

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

Estabilidad y efecto de la toxina *K1* recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:
Carlos Alberto Molina Vera

Dirigido por
Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Septiembre del 2021
México



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

Estabilidad y efecto de la toxina *K1* recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:
Carlos Alberto Molina Vera

Dirigido por
Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Presidente

Dra. Verónica Morales Tlalpan

Secretario

Dr. Roberto Augusto Ferríz Martínez

Vocal

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Suplente

Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Septiembre del 2021
México

Índice

Dedicatorias	9
Agradecimientos	10
Resumen	11
Introducción	13
2. Antecedentes	15
2.1 Panorama actual de los Microorganismos multirresistentes (MMRs).	15
2.2 Las toxinas <i>killer</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.2.1 Mecanismo de acción de <i>K1</i>	18
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
6. Metodología	25
6.1 Métodos microbiológicos.	25
6.1.1 Condiciones de cultivo.	25
6.1.2 Ensayos de inhibición en placa.....	25
6.1.3 Curvas de crecimiento.	26
6.1.4 Cuantificación proteica.....	27
6.2 Técnicas de Biología Molecular.	27
6.2.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	27
6.2.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	28
6.2.3 Amplificación del gen M1 por RT-PCR.	28
6.3 Análisis estadístico.	29

6.4 Consideraciones bioéticas.....	29
7. Resultados.....	29
7.1 Variables de impacto en la actividad de <i>K1</i>	29
7.1.1 El efecto <i>killer</i> a través del tiempo.	29
7.1.2 El efecto <i>killer</i> ante distintas condiciones de densidad celular.....	30
7.1.3 El pH del medio modifica la actividad de <i>K1</i>	33
7.2 Determinantes en la obtención del gen codificante de <i>K1</i>	35
7.2.1 La presencia del mRNA de <i>K1</i> está influenciado por el cultivo.....	35
8. Discusión.....	38
8.1 El tiempo de generación del halo de inhibición.....	38
8.2 El efecto de la cantidad de levadura sensible y productora.....	40
8.3 La influencia del pH en la actividad de <i>K1</i>	41
8.4 El efecto del medio en la obtención de mRNAs y proteína.....	41
8.5 Una actualización al mecanismo de acción de <i>K1</i>	43
9. Conclusiones.....	46
10. Perspectivas.....	46
11. Referencias.....	47
12. Apéndices.....	55
Apéndice 1.....	55
Carta de aprobación del comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro.....	55
Apéndice 2.....	56
Secuencia obtenida del producto de PCR de <i>K1</i>	56

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de acción propuestos de la toxina <i>K1</i>	22
Figura 2. Impacto de la cantidad de levadura sensible y productora sobre el efecto <i>killer</i>	32
Figura 3. Actividad de <i>K1</i> modulada por el pH.	34
Figura 4. Obtención del gen M1.	38
Figura 5. Formación del halo de inhibición.	39
Figura 6. Actualización al mecanismo de acción de <i>K1</i>	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Rendimiento de las reacciones de extracción de ácidos nucleicos en ng/μl.	36
--	----

Dedicatorias

A mi familia...

Always.

Agradecimientos

Primeramente, a mi familia, el pilar de mi vida y mi sustento de todos los días. A mi esposa, Luz, por siempre estar conmigo. Mis padres, por ver por mí y darme todo su apoyo y consejos; y a mi hermano por alegrarme a cada momento. A mis ídolos, Goku y Batman, por siempre ser una guía a mi ser, pese a tener bigote y familia y mantenerme ilusionado como un niño.

A mi director de tesis el Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez por su asesoría, acompañamiento, consejos y por sobre todo por confiar en mí y darme un espacio en su laboratorio, ha sido todo un honor y un privilegio haber trabajado con usted.

Encarecidamente a la Dra. Verónica Morales Tlalpan, por brindarme toda su paciencia y valiosos consejos, sin duda este trabajo no podría haber visto la luz de no ser por usted.

A mis sinodales, el Dr. Luis Gabriel Brieba (LANGEBIO), Dr. Alfredo Cruz (LANGEBIO), y al Dr. Roberto Ferríz por sus atinados consejos y la orientación académica durante este periodo.

A la M. en C. Adriana González Gallardo del INB, UNAM. Por todo el apoyo y recursos brindados hacia este proyecto, también por siempre recibirme con una agradable sonrisa (aún pese al cubre bocas).

A mis compañeras de laboratorio; Jimena, Aleyda, Jaqui y Jess por estar ahí conmigo, por brindarme unos ratos inolvidables y recordarme que estar en un laboratorio con amigos es mucho mejor.

A la causante de mi pasión por la ciencia, a mi tía Verónica Andrade, por abrirme los ojos cuando más ciego estaba, mil gracias hoy y siempre.

Financiamiento del proyecto:

1. CONACyT por la beca nacional de posgrado número CVU: 1003111
2. SEP-CONACyT, Ciencia básica proyecto número: A1-S-26966
3. CONACyT Laboratorios Nacionales LAVIS-UAQ.
4. FONDEC 2019 (UAQ)

Resumen

La toxina *killer K1* de *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado como una proteína tóxica capaz de matar distintas cepas de microorganismos como *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Zygosaccharomyces bailii*, entre otros. En su estado maduro la toxina *K1* cuenta con dos subunidades: α y β . Una vez que la toxina madura es secretada al medio extracelular, se une al receptor principal 1-6- β -D-Glucan y al canal Tok1p, matando a la cepa sensible. En el presente estudio el efecto *killer* fue caracterizado, así como el pH y la composición del medio influyen en la detección de la toxina *K1* a nivel de mRNA. Se demostró que tanto el pH del agar YPD, como la composición del cultivo de la cepa productora (pH 4.5, pH 4.7 y medio inductor) incrementan el efecto *killer* sobre la cepa sensible. En contraparte, la cantidad de levadura sensible provista en ensayos de inhibición en placa, influye la cantidad de toxina secretada al medio. Estos hallazgos corroboran la identificación molecular del mensajero de la toxina *K1* mediante RT-PCR y contrasta la ausencia del efecto *killer* a pH 6, así mismo se plantea una actualización al mecanismo de acción de *K1*, basándose en la influencia del pH en el procesamiento previo a la maduración de la preprotoxina (pptox) y a la separación del dímero α - β a un estado activo.

Abstract

The *K1* toxin of *Saccharomyces cerevisiae* has been reported as toxic protein, capable of killing different strains of microorganisms like *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Zygosaccharomyces bailli*, and others. In the mature state, the *K1* toxin is made by two subunits: α and β , once the mature toxin is secreted to the extracellular media, it binds to the main receptor 1-6- β -D-Glucan, and the channel Tok1p, killing the sensitive cell. In the present study, the *killer* effect was characterized, and how do the pH and media composition influence the detection of *K1* toxin at mRNA level. It is shown that the pH of the YPD agar and composition of the media (pH 4.5, pH 4.7, and inductor media) increases the *killer* effect on the sensitive strain. In contrast, the amount of sensitive strain disposed in inhibition assays, influence the quantity of toxin secreted to the media. These findings support the molecular identification of the *K1* toxin messenger by RT-PCR, and contrast the absence of the *killer* effect at pH 6. Also, an update of the mechanism of action is proposed, based on the importance of pH and the previous processing to the maturation of preprotoxin (pptox) and the separation of the dimer α - β to an active state.

Introducción

Actualmente, los microorganismos son los mayores agentes causales de enfermedades en plantas y animales, debido a la letalidad y a la severidad de sus efectos. Estos aspectos son los puntos principales que llevan a la comunidad científica a encontrar soluciones rápidas y eficaces para contrarrestar este fenómeno. Con el desarrollo de los antibióticos disminuyó la letalidad de las enfermedades infecciosas, sin embargo, el uso indiscriminado y la falta de regulación por parte de las autoridades provocaron que los agentes microbianos hayan desarrollado mecanismos que contrarrestan los efectos o eliminan al antibiótico (MacLean & San Millan, 2019). Con el paso de los años se han generado una gran cantidad de antibióticos, pero la constante generación de multiresistencias indica que la investigación biomédica debe apostar por nuevos mecanismos (Lima et al., 2019), siendo los péptidos tóxicos (toxinas) una gran opción para el desarrollo de nuevos antibióticos (Nicolas et al., 2019).

La toxina *Killer K1* de *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado que causa la muerte en diversas cepas de *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Zygosaccharomyces bailii*, entre otros (Becker & Schmitt, 2017). La pptox consta de 4 subunidades (δ - α - γ - β) de las cuales solamente α y β se mantienen en la toxina madura (Ahmed et al., 1999). Hasta la fecha se han identificado 4 toxinas *killer* en *S. cerevisiae* (*K1*, *K2*, *K28* y *Klus*) siendo la toxina *K1* la más estudiada debido a su peculiar origen viral. El mecanismo molecular de acción de la toxina *K1* se lleva a cabo en dos pasos: el primero consta en el reconocimiento del 1-6- β -D-glucano de la célula objetivo. El segundo paso es la unión específica al canal de potasio Tok1p cuya interacción desencadena la despolarización de la célula (debido a la salida descontrolada de potasio), lo que causa la muerte de la célula (Sesti et al., 2001).

Un punto importante que distingue a las cepas de *S. cerevisiae* productoras de toxina *Killer* es su inmunidad ante la propia toxina, es decir, tienen un mecanismo molecular que las protege contra su toxina, pero son sensibles a otras toxinas *Killer* (Vondrejs & Palková, 1996). La inmunidad en el caso de la toxina *K1* se especula que se debe a la interacción intermolecular de la pptox con el canal Tok1p en sus

porciones intracelulares, se ha demostrado que la interacción entre estas dos entidades moleculares en el citoplasma deriva en el bloqueo de la función letal de *K1* (Bartunek et al., 2001; Sesti et al., 2001). Otro aspecto interesante, es que los mecanismos de inmunidad de las toxinas *killer* son distintos para cada caso, por ejemplo, el mecanismo de inmunidad para la toxina *K28* (inhibidor irreversible de la síntesis de DNA) es muy distinto al de *K1*; puesto que la inmunidad ante esta toxina hace uso del transporte retrógrado de la preprotoxina para ubiquitinarla y posteriormente degradarla en el proteosoma (Schmitt & Breinig, 2006).

Si bien las investigaciones alrededor de la funcionalidad de la toxina *K1* son abundantes, no se ha evaluado a profundidad el potencial antimicrobiano que esta toxina puede ofrecer; datos obtenidos en el Laboratorio de Biofísica de Membranas de la UAQ, han mostrado que la toxina *K1* es capaz de interactuar con microorganismos procariotas de importancia médica produciendo su muerte (Ramírez-Villarreal, 2018), por lo que la producción recombinante de esta toxina con fines biomédicos es altamente viable y de gran importancia ante la problemática de la generación de microorganismos multirresistentes a nivel mundial.

2. Antecedentes

2.1 Panorama actual de los Microorganismos multirresistentes (MMRs).

La multirresistencia a antibióticos es un problema creciente a nivel mundial, pues los microorganismos presentan un potencial riesgo a los grupos vulnerables de la sociedad, no solo por la letalidad o severidad de las enfermedades infecciosas, sino también por las secuelas que pueden presentar aquellas que avanzaron a cuadros más graves. En combinación, estos son los puntos principales que muestran una gran necesidad de encontrar nuevas soluciones rápidas y eficaces. Estudios recientes muestran una tendencia de un incremento en la hospitalización por infecciones relacionadas con MMRs (Khawaja et al., 2017), este incremento en la incidencia se debe principalmente al uso constante y desmedido de antibióticos, así mismo la automedicación y venta de fármacos sin receta médica han provocado que los agentes microbianos hayan desarrollado diversos mecanismos que contrarrestan los efectos o eliminan al antibiótico (MacLean & San Millan, 2019). Análisis de prospección muestran que para el año 2050 las enfermedades infecciosas causadas por MMRs alcanzarán alrededor de 10 millones de muertes en el mundo, superando la tasa de mortalidad por cáncer, diabetes y accidentes de tránsito (O'Neill, 2014).

