.049	27.78%	97	3OUF_A
<b>The structure of a potassium selective ion channel at atomic resolution</b>	Bacillus cereus	39.3	39.3	21%	0.006	30.43%	92	6UFE_A
<b>MULTISPECIES : potassium channel family protein</b>	Bacillus cereus	38.5	38.5	22%	0.014	31.25%	104	WP_016113126.1
<b>Crystal Structure of NaK2K Channel Y55F Mutant</b>	Bacillus cereus	37.7	37.7	21%	0.019	28.26%	97	3T4C_A
<b>Hypothetical protein</b>	Staphylococcus aureus	42.4	42.4	12%	0.015	29.21%	232	MVL38240.1
<b>Hypothetical protein UMAG_05925</b>	Ustilago maydis (521)	92.0	242	48%	1e-19	49.35%	928	XP_011392261.1
<b>Two pore domain potassium channel family protein</b>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 13311 [[Salmonella typhimurium]] (taxid:90371))	40.8	40.8	6%	0.011	39.13%	150	TQS54966.1
<b>Two pore domain potassium channel family protein</b>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 13311 [[Salmonella	41.2	41.2	6%	0.025	41.30%	356	EBX2902346.1

	typhimurium]] (taxid:90371))							
<b>Two pore domain potassium channel family protein</b>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 13311 [[Salmonella typhimurium]] (taxid:90371))	41.2	41.2	6%	0.028	39.13%	356	EGO1831246.1
<b>Two pore domain potassium channel family protein</b>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 13311 [[Salmonella typhimurium]] (taxid:90371))	40.4	40.4	6%	0.042	39.13%	275	TQS58859.1
<b>Membrane protein</b>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 13311 [[Salmonella typhimurium]] (taxid:90371))	40.4	40.4	6%	0.046	39.13%	308	KNB40205.1

## F. Alineamiento de Secuencias Completas.

Descripción	Especie	Alineamiento	Residuos y Dominios conservador
Ion transporter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<pre> Query 407 SYFNCIYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLMGAILST 455 S+ +Y+ ++T+GYGD P+T GRA V+W +G++ L+ ++L+T Sbjct 25 SWHEGVYWAUVTMTTVGYGDKTPKTHLGRALAVLWVWVGLV-LV-SLLTT 72 </pre>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad homólogo. Y, W, L conservadas (mismo aa o misma propiedad). Mismo aminoácido conservado: Y: 2/4=0.5 C: 0/3=0 F: 0/5=0 L: 2/6=0.33 W: 1/1=1</p>
Two pore domain potassium channel family protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<pre> Query 412 IYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C + T+GYGD +P+T GR F +W + +V L GA++ V Sbjct 27 IYCVSVVGSTLGRGDLSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLRGLMGKV 72 </pre>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad homólogo. C, Y, F, W, L conservadas (mismo aa o misma propiedad). Mismo aminoácido conservado: Y: 1/3=0.33 C: 1/2=0.5 F: 1/4=0.25 L: 1/6=0.16 W: 1/1=1</p>

<p>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</p>	<p><i>Candida albicans</i> (SC5314)</p>	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSVINAEPSSSTLFVWFVWVSCYFPVITACLGPVA 93  Sbjct 74 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A 133</p> <p>Query 94 NTISIACVVEKWRSLKNNVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPGIFAVNIISLVLGFTSN 153  Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLLTYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN--DMPSIYKTIIGWFAC 210  Sbjct 177 I L++FS+ +YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTIHFPIGKLGYPPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWLWAGMFSGLL 270  Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLILVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGS LI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLTGLGDILPKSVGAKIMVLFPSLGGVLMGLIVFMTRSI IQKS 329  Sbjct 296 IY+G+ALY+C VS LT+GLGDILP++ GAK+ VL+FSL GV++MGLIV RS+I S 355</p> <p>Query 330 SGPFFHVRVEKGRSKSWKHYMDSKNSLSEAFDLMKCIQRTASRQHWFSLSVTIAIF 389  Sbjct 356 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ +R+ + SL++TIA+F 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKPANNYSYFNICYFCPLCLLTYGQDYAPRTGAGRAFFVWALGAVPLM 449  Sbjct 416 MIFWLLGALVFKPANNYSYFNICYFCPLCLLTYGQDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQRAL-----SEFVNTGEIFE 502  Sbjct 476 TILVSNVGDITLYDISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLWKKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2DADGDELENTTSSQSSQSEFNNDNNEENDS2VTP--PASLQESFSSLSKASPEG 560  Sbjct 534 RSSELDLDDLLARMEQASLEARDNSNGEIGAASIDNPNEDVKVEDNDTCTINSGNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFS2WSYIHKL 618  Sbjct 594 RYKQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTQKATSKQVHEMLI-----DYLEKRM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFLPNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668  Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKWKAGYDGFWSSESPRLRPLKEPNYLLIKIYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672  V+ E  Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO ÚNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos.</p> <p>L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado:  Y: 13/19=0.68  C: 5/13=0.38  F: 21/43=0.49  L: 33/74=0.45  W: 8/12=0.67</p>
<p>K<sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote</p>	<p><i>Candida albicans</i> (12 C)</p>	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSVINAEPSSSTLFVWFVWVSCYFPVITACLGPVA 93  Sbjct 74 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A 133</p> <p>Query 94 NTISIACVVEKWRSLKNNVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPGIFAVNIISLVLGFTSN 153  Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLLTYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN--DMPSIYKTIIGWFAC 210  Sbjct 177 I L++FS+ +YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTIHFPIGKLGYPPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWLWAGMFSGLL 270  Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLILVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGS LI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLTGLGDILPKSVGAKIMVLFPSLGGVLMGLIVFMTRSI IQKS 329  Sbjct 296 IY+G+ALY+C VS LT+GLGDILP++ GAK+ VL+FSL GV++MGLIV RS+I S 355</p> <p>Query 330 SGPFFHVRVEKGRSKSWKHYMDSKNSLSEAFDLMKCIQRTASRQHWFSLSVTIAIF 389  Sbjct 356 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ +R+ + SL++TIA+F 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKPANNYSYFNICYFCPLCLLTYGQDYAPRTGAGRAFFVWALGAVPLM 449  Sbjct 416 MIFWLLGALVFKPANNYSYFNICYFCPLCLLTYGQDYAPRTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQRAL-----SEFVNTGEIFE 502  Sbjct 476 TILVSNVGDITLYDISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLWKKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2DADGDELENTTSSQSSQSEFNNDNNEENDS2VTP--PASLQESFSSLSKASPEG 560  Sbjct 534 RSSELDLDDLLARMEQASLEAGGNSNGEIGAASIDNPNEDVKVEDNDTCTINSSNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFS2WSYIHKL 618  Sbjct 594 RYKQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTQKATSKQVHEMLI-----DYLEKRM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFLPNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668  Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKWKAGYDGFWSSESPRLRPLKEPNYLLIKIYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672  V+ E</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO ÚNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos.</p> <p>L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado:  Y: 13/19=0.68  C: 5/13=0.38  F: 21/43=0.49  L: 33/74=0.45  W: 8/12=0.67</p>

