

Expresión heteróloga entre levaduras y células de mamífero  
para la caracterización de la resistencia al sistema *Killer* de  
*Saccharomyces cerevisiae*

2022

Jaqueline Alejandra Vázquez Mendieta



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Expresión heteróloga entre levaduras y células  
de mamífero para la caracterización de la  
resistencia al sistema *Killer* de *Saccharomyces*  
*cerevisiae*

Tesis

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

Presenta

Jaqueline Alejandra Vázquez Mendieta

Dirigido por

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Querétaro, Qro. Junio 2022



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Expresión heteróloga entre levaduras y células de mamífero para la  
caracterización de la resistencia al sistema *Killer* de *Saccharomyces*  
*cerevisiae*.

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

Presenta  
Jaqueline Alejandra Vázquez Mendieta

Dirigido por  
Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez  
Presidente

Dra. Verónica Morales Tlalpan  
Secretaria

Dr. Jorge Luis Chávez Servín  
Vocal

Dr. Joel Edmundo López Meza  
Suplente

Dr. Roberto Augusto Ferríz Martínez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Junio 2022  
México



## **Agradecimientos**

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para poder llevar a cabo el posgrado. No. becario: 992582.
- SEP-CONACyT por su apoyo a través del proyecto de Ciencia Básica. Número: A1-S-26966.
- CONACyT-Laboratorios Nacionales: LAVIS-UAQ.
- Al Fondo para el Desarrollo del Conocimiento (FONDEQ) 2019 por la beca para realizar el presente proyecto.

Al Laboratorio de Biofísica de Membranas UAQ, encabezado por el Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez (FCN-UAQ), quien dirigió la presente tesis. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por su enseñanza, comprensión, paciencia, ánimo y apoyo en este camino.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan (FCN-UAQ) por su gran enseñanza, paciencia y apoyo desinteresado en los experimentos de laboratorio.

Al Dr. Roberto Ferríz (FCN-UAQ) por su enseñanza, consejos y gran apoyo desde el día cero.

Al Dr. Jorge Chávez (FCN-UAQ) por su enseñanza, ánimo y ayuda para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Joel López (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) por sus valiosos comentarios y conocimientos, así como por el apoyo para realizar este proyecto.

A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM, gracias por abrirnos las puertas de su hermoso laboratorio.

A mis profesores de posgrado por su dedicación y conocimientos compartidos.

A mis compañeras y compañeros de posgrado y de laboratorio, gracias por sus ánimos, consejos y gran compañerismo.

A mi compañera de aventuras Aleyda, salir de casa no fue fácil, pero nos sostuvimos. Esto no hubiera sido lo mismo sin ti.

A Fer y Ross por estar siempre para mí y sacarme mil y una sonrisas.

A Jorge por haber estado en los mejores y peores momentos.

A mi hermosa familia, especialmente a mi mamá y a mi abuelita por siempre estar y apoyarme.

# Índice

	Página
<b>Índice de cuadros</b> .....	8
<b>Índice de figuras</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	11
<b>I. Introducción</b> .....	12
<b>II. Antecedentes</b> .....	14
2.1 Levaduras .....	14
2.1.1 Generalidades.....	14
2.1.2 Aplicaciones de las levaduras.....	15
2.1.2.1 Células de levadura como modelo experimental .....	15
2.1.2.2 Células de levadura como agente bioprotector .....	16
2.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
2.2 Sistema <i>Killer</i> en levaduras.....	17
2.2.1 Aplicación de levaduras con sistema <i>Killer</i> .....	20
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como levadura <i>Killer</i> .....	21
2.3.1 Generalidades.....	21
2.3.2 Elementos del sistema <i>Killer</i> .....	22
2.3.3 Toxina <i>K1</i> .....	23
2.3.3.1 Síntesis y componentes de la toxina .....	23
2.3.3.2 Mecanismo de acción <i>Killer</i> .....	27
2.3.4 Efecto de resistencia a la toxina <i>K1</i> .....	28
2.3.5 Canal de potasio TOK1 .....	28
2.4 Expresión heteróloga de componentes del sistema <i>Killer</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	29
<b>III. Justificación</b> .....	31
<b>IV. Hipótesis</b> .....	32
<b>V. Objetivos</b> .....	32
5.1 General .....	32
5.2 Específicos.....	32
<b>VI. Materiales y métodos</b> .....	33

6.1 Clonación del canal TOK1 y la preprotoxina K1 .....	34
6.1.1 Vectores.....	34
6.1.2 Secuencias del canal TOK1 y la preprotoxina <i>K1</i> .....	35
6.1.3 Clonación del material genético en pcDNA3-EGFP.....	36
6.1.4 Transformación celular .....	37
6.1.5 Extracción de DNA.....	38
6.2 Cultivo celular.....	39
6.3 Expresión heteróloga .....	41
6.4 Ensayos de halos inhibición en placa .....	42
6.5 Producción de toxina <i>K1</i> en levaduras.....	43
6.6 Viabilidad celular .....	44
<b>VII. Resultados y discusión .....</b>	<b>46</b>
7.1 Clonación de <i>K1</i> y TOK1 .....	46
7.2 Expresión heteróloga .....	50
7.3 Ensayos de toxicidad en células de mamífero. ....	53
<b>VIII. Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>IX. Bibliografía .....</b>	<b>57</b>
<b>X. Anexos .....</b>	<b>7172</b>
10.1 Secuencia de <i>K1</i> .....	7172
10.2 Secuencia de TOK1 .....	72

## Índice de cuadros

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Toxinas <i>Killer</i> , estructura, tamaño, receptores y mecanismos de acción.....	18
<b>Cuadro 2.</b> Bases genéticas en el fenotipo de levaduras <i>Killer</i> .....	19



## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Síntesis de la preprotoxina <i>K1</i> .....	24
<b>Figura 2.</b> Modificación postranscripcional de la preprotoxina <i>K1</i> en el lumen del retículo endoplásmico.....	25
<b>Figura 3.</b> Modificación postranscripcional de la protoxina <i>K1</i> en el aparato de Golgi.....	26
<b>Figura 4.</b> Toxina madura .....	27
<b>Figura 5.</b> Diagrama general del proceso de clonación y transfección relacionado a las secuencias TOK1 y <i>K1</i> .....	33
<b>Figura 6.</b> Plásmido pcDNA3-EGFP.....	34
<b>Figura 7.</b> Ensayos de inhibición en placa.....	46
<b>Figura 8.</b> Área de inhibición producida por la levadura <i>Killer K1</i> .....	47
<b>Figura 9.</b> Cuantificación proteica de la toxina <i>K1</i> en la levadura <i>Killer 42300</i> .....	48
<b>Figura 10.</b> Efecto del pH en el crecimiento de la levadura <i>Killer K1 42300</i> .....	49
<b>Figura 11</b> Células de mamífero transfectadas.....	50
<b>Figura 12.</b> Intensidad de fluorescencia de las transfecciones con pcDNA3-EGFP y sus diferentes construcciones moleculares en células de mamífero.....	51
<b>Figura 13.</b> Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular HEK293.....	52
<b>Figura 14.</b> Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular MCF-7.....	52
<b>Figura 15.</b> Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular MCF-12F.....	53
<b>Figura 16.</b> Dosis-respuesta del MI en células MCF-7.....	54
<b>Figura 17.</b> Efecto de diferentes soluciones sobre la viabilidad de células MCF-7....	55

## Resumen

Las levaduras son organismos microscópicos con diversas aplicaciones en la biotecnología y en la industria. A mediados del siglo XX, se observó que algunas levaduras atacan y matan microorganismos, a estas se les conoce como “levaduras *Killer*”. Las moléculas responsables de este evento celular son toxinas proteicas secretadas al medio extracelular, posteriormente reconocidas por receptores en la superficie de las células sensibles. Las levaduras *Killer* evaden a su propia toxina porque han generado complejos mecanismos de resistencia o autoinmunidad; aunque poseen en la membrana plasmática receptores para su propia toxina, en principio, son tan susceptibles a la toxina como las células sensibles. Algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son *Killer*, y es en este modelo donde mayormente ha sido estudiado el fenotipo *Killer*. Muchos de los mecanismos se desconocen, por lo que en este estudio se expresó heterológamente la toxina *K1* y el canal de potasio TOK1 en células de mamífero HEK 293, MCF-7 y MCF12-F. Para esto, se clonaron las secuencias de nucleótidos, que codifican para ambas proteínas, en el vector pcDNA3-EGFP y posteriormente las células fueron transfectadas con estas construcciones moleculares. Esta estrategia experimental permitió aislar los componentes que intervienen en el mecanismo de resistencia de *K1* y estudiarlos fuera de la influencia de cualquier otro componente fúngico.