Normalmente, se asocia a los MMRs a infecciones nosocomiales (Infecciones durante una hospitalización), debido a que en un ambiente intrahospitalario, la presión de selección con antibióticos son constantes y se mantienen a dosis altas, por lo que los microorganismos desarrollan mecanismos que les permiten resistir a estas presiones. Una infección por MMRs puede provenir de dos orígenes: de la comunidad, es decir un sujeto que adquiere una infección del ambiente exterior (Morin & Hadler, 2001; van Duin & Paterson, 2016), o una infección que surge dentro de un hospital (nosocomial) (Friedman et al., 2002). Estudios realizados en una serie de hospitales en India han demostrado que el simple hecho de ser portador de un MMR aumenta el riesgo de muerte. En este estudio se determinó un factor de riesgo (OR) de 2.01 para las áreas de cuidados intensivos, mientras que las áreas

aledañas resultaron tener un mayor factor de riesgo, alcanzando un valor de 2.87 (Gandra et al., 2019).

La incidencia de las infecciones por MMR a nivel mundial ha ido en aumento en los últimos años. En Estados Unidos se han reportado infecciones inducidas por *Clostridioides difficile*, *Candida* y *Enterobacteriaceae* como las infecciones con mayor cantidad de muertes reportadas, alcanzando cifras de 12,800, 1,700 y 9,100 fallecimientos respectivamente (*Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*, 2019); y en México, desafortunadamente, no existen registros de esta índole. A pesar de lo llamativo de esta situación, los datos reflejan una pequeña parte de la magnitud del problema. Se necesitan estudios para determinar la cantidad de MMR totales, puesto que se proyecta que el número de casos aumentaría a millones alrededor del mundo. Bajo este esquema de latencia, las infecciones por MMR latentes son de gran importancia, un claro ejemplo es *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria multirresistente por naturaleza que puede permanecer asintomática por largos periodos de tiempo y manifestarse súbitamente. Respecto a esta bacteria, se ha estimado que el 23 % de la población mundial es un portador latente de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente, de los cuales el 14 % mueren (Knight et al., 2019). El control de estas enfermedades ahora toma lugar dentro de las principales prioridades a nivel mundial, para atender esta necesidad en Octubre del 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló un plan de acción para combatir la multirresistencia microbiana (WHO, 2014). El plan consta de los siguientes puntos, los cuales (de cumplirse) pretenden asegurar la reducción del número de infecciones y/o muertes ocasionadas por MMR a nivel mundial:

- Educar sobre la problemática, riesgos, fuentes de contaminación, fomentar la cultura de la no automedicación, asegurar la toma de los tratamientos antibióticos completos y acciones que pueden tomar en cuenta para disminuir la incidencia de estas enfermedades.
- Fortalecer la investigación, recopilación constante de datos epidemiológicos, investigación básica sobre los MMR, estimación de impactos en distintos sectores (económico, salud, etc.).

- Reducir la incidencia de infecciones a través de la prevención e higiene, implementación de campañas de vacunación y generación de nuevas vacunas, mejoramiento de las medidas sanitarias.
- Optimización de la distribución de antibióticos existentes, asegurar la disponibilidad de antibióticos para quien lo necesite y evitar la venta de antibióticos sin prescripción médica.
- Investigación de nuevos métodos de detección, tratamientos, desarrollo de nuevos antibióticos que sustituyan a los actuales.

Estos puntos que subyace la OMS ya se encuentran en marcha en varios países alrededor del mundo, Estados Unidos y el Reino Unido se posicionan como los pioneros en el establecimiento de estrategias económicas y administrativas que pretenden el cumplimiento de los puntos que sugiere la OMS. Así mismo, países de bajos recursos han mostrado sus propios planes para combatir las multirresistencias, entre los cuales destacan Etiopía, Sudáfrica, Nepal y Vietnam (Miller-Petrie et al., 2017). En México, la situación actual que llevan los MMR atiende a la distribución de fármacos capaces de combatir estas infecciones, no obstante, la investigación de nuevas alternativas para tratamientos se mantiene como uno de los principales puntos en los que se puede incursionar. En este sentido, la investigación de moléculas con capacidades antibióticas es de gran importancia, un ejemplo de esta estrategia es la búsqueda de microorganismos capaces de secretar péptidos o metabolitos con capacidades antibióticas.

2.2 Las toxinas killer de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae ha sido el hongo más utilizado en la historia de la humanidad. Su nombre significa “hongo del azúcar” y “cerveza”, cuyo uso se ha enfocado en la gastronomía para la producción de pan y alcohol. En investigación llama la atención porque es un eucarionte relativamente “sencillo”, atractivo porque es barato su mantenimiento, su reproducción puede ser tanto sexual como asexual,

generando células haploides o diploides en periodos cortos (Salari & Salari, 2017). Dentro de las características más relevantes que envuelven a *S. cerevisiae* está el fenotipo *killer*, el cual hace referencia a la capacidad que tienen algunas cepas de esta levadura para producir una molécula proteica causante de la muerte en cepas sensibles (Bevan & Makower, 1963). Hasta la fecha se han descubierto diversas toxinas *killer* en *Saccharomyces cerevisiae*; el origen de estas toxinas radica en la simbiosis de esta levadura con dos agentes virales de la familia *Totiviridae*: un virus M dsRNA el cual codifica para una preprotoxina y un virus LA helper que contiene la secuencia para la cápside y la RNA polimerasa dependiente de RNA (Pieczynska et al., 2017). Estos virus llamados ScV (*Saccharomyces cerevisiae* viruses) dan el nombre a cada una de las toxinas *killer*, siendo M1, M2, M28 y Mlus los codificantes de *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* respectivamente (Rodríguez-Cousiño et al., 2011a, 2017). Un punto interesante a recalcar respecto a estos virus, es la aparente compatibilidad que existe entre ellos; se ha reportado que cada virus LA se relaciona con un solo tipo de virus M, en ese sentido, el virus LA-1 es el satélite del virus M1, LA-2 con M2, LA-28 con M28 y LA-lus con Mlus (Aitmanaitė et al., 2021; Lukša et al., 2017), sin embargo, existe la incógnita sobre la posibilidad de encontrar diferentes virus M coexistiendo en una misma célula. Esta interrogante ha sido pobremente estudiada, sin embargo, existe un reporte al respecto donde se coinfectó una cepa de levadura con dos distintos virus M (M1 y M2) bajo un mismo satélite (LA-1), este estudio demostró que la coinfección es posible, así como la manutención del fenotipo *killer* de ambos virus M, pero en consecuencia de la baja compatibilidad, el virus foráneo se pierde en las generaciones, posiblemente debido a que necesita al satélite LA-2 para su correcta replicación en la levadura (el-Sherbeini & Bostian, 1987).

2.2.1 Mecanismo de acción de *K1*.

La toxina *K1* ha sido la más estudiada de entre todas las toxinas *killer* de *S. cerevisiae* encontradas hasta la fecha, sin embargo, aún existe controversia sobre cuál es el mecanismo molecular que utiliza esta toxina para provocar la muerte de

las cepas sensibles (*K*). Una primera aproximación en la determinación del mecanismo de acción de *K1* fue abordada diez años después de su propio descubrimiento. En estos trabajos se demostró que la toxina tiene un mecanismo molecular en dos pasos, los cuales se basaban en (i) la unión con el receptor 1-6- β -D glucano de la pared de la levadura sensible, y (ii) la interacción de la toxina con la membrana celular. Esta afirmación surge de las evidencias mostradas por Bussey & Sherman (1973) y de la Peña (1981), quienes determinaron que la acción de la toxina en su estado maduro desregula el flujo de protones y ATP a través de la membrana celular (**Figura 1A**). Así mismo una serie de estudios independientes muestran que la toxina tiene efecto, no solo en células completas, sino que también las células carentes de pared celular (esferoplastos) muestran sensibilidad a la toxina (Bussey et al., 1973), por lo que el efecto *killer* puede estar directamente ligado con la membrana celular.

El segundo mecanismo propuesto abarca parte de las evidencias mencionadas sobre la salida de potasio desencadenada por la interacción de la toxina con la célula sensible. En este mecanismo se propone que la toxina per se es capaz de formar canales iónicos; como lo harían cierto tipo de ionóforos, los cuales permiten la salida descontrolada de iones como K^+ y Na^+ principalmente (**Figura 1B**). Este efecto pudo ser contrarrestado mediante la adición de altos niveles de K^+ en el exterior de la célula, lo cual sustentó esta teoría (Martinac et al., 1990).

Un tercer mecanismo (y el más aceptado hasta ahora), corresponde a un sistema de acción en dos fases, donde la subunidad β interactúa con el receptor 1-6- β -D glucano y posteriormente ocurre una interacción de la toxina con el canal Tok1p, descrito como una canal de potasio rectificador saliente con dos cominos de poro en tándem (Ketchum et al., 1995). Este canal se ha encontrado en la membrana plasmática de la levadura (Bertl et al., 2003; Loukin & Saimi, 1999), y se ha demostrado que la activación de los canales Tok1p pueden ser producidos por la toxina *K1* en cepas K^- (Ahmed et al., 1999; Baev et al., 2003; Sesti et al., 2001). Esta hipótesis fue demostrada al evaluar si la ausencia del canal (mutante nula de TOK1) confiere resistencia a la toxina, y a su vez, la sobreexpresión del canal

produce más sensibilidad; determinando que no existe efecto de la toxina *K1* en aquellas células que no expresan el canal Tok1p (Ahmed et al., 1999). Aunado a estos datos, se ha demostrado que la presencia de la toxina inmadura o ptoxK1, en el interior celular es capaz de producir un efecto protector o inmune. Este efecto de protección se evaluó mediante experimentos de electrofisiología utilizando el canal Tok1p expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se demostró que la inmunidad a *K1* se debe a que la ptoxK1 puede actuar sobre el canal Tok1p por el lado interno, bloqueando su actividad e impidiendo que la toxina madura tenga efecto por el lado externo del canal (Sesti et al., 2001). Tomando en cuenta las evidencias generadas y los mecanismos planteados, es posible plantear que el reconocimiento de la toxina madura con el receptor 1-6- β -D-glucano ocurre mediante el reconocimiento de la subunidad β , mediante la cisteína 248 (Gier et al., 2019; Zhu & Bussey, 1991), y acto seguido, la subunidad β interactúa con el canal Tok1p (**Figura 1C**). Sin embargo, la interacción puntual de *K1* con Tok1p permanece indeterminada y también es motivo de estudio en el laboratorio.

El cuarto mecanismo molecular propone una visión contraria al mecanismo descrito anteriormente, en el cual se establece la misma interacción de la subunidad β con su receptor (1-6- β -D-glucano), seguido de la unión específica de la subunidad α con el receptor Kre1p; una proteína O-glicosilada glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclada al C-terminal que se encuentra expresada en superficie celular (Roemer & Bussey, 1995). Se ha estudiado que esta proteína se encuentra involucrada en la síntesis del 1-6- β -D-glucano, inclusive se ha observado que en la mutante $\Delta kre1$ se ve reducida la producción del 1-6- β -D-glucano en un 40 %, así mismo, se observó que estas mutantes son resistentes al efecto de la toxina *K1* (Boone et al., 1990; Breinig et al., 2002). El mecanismo que se propone basándose en la interacción de *K1* con Kre1p establece un sistema de tres pasos donde (i) la toxina se une al receptor 1-6- β -D-glucano seguido de (ii) unión a Kre1p y (iii) formación de poros cationicos-selectivos que permiten la salida masiva de potasio, así como la entrada de protones (**Figura 1D**) (de la Peña et al., 1981; Skipper & Bussey, 1977). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que la resistencia a la toxina *K1* no es causada

por la interacción de la toxina *K1* con el receptor Kre1p, sino con el papel que desarrolla Kre1p en la síntesis del 1-6-β-D-glucano, quien es el receptor primario de la toxina (Breinig et al., 2004). Las cepas mutantes $\Delta kre1$ tienen una reducción de la expresión del receptor 1-6-β-D-glucano y por lo tanto, confiere un fenotipo resistente a *K1* (Gier et al., 2017, 2019; Page et al., 2003), por lo que el mecanismo molecular exacto aún necesita validación experimental.