		Sbjct 702 VDME 705	
Tok1p	<i>Candida albicans</i> (SC5314)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFDRVERSIINAEPSSTLFVWFVWVSCYFFVITACLGPVA 93 NT KQ + L+AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKQDSSPMKSPVTLQHALNVRLESLSLAVRPGEPFFVWFLISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVKWRSLKNNVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPGPIFVAVNIIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYKTIQGFAC 210 I L+++FS+ +YL SQ ++I W A +L +V + + P Y + GF+FA</p> <p>Sbjct 177 ISLLMNFSSRSVKYLVQSQSVSIIAWLCASALLAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTHIFIGYKLGYPPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSLL 270 +SG Y VC +IL I+P+GY L KYPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+</p> <p>Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLTTCGLDILPKSVGAKIMVLFSLSGVVMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLDILP++ GAK+ VL+FSL GV++MGLIV RS+I S</p> <p>Sbjct 296 DDSYGSALYCYVSLTTCGLDILPETS GAKVAVLVFSLGGVLMGLIVATLRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPIFFHVRVEKGRSKWKHYMDSKKNLSEAEFLDMKCIQRTASRQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+R+ + SL++TIA+F</p> <p>Sbjct 356 AAPAIFWVNDVEKTRIALLAQLDKNRHLTSEESFHEMRVLRKVKVSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENNSYFNICYFCFLCLLTIGYDYPARTGAGRAFFVIVALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E MSYFN +YCFCLCL+TIGYDYPART GR FVW WA+GAVPLM</p> <p>Sbjct 416 MIFWLLGALIFQKIEKNSYFNAMYFCFLCLITIGYDYPARTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLDFDISTS LDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + ++L VN+ +</p> <p>Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWMPSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES DADGDLLENTSSQSSQISEFNNDNSENDSGVTS--PASLQESFSSLSKASPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E ++ +P ++++ + ++ +S+</p> <p>Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQEALEARDNSNGEIGAASIDNPEDVKVEDNDTCTINSNSNM 593</p> <p>Query 561 I L P L E Y V S S A E Y A L Q D S G T C N -- L R N L Q E L L K A V K K L H R I C L A D K D Y T L S F S D W S Y I H K L 618 E S +E ++ S N + +++ + + K+H + + Y+ K+</p> <p>Sbjct 594 R K D Q E N N S Y S E R S V C K S E K Q N F D I E R T R Q K I A S K Q V H E M L I -----D Y L E K M 641</p> <p>Query 619 H L R N I T D I E E Y T R G -----P E F W I S P D T P L K F P L N E P H F A F M M L F K N I E E L V G N L 668 I E R F W + S +P L + P L E P + + + + I E + + L</p> <p>Sbjct 642 K P L I G D S I E S P N R K Y S Y K W G A Y D G F W L S E S S P L R L P L K E P N Y L I L K I Y F E I E M M L R G L 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E</p> <p>Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos. L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P76055)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFDRVERSIINAEPSSTLFVWFVWVSCYFFVITACLGPVA 93 NT KQ + L+AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKQDSSPMKSPVTLQHALNVRLESLSLAVRPGEPFFVWFLISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVKWRSLKNNVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPGPIFVAVNIIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYKTIQGFAC 210 I L+++FS+ +YL SQ ++I W A +L +V + + P Y + GF+FA</p> <p>Sbjct 177 ISLLMNFSSRSVKYLVQSQSVSIIAWLCASALLAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTHIFIGYKLGYPPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSLL 270 +SG Y VC +IL I+P+GY L KYPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+</p> <p>Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLTTCGLDILPKSVGAKIMVLFSLSGVVMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLDILP++ GAK+ VL+FSL GV++MGLIV RS+I S</p> <p>Sbjct 296 DDSYGSALYCYVSLTTCGLDILPETS GAKVAVLVFSLGGVLMGLIVATLRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPIFFHVRVEKGRSKWKHYMDSKKNLSEAEFLDMKCIQRTASRQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+R+ + SL++TIA+F</p> <p>Sbjct 356 AAPAIFWVNDVEKTRIALLAQLDKNRHLTSEESFHEMRVLRKVKVSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENNSYFNICYFCFLCLLTIGYDYPARTGAGRAFFVIVALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E MSYFN +YCFCLCL+TIGYDYPART GR FVW WA+GAVPLM</p> <p>Sbjct 416 MIFWLLGALIFQKIEKNSYFNAMYFCFLCLITIGYDYPARTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLDFDISTS LDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + ++L VN+ +</p> <p>Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWMPSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES DADGDLLENTSSQSSQISEFNNDNSENDSGVTS--PASLQESFSSLSKASPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E ++ +P ++++ + ++ +S+</p> <p>Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQEALEARDNSNGEIGAASIDNPEDVKVEDNDTCTINSNSNM 593</p> <p>Query 561 I L P L E Y V S S A E Y A L Q D S G T C N -- L R N L Q E L L K A V K K L H R I C L A D K D Y T L S F S D W S Y I H K L 618 E S +E ++ S N + +++ + + K+H + + Y+ K+</p> <p>Sbjct 594 R K D Q E N N S Y S E R S V C K S E K Q N F D I E R T R Q K I A S K Q V H E M L I -----D Y L E K M 641</p> <p>Query 619 H L R N I T D I E E Y T R G -----P E F W I S P D T P L K F P L N E P H F A F M M L F K N I E E L V G N L 668 I E R F W + S +P L + P L E P + + + + I E + + L</p> <p>Sbjct 642 K P L I G D S I E S P N R K Y S Y K W G A Y D G F W L S E S S P L R L P L K E P N Y L I L K I Y F E I E M M L R G L 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E</p> <p>Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos. L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P57072)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFDRVERSIINAEPSSTLFVWFVWVSCYFFVITACLGPVA 93 NT KQ + L+AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKQDSSPMKSPVTLQHALNVRLESLSLAVRPGEPFFVWFLISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVKWRSLKNNVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPGPIFVAVNIIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYKTIQGFAC 210 I L+++FS+ +YL SQ ++I W A +L +V + + P Y + GF+FA</p> <p>Sbjct 177 ISLLMNFSSRSVKYLVQSQSVSIIAWLCASALLAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTHIFIGYKLGYPPTFNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSLL 270 +SG Y VC +IL I+P+GY L KYPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+</p> <p>Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGSLLI 295</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos. L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p>