## **Abstract**

Yeasts are microscopic organisms with various applications in biotechnology and industry. In the middle of the 20th century, it was observed that some yeasts attack and kill microorganisms and were called “Killer yeasts”. The molecules responsible for this cellular event are protein toxins secreted into the extracellular medium, which are recognized by receptors on the surface of sensitive cells. Killer yeasts can evade the action of their toxin due to complex mechanisms of resistance or autoimmunity; however, the presence of receptors for its toxin on the plasma membrane makes them, in principle, susceptible to the toxin. Some strains of *Saccharomyces cerevisiae* are Killer and have been the model more studied. Since many of the mechanisms are unknown, in this study, we expressed the K1 toxin and TOK1 potassium channel heterologous in mammalian cells HEK 293, MCF-7, and MCF12-F. The DNA sequence of both proteins was cloned in the pcDNA3-EGFP vector, and the mammalian cells were subsequently transfected. This experimental strategy allowed the isolation of critical components involved in the resistance mechanism of K1 and their study outside any other fungal component influence.

## I. Introducción

Las levaduras son microorganismos de gran importancia en la fabricación de alimentos y bebidas, así como en la biotecnología. Desde mediados del siglo XX, se observó que algunas levaduras atacan y matan microorganismos, a este tipo de levaduras se les ha denominado “*Killer*” (Magliani *et al.*, 1997; Makower & Bevan, 1963).

La característica principal del fenotipo *Killer* es que la levadura es capaz de sintetizar toxinas proteicas que son exocitadas, y posteriormente, actúan sobre receptores en la superficie de microorganismos sensibles, ejerciendo su efecto sin interacción directa (Gier *et al.*, 2017; Somers & Bevan, 1969). Así mismo, las levaduras *Killer* se han caracterizado por presentar un mecanismo que les permite ser inmunes o resistentes a la actividad de su propia toxina (Magliani, 1997). Así, el fenotipo *Killer* ofrece una ventaja sobre las levaduras sensibles, ya que, tienen mayor capacidad de obtener los nutrientes disponibles en el medio (Schmitt, 2002).

Una de las especies mayormente estudiadas es *Saccharomyces cerevisiae*, de las cuales algunas cepas presentan el fenotipo *Killer* (Makower, 1963). Al día de hoy, se han encontrado cuatro grupos principales de toxinas producidas por esta especie de levadura (*K1*, *K2*, *K28* y *Klus*), las cuales varían en su mecanismo de acción y de resistencia (Magliani *et al.*, 1997; Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2011).

Estudios previos han mostrado que la toxina *K1* o súper *Killer* posee un blanco molecular presente en la membrana plasmática de diferentes organismos: los canales de potasio TOK1. De manera general, se ha observado que la presencia de la toxina en el medio extracelular de la levadura sensible, desencadena un flujo descontrolado de potasio y ocasiona muerte celular a través de la activación de los canales TOK1 (Ahmed *et al.*, 1999).

Al igual que todas las levaduras *Killer*, las cepas de *S. cerevisiae* productoras de *K1* son resistentes a su propia toxina, pero son susceptibles a las toxinas secretadas por otras levaduras *Killer*. Actualmente, se conoce que una porción de *K1* inhibe los canales TOK1 de manera interna suprimiendo la activación por la toxina en el lado extracelular, generando así el mecanismo de resistencia propio de esta toxina; sin embargo, este mecanismo no ha sido conocido en su totalidad (Schmitt, 2002; Sesti, 2001).

Por su parte, la expresión de toxinas y canales iónicos en diferentes modelos biológicos, han permitido ayudar a comprender sus mecanismos y propiedades (Mathie *et al.*, 2021; Rivera-de-Torre *et al.*, 2022). Así, la expresión heteróloga de *K1* y TOK1 en líneas celulares de mamífero es una estrategia útil para el estudio del mecanismo de resistencia a *K1*. Previamente, TOK1 ha sido expresado con éxito en ovocitos de rana (*Xenopus laevis*), así como partes de este en células de ovario de hámster chino (CHO) y células embrionarias de riñón humano (HEK293) (Saldaña, 2002).

En el presente trabajo se emplearon técnicas novedosas para el estudio de sistemas de expresión heteróloga en las líneas celulares HEK293, MCF-12F y MCF-7, con enfoque hacia el sistema *Killer* de *S. cerevisiae*.

## II. Antecedentes

### 2.1 Levaduras

#### 2.1.1 Generalidades

A finales del siglo XVIII y principios del XIX, las levaduras no se consideraban un organismo vivo (Barnett, 1998). En la actualidad, las levaduras se han clasificado como parte del reino Fungi (Madigan, 2015), y se conoce que son un grupo heterogéneo de microorganismos eucariotas unicelulares (Arnold, 2018).

Las levaduras muestran heterogeneidad morfológica, aun siendo de una cepa de la misma especie, varían en tamaño, forma y color. Su tamaño oscila entre 3 y 8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Muchas especies de levadura son elipsoidales u ovoides, pero también se encuentran con formas esférica, alargada o piriforme (Feldman, 2012; García Cortés, 1995).

Respecto a la estructura de las levaduras, estas presentan una pared celular compuesta por glucanos y mananos; la pared no solo se considera una envoltura que brinda protección física y osmótica a una célula, sino que también es un componente celular dinámico que proporciona permeabilidad selectiva y reconocimiento y adhesión célula a célula (Stratford, 1994). Así mismo, al igual que otras células eucariotas, las levaduras se conforman por membrana plasmática, citoplasma, ribosomas, núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y peroxisomas (Feldma, 2012b).

Para crecer, las células de levadura requieren de compuestos orgánicos; algunas de las fuentes de carbono importantes en el metabolismo de la levadura son: azúcares simples, polioles, ácidos orgánicos y grasos, entre otros (Walker, 1998). Un factor igual de importante es el pH del medio en el que se encuentran las levaduras, considerándose un pH entre 5 y 6 un valor óptimo (Tortora *et al.*, 2019a).

Por otra parte, las levaduras no siempre necesitan oxígeno, ya que, la mayoría son anaerobias facultativas (pueden crecer en un ambiente con o sin oxígeno), lo cual les ha permitido colonizar diversos ecosistemas. Dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno, las levaduras tendrán procesos metabólicos diferentes: si hay presencia de oxígeno, metabolizarán los carbohidratos en dióxido de carbono y agua, a través de la respiración aerobia; mientras que, en ausencia de oxígeno, se llevará a cabo la fermentación de carbohidratos, obteniendo dióxido de carbono y etanol, productos de suma importancia en la elaboración de pan, vino, entre otros (Tortora 2019b, 2019a).