Estudios recientes han desenmascarado un quinto mecanismo molecular, basado en eventos poco comunes; La muerte celular programada (PCD) en levaduras, es un mecanismo altamente regulado que puede ser activado por una gran cantidad de efectores, siendo de los más importantes, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la acción de las caspasas (Schmitt & Breinig, 2006). Recientemente, se ha observado que las toxinas *killer* también pueden activar los mecanismos necesarios para desencadenar la muerte celular programada, lo cual abre un nuevo panorama en el mecanismo de acción de estas toxinas. Siendo así, es posible tener en cuenta dos vías de acción: (i) vía canónica (Unión Toxina-Receptor, desencadenando la muerte por salida desmedida de potasio) y (ii) vía secundaria (Apoptosis) (Sheppard & Dikicioglu, 2019).

Un aspecto importante a considerar sobre la vía secundaria es la cantidad de toxina que interactúa con la célula sensible. Se ha observado que altas concentraciones de toxina llevan a la célula sensible a la muerte por la vía canónica, mientras que las bajas concentraciones de toxina pueden ser capaces de disparar la señalización apoptótica (**Figura 1E**). El proceso de PCD se ha hipotetizado como una respuesta ante la interacción de las toxinas con sus receptores en la membrana plasmática (Tok1p, Kre1p) y componentes intracelulares tales como la caspasa 1 de levaduras (Yca1p) y con la mitocondria (Hamann et al., 2008; Mazzoni & Falcone, 2008; Reiter et al., 2005). Además, de que el aumento de ROS y el factor pro-muerte Dnm1p son los principales efectores de PCD ante la toxina *K1*, mientras que la proteína mitocondrial formadora de poro Fis1p se ha observado que inhibe la señal apoptótica ante la interacción con *K1* (Ivanovska & Hardwick, 2005; Schmitt & Reiter, 2008).

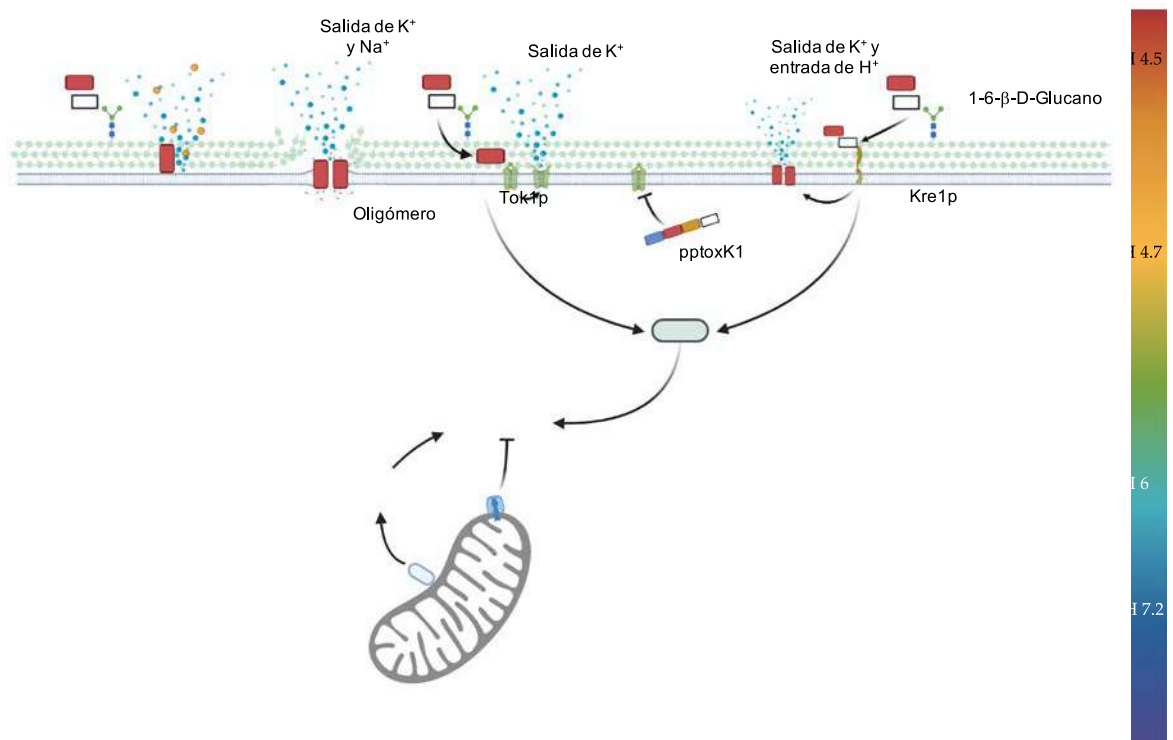


Figura 1. Mecanismos de acción propuestos de la toxina *K1*. A) Desregulación de la membrana por *K1*. La interacción de la toxina directamente sobre la membrana celular desregula el flujo de protones y ATP. B) Formación de poros en la membrana celular. La acumulación de oligómeros en la membrana celular forma orificios tipo canal iónico, permitiendo la salida descontrolada de K^+ y Na^+ . C) Desregulación del canal Tok1p. Mecanismo en dos pasos, comenzando por unión de la subunidad β con el receptor 1-6- β -D glucano, seguido de la unión de la subunidad α con el canal Tok1p, desregulando su función y permitiendo la salida descontrolada de potasio. D) Muerte celular dirigida por la unión a Kre1p. La unión de la toxina mediante la subunidad β al receptor 1-6- β -D-glucano permite la interacción de la subunidad α con la proteína Kre1p, permitiendo la formación de poros cation-selectivos, provocando la salida descontrolada de potasio y la entrada de protones. E) Muerte celular programada activada por *K1* en respuesta a la interacción de la toxina con sus receptores en la membrana plasmática (Tok1p, Kre1p). La interacción a bajas concentraciones de toxina promueven la activación de Yca1p, así como el factor pro-death Dnm1p mitocondrial, liberando ROS, llevando a la célula a PCD; mientras que Fis1p funciona como un inhibidor de la señal apoptótica.

Fuente: Elaboración propia. Generado en BioRender [Molina-Vera C, 2021. (Tesis en proceso)]

3. Justificación

De acuerdo con los puntos que establece la OMS como estrategias para la erradicación de enfermedades ocasionadas por microorganismos multirresistentes, la investigación científica en México puede tener un gran campo de oportunidad dentro de los objetivos referentes a la investigación de los MMR, así como en el desarrollo de nuevas estrategias para la eliminación o tratamientos para estos. Si bien, con el paso de los años se han generado una gran cantidad de fármacos antimicrobianos, la investigación biomédica debe apostar por nuevos mecanismos. Dentro de las múltiples alternativas de investigación se encuentran los péptidos tóxicos (toxinas) como una gran opción para el desarrollo de nuevos antibióticos (Miller-Petrie, Pant, & Laxminarayan, 2017), sin embargo, el uso de estas proteínas ya sea en estado nativo o recombinante, puede no ser del todo plausible, ya que es necesario estudiar más sobre la naturaleza de estas toxinas, determinando la efectividad, seguridad o inclusive consecuencias de su uso. Es por esto que la investigación de los péptidos antimicrobianos toma gran importancia, no solo para atacar las distintas formas de vida multirresistentes, sino para asegurar una buena calidad de vida para todas las personas y animales que habitan en el planeta. La aparición de MMR se ha convertido en una de las principales problemáticas a nivel mundial. La búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias de control microbiano forman parte de las prioridades de la humanidad para los siguientes años, por lo que la investigación de péptidos antimicrobianos es de suma importancia.

Las toxinas *killer* han mostrado gran eficacia para el control biológico contra diversos hongos levaduriformes, sin embargo, hasta la fecha no se tienen reportes sobre la producción de estas toxinas recombinantes con fines antimicrobianos. En el caso particular de la toxina *K1* de *S. cerevisiae*, se propone como un agente protéico con un gran potencial como péptido antimicrobiano, por lo que es necesario investigar

las propiedades de la toxina producida de manera recombinante. La prospección de este proyecto tiende a alcanzar la generación de conocimiento científico, atendiendo la necesidad de investigar los mecanismos de acción y proponer nuevos métodos de control microbiano.

4. Hipótesis

La toxina *K1* de *Saccharomyces cerevisiae* es estable a diferentes pH y mantiene el fenotipo *killer* a lo largo del tiempo.

5. Objetivos

General

- Determinar la estabilidad y el efecto de la toxina *K1* de *S. cerevisiae* a distintos pH y tiempos de actividad.

Particulares

- I. Determinar el pH óptimo para el efecto de la toxina *K1*.
- II. Comparar el efecto *killer* en distintas condiciones de densidad celular.
- III. Estimar el tiempo de generación del efecto *killer*.
- IV. Determinar los factores clave para obtener la toxina *K1*.
 - a. Estandarizar las condiciones de cultivo donde se magnifica la obtención de RNA total.
 - b. Comparar el efecto de las distintas condiciones de cultivo en rendimiento de extracciones de RNA total.
- V. Obtener el cDNA de la toxina *K1*.

6. Metodología

6.1 Métodos microbiológicos.

6.1.1 Condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* 5x47 (sensible; MAT α his1/+ trp1/+ ura3/+ [K10 K20 K280 Klus0]; Dra. Rosa Esteban, Universidad de Salamanca, España), la cepa 42300 (Killer; MAT α Ade2/+ Thr1/+ sKi2-1/+ [KIL-K1]; ATCC) y By4742 (resistente; WT; MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0; [Soledad Funes Instituto de Fisiología Celular. UNAM]). Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: YPD estándar: Extracto de levadura (YE) 1 %, Peptona (PP) 2 %, Glucosa (Glu) 2 %. YPD-Agar: YPD con Agar 2.5 %. YPD-Agar pH 4, 4.5, 4.7, 5 y 6 fueron preparados adicionando 0.1 M de KH₂PO₄ (pH ajustado con ácido cítrico o KOH para ajustar a pH 6) y agar al 2.5 %. Medio inductor (MI): YE 7.5 g/L, PP 5 g/L, FeCl₃ 30 μ M, MgSO₄ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 30 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 2 mM, glicerol 52 g/L (Flegelová et al., 2002). Las cepas fueron cultivadas en medio YPD agregando 0.5 mg de levadura por mL, todos los cultivos fueron incubados a 27 °C, 120 rpm. Los cultivos con MI fueron mantenidos por 24 horas en medio YPD y posteriormente se reemplazó el medio por un volumen de MI, manteniendo el cultivo en las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta su procesamiento.

6.1.2 Ensayos de inhibición en placa.

Se evaluó la letalidad de la toxina *K1* contra la cepa sensible 5x47 mediante una serie de ensayos de letalidad en placa (Palková & Vondrejs, 1996; Picazo, 2000). Cada experimento consistió en el inóculo de un césped de levadura sensible 5x47 (0.3mg, 1mg y 3mg) en cajas de YPD-Agar con los siguientes pH: 4.0, 4.5, 4.7, 5.0 y 6.0 (control). Sobre el césped se colocaron gotas de 10 μ l de la cepa *killer* 42300 a diferentes concentraciones celulares (0.1mg, 0.4mg, 1mg, 2mg, 3mg, 4mg, 5mg,

6mg, 7mg y 10mg). Las cajas se mantuvieron a temperatura constante de 27 °C por 48 horas. Se registró la presencia de halos de inhibición (efecto *killer*) a las 24 y 48 horas. El fenotipo *killer* fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$K = [\text{Área de inhibición}] - [\text{Área de cultivo } K^+]$$

El resultado obtenido de la resta de estas áreas fue evaluado como el área de muerte en el programa ImageJ para Mac.

6.1.3 Curvas de crecimiento.

Se realizaron distintas combinaciones de interacción entre la cepa 42300 y la 5x47, tomando en cuenta el pH (4.7 y 6.0) y la cantidad de cepa 5x47 respecto de la 42300 (1:1 y 2:1), la cantidad de levadura productora inoculada se mantuvo como se menciona anteriormente a 0.5 mg/ml. Los cultivos se realizaron en un volumen total de 10 ml de medio YPDL incubándose a 27 °C, 120 rpm. Se tomó un volumen de 100 µl de cada cultivo para su medición a 600 nm (para estimar densidad celular) en el equipo Varioskan (Thermo) de la unidad de proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se tomaron muestras desde las 0 hasta las 96 horas en intervalos de cada dos horas.