		<p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLLT<sup>GLGD</sup>ILPKSVGAKIMVLFISLGGVLMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+<sup>GLGD</sup>ILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S Sbjct 296 DDISYGSALYCYIVSFLT<sup>GLGD</sup>ILPETS GAKVAVLVFSLGGVLMGLIVATLRVSLSS 355</p> <p>Query 330 SGPPIFFHRVEKGRKSWKHYMDSKKNLSERAEFLMKCIRQTASRKHQWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ R+ + SL++TIA+F Sbjct 356 AAPAIFWNVDEKTRIALLAQLDKENRHLTSEESFHEMRVLRKVKSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENWSYFNICYFCFLCLLT<sup>GYGDY</sup>APRTGAGRAFFVIVALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+T<sup>GYGDY</sup>AP+T GR FFV WA+GAVPLM Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLIT<sup>GYGDY</sup>APKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIFNQRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + +++ L VN+ + Sbjct 476 TILVSNVGDITLYEISNDISAWFSTWMPFSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ESDTADGDLENTTSSQSQISEFNNDNNEENDSGVTSP--PASLQESFSSLSKASPEG 560 S D DL+ ++S + N+N E ++ +P +++++ ++ +S+ Sbjct 534 RSSELDLDDLLARMEQASLEARDNSNGEIGAASIDNPNEDVKVEDNDTCTINSNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTGN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFSFDSWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + +++ + +K+H + + Y+ K+ Sbjct 594 RKDQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTQKIASKKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFPNPHFAPMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FW+S +PL+ PL EP++ + ++ IE ++ L Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKY<sup>SYK</sup>WKGAYDGFVLSSESPRLRPLKEPNY<sup>LILKI</sup>YFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E Sbjct 702 VDME 705</p>	<p>aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P78048)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSVINAEPSTLFVFEVFWVSCYFPVITACLGVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A Sbjct 74 NTKNQDSSPMKSPVTLQHALNVLES<sup>L</sup>LSLAVRPGEPFVFWL<sup>L</sup>ISSYFP<sup>L</sup>IAACLG<sup>L</sup>PLA 133</p> <p>Query 94 NTISACVVEKWRSLKNSVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPPGIFAVNIISLVGLFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKKLTVLKSQNLINITGWTIAGGMLLVVIVCSLN---DMPSIYKTI<sup>G</sup>WFAC 210 I L+++FS+ + YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA Sbjct 177 ISLLMNF<sup>S</sup>RSVKV<sup>L</sup>VSQV<sup>S</sup>IIAW<sup>L</sup>CASAL<sup>L</sup>AAAL<sup>F</sup>V<sup>T</sup>NRE<sup>F</sup>GGENPK-YVPSEGF<sup>F</sup>FAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTIHFYKGLKYPPTFNLLPNER<sup>S</sup>IMAYTVLLSLWLWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+F+GY L KYPPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+ Sbjct 236 FTSGNY<sup>F</sup>VCML<sup>L</sup>ILVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRT<sup>L</sup>ML<sup>F</sup>TILFSTWTVIGAF<sup>T</sup>MGSLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLLT<sup>GLGD</sup>ILPKSVGAKIMVLFISLGGVLMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+<sup>GLGD</sup>ILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S Sbjct 296 DDISYGSALYCYIVSFLT<sup>GLGD</sup>ILPETS GAKVAVLVFSLGGVLMGLIVATLRVSLSS 355</p> <p>Query 330 SGPPIFFHRVEKGRKSWKHYMDSKKNLSERAEFLMKCIRQTASRKHQWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ R+ + SL++TIA+F Sbjct 356 AAPAIFWNVDEKTRIALLAQLDKENRHLTSEESFHEMRVLRKVKSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENWSYFNICYFCFLCLLT<sup>GYGDY</sup>APRTGAGRAFFVIVALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+T<sup>GYGDY</sup>AP+T GR FFV WA+GAVPLM Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLIT<sup>GYGDY</sup>APKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIFNQRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + +++ L VN+ + Sbjct 476 TILVSNVGDITLYEISNDISAWFSTWMPFSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ESDTADGDLENTTSSQSQISEFNNDNNEENDSGVTSP--PASLQESFSSLSKASPEG 560 S D DL+ ++S + N+N E ++ +P +++++ ++ +S+ Sbjct 534 RSSELDLDDLLARMEQASLEAGGNSNGEIGAASIDNPNEDVKVEDNDTCTINSNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTGN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFSFDSWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + +++ + +K+H + + Y+ K+ Sbjct 594 RKDQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTQKIASKKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFPNPHFAPMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FW+S +PL+ PL EP++ + ++ IE ++ L Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKY<sup>SYK</sup>WKGAYDGFVLSSESPRLRPLKEPNY<sup>LILKI</sup>YFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos. L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad). Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P94015)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSVINAEPSTLFVFEVFWVSCYFPVITACLGVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A Sbjct 74 NTKNQDSSPMKSPVTLQHALNVLES<sup>L</sup>LSLAVRPGEPFVFWL<sup>L</sup>ISSYFP<sup>L</sup>IAACLG<sup>L</sup>PLA 133</p> <p>Query 94 NTISACVVEKWRSLKNSVVTNPRNSDNDVLMNQVKTVPDPPGIFAVNIISLVGLFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKKLTVLKSQNLINITGWTIAGGMLLVVIVCSLN---DMPSIYKTI<sup>G</sup>WFAC 210 I L+++FS+ + YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA Sbjct 177 ISLLMNF<sup>S</sup>RSVKV<sup>L</sup>VSQV<sup>S</sup>IIAW<sup>L</sup>CASAL<sup>L</sup>AAAL<sup>F</sup>V<sup>T</sup>NRE<sup>F</sup>GGENPK-YVPSEGF<sup>F</sup>FAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTIHFYKGLKYPPTFNLLPNER<sup>S</sup>IMAYTVLLSLWLWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+F+GY L KYPPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+ Sbjct 236 FTSGNY<sup>F</sup>VCML<sup>L</sup>ILVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRT<sup>L</sup>ML<sup>F</sup>TILFSTWTVIGAF<sup>T</sup>MGSLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLLT<sup>GLGD</sup>ILPKSVGAKIMVLFISLGGVLMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+<sup>GLGD</sup>ILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S Sbjct 296 DDISYGSALYCYIVSFLT<sup>GLGD</sup>ILPETS GAKVAVLVFSLGGVLMGLIVATLRVSLSS 355</p> <p>Query 330 SGPPIFFHRVEKGRKSWKHYMDSKKNLSERAEFLMKCIRQTASRKHQWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ R+ + SL++TIA+F Sbjct 356 AAPAIFWNVDEKTRIALLAQLDKENRHLTSEESFHEMRVLRKVKSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENWSYFNICYFCFLCLLT<sup>GYGDY</sup>APRTGAGRAFFVIVALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+T<sup>GYGDY</sup>AP+T GR FFV WA+GAVPLM Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLIT<sup>GYGDY</sup>APKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIFNQRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L+DIS + F+ K + +++ L VN+ + Sbjct 476 TILVSNVGDITLYDISNDISAWFSTWMPFSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ESDTADGDLENTTSSQSQISEFNNDNNEENDSGVTSP--PASLQESFSSLSKASPEG 560 S D DL+ ++S + N+N E ++ +P +++++ ++ +S+ Sbjct 534 RSSELDLDDLLARMEQASLEAGGNSNGEIGAASIDNPNEDVKVEDNDTCTINSNSNM 593</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos. L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad). Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>