El proceso reproductivo de las levaduras puede ser de forma asexual o sexual. En la reproducción asexual, la levadura genera una copia de sí misma; la forma más común es por gemación, en la que se da una repartición desigual del material; sin embargo, la reproducción asexual también puede darse por fisión binaria. Respecto a la reproducción sexual, esta se da a través de la formación de esporas, como las ascosporas (García Cortés, 1995; Tortora, 2019b).

Las levaduras no son microorganismos móviles, por lo que dependen de vectores animales y de la actividad humana para su dispersión. A pesar de esto, son microorganismos ampliamente distribuidos en la biosfera, pudiendo aislarse de ambientes terrestres, acuáticos y aéreos (Tortora, 2019b; Walker, 1998). La mayoría de las levaduras son saprófitas, proliferando en materia orgánica muerta, mientras que otras son parasitarias y pueden causar enfermedades en animales y plantas (García Cortés, 1995).

## 2.1.2 Aplicaciones de las levaduras

### 2.1.2.1 Células de levadura como modelo experimental

Al comparar células procariotas con células eucariotas, no es ninguna sorpresa encontrar que estas últimas son un grupo más complejo. Si bien las bacterias han

sido un modelo que han permitido el estudio de las propiedades generales de las células, los organismos procariotas no son un organismo apropiado para obtener conclusiones respecto a las células eucariotas, ya que estos se diferencian en tamaño, estructura y funciones (Cooper, 2007).

Por su parte, las levaduras han mostrado ser un modelo adecuado para el estudio de distintas propiedades de las células eucariotas. Si bien las levaduras no tienen exactamente las mismas características de un organismo eucariota complejo, sí presentan diversas similitudes en su estructura, como un citoplasma con distintos organelos y un núcleo que guarda el material genético (organizado en 16 cromosomas). Otra ventaja de estos microorganismos es que su tiempo de replicación es corto (alrededor de dos horas) comparado con otras células eucariotas; además, pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio (Alberts, 2015; Cooper, 2007).

Además, los análisis de las secuencias genómicas de las levaduras, y de otros eucariotas, ha concluido que las secuencias de aminoácidos de las proteínas y, en general, las funciones de las mismas se han conservado entre este tipo de células. Por todo lo anterior, hoy en día se considera que las levaduras pueden ser un modelo experimental apropiado (Botstein, 2011).

#### 2.1.2.2 Células de levadura como agente bioprotector

Las levaduras se caracterizan por ser microorganismos competitivos, lo cual les ha permitido crecer y sobrevivir en diversas condiciones, razón por la cual se pueden encontrar en diferentes ecosistemas. Esta capacidad es atribuida a diferentes aspectos: producción y secreción de enzimas (p. ej., glucanasas, lipasas, etc.), cambios en el pH del medio (resultado de la producción de ácidos orgánicos), producción y tolerancia de altas concentraciones de etanol, así como la síntesis de toxinas asesinas o toxinas *Killer* (moléculas proteicas que muestran actividad antimicrobiana en diferentes tipos de hongos y bacterias). Gracias a lo anterior, las



levaduras son consideradas como agentes bioprotectores en diferentes sectores: agricultura, industria de bebidas fermentadas, medicina, entre otros (Freimoser, 2019; Golubev, 2006; Muccilli, 2015).

### 2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* incluye ascomicetos morfológicamente simples. Está conformados por alrededor de 40 especies, siendo la levadura *S. cerevisiae* la más conocida (Mohamudha, 2010; Walker, 2009).

El nombre de la especie *S. cerevisiae* proviene de los términos *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es un microorganismo ampliamente utilizado por el hombre, principalmente en la elaboración del pan y la producción de bebidas alcohólicas fermentadas. De manera más reciente ha sido empleada en el área de la biotecnología y ciencias afines (Feldman, 2012b; Suárez-Machín, 2016).

## 2.2 Sistema *Killer* en levaduras

A mediados del siglo XX, Bevan y Makower observaron levaduras de *S. cerevisiae* en cultivo y encontraron que estas se podían comportar de tres formas distintas: algunas de ellas podían matar a un segundo grupo de levaduras, pero había un tercer tipo sobre las cuales el primer grupo no tenía efecto; a estos tres grupos se les denominó levaduras *Killer* o asesinas, levaduras sensibles y levaduras con fenotipo neutro, respectivamente (Makower, 1963).

Investigando más al respecto, encontraron que no era necesario un contacto entre las células *Killer* y las células sensibles; para esto, observaron que las células sensibles morían cuando se incubaban en medios filtrados libres de levaduras *Killer* (derivados de un crecimiento de 48 horas de células *Killer*), siendo hasta el 39% de las células sensibles destruidas. Con esto, se planteó que había un compuesto que las levaduras *Killer* secretaban y con el cual ejercían su efecto (Bevan, 1963).

**Cuadro 1.** Toxinas *Killer*, estructura, tamaño, receptores y mecanismos de acción.

Levadura	Toxina <i>Killer</i>	Estructura de la toxina <i>Killer</i>	Tamaño de la toxina (kDa)	Receptor	Mecanismo de acción
<i>Kuyveromyces lactis</i>	-	Trímero $\alpha\beta\gamma$	156.5	Quitina	Arresto del ciclo celular en G1, actividad quitinasa
<i>Pichia anomala</i> NCYC434	K5	-	49	$\beta$ -1,3 D-glucano	Glucanasa
<i>Pichia farinose</i>	SMK1	Dímero $\alpha\beta$	14.2	-	Incrementa la permeabilidad de la membrana a iones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1	Dímero $\alpha\beta$	19.0	$\beta$ -1,6 D-glucano	Incrementa la permeabilidad de la membrana a iones
	K2	Dímero $\alpha\beta$	21.5		
	KHR	Monómero	20.0	-	Inhibición de la síntesis de DNA
	KHS	Monómero	75.0	-	
<i>Ustilago maydis</i>	K28	Dímero $\alpha\beta$	21.5	$\alpha$ -1,3 manoproteína	
	P1	Dímero $\alpha\beta$	19.0	-	Incrementa la permeabilidad de la membrana a iones
	P2	Monómero	11.1	-	
P6	Dímero $\alpha\beta$	17.7	-		
<i>Williopsis mrakii</i>	HM-1	Monómero	10.7	B-glucano de la pared celular	Inhibición de la síntesis de $\beta$ 1,3 glucano
	K-500	Monómero	1.8-5		Incrementa la permeabilidad de la membrana a iones

Tomado y modificado de (El-Banna, 2011).

Cinco años después, Bevan y Woods describieron que la sustancia causante de la muerte de cepas de levadura sensibles, inicialmente denominada “factor *Killer*”, consistía en una proteína con un espectro de acción altamente específico,

dependiente de ciertas condiciones de pH (pH ácidos) y temperatura (menor a 37°C) (Marquina *et al.*, 2002; Woods & Bevan, 1968).

El factor *Killer*, actualmente denominado toxina *Killer*, es capaz de matar microorganismos sensibles, así como levaduras *Killer* que secretan un tipo de toxina diferente. Además de producir toxinas, las levaduras *Killer* tienen la capacidad de evadir la actividad de su propia toxina, siendo inmunes o resistentes a ésta. Ambas propiedades conforman el “sistema *Killer*” (Magliani, 1997; Marquina, 2002).