Para la lectura de la densidad celular se realizó un homogenizado de las muestras mediante vortex, seguido de centrifugación 5000 rpm por 10 minutos para separar el sobrenadante del precipitado celular. El sobrenadante fue transferido a una placa de microtitulación para cuantificación protéica, mientras que el precipitado celular fue homogenizado en 100 µl de agua destilada. Las muestras celulares se colocaron en una placa de microtitulación para su lectura a 600 nm.

6.1.4 Cuantificación proteica.

Se estimó el rendimiento de la producción de la toxina *K1* en las distintas condiciones de cultivo mencionadas en el punto anterior. Mediante la técnica de cuantificación Bradford (Bradford, 1976), se analizaron los sobrenadantes obtenidos de cada muestra utilizando 5 μ l de cada muestra con 100 μ l de reactivo de Bradford. Posteriormente, la placa de microtitulación se incubó en agitación suave (100 rpm) por 10 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Acto seguido, se leyó a 595 nm en el Varioskan.

6.2 Técnicas de Biología Molecular.

6.2.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Se realizaron dos métodos de extracción de ácidos nucleicos: Extracción de RNA total y ácidos nucleicos totales. En ambos casos se utilizó la cepa 42300, la cual fue crecida en medio YPD por 24 hrs., en agitación constante a 120 rpm y 27 °C, al paso de las primeras 24 horas, se sustituyó el medio YPD por medio MI por 24 horas más en las condiciones ya mencionadas. Las células fueron colectadas por centrifugación (5000 rpm, 10 min) y se determinó el peso húmedo de cada cultivo. Para aislar el RNA total: Las pastillas celulares fueron homogenizadas en 750 μ L de TRIzol y posteriormente lisadas mediante choque térmico (nitógeno líquido seguido de 55 °C), posteriormente se realizó la extracción de RNA total mediante el método de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del kit (750 μ L de TRIzol/100 mg de levadura).

Para aislar ácidos nucleicos totales (mRNA, dsRNA y mtDNA y gDNA): 100 mg de células se lisaron con 350 μ L de Buffer RC (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM de NaCl, 10 mM EDTA y 0.2 % SDS), seguido de un volumen de fenol pH 8.0 y un volumen de cloroformo. Las muestras se homogenizaron mediante vortex por 3 minutos hasta obtener una apariencia lechosa y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante. Acto seguido, se recuperaron los ácidos

nucléicos totales mediante centrifugación a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante conteniendo los ácidos nucleicos totales fueron precipitados con isopropanol, seguido de una limpieza con etanol 70% (Rodríguez-Cousiño et al., 2011b). La visualización de los ácidos nucleicos se realizó en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X, 1 µL de Buffer de carga (Fermentas) con GelRed y la aplicación de un campo eléctrico 100V por 20 min.

6.2.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA).

Para la síntesis de cDNA: se utilizaron 2 µg de mRNA o dsRNA obtenido de la cepa 42300. Se añadió 1 unidad (U) de DNasa I (para eliminar el DNA). El RNA de cadena sencilla fue retrotranscrito a cDNA con la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega) utilizando oligo dT como primer siguiendo las instrucciones del fabricante: 200 U M-MLV RT (1 µL) por cada 2 µg de mRNA o dsRNA obtenido.

6.2.3 Amplificación del gen M1 por RT-PCR.

Para amplificar el gen que codifica para la pptox *K1* de la cepa 42300, se utilizó la técnica RT-PCR punto final. Los primers utilizados fueron los siguientes: K1YESFw (5'-*gcg gga tcc gcg ATG ACG AAG CCA ACC CAA GTA TTA GTT AG*-3') y K1YESRv (5'-*gca tct aga CTA GTG GCC TGT GTC ACA GCC TTC AAA G*-3'), las letras minúsculas en ambos primers señalan las secuencias para las enzimas BamHI y XbaI respectivamente. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el cDNA obtenido de la cepa 42300, usando la enzima Go Taq Flexi DNA (Promega), además se estandarizó la cantidad de MgCl₂ a 25mM. Se utilizó el termociclador c1000 (BIO-RAD), y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificación (94 °C 45 seg, 64.5 °C 30 seg, 72 °C 1 min), concluyendo con una amplificación final de 5 minutos. El producto de PCR obtenido fue secuenciado en el LANGEBIO, CINVESTAV – Irapuato.

6.3 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la inhibición en placa se analizaron mediante (ANOVA) para varias muestras, comparando los tiempos de cultivo, cantidad de cepa sensible inoculada, cantidad de cepa productora inoculada y pH. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Past 4 y JMP9 para Mac.

6.4 Consideraciones bioéticas.

Las técnicas de Biología Molecular y Microbiología se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biofísica de membranas y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales (UAQ). El manejo de residuos plásticos derivados de las reacciones enzimáticas y PCR fueron dispuestos en bolsas rojas de plástico para su deshecho. Así mismo las cajas de cultivo de *S. cerevisiae* fueron inactivadas mediante la adición de óxido de calcio (cal viva) con el fin de neutralizar la toxina *K1* presente en los cultivos, posteriormente cada caja de petri fue sellada y dispuesta en bolsas rojas.

Los residuos de las extracciones con Trizol y Fenol fueron almacenados en un frasco para desechos color ámbar de vidrio. Ambos residuos serán identificados con las características del residuo, siguiendo las indicaciones de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

7. Resultados

7.1 Variables de impacto en la actividad de K1.

7.1.1 El efecto killer a través del tiempo.

El primer punto a evaluar respecto a la actividad de la toxina *K1* fue determinar si existe un punto temporal de generación del halo de inhibición que caracteriza el efecto *killer*, así como evaluar si el efecto disminuye o incrementa respecto al tiempo. Para lograr este objetivo, se determinó el tamaño del área de inhibición

efectiva (ver 6.1.2), mediante experimentos de inhibición en placa. Se evaluaron las áreas de inhibición generadas por la cepa 42300 a las 8, 24 y 48 horas en céspedes de 5x47; los resultados mostraron una cinética de crecimiento del área de inhibición, la cual comienza a visualizarse a las 8 horas, a partir de esta hora, el halo crece hasta un punto máximo a las 24 horas ($p < 0.05$). Interesantemente, a partir de las 24 y hasta las 48 horas el tamaño del halo de inhibición se mantiene constante (**Figura 2A**). Cabe mencionar, que el tamaño del halo se mantuvo sin cambios a las 72, 96 y hasta las 120 horas; por lo que se asegura que la cepa sensible no recoloniza el área delimitada por la cepa productora, así mismo, los botones de crecimiento de la cepa productora no crecieron durante el lapso de las 24 a 120 horas.

7.1.2 El efecto killer ante distintas condiciones de densidad celular.

Un aspecto no evaluado en los diversos estudios referentes a la toxina *K1*, es el efecto que tiene la densidad celular (tanto de la cepa sensible como de la productora) en la dinámica de producción de la toxina; lo cual se visualiza como el cambio en el tamaño del halo de inhibición. Para evaluar esta problemática, se utilizaron distintas cantidades de la cepa 5x47 sensible (0.3, 1 y 3 mg), las cuales fueron inoculadas en placas de YPD-Agar. En cada placa se inocularon gotas de 10 μ l conteniendo 1 mg de cepa 42300 productora, evaluando los resultados a las 24 y 48 horas. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de ANOVA. Como era de esperarse, los resultados indicaron que los céspedes de menor densidad celular (0.3 mg de 5x47) tenían halos más grandes (0.29 cm^2 , $p < 0.05$), mientras que los céspedes inoculados con 1 mg de 5x47 tenían halos de menor tamaño (0.22 cm^2). Interesantemente, los céspedes inoculados con 3 mg de 5x47, muestran un efecto muy similar al de los inoculados con 1 mg de 5x47 (0.22 cm^2) (**Figura 2B**), este efecto puede deberse a la interacción de las dos cepas, lo cual incrementó la producción de toxina en respuesta a la alta densidad celular de la cepa sensible.

De manera paralela, se evaluó si la cantidad de cepa *killer* 42300 dispuesta en las placas de YPD-Agar sobre el césped sensible tiene un efecto en el área de inhibición, para lo cual se probaron diferentes cantidades de cepa *killer* en un mismo volumen (10 μ l). Los halos de inhibición observados en estos experimentos fueron documentados a las 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos lograron demostrar que no hay diferencias significativas en el tamaño del halo de inhibición generado por las distintas cantidades de 42300 (**Figura 2D**) ($p= 0.6227$), por lo que el efecto *killer* puede estar más relacionado a la disponibilidad y rendimiento de producción, que con la cantidad de levadura productora dispuesta en el medio (**Figura 2C**). Estos datos sugieren fuertemente que la cantidad de toxina secretada al medio no es constante, puesto que la cepa sensible infiere de alguna manera en la cantidad de toxina secretada, lo cual repercute en una diferencia en las áreas de inhibición, logrando tener áreas de muerte similares inclusive en aquellos ensayos donde la densidad celular es más alta (**Figura 2B**).

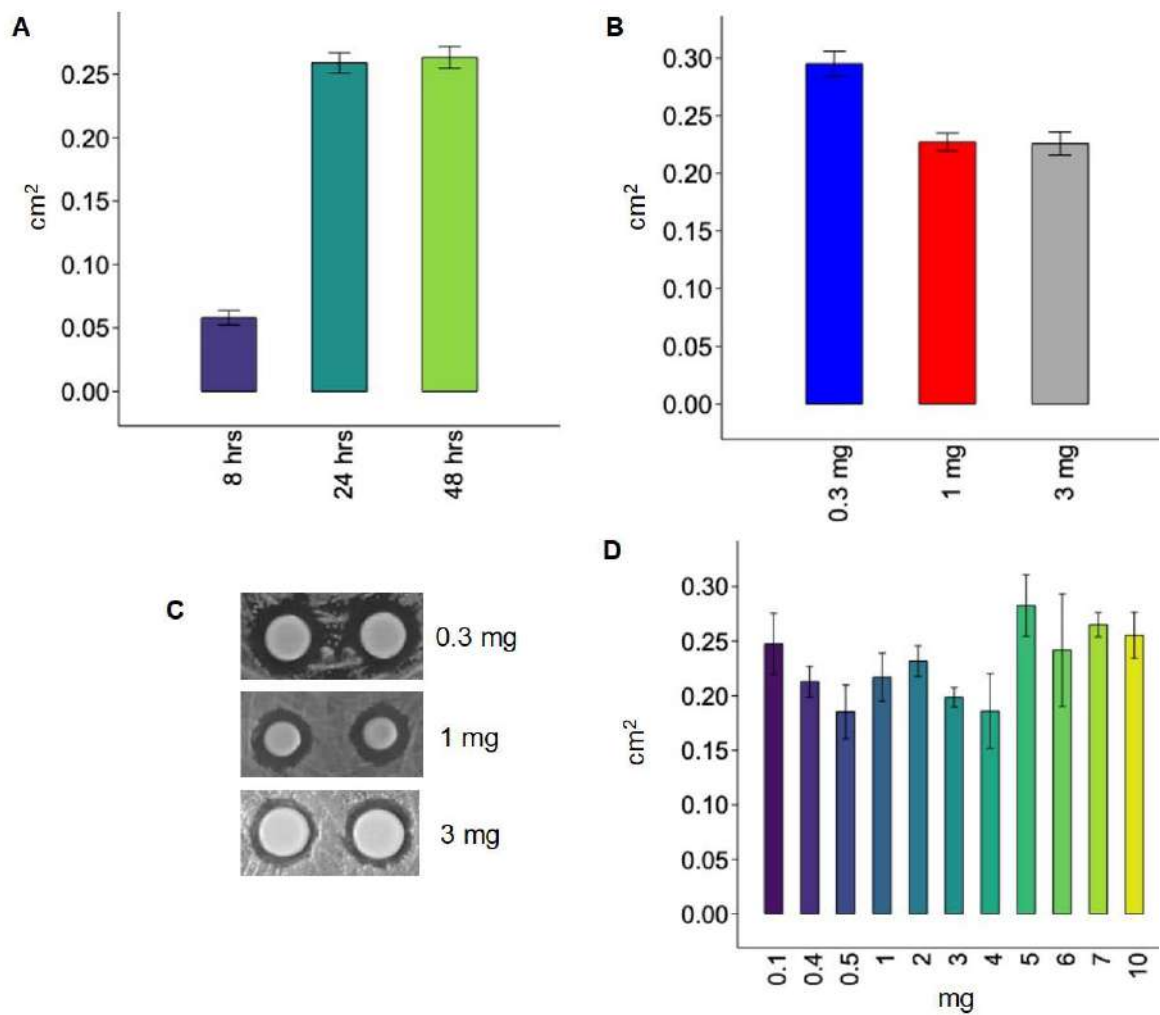


Figura 2. Impacto de la cantidad de levadura sensible y productora sobre el efecto *killer*.