		<p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRCLADKDYTLFSFSDWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + +++ + K+H + + Y+ K+</p> <p>Sbjct 594 RKDQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTROKIASKKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFLPNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FWS +PL+ PL EP++ ++ IE ++ L</p> <p>Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKWKQYDGFWSLSESSPLRLPLKEPNYLILKLYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E</p> <p>Sbjct 702 VDME 705</p>	
Hypothetical protein L150_03278	<i>Candida albicans</i> (Ca529L)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSIINAEPSSTLFVFWFVSCYFPVITACLGPVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKNQDSSPMKSPVTLQHALNVRLSLSLAVRPFGEFFVFWLFISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVVEKWRSLKNSVVTNPRSDTDVLMNQVTVFDPGPIFVAVNIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGGMLLVIVCSLN---DMPSIYKTIQFWFAC 210 I L+++FS+ +YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GP+FA</p> <p>Sbjct 177 ISLLMNFSSRVKVLVSQSVSI IAWLCASALLAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVTCTIILTHIFIGYKLGKYPPTFNLLPNERIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+FGY L KYPPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+</p> <p>Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLT+GLGDI LPKSVGAKIMVLFISLGGVLMGLIVFMTRSIIQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLGDI L P++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S</p> <p>Sbjct 296 DDSYGSALYCVISFLT+GLGDI L PETS GAKVAVL VFSLGGVLMGLIVATRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPPIFFHVEKGRSKWKHYMDSKNSLREAFDLMKCIQRTASRKQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ R+ + SL++TIA+F</p> <p>Sbjct 356 AAPAIFWVDVEKTRIALLAQLDKENRHLTSEESFHEMRVLRKVKVSRHKVSLALTIIVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFPAENNSYFNICYFCFLCLLTI+GYGDYAPRTGAGRAFFVWALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YCFCLC+TI+GYGDYAP+T GR FVW WA+GAVPLM</p> <p>Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLIT+GYGDYAPKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + +++ L VN+ +</p> <p>Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2TADGDLLENTTSSQSQISEFNDDNSENDSGVTP--PASLQESFSSLSKASSPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E + + +P + + + + + + + +</p> <p>Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQASLEARDNSNGEIGAASIDNPEDVKVEDNDTCTINSGNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRCLADKDYTLFSFSDWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + +++ + K+H + + Y+ K+</p> <p>Sbjct 594 RKDQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTROKIASKKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFLPNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FWS +PL+ PL EP++ ++ IE ++ L</p> <p>Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKWKQYDGFWSLSESSPLRLPLKEPNYLILKLYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E</p> <p>Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad homólogos.</p> <p>L, W, Y, F, C conservadas (mismo aa o misma propiedad).</p> <p>Mismo aminoácido conservado: Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38 F: 21/43=0.49 L: 33/74=0.45 W: 8/12=0.67</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P60002)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSIINAEPSSTLFVFWFVSCYFPVITACLGPVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKNQDSSPMKSPVTLQHALNVRLSLSLAVRPFGEFFVFWLFISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVVEKWRSLKNSVVTNPRSDTDVLMNQVTVFDPGPIFVAVNIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGGMLLVIVCSLN---DMPSIYKTIQFWFAC 210 I L+++FS+ +YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GP+FA</p> <p>Sbjct 177 ISLLMNFSSRVKVLVSQSVSI IAWLCASALLAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVTCTIILTHIFIGYKLGKYPPTFNLLPNERIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+FGY L KYPPTFNL +R+M +T+L S W + GA L+</p> <p>Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTFNLDQRQRTLMLFTILFSTWTVIGAFMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLT+GLGDI LPKSVGAKIMVLFISLGGVLMGLIVFMTRSIIQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLGDI L P++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S</p> <p>Sbjct 296 DDSYGSALYCVISFLT+GLGDI L PETS GAKVAVL VFSLGGVLMGLIVATRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPPIFFHVEKGRSKWKHYMDSKNSLREAFDLMKCIQRTASRKQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ R+ + SL++TIA+F</p> <p>Sbjct 356 AAPAIFWVDVEKTRIALLAQLDKENRHLTSEESFHEMRVLRKVKVSRHKVSLALTIIVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFPAENNSYFNICYFCFLCLLTI+GYGDYAPRTGAGRAFFVWALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YCFCLC+TI+GYGDYAP+T GR FVW WA+GAVPLM</p> <p>Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLIT+GYGDYAPKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVFVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L++IS + F+ K + +++ L VN+ +</p> <p>Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLKWKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2TADGDLLENTTSSQSQISEFNDDNSENDSGVTP--PASLQESFSSLSKASSPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E + + +P + + + + + + + +</p> <p>Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQASLEARDNSNGEIGAASIDNPEDVKVEDNDTCTINSGNSNM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRCLADKDYTLFSFSDWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + +++ + K+H + + Y+ K+</p> <p>Sbjct 594 RKDQENNSYSERSVCKSEKQNFDIERTROKIASKKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKFLPNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FWS +PL+ PL EP++ ++ IE ++ L</p> <p>Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKWKQYDGFWSLSESSPLRLPLKEPNYLILKLYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E</p> <p>Sbjct 702 VDME 705</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de selectividad conservados.</p> <p>L, F, W, C y Y conservadas.</p> <p>L:32/74=0.43 F:21/44=0.48 W: 8/13=0.62 Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38</p>
K <sup>+</sup> channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans</i> (P78042)	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALRFRDERSIINAEPSSTLFVFWFVSCYFPVITACLGPVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A</p> <p>Sbjct 74 NTKNQDSSPMKSPVTLQHALNVRLSLSLAVRPFGEFFVFWLFISSYFPLIAACLGPLA 133</p> <p>Query 94 NTISIACVVEKWRSLKNSVVTNPRSDTDVLMNQVTVFDPGPIFVAVNIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N</p> <p>Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE</b></p> <p>Ambos filtros de</p>