**Cuadro 2.** Bases genéticas en el fenotipo de levaduras *Killer*.

Base genética		Nombre del gen de la toxina	Tamaño del gen de la toxina (kbp)	Nombre de la toxina
Virus de RNA de doble cadena (dsRNA) encapsulado. Heredado citoplasmáticamente	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M1	1.8	<i>K1</i>
		M2	1.5	<i>K2</i>
		M28	1.9	<i>K28</i>
		Mlus	2.1-2.3	<i>Klus</i>
	<i>Ustilago maydis</i>	M1/M2	1.4	<i>P1</i>
		M2	0.98	<i>P4</i>
		M2	1.2	<i>P6</i>
Plásmidos lineales de DNA de doble cadena	<i>Kuyveromyces lactis</i>	pGkL 1	8.8	-
		pGkL 2	13.4	-
	<i>Pichia acaciae</i>	pPac 1-1	13.6	-
		pPac 1-2	6.8	-
Genes cromosómicos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	0.9	<i>KHR</i>
		KHS	2.1	<i>KHS</i>
	<i>Williopsis mrakii</i>	HMK	-	<i>HM-1, K-500</i>

Tomado y modificado de (El-Banna, 2011).

Actualmente, se conocen una gran variedad de toxinas *Killer*. Estas toxinas son producidas por diferentes géneros de levadura *Killer*: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*,

*Saccharomyces*, *Tilletiopsis*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, entre otras (Magliani 1997; Marquina 2002; Mohamudha 2010). De manera general, las toxinas *Killer* se diferencian según: el origen genético, tamaño, estructura, mecanismo de acción y propiedad de resistencia (Cuadro 1) (El-Banna, 2011; Marquina, 2002).

Como se mencionó previamente, el origen genético de las toxinas *Killer* puede variar; estas variaciones se engloban de manera general: virus de dsRNA (RNA de doble cadena) que son heredados citoplasmáticamente, por ejemplo, las levaduras productoras de toxinas *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* de *S. cerevisiae*; plásmidos de DNA lineales, como el caso de *Kluyveromyces lactis* y *Pichia acaciae*; o en genes cromosómicos, presentes en *Williopsis mrakii* (Cuadro 2) (El-Banna *et al.*, 2011; Magliani *et al.*, 1997; Mannazzu *et al.*, 2019).

### 2.2.1 Aplicación de levaduras con sistema *Killer*

Tras años de investigación de las levaduras *Killer*, se han estudiado diferentes posibles aplicaciones de las mismas. Principalmente, han tenido especial atención en productos que requieren un proceso de fermentación. Un ejemplo de ello es el vino, el cual puede sufrir deterioro en cualquier etapa del proceso de vinificación como resultado de la presencia de levaduras contaminantes, por lo que su uso tiene la finalidad de evitar el crecimiento de estas levaduras, como lo son las del género *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Pichia* (Bortol, 1986; Magliani, 1997; Young, 1981).

De manera general, las levaduras *Killer* pueden ser una herramienta útil como organismos de control biológico, desde el cultivo de plantas hasta en la conservación de alimentos (Kinal, 1995; Palpacelli, 1991).

En el área de la medicina, existen levaduras patógenas, las cuales pueden generar infecciones, particularmente en organismos inmunocomprometidos. Entre las

infecciones por levaduras más frecuentes, se encuentran las ocasionadas por *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pichia anómala*, entre otras (Magliani, 1997). Por lo anterior, se ha buscado desarrollar nuevos antimicóticos para el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos y animales (Polonelli, 1986; Schmitt, 2002).

Así mismo, las toxinas *Killer* también muestran un amplio espectro de actividad contra un gran número de bacterias patógenas humanas. Esto, aunado a la reciente preocupación de diferentes instituciones de salud por la resistencia a antibióticos, hace que estas toxinas, potenciales péptidos antimicrobianos, sean atractivos objetos de estudio (Lobato Tapia, 2019; Schmitt & Breinig, 2002; Selitrennikoff, 2001).

Si bien el uso de las levaduras *Killer*, o sus toxinas, siguen limitándose a su estudio en el laboratorio, estas actualmente presentan un abanico de posibles aplicaciones que pueden llegar a ser aplicables a diferentes organismos animales y vegetales con el fin de contrarrestar la proliferación de microorganismos no deseados (Mannazzu, 2019).

## 2.3 *Saccharomyces cerevisiae* como levadura *Killer*

### 2.3.1 Generalidades

Al día de hoy, uno de los sistemas *Killer* de levadura más estudiados es el de *S. cerevisiae*. Esta especie presenta diferentes cepas con fenotipo *Killer*, las cuales se ha visto que pueden sintetizar y secretar un tipo de toxina, ya sea *K1*, *K2*, *K28* o *Klus* (Magliani, 1997; Rodríguez-Cousiño, 2011). Aunado a lo anterior, también se ha observado que *S. cerevisiae* es productora de toxinas *KHS* (*Killer of Heat Sensitive*) y *KHR* (*Killer of Heat Resistant*), que están codificadas en el cromosoma V y IX de la levadura, respectivamente; a diferencia de las primeras toxinas mencionadas, estas últimas muestran una actividad débil (Goto, 1990).

Para ejercer su efecto, todas las toxinas *Killer* se unen a blancos moleculares presentes en las levaduras sensibles. En el caso de *K1*, esta se une primero al receptor  $\beta$ -1,6-glucano de la pared celular (Hutchins, 1983; Schmitt, 2006). Su posterior blanco molecular no se conocen con exactitud, pero tras la interacción con este, *K1* logra tener un efecto sobre la membrana plasmática y genera una salida descontrolada de potasio (de la Peña, 1981).

Respecto al mecanismo de acción de *K2*, esta presenta una actividad similar a la de *K1*, generando una mayor permeabilidad de iones en la membrana plasmática (Guyard, 2002; Orentaite, 2016).

Por otra parte, se conoce que *K28* se une a la pared celular mediante los residuos de manosa unidos a  $\alpha$ -1,3 de manoproteínas, y cuando llega a la membrana citoplasmática bloquea la síntesis de DNA y retiene a las células en la fase S temprana del ciclo celular (Magliani, 1997; Schmitt, 1996).

En cuanto a *Klus*, descubierta más recientemente, se desconoce un posible mecanismo de acción; sin embargo, se ha observado que tiene un efecto *Killer* sobre las levaduras *S. cerevisiae* productoras de *K1*, *K2* y *K28*, *Hanseniaspora sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, entre otras (Rodríguez-Cousiño, 2011).

### 2.3.2 Elementos del sistema *Killer*

Los responsables del fenotipo *Killer* en las levaduras *S. cerevisiae* son virus de RNA de doble cadena (dsRNA). Para que las células puedan producir a *K1* es necesario que estén infectadas con el virus denominado M1 (1.8 kb); para *K2*, se requiere del virus M2 (1.5 kb); para *K28*, se necesita M28 (1.9 kb); y para *Klus*, es necesario el virus Mlus (2.1-2.3 kb). Cada uno de estos virus le dará una propiedad específica a

cada levadura *Killer*, ya que cada toxina tiene un mecanismo de acción y de resistencia específicos (Magliani, 1997; Rodríguez-Cousiño, 2011).

Cada uno de los genomas de los virus M antes mencionados, contiene un ORF único que codifica una preprotoxina (pptox) precursor de la toxina *Killer* madura (Esteban, 1986). En este caso, cada virus está compuesto por dos cadenas de RNA; sin embargo, la información genética para que la preprotoxina pueda expresarse se encuentra exclusivamente en la cadena positiva (Rodríguez-Cousiño, 2011; Schmitt, 1995).

Los virus M dependen de un segundo virus auxiliar de dsRNA, L-A, para su mantenimiento y replicación (Esteban, 1986; Magliani, 1997; Schmitt, 2006; Wickner, 1992). La importancia del virus L-A reside en que estos proporcionan las cápsides en las que el material genético del virus L-A y el virus M se empaquetan individualmente (Bostian, 1980; Schmitt, 2006).