A. Curso temporal de la actividad de *K1* a las 8, 24 y 48 horas.

B. Césped de 0.3 mg, 1 mg y 3mg de cepa 5x47 sensible. La diferencia entre la actividad de la cepa *killer* 42300 sobre los céspedes de 0.3 mg es significativamente mayor en comparación con los de 1 y 3 mg ($p < 0.05$), mientras que la actividad de la toxina a densidades de 1 y 3 mg es muy similar.

C. Imágenes representativas de los halos de inhibición correspondientes al panel A.

D. Efecto de la cantidad de cepa 42300 inoculada. Las áreas de inhibición entre las distintas cantidades de cepa 42300 no son significativas entre sí ($p: 0.6227$).

7.1.3 El pH del medio modifica la actividad de K1.

Con el fin de corroborar el efecto de la toxina K1 a pH bajo, se realizaron ensayos de inhibición en placas de YPDA a diferentes pH (4.0, 4.5, 4.7, 5.0 y 6.0), así como curvas de crecimiento y cuantificación proteica mediante el método de Bradford. Se demostró que la actividad de la toxina K1 tiene un efecto diferencial entre los distintos pH (4, 4.5, 4.7, 5 y 6) con 3 mg de la cepa 42300 (**Figura 3B**). Los datos obtenidos mostraron que el efecto a pH 4 es de 0.1839 cm², pero a medida que se aumenta el pH a pH 4.5 y 4.7, las áreas de inhibición aumentan significativamente (0.3097 cm² y 0.3093 cm²; $p < 0.05$), sin embargo, este efecto disminuye a pH 5 (0.2419 cm²) y muestra un efecto nulo a pH 6. Cabe mencionar que, aunque la actividad de la toxina a pH 4.5 es significativamente alta con respecto a los pH 4, 5 y 6 ($p: 0.0008$), comparando con las áreas obtenidas a pH 4.7, la diferencia no es significativa (**Figura 3A**).

De manera independiente, se evaluó la importancia del pH en el crecimiento de la cepa productora y la cantidad de toxina que se produce a los distintos pH, para lo cual se realizó una serie de curvas de crecimiento utilizando la cepa productora 42300 con las siguientes condiciones de medio: YPD, YPD pH 4, YPD pH 5 y YPD pH 6. Estos cultivos fueron medidos a 600 nm (crecimiento) y a 595 nm (proteínas) cada dos horas. Se encontró que el crecimiento de la cepa 42300 no se ve favorecido a ningún pH, siendo el medio con mejor producción de biomasa el YPD estándar, cuyo pH es de 5.5. En los medios de cultivo con pH 4, 5 y 6 el crecimiento de la cepa es menor en comparación con el medio YPD, sin embargo, la diferencia del crecimiento a estos pH no difiere mucho entre ellos (**Figura 3C**). En contraparte, se encontró que la cantidad de proteínas totales en estos medios fue favorecida a pH 6 desde las 0 hasta las 16 horas, teniendo un pico de la secreción proteica a las 16 horas. Este pico de producción proteica se observó también a pH 5, pero a diferencia del cultivo a pH 6, la secreción proteica se mantuvo baja durante las primeras horas y tuvo una recaída a las 18 horas, manteniendo los niveles proteicos

a la baja durante el resto del experimento (**Figura 3D**). Los demás cultivos mantuvieron una secreción proteica similar.

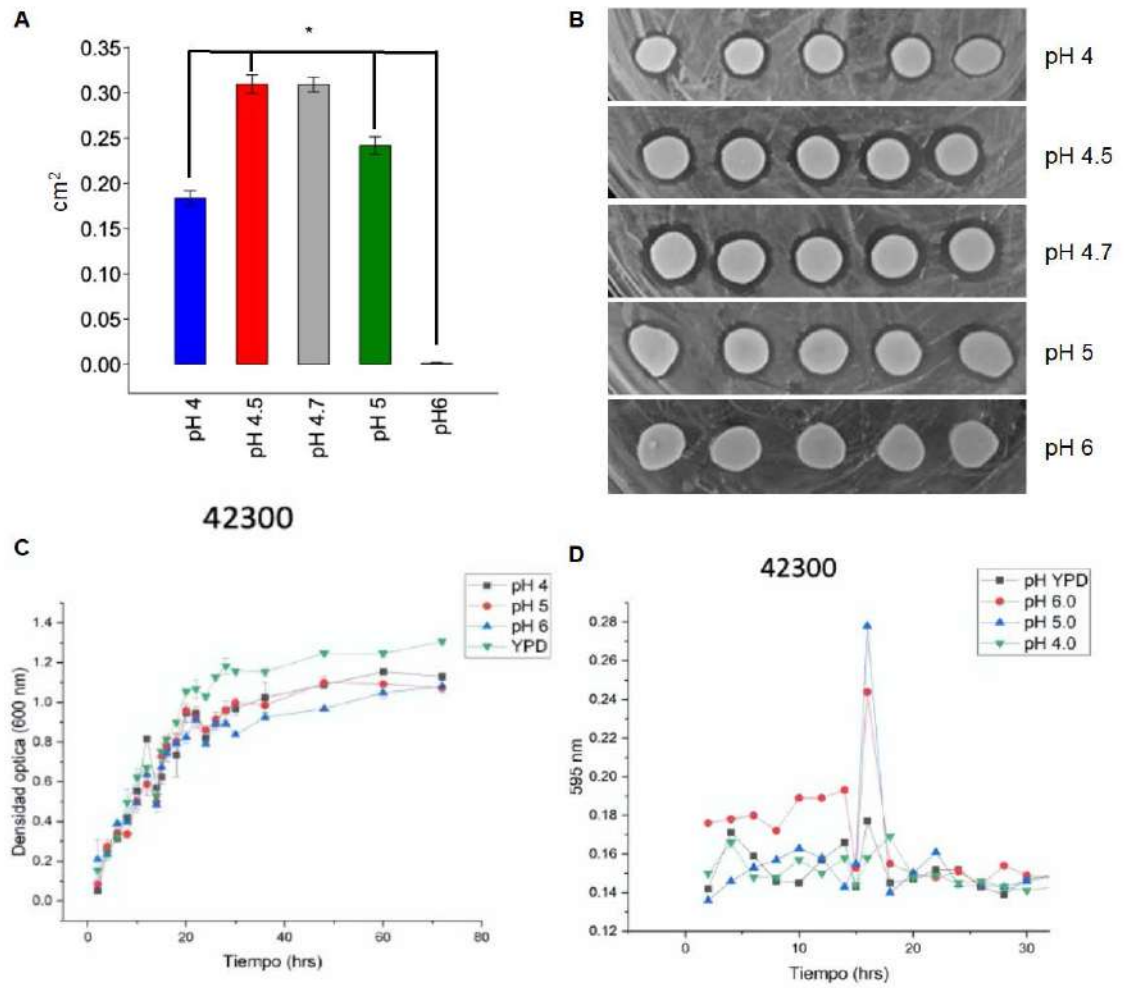


Figura 3. Actividad de *K1* modulada por el pH.

A. Comparación de la actividad de la cepa 42300 a diferentes pH. Se muestra un efecto mayor a pH 4.5 y 4.7 en comparación con pH 4, 5 y 6 ($p < 0.05$).

B. Imágenes representativas de la influencia del pH en el efecto *killer* de la cepa 42300. Se muestra un mayor efecto a pH 4.5 y 4.7, mientras que a pH 6 no hay efecto.

C. Curva de crecimiento de la cepa 42300. El medio YPD muestra tener una mayor producción de biomasa en comparación con los medios a pH 4, 5, y 6.

D. Cuantificación proteica total del medio de cultivo a distintos pH. La cantidad de proteínas secretadas se ve favorecida a pH 6 con un pico de la secreción a las 16 horas, al igual que a pH 5, mientras que los cultivos en YPD a pH 4 no muestran alteraciones en la cantidad de proteína total secretada al medio.

7.2 Determinantes en la obtención del gen codificante de K1.

7.2.1 La presencia del mRNA de K1 está influenciado por el cultivo.

Para determinar el pico de expresión del mRNA de la ptox en la cepa productora, se realizaron ensayos de inhibición en placa. Se analizaron distintas condiciones del medio de cultivo: YPDL, pH (4.5 y 4.7) y medio inductor. Los análisis de los halos de inhibición permitieron determinar las condiciones de cultivo de la cepa 42300 donde el efecto *killer* se magnifica; en ese sentido, el medio inductor mostró resultados más favorables en comparación con el cultivo de la cepa crecida en YPDL, pH 4.5 y 4.7 (p:0.0008).

Utilizando las cepas 5x47, 42300 y By4742, se tomaron los resultados anteriores para estandarizar las condiciones óptimas de crecimiento para obtener el mRNA de K1. Tras probar diferentes métodos de extracción, condiciones de fragmentación de la pared celular de la levadura y tiempos de incubación, se estandarizaron dos métodos de extracción: extracción de RNA total y extracción de ácidos nucleicos totales (A.N.). La extracción de RNA total se estandarizó tomando como base el método de TRizoL, añadiendo un procesamiento de criofractura previo de las muestras, en contraparte, el método de extracción de A. N. totales se realizó siguiendo el protocolo establecido por Rodríguez Cousiño y col. (2011).

Las extracciones realizadas se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de cultivo, en comparación, la extracción de A. N. totales tuvo un mejor rendimiento

que la extracción de TRIzol (**Tabla 1**). Los rendimientos de ambos métodos fueron estimados mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{[A \text{ ng}/\mu\text{l}]}{\text{mg}}$$

Donde:

R: rendimiento de la extracción

A: cuantificación de los ácidos nucleicos (RNA y/o DNA) en ng/μl

mg: peso húmedo de levadura utilizada para la extracción.

Interesantemente, el rendimiento de los métodos probados varía entre las distintas cepas utilizadas, sin embargo, la calidad del material genético (integridad) se vio comprometida en ambos métodos (**Figura 4A**), en cuanto al medio utilizado, se demostró que el medio inductor (MI) proporciona un mejor rendimiento para ambas extracciones, mientras que el medio YPD mantiene una cantidad constante (aunque baja) de RNA total.

Tabla 1. Rendimiento de las reacciones de extracción de ácidos nucleicos en ng/μl.

Cepa	TRIzol		A. N. totales	
	YPD (20mg)	MI (20 mg)	YPD (20mg)	MI (20 mg)

By4742	29.7	653.2	3.4	401.7
5x47	16.3	710.5	20.8	636.6
S.C. 42300	44.3	428.7	51.8	426.3

Las extracciones de RNA y A. N. totales con mejor rendimiento e integridad fueron utilizadas para realizar la amplificación del gen codificante de la pptoX usando la técnica de RT-PCR. Los productos de PCR obtenidos de las extracciones con MI resultaron en una banda de aproximadamente 900 pb obtenidas con los primers K1YES (**Figura 4B**), las cuales corresponden con el tamaño esperado, según el alineamiento con el gen M1. Así mismo, la secuenciación del producto de PCR concuerda con la secuencia previamente reportada para la pptoX de K1 (**Apéndice 2**). Este resultado sugiere fuertemente que la expresión del mensajero para la toxina K1, se incrementa bajo el cultivo inductor donde la levadura tiene un mayor efecto *killer*. En contraparte, las reacciones de PCR obtenidas de las extracciones con medio YPD no mostraron amplificación alguna.