		<p>Query 154 IILMLHFSKLLTYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYSKTIQGFWAC 210 I L+++FS+ + YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA Sbjct 177 ISLMLNFSRSVKYLVQSQSVIIAFLCASALLAAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTHIFIGYKLGKYPPTNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+F+GY L KYPPTFNL +R++M +T+L S W + GA L+ Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTNLDQRQRTLALFTILFSTWTVIGAFITMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLLT+GLGDILPKSVGAKIMVLFPSLGVVLMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLGDILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S Sbjct 296 DDISYGSALYCVISFLTI+GLGDILPETS GAKVAVLVSFSLGGVLMGLIVATLRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPIFFHVRVEKGRSKWKHYMDSKNSLREAFDLMKCIQRTASRKQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ +R+ + SL++TIA+F Sbjct 356 AAPAIFWNVDEKTRIALLAQLDKNRHLTSEESFHEMRVLRKRVKSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENNSYFNICYFCFLCLLTI+CYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+TI+CYGDYAP+T GR FVW WA+GAVPLM Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLITICYGDYAPKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L+DIS + F+ K + +++ L VN+ + Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLWKKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2TADGDLEENTSSQSQISEFNDDNNEENDSGVTSP--PASLQESFSSLSKASSPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E + + +P + + + + + + + + + Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQASLEAGNNSNGEIGAASIDNPEDVKVDNDTCTINSNGNSM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFSFSDWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + + + + + K+H + + Y+ K+ Sbjct 594 RKDQENNSYERSVCKSEKQNFDIERTQKASKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKPLNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FWS +PL+ PL EP++ + + IE ++ L Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKQWKGAYDGFWLESSEPLRLPKPEPNYILKLYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E Sbjct 702 VDME 705</p>	<p>selectividad conservados. L, F, W, C y Y conservadas. L:32/74=0.43 F:21/44=0.48 W: 8/13=0.62 Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38</p>
Conserved hypothetical protein	<i>Candida albicans (WO-1)</i>	<p>Query 36 NTPKQAKGVLAEE--LKDALFRDRERSIINAEPSTLFFVFWFVSVCFYFVITACLGPVA 93 NT KQ + L+ AL R E + +N P FV WF++S YFP+I ACLGP+A Sbjct 74 NTNKQDSSFMKSPVTLQHALNVRLESLSLNRVGPFPFVWFLISSYFPLIAACLGLPLA 133</p> <p>Query 94 NTISACVVEKWRSLKNSVTVNPRSDTDVLMNQVKTVPDPPGIFAVNIISLVLGFTSN 153 N ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG N Sbjct 134 NMISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGN 176</p> <p>Query 154 IILMLHFSKLLTYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYSKTIQGFWAC 210 I L+++FS+ + YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA Sbjct 177 ISLMLNFSRSVKYLVQSQSVIIAFLCASALLAAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAA 235</p> <p>Query 211 ISSGLYLVCTIILTHIFIGYKLGKYPPTNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSGLL 270 +SG Y VC +IL I+F+GY L KYPPTFNL +R++M +T+L S W + GA L+ Sbjct 236 FTSGNYFVCMILLVINFMGYSLKYPPTNLDQRQRTLALFTILFSTWTVIGAFITMGSLLI 295</p> <p>Query 271 H-ITYGNALYFCTVSLLT+GLGDILPKSVGAKIMVLFPSLGVVLMGLIVFMTRSI IQKS 329 I+YG+ALY+C VS LT+GLGDILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S Sbjct 296 DDISYGSALYCVISFLTI+GLGDILPETS GAKVAVLVSFSLGGVLMGLIVATLRSVILSS 355</p> <p>Query 330 SGPIFFHVRVEKGRSKWKHYMDSKNSLREAFDLMKCIQRTASRKQHWFSLSVTIAIF 389 + P F++ VEK R +++L+ E+F M+ +R+ + SL++TIA+F Sbjct 356 AAPAIFWNVDEKTRIALLAQLDKNRHLTSEESFHEMRVLRKRVKSRHKVSLALTI AVF 415</p> <p>Query 390 MAFWLLGALVFKFAENNSYFNICYFCFLCLLTI+CYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLM 449 M FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+TI+CYGDYAP+T GR FVW WA+GAVPLM Sbjct 416 MIFWLGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLITICYGDYAPKTSLGRVFFVSWAVGAVPLM 475</p> <p>Query 450 GAILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIVNGRQAL-----SFMVNTGEIFE 502 ++S VGD L+DIS + F+ K + +++ L VN+ + Sbjct 476 TILVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLWKKKKLQEDQEDQTLVNSEAV-- 533</p> <p>Query 503 ES2TADGDLEENTSSQSQISEFNDDNNEENDSGVTSP--PASLQESFSSLSKASSPEG 560 S D DL+ ++S + N +N E + + +P + + + + + + + + + Sbjct 534 RSSELDLDELDLAKMEQASLEAGNNSNGEIGAASIDNPEDVKVDNDTCTINSNGNSM 593</p> <p>Query 561 ILPLEYVSSAEYALQDSGTCN--LRNLQELLKAVKHLRICALDKDYTLFSFSDWSYIHKL 618 E S +E ++ S N + + + + + K+H + + Y+ K+ Sbjct 594 RKDQENNSYERSVCKSEKQNFDIERTQKASKQVHEMLI-----DYLEKM 641</p> <p>Query 619 HLRNITDIEEYTRG-----PEFWISPDTPKPLNEPHAFMMLFKNIEELVGNL 668 IE R FWS +PL+ PL EP++ + + IE ++ L Sbjct 642 KPLIGDSIESPNRKYKQWKGAYDGFWLESSEPLRLPKPEPNYILKLYFEIEMMLRGL 701</p> <p>Query 669 VEDE 672 V+ E Sbjct 702 VDME 705</p>	<p>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE Ambos filtros de selectividad conservados. L, F, W, C y Y conservadas. L:32/74=0.43 F:21/44=0.48 W: 8/13=0.62 Y: 13/19=0.68 C: 5/13=0.38</p>
K+ channel subfamily K, other eukaryote	<i>Candida albicans (Ca6)</i>	<p>Query 96 ISACVVEKWRSLKNSVTVNPRSDTDVLMNQVKTVPDPPGIFAVNIISLVLGFTSNII 155 ISI +VE W+ D++ K V D P + +N +SL LG NI Sbjct 2 ISIVALVEHWK-----VDIITR--KNVPDIPKVVMMNAVSLALGLIGNIS 44</p> <p>Query 156 LMLHFSKLLTYLKSQNLINITGWTIAGGMLLDVIVCSLN---DMPSIYSKTIQGFWACIS 212 L+++FS+ + YL SQ ++I W A +L + V + + P Y + GF+FA Sbjct 45 LLMNFSRSVKYLVQSQSVIIAFLCASALLAAALFVNTREFGGENPK-YVPSEGFYFAAFT 103</p> <p>Query 213 SGLYLVCTIILTHIFIGYKLGKYPPTNLLPNERSIMAYTVLLSLWLIWAGMFGSGLLH- 271 SG Y VC +IL I+F+GY L KYPPTFNL +R++M +T+L S W + GA L+ Sbjct 104 SGNFYVCMILLVINFMGYSLKYPPTNLDQRQRTLALFTILFSTWTVIGAFITMGSLLID 163</p> <p>Query 272 IYGNALYFCTVSLLT+GLGDILPKSVGAKIMVLFPSLGVVLMGLIVFMTRSI IQKSSG 331 I+YG+ALY+C VS LT+GLGDILP++ GAK+ VL+FSL GV+MGLIV RS+I S+ Sbjct 164 ISYGSALYCVISFLTI+GLGDILPETS GAKVAVLVSFSLGGVLMGLIVATLRSVILSSAA 223</p> <p>Query 332 PIFFFHVRVEKGRSKWKHYMDSKNSLREAFDLMKCIQRTASRKQHWFSLSVTIAIFMA 391 P F++ VEK R +++L+ E+F M+ +R+ + SL++TIA+FM Sbjct 224 PAIFWNVDEKTRIALLAQLDKNRHLTSEESFHEMRVLRKRVKSRHKVSLALTI AVFMI 283</p> <p>Query 392 FWLLGALVFKFAENNSYFNICYFCFLCLLTI+CYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLMGA 451 FWL+GAL+F+ E WSYFN +YFCFLCL+TI+CYGDYAP+T GR FVW WA+GAVPLM Sbjct 284 FWLIGALIFQKIEKWSYFNAMYFCFLCLITICYGDYAPKTSLGRVFFVSWAVGAVPLMTI 343</p> <p>Query 452 ILSTVGDLLFDISTSLDIKIGE-SFNKVKSVIVNGRQAL-----SFMVNTGEIFEES 504 ++S VGD L+DIS + F+ K + +++ L VN+ + S Sbjct 344 LVSNVGDITLVEISNDISAWFSTWFMFSTKEEYRDLWKKKKLQEDQEDQTLVNSEAV--RS 401</p>	<p>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REGIÓN DE PORO UNICAMENTE Ambos filtros de selectividad conservados. L, F, W, C y Y conservadas. L: 30/69=0.43 F: 18/39=0.46 W: 7/12=0.58 Y: 12/18=0.67 C: 4/11=0.36</p>