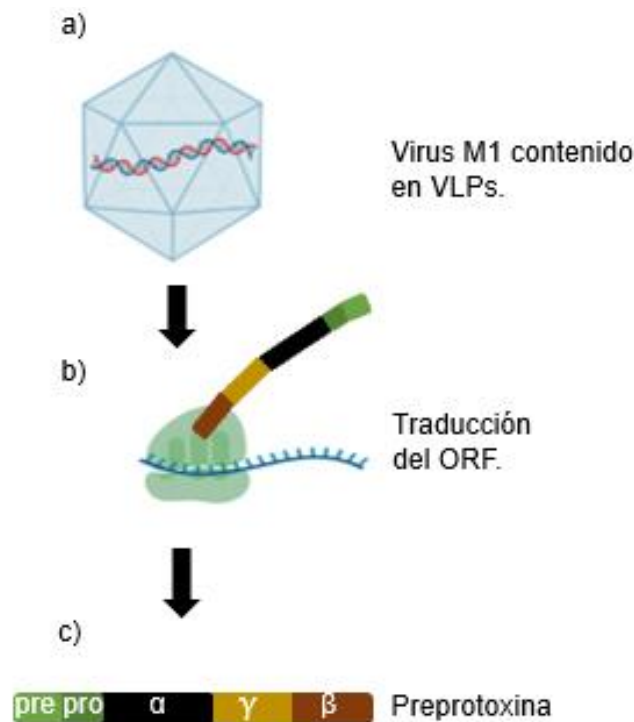
Los virus antes mencionados pertenecen a la familia de virus *Totiviridae*, de manera particular estos se conocen como virus de *S. cerevisiae* o ScV (Bostian *et al.*, 1983). Debido a que los virus M dependen de la coexistencia de los virus auxiliares L-A para su replicación, estos se conocen como virus satélites de L-A (Wickner, 1992).

### 2.3.3 Toxina K1

#### 2.3.3.1 Síntesis y componentes de la toxina

El ORF, encontrado en la cadena positiva del virus M1 (Fig. 1a), se traduce en una pptox que será procesada y secretada como toxina madura. El producto de traducción primario es un polipéptido de 316 aminoácidos y 35 kDa (Fig. 1b), que consiste en cuatro segmentos: dominio  $\delta$ , una secuencia líder en el extremo N terminal de 44 aminoácidos; dominio  $\alpha$ , constituido por 103 residuos (posiciones 45 a 147); dominio  $\gamma$ , compuesto por 104 residuos (posición 148 a 233); dominio  $\beta$ ,

conformado por 83 residuos (posiciones 234 a 316) (Bostian, 1984; Magliani, 1997; Zhu, 1992) (Fig. 1c).

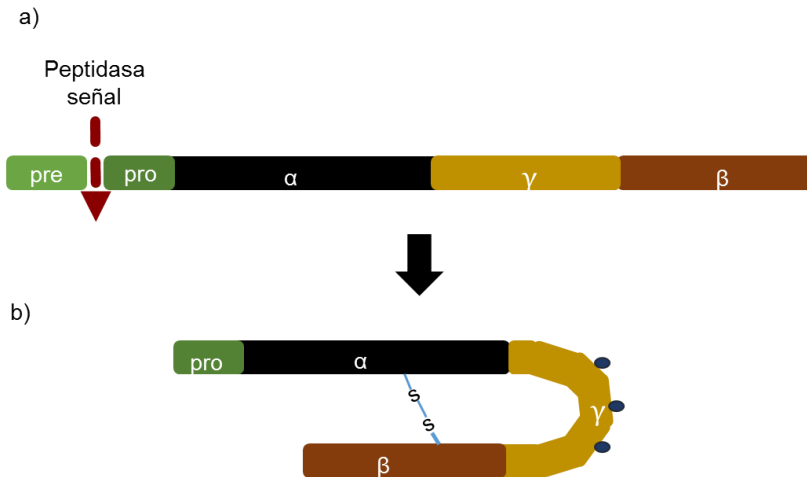


**Figura 1.** Síntesis de la preprotoxina K1. a) El virus M1, compuesto por dsRNA (cadena roja y morada), se encuentra encapsulado en VLPs (ilustrada como icosaedro azul). b) La cadena positiva (+) es extruida al citoplasma, llegando a los ribosomas, donde es traducida en una proteína de 316 aminoácidos (pptox). c) La pptox consta de cuatro dominios:  $\delta$  (color verde, formado a su vez de dos regiones: preregión y proregión),  $\alpha$  (color negro),  $\gamma$  (color amarillo) y  $\beta$  (color café). Imagen inédita del presente trabajo.

El dominio  $\delta$ , a su vez está conformado por dos regiones: la preregión y la proregión. La preregión contiene una señal N-terminal de 26 residuos de aminoácidos, la cual permite que la pptox sea movilizad a la luz del retículo endoplásmico; en este sitio, la preregión es removida por una peptidasa, obteniendo una protoxina (ptox) (Fig. 2a). Además, se forma un enlace disulfuro entre el carbono 92 del dominio  $\alpha$  y el carbono 239 del dominio  $\beta$ , y tres sitios del dominio  $\gamma$  son glucosilados (Fig. 2b).



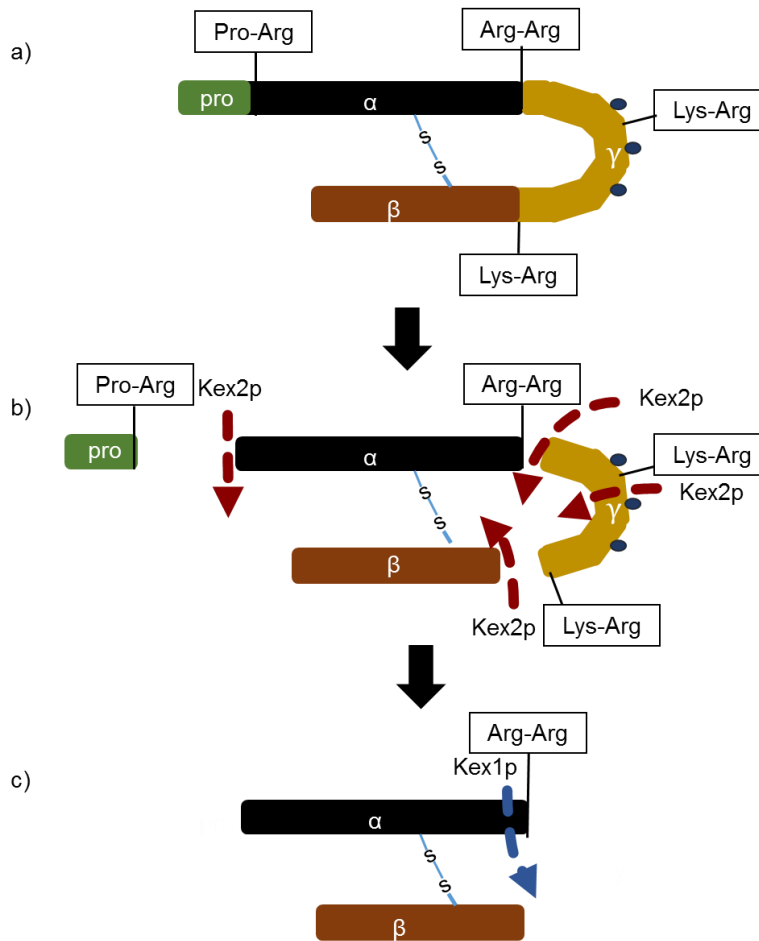
Posteriormente, la ptox es translocada al aparato de Golgi (Bostian, 1983; Gier, 2020; Magliani, 1997).