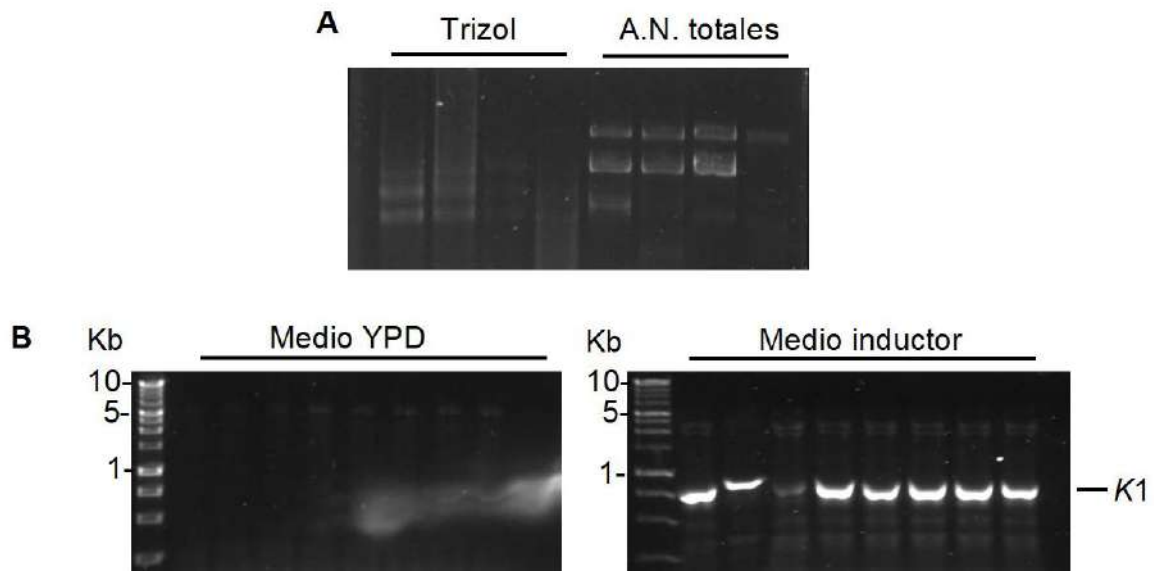


Figura 4. Obtención del gen M1.

A. Integridad de los RNA totales obtenidos mediante el método de TRIZOL y ácidos nucleicos totales (Imagen representativa).

B. RT-PCR de *K1*. En el panel izquierdo se muestra una nula obtención del producto esperado en medio estándar YPD, mientras que en el panel derecho se muestra la amplificación del gen esperado de 963 pb (Imagen representativa).

8. Discusión

8.1 El tiempo de generación del halo de inhibición.

El tiempo de formación en el halo de inhibición toma un comportamiento creciente a partir de las 8 horas, encontrando un punto máximo a las 24 horas; posteriormente el tamaño del halo permanece sin cambios significativos (**Figura 2B**). Este comportamiento podría explicarse basándose en el área y la tasa de producción de la toxina, permitiendo que, a una producción constante, se mantenga un área de inhibición delimitada, evitando así que la cepa sensible recolonice. Los datos

obtenidos de producción de toxina demostraron que la cantidad de toxina secretada al medio se mantiene constante, salvo por un pico de producción a las 16 horas donde la cantidad de toxina se duplica; posteriormente, la cantidad de toxina secretada al medio se mantiene en niveles constantes hasta las 96 horas; así mismo, se demostró que la cantidad de 42300 dispuesta en el agar no tiene un efecto significativo en el área de inhibición ($p: 0.6227$, **Figura 2D**), por lo que sin importar la cantidad de cepa productora que se agregue en el agar, el área de inhibición se mantiene oscilando alrededor de los 0.2 cm^2 . Estos datos sugieren fuertemente que la formación del halo de inhibición se debe a: 1) el pico de producción de las 16 horas, el cual delimita el área de inhibición, y 2) una producción constante que permite el mantenimiento definido del área de inhibición (**Figura 5**).

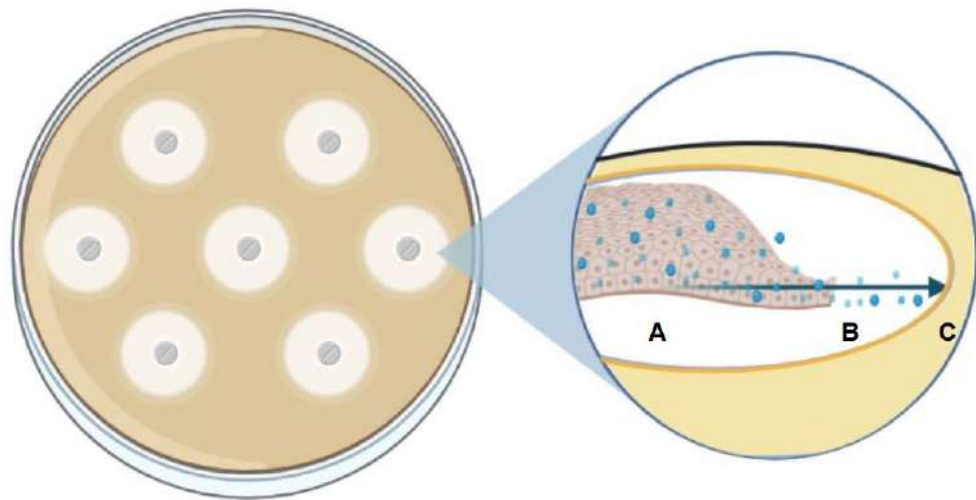


Figura 5. Formación del halo de inhibición.

A. La cepa *killer* secreta la toxina *K1* madura al medio extracelular en una tasa constante, manteniendo la producción de toxina por +96 horas.

B. La toxina secretada en el agar es movilizada por capilaridad hacia la cepa sensible, formando un halo con un área máxima delimitada por el ratio de producción de la toxina.

C. La producción de toxina constante impide que la cepa sensible recolonice el área de inhibición.

Fuente: Elaboración propia. Generado en BioRender. [Molina-Vera C, 2021. (Tesis en proceso)]

8.2 El efecto de la cantidad de levadura sensible y productora.

Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición en placa demostraron que la magnitud del halo de inhibición producto de la interacción de la toxina *K1* con la cepa sensible se debe principalmente por la densidad celular en el medio. Este efecto es similar a lo reportado en la efectividad denso-dependiente de algunos antibióticos sobre microorganismos en altas densidades, los cuales tienen un efecto reducido ante cultivos densos (Udekwa et al., 2009). Este resultado sugiere que la actividad de la toxina podría ser denso-dependiente, ya que la el área de inhibición crece o disminuye en función de la cantidad de cepa sensible; ese sentido, los siguientes experimentos deben ir enfocados en la determinación de la EC_{50} en función con la carga del inóculo sensible y determinar si existen señalizadores químicos (*quorum sensing*) que influyen en la comunicación sensible-productora. De la misma manera, es necesario determinar la concentración de toxina purificada y así evaluar su actividad ante distintas cantidades de cepa sensible, así como a distintas concentraciones de toxina. Interesantemente, los cultivos con una mayor densidad muestran efectos similares a cultivos menos densos (3.0 mg y 1.0 mg respectivamente), por lo que es posible que la densidad de cepa sensible influya mediante señalizadores químicos, la producción de toxina, lo cual permite obtener halo de tamaño similar pese a la diferencia de densidades.

8.3 La influencia del pH en la actividad de K1

El pH del medio se ha determinado como una variable crítica en la actividad de la toxina K1y K2 (Novotna et al., 2004). Se ha propuesto que los puentes disulfuro que mantienen unidas a las subunidades α y β a pH básicos son estables, mientras que, a pH ácidos este entrecruzamiento se torna inestable (Rajpal & Arvan, 2013). Basado en las observaciones de los ensayos de inhibición en placa, se corroboró que a pH 4.5 y 4.7 el efecto de la toxina tiene su efecto máximo, en comparación con los pH 4 y 5, mientras que a pH 6 el efecto es nulo. Estos datos sugieren fuertemente que las subunidades α y β interactúan por separado en algún punto del mecanismo de acción, posiblemente después del reconocimiento de la subunidad β con el receptor 1-6- β -D-Glucano de la pared celular. Basado en estos resultados, es posible hipotetizar un desprendimiento de la subunidad α (efecto del pH), permitiendo a esta subunidad interactuar con el blanco molecular Tok1p, en contraparte, a pH altos (pH 6), las subunidades α y β se mantienen unidas debido a que los puentes bisulfuro se mantienen estables, lo cual impide que la subunidad α se libere e interactúe con su blanco molecular. Esta hipótesis se sustenta con los resultados de Gier et al., (2017), donde se demostró que por sí sola, la subunidad α es capaz de tener un efecto *killer* sobre las cepas sensibles.

8.4 El efecto del medio en la obtención de mRNAs y proteína.

El rendimiento de producción de mRNA fue evaluado bajo dos condiciones de crecimiento distintas: YPD estándar (YE 1 %, PP 2 %, Glu 2 %) y MI (YE 7.5 g/L, PP 5 g/L, FeCl₃ 3 mM, MgSO₄ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 30 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 2 mM, glicerol 52 g/L). Los rendimientos calculados (**Tabla 1**), pese a contener la misma cantidad de biomasa, fueron superiores en aquellas cepas cultivadas en MI; tanto para la cepa control (By4742), la cepa sensible (5x47) y la productora (42300). Concretamente, la concentración de ácidos nucleicos totales obtenidos de MI superaron más de 10 veces los cultivados en YPD. La cantidad e integridad de A.N.

totales cobraron relevancia en los resultados de RT-PCR; aquellos cultivos crecidos en MI resultaron ser los únicos en los que fue posible amplificar el gen codificante de *K1*.

Es posible que la presencia del gen de *K1* se encuentre favorecida por los nutrientes y aditivos del medio, más concretamente, la cantidad de cofactores dispuestos en el MI (FeCl_3 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl y CaCl_2). Estos metales han sido ampliamente estudiados debido a sus implicaciones en la biología molecular. Se ha demostrado que los metales divalentes favorecen la producción de mRNA al interactuar con las RNAPol, mejoran la actividad de las DNAPol, estimulan la reparación del DNA y mantienen la homeostasis de la célula (Gabrielsen et al., 1984; Rodríguez-Del Valle & Rodríguez-Medina, 1993; Sergio M. Cocucci et al., 1986; Sosunov et al., 2003; Zhang, 2014). En consecuencia, es posible que intervengan en el incremento de la síntesis de mRNA codificante para *K1* y a su vez, se estimule la síntesis proteica. Un claro ejemplo del impacto de los cofactores en la actividad de las polimerasas es el caso del Mn^{2+} , el cual no solo contribuye a la estabilidad de la polimerasa η de *S. cerevisiae* ($\text{Pol}\eta$), sino que se ha demostrado que la adición de hasta 5 mM de Mn^{2+} puede incrementar de 400 a 2000 veces más la incorporación de ribonucleósidos, aún en comparativa con altas concentraciones de Mg^{2+} (Balint & Unk, 2020). En el caso de la cepa productora, la adición de los metales en el medio de cultivo (Mg^{2+} , Fe^{3+} y Ca^{2+}), favorecen la síntesis de mRNA a partir del RNA viral. En su conjunto, estos metales mantienen la homeostasis metabólica, contribuyendo como cofactores para las enzimas encargadas de la reparación del DNA y contribuyen en la estabilidad, plegamiento y función de los ribosomas (Rozov et al., 2019).

Uno de los puntos más interesantes, está relacionado con la cantidad de proteína cuantificada en el medio a los distintos pH utilizados. Se demostró que la cantidad de proteína secretada al medio en los cultivos de la cepa 42300 a pH 4.7 y 4.5 se mantenían en niveles constantes ($\sim 0.14 - 0.17$; 595 nm) durante todo el experimento, si bien las cantidades de proteína cuantificadas oscilaban, se mantenían en el mismo rango, sin embargo, los cultivos de 42300 a pH 6 mostraron

un claro incremento en la cantidad de proteína secretada al medio, con un pico importante a las 16 horas, mismo que comparte con el cultivo a pH 5 (**Figura 3D**). Este resultado contrasta los mecanismos de acción de la toxina *K1*, si bien el pH de mejor actividad es 4.7, la cantidad de mRNA y proteínas se ven favorecidas a pH 6, lo cual refleja un claro escenario de acción independiente. Es decir, el mecanismo de producción de la toxina es un paso independiente de la activación de la misma.