		Sbjct 175 IVSNDAE--NVFITLTARGLNDAIKIVARAEPKE 206	F: 5/17=0.3 Y: 1/4=0.25
potassium channel protein	<i>Bacillus cereus</i> <i>PFS60334.1</i>	Query 374 SRKQHWFSLSVTIAIFMAFW-LLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTG 432 +RKQ W ++ I M F +LG L F E S F + + +LT+GYD P T Sbjct 7 ARKQLWIAV----ICMTFVVLGLTGFMAIEEISLFQAFWMTMTITVLTGYDVPVPTQ 61 Query 433 AGRAF-----FVIWALGAVPLM 449 AG+AF V +A+G V M Sbjct 62 AGKAFALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM 88	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Cisteínas no conservadas. W, F, L y Y conservadas: W: 1/4=0.25 F: 4/10=0.4 L: 3/9=0.33 Y: 1/4=0.25
potassium channel protein	<i>Bacillus cereus</i> <i>WP_142332080.1</i>	Query 374 SRKQHWFSLSVTIAIFMAFW-LLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTG 432 +RKQ W ++ I M F +LG L F E S F + + +LT+GYD P T Sbjct 3 ARKQLWIAV----ICMTFVVLGLTGFMAIEEISLFQAFWMTMTITVLTGYDVPVPTQ 57 Query 433 AGRAF-----FVIWALGAVPLM 449 AG+AF V +A+G V M Sbjct 58 AGKAFALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM 84	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Cisteínas no conservadas. W, F, L y Y conservadas: W: 1/4=0.25 F: 4/10=0.4 L: 3/9=0.33 Y: 1/4=0.25
potassium channel protein	<i>Bacillus cereus</i> <i>PFN28206.1</i>	Query 374 SRKQHWFSLSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTGA 433 +RKQ L + + + +LGAL F E S+F + + +LT+GYD P T A Sbjct 7 ARKQ----LGIIVICMTSVVILGALGFMTEIEISFFQAFWMTMTITVLTGYDAVPLTHA 62 Query 434 GRAF-----FVIWALGAVPLM 449 G+ F V +A+G V M Sbjct 63 GKVFALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM 88	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Cisteínas no conservadas. F, L y Y conservadas: F: 3/10=0.3 L: 4/9=0.44 Y: 1/4=0.25
potassium channel protein	<i>Bacillus cereus</i> <i>WP_141537981.1</i>	Query 374 SRKQHWFSLSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTGA 433 +RKQ L + + + +LGAL F E S+F + + +LT+GYD P T A Sbjct 3 ARKQ----LGIIVICMTSVVILGALGFMTEIEISFFQAFWMTMTITVLTGYDAVPLTHA 58 Query 434 GRAF-----FVIWALGAVPLM 449 G+ F V +A+G V M Sbjct 59 GKVFALLIIPVGVGIVTYAIGVVAAM 84	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Cisteínas no conservadas. F, L y Y conservadas: F: 3/10=0.3 L: 4/9=0.44 Y: 1/4=0.25
Studies of Ion Transport in K <sup>+</sup> Channels	<i>Bacillus cereus</i> <i>(BDRD-Cer4)</i> <i>6DZ1_A</i>	Query 396 GALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTGAGRAFFVIWALGAVPLM 449 G + + E + +YF + L T +GYD++P+T G+ F +++ + L+ Sbjct 19 GTIFYSTVEGLRPIDALYFSVVLTTVGYGDFSPQTFGKIFITILYIFIGIGLV 72	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Cisteínas no conservadas. F, L y Y conservadas: F: 2/7=0.29 L: 2/6=0.33 Y: 1/4=0.25
Structure of a K <sup>+</sup> selective NaK mutant	<i>Bacillus cereus</i> <i>(m1550)</i> <i>3OUF_A</i>	Query 396 GALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTGAGRAFFVIWALGAVPLM 449 G + + E + +YF + L T +GYD++P+T G+ F +++ + L+ Sbjct 21 GTIFYSTVEGLRPIDALYFSVVLTTVGYGDFSPQTFGKIFITILYIFIGIGLV 74	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Y, F y L conservadas. Cisteínas no conservadas. Y: 2/4=0.5 F: 2/7=0.29 L: 2/6=0.33
The structure of a potassium selective ion channel at atomic resolution	<i>Bacillus cereus</i> <i>6UFE_A</i>	Query 150 GALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYDYPARTGAGRAFFVIW 195 G + + E + +YF + L T +GYD++P+T G+ F +++ + L+ Sbjct 16 GTIFYSTVEGLRPIDALYFSVVLTTVGYGDFSPQTFGKIFITILY 61	<b>BLAST A LA REGION DE PORO UNICAMENTE</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Y, F y L conservadas. Cisteínas no conservadas. Y: 2/4=0.5 F: 2/7=0.29 L: 1/4=0.25