**Figura 2.** Modificación postraduccional de la preprotoxina *K1* en el lumen del retículo endoplásmico. a) La pptox se ve modificada por una peptidasa señal, que escinde los primeros 26 aminoácidos (preregión), obteniendo ptox. b) La ptox se pliega, dando lugar a un enlace disulfuro entre el dominio  $\alpha$  y  $\beta$ . Asimismo, tres sitios del dominio  $\gamma$  son glucosilados. Imagen inédita del presente trabajo.

Una vez en el aparato de Golgi, la ptox es modificada por la endoproteasa Kex2p, la cual reconoce esencialmente aminoácidos básicos (lisina y arginina), y escinde en la posición 44, 149, 188 y 233; eliminando así la secuencia restante de 27 a 44 aminoácidos (proregión) del dominio  $\delta$  y el dominio  $\gamma$  (Fig. 3a y 3b). Adicionalmente, la subunidad alfa es procesada por Kex1p, una serina carboxipeptidasa, removiendo la secuencia dibásica de arginina correspondiente a la posición 148 y 149 (Dmochowska, 1987; Gier, 2020; Zhu, 1992) (Fig. 3c).

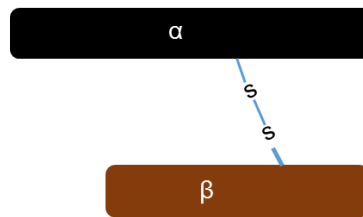
Finalmente, la toxina madura activa se secreta como una molécula dimérica en la que los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  están unidos covalentemente por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína (Bostian, 1984; Schmitt, 2006) (Fig. 4).



**Figura 3.** Modificación postraduccional de la protoxina *K1* en el aparato de Golgi. a) Residuos básicos de la protoxina, mismos donde cortan endopeptidasas (*Kex2p*) y carboxipeptidasas (*Kex1p*). b) Sitios de escisión de *Kex2p* en la protoxina. c) Última modificación postraduccional por la enzima *Kex1p*. Imagen inédita del presente trabajo.

Se ha observado que el procesamiento de ptox se asemeja a las modificaciones postraduccionales de hormonas peptídicas de mamíferos, como la preproinsulina. En un inicio, la ptox y la preproinsulina están formadas por 4 dominios, de los cuales su forma funcional solo conserva 2, siendo secretadas ambas moléculas como dímeros unidos por puentes disulfuro. Para que lo anterior suceda, se requiere de enzimas clasificadas como serina proteasas: *Kex2p* (encontrada en levaduras en el procesamiento de *K1*), *PC1*, y *PC2*, (encontradas en mamíferos en el

procesamiento de preproinsulina), las cuales escinden después de residuos básicos (Barr, 1991; Davidson, 2004; Gier, 2020; Zhu, 1992).



**Figura 4.** Toxina madura. La toxina es secretada como un dímero unido por un enlace disulfuro entre los dominios  $\alpha$  y  $\beta$ ; esta estructura se conoce como la forma madura de la toxina, la cual es la encargada de llevar a cabo el efecto *Killer*. Imagen inédita del presente trabajo.

#### 2.3.3.2 Mecanismo de acción *Killer*

Para que la toxina *K1* tenga un efecto *Killer* sobre las levaduras sensibles, ésta interactúa inicialmente con el receptor  $\beta$ -1,6-glucano de la pared celular (Hutchins, 1983; Schmit, 2006). Después, la toxina es translocada a la membrana citoplasmática y ejerce su efecto; en este último paso se han estudiado dos posibles blancos de acción: el receptor de membrana Kre1p (Breinig, 2002) y los canales de potasio TOK1 (Ahmed *et al.*, 1999).

En relación al posible blanco molecular TOK1, se ha observado que *K1* tiene un efecto sobre diferentes bacterias de interés biomédico, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Aunado a esto, análisis bioinformáticos han mostrado que estos microorganismos presentan ORF homólogos a TOK1 (Ramírez-Villarreal, 2018).

Se considera que los canales de potasio TOK1 son necesarios para la interacción letal de *K1* con la membrana plasmática; cabe mencionar que esta última interacción se ha estudiado también en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan, en condiciones de laboratorio, el canal TOK1 (Ahmed, 1999).

Ensayos previos indican que el efecto letal de la toxina *K1* implica la interrupción del gradiente de iones electroquímicos a través de la membrana plasmática. Como resultado, hay una fuga incontrolada de iones  $K^+$ , que lleva a la muerte celular (Bussey & Sherman, 1973; Kagan, 1983; Orentaite *et al.*, 2016)

#### 2.3.4 Efecto de resistencia a la toxina *K1*

Se ha demostrado que la forma no madura de la toxina *K1* juega un papel importante en la resistencia de las levaduras *Killer* a su propia toxina, una vez que la forma madura se encuentra en el medio extracelular. De manera específica, se ha observado que las cisteínas 95 y 107 del dominio  $\alpha$ , juegan un papel fundamental en la resistencia, así como los primeros 31 aminoácidos del dominio  $\gamma$  (Boone *et al.*, 1986; Gier *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 1993).

Por su parte, el canal TOK1 se expresa en las membranas plasmáticas de levaduras *Killer* y sensibles; sin embargo, el canal solamente es activado en las células sensibles. Al respecto, se ha hipotetizado que el precursor de la toxina *K1* suprime la activación del canal TOK1 desde el interior de la levadura *Killer* (Sesti, 2001).

#### 2.3.5 Canal de potasio TOK1

Los canales de potasio ( $K^+$ ) son proteínas que atraviesan la membrana con varios segmentos transmembrana (Biggin, 2000). Estos canales se clasifican en tres familias: 1) canales de potasio dependientes de voltaje o  $K_v$ , los cuales tienen 6 cruces transmembranales (CT) y una región formadora de poro a través de la cual sacan potasio de la célula; su cuarto CT está enriquecido en aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina), lo que los hace sensibles a los cambios de voltaje a través de la membrana. 2) canales de potasio  $K_{ir}$  que presentan estructuralmente 2 CT y movilizan potasio hacia el interior celular. 3) canales de potasio con dominios de poro en tándem (K2P), las cuales pueden tener 8 CT o 4 CT; los canales con 4 CT, tienen amplia distribución en la naturaleza, mientras que los de 8 CT, solamente

se han encontrado en hongo levaduriformes y filamentosos (Catterall, 2010; Gómora Martínez, 2010).

Dentro la familia K2P, se encuentra el canal TOK1 de *S. cerevisiae*, que consta de ocho dominios transmembrana y es rectificador saliente de potasio. Como su nombre lo indica, este canal cuenta con dos poros: el primer dominio de poros (*P1*) se ubica entre el CT 5 y 6 y el segundo dominio de poros (*P2*) está entre el CT 7 y 8 (Ketchum, 1995; O'Connell, 2002).

#### 2.4 Expresión heteróloga de componentes del sistema *Killer* de *S. cerevisiae*

La expresión heteróloga consiste en un sistema de clonación y expresión de material genético en un organismo diferente al de origen. Para ello, se requiere de vectores de clonación, los cuales son necesarios para la transcripción y traducción del material genético en estudio. Esta herramienta ha mostrado tener un papel importante en la generación del conocimiento respecto a la actividad de las proteínas y el estudio de las toxinas *Killer* no ha sido la excepción (Farrokhi, 2009; Ferrer-Miralles, 2015; Giesselmann, 2017; Goto, 1991).