8.5 Una actualización al mecanismo de acción de *K1*.

Basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible aportar un punto más en el mecanismo de acción de la toxina *K1* de *S. cerevisiae*, si bien los datos aquí mostrados requieren una serie de experimentos adyacentes que ayuden al sustento de la siguiente teoría, es factible hipotetizar un panorama más completo del mecanismo de acción (**Figura 6**). Esta teoría comprende un paso previo a lo propuesto por Ahmed (1999), Baev (2003) y Sesti (2001); en concreto, se basa en la importancia del pH antes de la acción de *K1*. El paso 0 involucra una adaptación de la levadura a su medio de cultivo, en este momento la levadura entra en un estado de replicación que comprende desde las 0 hasta las 16 horas. En estas primeras horas, la densidad poblacional de la cepa *killer* favorece el incremento de la tasa de síntesis de mRNA (tanto virales como de la levadura), y secreción protéica (**Figura 3C,D**), es en este paso cuando la síntesis de la toxina *K1* alcanza su estadio final (maduración de ppto_x a dímero α - β). Cabe mencionar que en este punto el pH del medio extracelular juega un punto crucial ya que si el medio de cultivo se mantiene en pH 6, el dímero α - β se mantiene unido y no es posible que la subunidad α interactúe con el sitio blanco (aunque sí puede estar unida al receptor 1-6- β -D-glucano), ya que los puentes disulfuro se conservan estables a pH cercanos a 7 (Rajpal & Arvan, 2013). Es posible que esta forma “inactiva” de la toxina madura se mantenga en la cercanía de la célula productora, mientras que el microhábitat de la cepa sensible se encuentre ligeramente más acidificado (pH \leq 5), provocando la separación de las subunidades y “activando” la toxina *K1*.

Otro panorama es que ambas cepas se encarguen de la acidificación del medio, la toxina madura “inactiva” α - β se une con el receptor 1-6- β -D-glucano por medio de la subunidad β (Gier et al., 2019), el dímero se mantiene en estado “inactivo” y unido al receptor de la célula sensible, y solamente cuando el pH sea igual o menor a 5, estas toxinas son activadas (separando las subunidades) y posteriormente se trasloca la subunidad α hasta el sitio blanco (**Figura 6**). La interacción de la subunidad α se ha demostrado es suficiente para provocar la muerte en células sensibles (Gier et al., 2017), por lo que esta teoría cobra sentido.

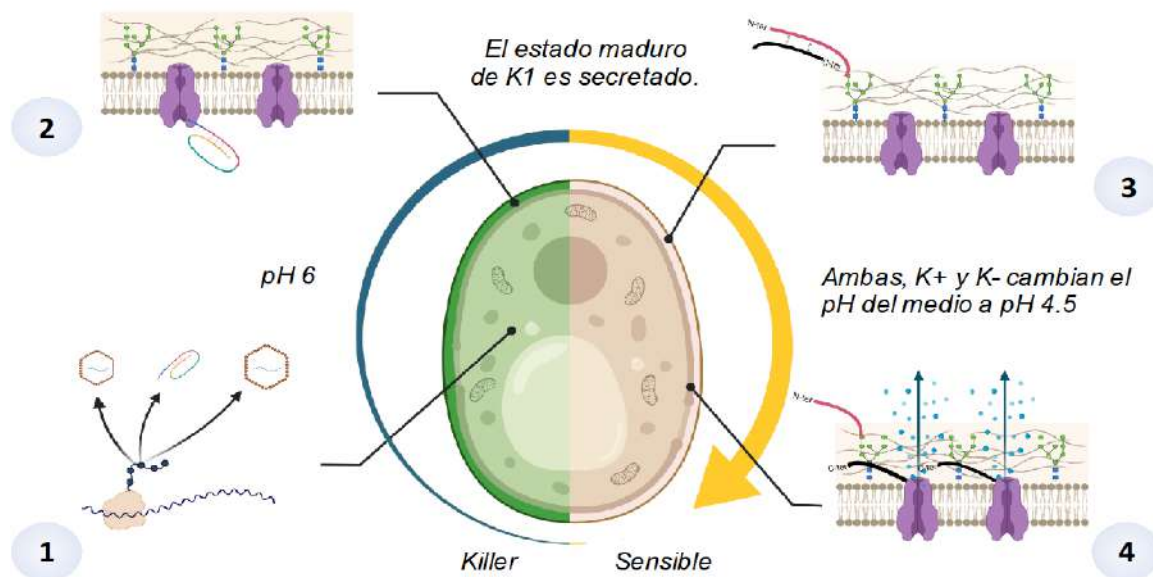


Figura 6. Actualización al mecanismo de acción de K1.

1.- Se muestra la importancia de la composición del medio, rico en cofactores y señalizadores de la cepa sensible para favorecer la replicación viral y síntesis del mRNA de K1, remarcando este proceso a pH cercano a 6.

2.- La pptoX en el interior de la cepa productora bloquea al canal Tok1p por la parte interna del canal, bloqueando su actividad y previniendo la interacción de K1 madura con el exterior del canal.

3.- La toxina madura es secretada al medio extracelular, donde interaccionará la subunidad β con el receptor 1-6- β -D-Glucano de la pared celular de la levadura.

4.- Tanto la cepa sensible como la productora, bajan el pH del medio entre 4.5 y 4.7, provocando la separación de las subunidades de la toxina madura, permitiendo a la subunidad α a desestabilizar el canal Tok1p, liberando masivamente potasio, matando a la célula sensible.

Fuente: Elaboración propia. Creado con BioRender.com

9. Conclusiones

Las condiciones determinantes del efecto *killer* sobre la cepa sensible 5X47 resultaron ser óptimas para la amplificación del mensajero de la toxina *K1*. En ese sentido, las condiciones propias de la cepa *killer* que influyen en la maximización del efecto hacen referencia al medio (pH y composición), siendo pH 4.5, 4.7 y medio inductor, las variables que mostraron mejores resultados. Estas condiciones de crecimiento demostraron tener un mayor efecto en el halo de inhibición, además de ser las condiciones donde se encuentra presente el mRNA de *K1*.

La diferencia entre el tamaño del halo de inhibición entre las 24 y 48 horas no muestra diferencias significativas. Debido a la distancia relativa entre la cepa productora y la sensible, así como el rendimiento de producción de la toxina. En contraparte, los cultivos de distintas densidades (1 mg y 3 mg de cepa sensible) muestran halos de inhibición de tamaños similares, por lo que la influencia de la cepa sensible juega un papel importante en la señalización de *K1*, efecto que aún requiere más estudios.

Por último, se propone una actualización al mecanismo de acción de la toxina *K1* basado en la importancia del medio de cultivo antes y después de la síntesis y maduración de la toxina. En concreto, se expone la importancia de pH cercanos a 6 para maximizar la síntesis proteica y $\text{pH} \leq 5$ para asegurar el efecto de la toxina *K1*.

10. Perspectivas

La importancia de estudiar proteínas fúngicas con potencial aplicación biomédica cada vez cobra más sentido. El panorama de las multirresistencias microbianas que se avecina es críticamente lúgubre, por lo que continuar con estas líneas de investigación es cada vez más importante.

Dentro de las posibilidades que este proyecto puede atender se encuentran las siguientes:

- Identificar los genes que participan en el mecanismo *killer*, tanto en la cepa productora como en la sensible.

- Identificar los factores de transcripción que favorecen la síntesis del mRNA de *K1* (elementos en cis y trans).
- Determinar las moléculas señalizadoras que intervienen en la interacción sensible:productora.
- Resolver la estructura cristalográfica de la toxina *K1* y su blanco molecular Tok1p.
- Esclarecer los dominios de unión de la toxina *K1* con sus blancos moleculares en procariontes.
- Incrementar la afinidad o dirigir la toxina agregando secuencias proteicas específicas.

11. Referencias

- Ahmed, A., Sesti, F., Nitza, I., Shih, T. M., Sturley, S. L., & Goldstein, S. A. N. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, 99(3), 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81659-1)
- Aitmanaitė, L., Konovalovas, A., Medvedevas, P., Servienė, E., & Serva, S. (2021). Specificity Determination in *Saccharomyces cerevisiae* Killer Virus Systems. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020236>
- Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019* (p. 148). (2019). [Full report]. CDC.
- Baev, D., Rivetta, A., Li, X. S., Vylkova, S., Bashi, E., Slayman, C. L., & Edgerton, M. (2003). Killing of *Candida albicans* by human salivary histatin 5 is modulated, but not determined, by the potassium channel TOK1. *Infection and Immunity*, 71(6), 3251–3260. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3251-3260.2003>
- Balint, E., & Unk, I. (2020). Selective Metal Ion Utilization Contributes to the Transformation of the Activity of Yeast Polymerase η from DNA Polymerization toward RNA Polymerization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218248>

- Bartunek, M., Jelinek, O., & Vondrejs, V. (2001). Susceptibility of Individual Cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the Killer Toxin K1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(2), 526–530.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4809>
- Becker, B., & Schmitt, M. (2017). Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing. *Toxins*, 9(10), 333.
<https://doi.org/10.3390/toxins9100333>
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P., & Ljungdahl, P. O. (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Molecular Microbiology*, 47(3), 767–780.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03335.x>
- Bevan, E. A., & Makower, M. (1963). *The physiological basis of the killer character in yeast*. 202–203.
- Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., & Bussey, H. (1990). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *The Journal of Cell Biology*, 110(5), 1833–1843. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.5.1833>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Breinig, F., Schleinkofer, K., & Schmitt, M. J. (2004). Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 10), 3209–3218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27175-0>
- Breinig, F., Tipper, D. J., & Schmitt, M. J. (2002). Kre1p, the Plasma Membrane Receptor for the Yeast K1 Viral Toxin. *Cell*, 108(3), 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00634-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00634-7)
- Bussey, H., & Sherman, D. (1973). Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 298(4), 868–875. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90391-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90391-X)

- Bussey, H., Sherman, D., & Somers, J. M. (1973). Action of yeast killer factor: A resistant mutant with sensitive spheroplasts. *Journal of Bacteriology*, *113*(3), 1193–1197. <https://doi.org/10.1128/JB.113.3.1193-1197.1973>
- de la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Lazo, P. S., & Ramos, S. (1981). Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*(20), 10420–10425.
- el-Sherbeini, M., & Bostian, K. A. (1987). Viruses in fungi: Infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(12), 4293–4297. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4293>
- 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>
- Friedman, N. D., Kaye, K. S., Stout, J. E., McGarry, S. A., Trivette, S. L., Briggs, J. P., Lamm, W., Clark, C., MacFarquhar, J., Walton, A. L., Reller, L. B., & Sexton, D. J. (2002). Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Annals of Internal Medicine*, *137*(10), 791–797. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00007>
- Gabrielsen, O. S., Andersen, K. E., & Oyen, T. B. (1984). Yeast RNA polymerase III. Chromatographic, catalytic and DNA-binding properties are highly dependent on the type of anion. *European Journal of Biochemistry*, *141*(2), 345–350. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08198.x>
- Gandra, S., Tseng, K. K., Arora, A., Bhowmik, B., Robinson, M. L., Panigrahi, B., Laxminarayan, R., & Klein, E. Y. (2019). The Mortality Burden of Multidrug-resistant Pathogens in India: A Retrospective, Observational Study. *Clinical Infectious Diseases*, *69*(4), 563–570. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy955>
- 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), 13127. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49621-z>
- Gier, S., Schmitt, M. J., & 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. PubMed. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>
- Hamann, A., Brust, D., & Osiewacz, H. D. (2008). Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends in Microbiology*, 16(6), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.003>
- Ivanovska, I., & Hardwick, J. M. (2005). Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *Journal of Cell Biology*, 170(3), 391–399. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503069>
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., & Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542), 690–695. <https://doi.org/10.1038/376690a0>
- Khawaja, T., Kirveskari, J., Johansson, S., Väisänen, J., Djupsjöbacka, A., Nevalainen, A., & Kantele, A. (2017). Patients hospitalized abroad as importers of multiresistant bacteria—A cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(9), 673.e1-673.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.02.003>
- Knight, G. M., McQuaid, C. F., Dodd, P. J., & Houben, R. M. G. J. (2019). Global burden of latent multidrug-resistant tuberculosis: Trends and estimates based on mathematical modelling. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(8), 903–912. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30307-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30307-X)
- Lima, R., Del Fiol, F. S., & Balcão, V. M. (2019). Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 692. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00692>
- Loukin, S. H., & Saimi, Y. (1999). K⁺-Dependent Composite Gating of the Yeast K⁺ Channel, Tok1. *Biophysical Journal*, 77(6), 3060–3070. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77137-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77137-7)
- Lukša, J., Ravoitytė, B., Konovalovas, A., Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V.,