MULTISPECIES: two pore domain potassium channel family protein	<i>Bacillus cereus</i> group WP_016113.126.1	<p>Query 148 LLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVW 195 L G + + E + +YF + L T +GYGD++P+T G+ F + +</p> <p>Sbjct 26 LSGTIFYSTVEGLRITDALYFSVVLTTVGYGDFSPQTDGFKIPTIFY 73</p>	<b>BLAST A LA REGION DE PORO UNICAMENTE</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Y, F y L conservadas. Cisteínas no conservadas. Y: 2/4=0.5 F: 2/7=0.29 L: 2/6=0.33
Crystal Structure of NaK2K Channel Y55F Mutant	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579) 3T4D_A	<p>Query 150 GALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVW 195 G + + E + +F + L T +GYGD++P+T G+ F + +</p> <p>Sbjct 21 GTIFYSTVEGLRIPDALYFSVVLTTVGYGDFSPQTDGFKIPTILY 66</p>	<b>BLAST A LA REGION DE PORO UNICAMENTE</b> Segundo filtro de selectividad conservado. Y, F y L conservadas. Cisteínas no conservadas. Y: 1/4=0.25 F: 2/7=0.29 L: 1/4=0.25
hypothetical protein	<i>Staphylococcus aureus</i> MVL38240.1	<p>Query 232 LGKYPPTFNLLPNSRSIMAYTVLLSLWLI-WGAGMFGSLLHI-TYGNALYFCTVSLLTVG 289 L +Y PT +PN+ +M V + + + + ++ +I TYG+AL++ V+ TVG</p> <p>Sbjct 95 LKRYTPTVNLNIPNQHGMLNALVFIITVITSLVSVVYLVVEPNIRKTYGDALWAVVTTTIVG 154</p> <p>Query 290 LGDILPKSVGAKIMVLIPLSLGVSVMGLI 318 GD+ P ++ +++ I +SG+ ++GL+</p> <p>Sbjct 155 YGDLSPSTIVGRVIGFLIMISGIGVIGLL 183</p>	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Primer filtro de selectividad semiconservado, cambio en la L por Y, similar a segundo filtro de selectividad, pero la región es similar a la cercana al primer filtro. Cisteínas no conservadas. L y Y conservadas: L:3/18=0.17 Y:2/4=0.5
hypothetical protein UMAG_05925	<i>Ustilago maydis</i>	<p>Query 249 MAYTVLLSLWLIWAGMFGSLLHITYGNALYFCTVSLLTVGLGDILPKSVGAKIMVLIPLS 308 +A +V WL+ GA F+ +YG A++FC +++T+G GD P + + +I+</p> <p>Sbjct 535 LAASVTAGFWLL-GALAFIYAESWSYGGAMWFCFIAMITIGYGDYHPATQLGRAIFVIW 593</p> <hr/> <p>Query 309 LSGVLMGLIVFMTRSIQKSSGPIFFHRV 339 L GV ++ +++ + + +O + G I FHR+</p> <p>Sbjct 594 LMGVAVLTILL----AVVQDAFGSI--FHR 618</p> <hr/> <p>Query 382 LSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVW 441 L++ ++ FWLLGAL F +AE+WSY ++PCF+ ++TI GYGDY P T GRA FVIW</p> <p>Sbjct 533 LALAASVTAGFWLLGALAFIYAESWSYGGAMWFCFIAMITIGYGDYHPATQLGRAIFVIW 592</p> <hr/> <p>Query 442 ALGAVPLMGAILSTVGD 458 L V ++ +L+ V D</p> <p>Sbjct 593 GLMGVAVLTILLAVVQD 609</p> <hr/> <p>Query 83 FVITACLGVPVANTISIAACVVEKWSR-LKNSVVTNPRNDTDVLMNQVKTVPDPPGIFAV 141 P+ + + P++ + + + KW + + N +V + D P I V</p> <p>Sbjct 130 PIFSGLVAPLSIVLEVPGLTSKWKYAKIDQNGIV-----ERFIDNPTILT 174</p> <p>Query 142 NI-ISLVLGFTSNIIIMLHFSKLTLYLKSQNLINITGWTIAGMLLVDVI-VCSLNDMP 199 + ISL N+ ++ F + L +S ++ G+ +L D+I V +L I</p> <p>Sbjct 175 GLAISLSAAVGVNVAIFRPLEILRPRQSIILAFAGF-----MLHDLINVVVALATFGGI 228</p> <p>Query 200 Y-----SKTIGFWFACISSGLYLVCTIILTIHFYKLGKYPPTFNLLPNSRSIMAYT 252 Y S + +W C S+ + TI L ++ ++ + L ++ ++</p> <p>Sbjct 229 YGPKHDLGLSLSASYMVCASITSTLVITISLVADYVRTNDFRHAGS-GLTQLKGLVLAG 287</p> <p>Query 253 VLLSLWLIWAGMFGSLLHITYGNALYFCTVSLLTVGLGDILPKSVGAKIMVLIPLSLGVS 312 + L L+L G+ +F ++ I + ALYF ++LVG GD++P S GAK+V++++ +G+</p> <p>Sbjct 288 MGLLLYLSLGLIFVFIKIDFITALYFSCATVLTVGFQDVPASPAGKVLVILYAPTGI 347</p> <p>Query 313 VLMGLIVFMTRSI 326 VL+ ++V R+ I</p> <p>Sbjct 348 VLVAVVSAARNAI 361</p> <hr/> <p>Query 399 VFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVWALGAVPLMGAILSTVGD 458 +F F + +YF +L+G+GD P + + + +A + L + +S +</p> <p>Sbjct 300 IFVFIKIDFITALYFSCATVLTVGFQDVPASPAGKVLVILYAPTGI VLVAVVSAARN 359</p> <p>Query 459 LFD 462 + +</p> <p>Sbjct 360 AILE 363</p> <hr/> <p>Query 382 LSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVW 441 L++ ++ FWLLGAL F +AE+WSY ++PCF+ ++TI GYGDY P T GRA FVIW</p> <p>Sbjct 533 LALAASVTAGFWLLGALAFIYAESWSYGGAMWFCFIAMITIGYGDYHPATQLGRAIFVIW 592</p> <p>Query 442 ALGAVPLMGAILSTVGD 458 L V ++ +L+ V D</p> <p>Sbjct 593 GLMGVAVLTILLAVVQD 609</p> <p><b>BLAST A LA REGION DE PORO UNICAMENTE:</b></p> <p>Query 136 LSVTIAIFMAFWLLGALVFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVW 195 L++ ++ FWLLGAL F +AE+WSY ++PCF+ ++TI GYGDY P T GRA FVIW</p>	<b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1 Y REHIÓN DE PORO UNICAMENTE</b> Segunda región de selectividad conservada. Primera región de selectividad con un cambio de la leucina por una fenilalanina. Citosinas poco conservadas.