Las toxinas secretadas por *S. cerevisiae* que han sido objeto de expresión heteróloga son *KHS*, *KHR* y *K28*. Las dos primeras toxinas fueron estudiadas a finales del siglo XX, y para ello fue necesario la construcción de un vector con la secuencia de DNA, el cual fue insertado en una cepa no *Killer* de *S. cerevisiae*, obteniendo una secreción de toxina de 3 a 4 veces mayor que en la célula *wild-type*, permitiendo con esto su secuenciación (Goto, 1991; Goto, 1990).

Por su parte, *K28* se ha logrado expresar con distintas proteínas fluorescentes (mCherry y GFP) en diferentes levaduras. Entre las levaduras de expresión se encuentran *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y *Candida glabrata*, en las cuales en general se observaron resultados exitosos, ya que incluso se llegó a obtener una secreción en promedio diez veces mayor respecto a las cepas de *S.*

*cerevisiae*. Esto indica que el empleo de vectores para la expresión de ptox resulta viable para la expresión y secreción de proteínas heterólogas (Eiden-plach, 2004; Heintel, 2001).

Por otro lado, al día de hoy se ha expresado el canal TOK1 en diferentes células. Entre ellas se encuentran los ovocitos de *X. laevis*, que expresan una actividad de TOK1 igual a la de *S. cerevisiae*, en presencia de *K1*, mostrando corrientes rectificadoras externas selectivas de  $K^+$  (Ahmed, 1999; Ketchum, 1995).

Además, se ha logrado introducir una parte del canal TOK1 en células de mamífero, siendo las líneas celulares CHO (ovario de hámster chino) y HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) transfectadas con un vector con la secuencia del poro 2 del canal (TOK1B) (Saldaña, 2002).

### III. Justificación

Las levaduras *Killer* son microorganismos capaces de sintetizar y secretar toxinas con amplio espectro de acción sobre diferentes microorganismos. Gracias a esta característica se ha planteado que las levaduras *Killer* pueden tener diferentes aplicaciones en la industria agrícola, la industria de los alimentos y la medicina. Para esto, es necesario llevar a cabo más investigación que ayude a responder, entre otras cosas, cuál es la estructura, el modo de acción y el mecanismo de resistencia de las toxinas *Killer*.

Entre las toxinas de levadura, la toxina *Killer K1* de *S. cerevisiae* ha sido ampliamente estudiada; no obstante, el mecanismo por el cual las cepas *Killer K1* no reaccionan a su propia toxina no ha sido totalmente explicado. Por tanto, es importante aplicar estrategias experimentales que permitan el estudio del mecanismo mencionado, siendo una opción la expresión heteróloga en células de mamífero, las cuales pueden permitir aislar los componentes que intervienen en el mecanismo de resistencia de *K1* y estudiarlos fuera de la influencia de cualquier otro componente fúngico.

#### **IV. Hipótesis**

Las células de mamífero expresan de forma heteróloga el canal TOK1 y la toxina K1, componentes del sistema *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae*, en células de mamífero.

#### **V. Objetivos**

##### 5.1 General

Expresar de forma heteróloga el canal de potasio TOK1 y la toxina K1 del sistema *Killer* de *S. cerevisiae* en células de mamífero para caracterizar la propiedad de resistencia.

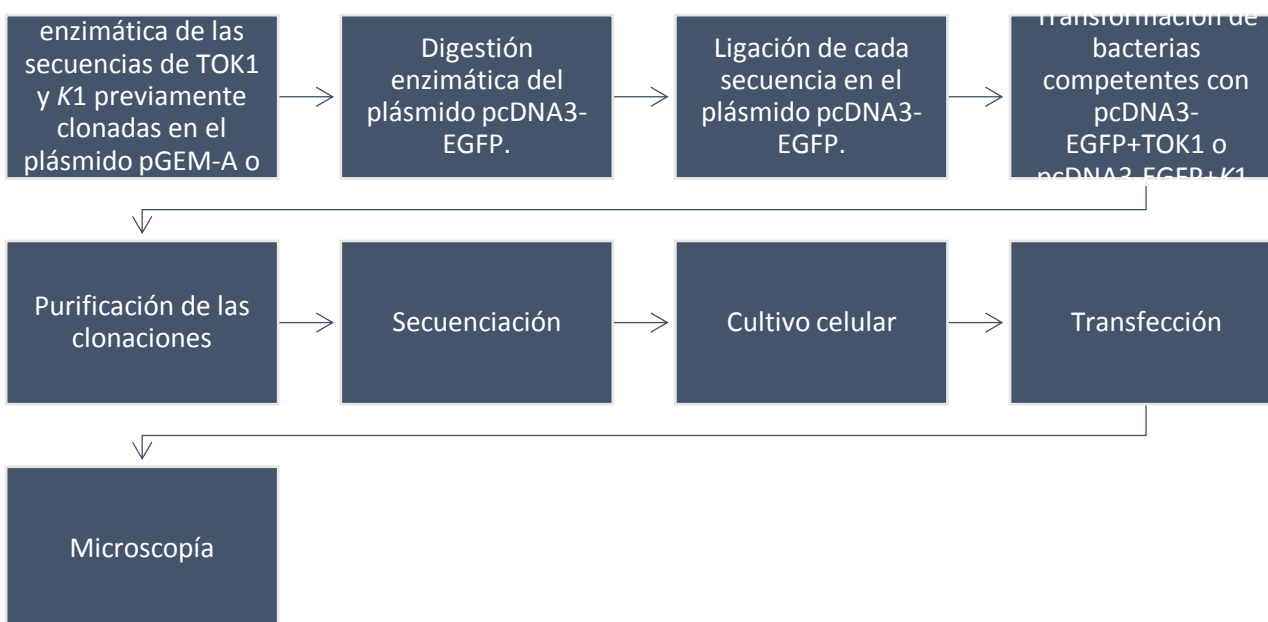
##### 5.2 Específicos

- Generar la construcción molecular del canal de potasio TOK1 y de K1 en el vector pcDNA3-EGFP.
- Transfectar ambas construcciones para su potencial expresión heteróloga en las líneas celulares de mamífero HEK 293, MCF-12F y MCF7.



## VI. Materiales y métodos

En el siguiente diagrama se muestra una idea general del proceso de clonación y transfección para las secuencias TOK1 y K1. Posteriormente, se da a conocer el proceso más a detalle.



**Figura 5.** Diagrama general del proceso de clonación y transfección relacionado a las secuencias TOK1 y K1.

Lo anterior se realizó en el Laboratorio de Biofísica de membranas en la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto; así como, en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla.