- Serva, S., & Serviené, E. (2017). Different Metabolic Pathways Are Involved in Response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M Viruses. *Toxins*, 9(8).
<https://doi.org/10.3390/toxins9080233>
- MacLean, R. C., & San Millan, A. (2019). The evolution of antibiotic resistance. *Science*, 365(6458), 1082–1083. <https://doi.org/10.1126/science.aax3879>
- Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X. L., Culbertson, M., Bussey, H., & Kung, C. (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6228–6232.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6228>
- Mazzoni, C., & Falcone, C. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1320–1327.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.015>
- Miller-Petrie, M., Pant, S., & Laxminarayan, R. (2017). Drug-Resistant Infections. In K. K. Holmes, S. Bertozzi, & B. R. Bloom (Eds.), *Major Infectious Diseases. 3rd edition.* (3rd. ed.). International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- Morin, C. A., & Hadler, J. L. (2001). Population-Based Incidence and Characteristics of Community-Onset *Staphylococcus aureus* Infections with Bacteremia in 4 Metropolitan Connecticut Areas, 1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1029–1034. <https://doi.org/10.1086/323459>
- Nicolas, I., Bordeau, V., Bondon, A., Baudy-Floc'h, M., & Felden, B. (2019). Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLOS Biology*, 17(7), e3000337.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000337>
- Novotna, D., Flegelova, H., & Janderova, B. (2004). Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 803–813. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.007>
- Page, N., Gerard-Vincent, M., Menard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J. P., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A.-M., & Bussey, H. (2003). A

Saccharomyces cerevisiae Genome-Wide Mutant Screen for Altered Sensitivity to K1 Killer Toxin. *163*(3), 875–894.

- Palková, Z., & Vondrejs, V. (1996). Killer Plaque Technique for Selecting Hybrids and Cybrids Obtained by Induced Protoplast Fusion. In I. H. Evans, *Yeast Protocols* (Vol. 53, pp. 339–342). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:339>
- Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 54.
- Pieczynska, M. D., Korona, R., & De Visser, J. A. G. M. (2017). Experimental tests of host–virus coevolution in natural killer yeast strains. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(4), 773–781. <https://doi.org/10.1111/jeb.13044>
- Rajpal, G., & Arvan, P. (2013). Disulfide Bond Formation. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 1721–1729). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00236-0>
- Ramírez-Villarreal, J. (2018). *Estudio de la relación estructura-función de la toxina Killer de Saccharomyces cerevisiae en TOK1 y sus posibles homólogos en microorganismos de importancia biomédica*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., & Schmitt, M. J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, *168*(3), 353–358. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408071>
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., & Esteban, R. (2017). Variation and Distribution of L-A Helper Totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* Yeasts Producing Different Killer Toxins. *Toxins*, *9*(10), 313. PubMed. <https://doi.org/10.3390/toxins9100313>
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011a). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(5), 1822–1832. PubMed. <https://doi.org/10.1128/AEM.02501-10>
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011b). A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Applied and Environmental Microbiology*,




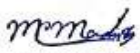

- 77(5), 1822–1832. <https://doi.org/10.1128/AEM.02501-10>
- Rodríguez-Del Valle, N., & Rodríguez-Medina, J. R. (1993). Calcium stimulates molecular and cellular events during the yeast-to-mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31(1), 43–53. <https://doi.org/10.1080/02681219380000051>
- Roemer, T., & Bussey, H. (1995). Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Molecular & General Genetics : MGG*, 249(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/BF00290368>
- Rozov, A., Khusainov, I., El Omari, K., Duman, R., Mykhaylyk, V., Yusupov, M., Westhof, E., Wagner, A., & Yusupova, G. (2019). Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction. *Nature Communications*, 10(1), 2519. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10409-4>
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1), 3592–3597. PubMed. <https://doi.org/10.19082/3592>
- 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., & Reiter, J. (2008). Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1413–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.017>
- Sergio M. Cocucci, Ranieri, A., & Graziano Zocchi. (1986). Potassium-Dependent Increase in RNA and Protein Synthesis in the Early Phase of Incubation of the Thermodynamically Dormant *Phacelia tanacetifolia* Seeds. *Plant Physiology*, 80(4), 891–894. JSTOR.
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., & Goldstein, S. A. N. (2001). *Immunity to K1 Killer Toxin: Internal TOK1 Blockade*. 105(5), 637–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00376-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00376-2)
- Sheppard, S., & Dikicioglu, D. (2019). Dynamic modelling of the killing mechanism of action by virus-infected yeasts. *Journal of The Royal Society Interface*, 16(152), 20190064. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0064>
- Skipper, N., & Bussey, H. (1977). Mode of action of yeast toxins: Energy requirement for

- Saccharomyces cerevisiae killer toxin. *Journal of Bacteriology*, 129(2), 668–677.
- Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., & Goldfarb, A. (2003). Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 22(9), 2234–2244. PubMed.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg193>
- Udekwu, K. I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., & Levin, B. R. (2009). Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 745–757. PubMed.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkn554>
- van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 377–390.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- Vondrejs, V., & Palková, Z. (1996). Rhodamine B Assay for Estimating Activity of Killer Toxins Permeabilizing Cytoplasmic Membranes. In I. H. Evans, *Yeast Protocols* (Vol. 53, pp. 319–324). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:319>
- WHO. (2014). *Draft global action plan on antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- Zhang, C. (2014). Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein & Cell*, 5(10), 750–760. PubMed.
<https://doi.org/10.1007/s13238-014-0083-7>
- Zhu, H., & Bussey, H. (1991). Mutational Analysis of the Functional Domains of Yeast K1 Killer Toxin. *MOL. CELL. BIOL.*, 7.

12. Apéndices

Apéndice 1.

Carta de aprobación del comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro.

	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES					
Campus Juriquilla, Qro, noviembre 13, 2019.						
DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ PROFESOR INVESTIGADOR FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES						
Tesista: Carlos Alberto Molina Vera						
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:						
<table border="1"><thead><tr><th>Título</th><th>Resolución</th></tr></thead><tbody><tr><td>"Estabilidad y efecto de la toxina K1 recombinante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>" (88FCN2019).</td><td>APROBADO</td></tr></tbody></table>	Título	Resolución	"Estabilidad y efecto de la toxina K1 recombinante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " (88FCN2019).	APROBADO		
Título	Resolución					
"Estabilidad y efecto de la toxina K1 recombinante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " (88FCN2019).	APROBADO					
Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.						
Atentamente,						
						
Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán Comité de Bioética Facultad de Ciencias Naturales						
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO Domicilio: Av. de las Ciencias s/n; Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230, Querétaro, Qro. Tels: [442] 192-12-00, Directo, 5301, Investigación y posgrado, 5371, Coordinaciones: Biología, Horticultura Ambiental, Medicina Veterinaria y Zootecnia y Nutrición; 5310, 5311, Coordinaciones: Geografía Ambiental y Microbiología. 65214						
		SOMOSUAQ EDUCAR CRECER CONSOLIDAR				

Apéndice 2.

Secuencia obtenida del producto de PCR de K1.

ATGACGAAGC CAACCCAAGT ATTAGTTAGA TCCGTCAGTA TATTATTTTT CATCACATTA
 CTACACCTAG TCGTAGCGCT GAACGATGTG GCCGGTCTCG CAGAAACAGC ACCAGTGTCA
 TTACTACCTC GTGAAGCGCC GTGGTATGAC AAGATCTGGG AAGTAAAAGA TTGGCTATTA
 CAGCGTGCCA CAGATGGCAA TTGGGGCAAG TCGATCACCT GGGGTTTCATT CGTAGCGAGC
 GATGCAGGTG TAGTAATCTT TGGTATCAAT GTGTGTAAGA ACTGCGTGGG TGAGCGTAAG
 GATGATAGCA GTACGGACTG CGGCAAGCAA ACACTTGCTT TACTAGTCAG CATTITTTGTA
 GCAGTTACAT CCGGCCATCA TCTTATATGG GGTGGTAATA GGCCGGTGTC GCAGTCAGAT
 CCTAATGGCG CTACCGTTGC TCGTCGTGAC ATTTCTACTG TCGCAGACGG GGATATTCCA
 CTGGACTTTA GTGCGTTGAA CGACATATTA AATGAACATG GTATTAGTAT ACTCCCAGCT
 AACGCATCAC AATATGTCAA AAGATCAGAC ACAGCCGAAC ACACGACAAG TTTTGTAGTG
 ACCAACAACT ACACTTCTTT GCATACCGAC CTGATTCATC ATGGTAATGG AACATATAAC
 ACGTTTACCA CACCTCACAT TCCAGCAGTG GCCAAGCGTT ATGTTTATCC TATGTGCGAG
 CATGGTATCA AGGCCTCATA CTGTATGGCC CTTAATGATG CCATGGTGTC GGCTAATGGT
 AACCTGTATG GACTAGCAGA AAAGCTGTTT AGTGAGGATG AGGGACAATG GGAGACGAAT
 TACTATAAAT TGTATTGGAG TACTGGCCAG TGGATAATGT CGATGAAGTT TATTGAGGAA
 AGTATTGATA ACGCCAATAA TGACTT

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces paradoxus M1 killer toxin mRNA, complete cds	Saccharomyces paradoxus	1711	1711	100%	0.0	100.00%	951	KJ796681.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae M1 killer toxin mRNA, complete cds	Saccharomyces cerevisiae	1705	1705	100%	0.0	99.89%	951	KJ796680.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae killer virus M1, complete genome	Saccharomyces cerevisiae killer virus M1	1705	1705	100%	0.0	99.89%	1801	U75817.1
<input checked="" type="checkbox"/> Yeast M1 double-stranded RNA preprotoxin coding region	Saccharomyces cerevisiae	1700	1700	100%	0.0	99.78%	1080	X02885.1
<input checked="" type="checkbox"/> Yeast (S. cerevisiae) M1 plasmid, M1-P1 preprotoxin gene	Saccharomyces cerevisiae	1700	1700	100%	0.0	99.78%	1010	K02042.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae killer virus M1 preprotoxin gene, partial cds	Saccharomyces cerevisiae killer virus M1	1194	1194	70%	0.0	99.69%	1297	AF014886.2
<input checked="" type="checkbox"/> Yeast (S. cerevisiae) S14 RNA (internal deletion of M1), complete	Saccharomyces cerevisiae	438	438	25%	4e-118	99.58%	793	M12718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Killer virus of Yeast (S. cerevisiae), MD-1 RNA 3' terminal region	Killer virus of S. cerevisiae	429	429	27%	2e-115	97.62%	262	J01337.1
<input checked="" type="checkbox"/> Killer virus of S. cerevisiae mutant M-p32 protein gene, complete cds	Killer virus of S. cerevisiae	368	368	23%	5e-97	97.26%	740	AF002373.2
<input checked="" type="checkbox"/> Yeast (S. cerevisiae) M-1 plasmid killer toxin gene fused to PHO5 promoter	synthetic construct	106	106	7%	5e-18	95.52%	120	M13242.1
<input checked="" type="checkbox"/> Yeast (S. cerevisiae killer strain) M plasmid ds-RNA, 3' end	Saccharomyces cerevisiae	102	102	5%	6e-17	100.00%	69	M12538.1
<input checked="" type="checkbox"/> Killer virus of S. cerevisiae 5' end	Killer virus of S. cerevisiae	100	100	5%	2e-16	100.00%	67	M12522.1