		<p>Sbjct 533 LALAASVTAGFWLLGALAFITYAESWSYGGAMWFCFIAMITIGYGDYHPATQLGRAIFVIM 592</p> <p>Query 196 ALGAVPLMGAILSTVGD 212 L V ++ +L+ V D</p> <p>Sbjct 593 GLMGVAVLTILLAVVQD 609</p> <hr/> <p>Query 19 MFGSLHITYGNALYFCTVSLLTVGLGDILPKSVGAKIMVLIFSLGVLMLGLIVFMTRS 78 +F ++ I + ALYF ++LTVG GD++P S GAK++V++++ +G+VL+ ++V R+</p> <p>Sbjct 300 IFVFKIKIDFITALYFSCATVLTVGFGDVVPASPGAKVLVILYAPTGIIVLVAIVVSAARN 359</p> <p>Query 79 II 80 I</p> <p>Sbjct 360 AI 361</p> <hr/> <p>Query 3 MAYTVLLSLWLIWAGMFGSLHITYGNALYFCTVSLLTVGLGDILPKSVGAKIMVLIFS 62 +A +V WL+ GA F+ +YG A++FC ++++T+G GD P + + + +I+</p> <p>Sbjct 535 LAAASVTAGFWLL-GALAFITYAESWSYGGAMWFCFIAMITIGYGDYHPATQLGRAIFVIM 593</p> <p>Query 63 LSGVLMGLIVFMTRSIIQKSSGPIFFHRV 93 L GV ++ +++ ++Q + G I FHR+</p> <p>Sbjct 594 LMGVAVLTILL---AVVQDAFGSI--FHL 618</p> <hr/> <p>Query 153 VFKFAENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALGAVPLMGAILS 208 +F F + +YF +LT+G+GD P + + +++A + L+ ++S</p> <p>Sbjct 300 IFVFKIKIDFITALYFSCATVLTVGFGDVVPASPGAKVLVILYAPTGIIVLVAIVVS 355</p>	
two pore domain potassium channel family protein, partial	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> m TQS54966. 1	<p>Query 412 IYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C + T+G+GD +P+T GR F +W + +V L GA++ V</p> <p>Sbjct 53 IYXCSLVGSTLGFGLSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV 98</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad semiconservado. Cambio en la tirosina por una fenilalanina. 1 cisteína conservada. Y, F, W y L conservadas. Y: 1/3=0.33 F: 3/4=0.75 W: 1/1=1 L: 1/6=0.17 C: 1/2=0.5</p>
two pore domain potassium channel family protein	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> m EBX290234 6.1	<p>Query 412 IYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C L T+G+GD +P+T GR F +W + +V L GA++ V</p> <p>Sbjct 53 IYXCSLVGSTLGFGLSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV 98</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad semiconservado. Cambio en la tirosina por una fenilalanina. 1 cisteína conservada. Y, F, W y L conservadas. Y: 1/3=0.33 F: 1/4=0.25 W: 1/1=1 L: 2/6=0.33 C: 1/2=0.5</p>
two pore domain potassium channel family protein	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> m EGO18312 46.1	<p>Query 412 IYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C + T+G+GD +P+T GR F +W + +V L GA++ V</p> <p>Sbjct 53 IYXCSLVGSTLGFGLSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV 98</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad semiconservado. Cambio en la tirosina por una fenilalanina. 1 cisteína conservada. Y, F, W y L conservadas. Y: 1/3=0.33 F: 1/4=0.25 W: 1/1=1 L: 1/6=0.17 C: 1/2=0.5</p>
two pore domain potassium channel family protein, partial	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> m TQS58859. 1	<p>Query 412 IYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C + T+G+GD +P+T GR F +W + +V L GA++ V</p> <p>Sbjct 53 IYXCSLVGSTLGFGLSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV 98</p>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b> Segundo filtro de selectividad semiconservado. Cambio en la tirosina por una fenilalanina. 1 cisteína conservada. Y, F, W y L conservadas. Y: 1/3=0.33 F: 1/4=0.25 W: 1/1=1 L: 1/6=0.17 C: 1/2=0.5</p>

<p>membrane protein, partial</p>	<p><i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> <i>m</i> <i>KNB40205.1</i></p>	<pre> Query 412 IYFCFLCLLTIGYCDYAPRTGAGRAFFVIWALG-AVPLMGAILSTV 456 IY+C + T+G+GD +P+T GR F +W + +V L GA++ V Sbjct 5 IYCSVVGSTLGFGLDSPQTAPGRLEFALWQIPVSVGLFGALMGKV 50 </pre>	<p><b>BLAST A TODO EL PÉPTIDO TOK1</b>  Segundo filtro de selectividad semiconservado.  Cambio en la tirosina por una fenilalanina. 1 cisteína conservada.  Y, F, W y L conservadas.  Y: 1/3=0.33  F: 1/4=0.25  W: 1/1=1  L: 1/6=0.17  C: 1/2=0.5</p>
----------------------------------	--	---	---



Campus Juriquilla, Qro, noviembre 09, 2021.

**DR. CARLOS SALDAÑA  
GUTIÉRREZ PROFESOR  
INVESTIGADOR FACULTAD DE  
CIENCIAS NATURALES**

**Tesista:** Jessica Gabriela Trujillo Barrientos

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Título	Resolución
"Proteínas homólogas del canal TOK1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en microorganismos patógenos: Su papel como posibles blancos moleculares de las toxinas Killer (K1)" <b>(90FCN2021).</b>	<b>APROBADO</b>

**Observaciones:** El protocolo que presentan ya inició, como está estipulado, el comité no puede revisar ningún trabajo que ya ha iniciado.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

*Oscar R. García*

Atentamente,

Dr. Oscar Ricardo García  
RubioComité de Bioética  
Facultad de Ciencias  
Naturales



## Consejo Académico

Campus Juriquilla, Qro., 06 de septiembre del 2021.

**C. Jessica Gabriela Trujillo Barrientos**  
(261827)  
**Alumna**  
**Licenciatura en**  
**Biología**  
**Presente**

Para los efectos que tenga lugar, hacemos de su conocimiento que el H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales en su Sesión Ordinaria del **03 de septiembre 2021** con apoyo en el dictamen emitido en el Consejo de la **Licenciatura en Biología**, autorizó una vez cubiertos los trámites académicos y administrativos que para ello se requieran, obtenga su **Título de Licenciado en Biología**, por la opción de: **Tesis Individual**.

Sin otro particular, quedamos de usted.

**Atentamente**  
**“Educo en la Verdad y en el Honor”**



**Dra. Andrea Margarita Olvera**  
**Ramírez Secretaria Académica**

c.c.