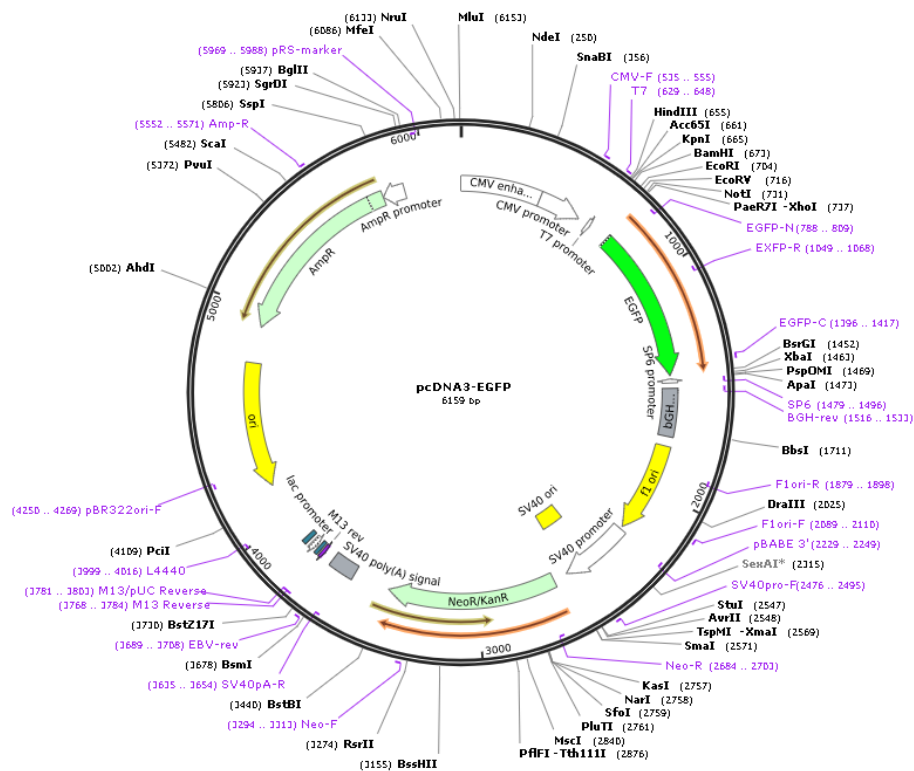
Los residuos biológicos fueron almacenados y eliminados siguiendo los protocolos de seguridad de la Universidad Autónoma de Querétaro, y por la Unidad de Proteogenómica de la UNAM, Campus Juriquilla.

El proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ con el número de registro 31FCN2020.

## 6.1 Clonación del canal TOK1 y la preprotoxina K1

### 6.1.1 Vectores

Para la expresión de ptox K1 y el canal TOK1, se utilizó el plásmido pcDNA3-EGFP (Plásmido Addgene #13031, proporcionado por el Dr. Doug Golenbock de la Universidad de Massachusetts) (Fig. 5), el cual contiene en su secuencia un promotor de tipo citomegalovirus (CMV) y un potenciador (enhancer), los cuales impulsan la expresión génica en una variedad de tipos de células (Yu et al., 2017). Asimismo, pcDNA3-EGFP presenta marcadores de seguimiento que consisten en resistencia a ampicilina y el gen reportero EGFP (proteína verde fluorescente mejorada) (Invitrogen, 2010).



**Figura 6.** pcDNA3-EGFP. El vector se conforma de 6159 pares de bases. Como parte de su estructura, sobresalen la secuencia que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP). Además, cuenta con: un sitio múltiple de clonación, un gen de resistencia a ampicilina y un promotor de citomegalovirus (CMV) que permite su expresión en células de mamífero (Addgene plasmid #13031).

Además, se utilizó el plásmido pGEM<sup>®</sup>T-easy (Promega, número de catálogo: A1360) para clonar inicialmente la secuencia de la pptoX *K1*. pGEM<sup>®</sup>T-easy es un vector para la clonación de productos de PCR con un nucleótido aislado de adenina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, debido a que contiene extremos compatibles de timina (Robles & Doers, 1994).

#### 6.1.2 Secuencias del canal TOK1 y la preprotoxina *K1*

Para la construcción del plásmido con el gen que codifica para el canal TOK1, se partió de la construcción pGEMA-TOK1 (amablemente donado por la Dra. Karen Ketchum). La secuencia de TOK1 fue digerida con las enzimas de restricción e insertada en los sitios BamHI-NotI de pcDNA3-EGFP.

La secuencia de la pptoX *K1* se obtuvo de la levadura *Killer* ATCC 42300<sup>™</sup> (MAT $\alpha$  ade2 thr1 ski2-1). Se realizó un cultivo en una relación 10:1, levadura *Killer* y la levadura sensible ATCC 38527<sup>™</sup> (5x47: MATa/MAT $\alpha$  his1/+ trp1/+ +/ura3), respectivamente. Las levaduras se cultivaron por 24 h a 30°C con 130 rpm; se emplearon diferentes medios de cultivo: medio inductor (MI o JG: 0.75% extracto de levadura, 0.5% peptona, 0.0005% FeCl<sub>3</sub>, 0.0005% MnSO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.08% KCl, 0.03% CaCl<sub>2</sub>, 1 % glucosa, 5.2% glicerol) (Flegelová *et al.*, 2002) o medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 5% glucosa) ajustado a diferentes pH con ácido cítrico 1M (pH: 4, 5, 6 y neutral~6.5).

Después del tiempo de cultivo, se sometió a las células a cinco ciclos de congelamiento (180°C) y calentamiento (55°C). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de RNA por el método de Trizol. Tras la obtención del ácido nucleico, se obtuvo cDNA con el kit Promega M-MLV transcriptasa inversa y se realizó PCR para obtener la secuencia de DNA de *K1* (anexo 1). Finalmente, la secuencia fue clonada en el plásmido pGEM<sup>®</sup>T-easy. Para ello, los oligos empleados fueron los siguientes:

oligo F K1YESFw (5´gcgggatccgcgATGACGAAGCCAACCCAAGTATTAGTTAG3´) y oligo F K1YESRv (gcatctagaCTAGTGGCCTGTGTCACAGCCTTCAAAG)

Tras obtener pGEM<sup>®</sup>T-easy-K1, se transformaron bacterias competentes XL1-Blue (protocolo descrito en la pág. 37) y se obtuvo DNA plasmídico por el método de purificación con polietilenglicol (protocolo descrito en la pág. 39). Para comprobar la presencia de pGEM<sup>®</sup>T-easy+K1 tras la purificación y en diferentes colonias de bacterias, se realizó PCR de colonias individuales con Platinum SuperFi<sup>™</sup> DNA polimerasa.

### 6.1.3 Clonación del material genético en pcDNA3-EGFP

Para clonar el canal TOK1 y la ptox K1 en pcDNA3-EGFP, se utilizó el kit de enzimas de restricción Anza<sup>™</sup> de ThermoFisher Scientific. Para el canal TOK1, se llevó a cabo una digestión enzimática en los sitios *Bam*HI y *Not*I en el plásmido pcDNA3-EGFP y pGEMA-TOK1. De manera general, para la reacción de digestión enzimática se preparó una mezcla de Buffer 1x, 1µg de DNA, 1 µL de cada enzima de restricción y agua libre de nucleasa hasta obtener un volumen de 30 µL; esta mezcla se incubó a 37°C por 3 h. El corte fue verificado en un transiluminador tras realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% y las enzimas fueron inactivadas a 80°C por 20 minutos.

De igual forma, el anterior protocolo fue realizado para la digestión enzimática de pcDNA3-EGFP y pGEM<sup>®</sup>T-easy-K1, haciendo en este caso un corte enzimático con la endonucleasa que reconoce el sitio *Eco*RI.

Para la clonación de TOK1 y K1, el plásmido pcDNA3-EGFP fue linearizado haciendo cortes dirigidos en los sitios *Bam*HI y *Not*I o en *Eco*RI para hacer la clonación correspondiente. Posterior a la digestión, pcDNA3-EGFP fue desfosforilado con el protocolo FastAP<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, 2020). Para esto, se mezcló agua libre de nucleasa, buffer AP, DNA (pcDNA3-EGFP) y fosfatasa

alcalina FastAP™; después, se dejó incubando la mezcla por a 37°C por 10 minutos y se inactivó la enzima a 75°C por 5 minutos.

Con la finalidad de separar los DNA cortados por las enzimas de restricción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.6% y se tomó la parte del gel donde estaban los DNA de interés (Ausubel *et al.*, 2003b). Posteriormente se llevó a cabo la purificación de pcDNA3-EGFP, TOK1 y K1 en gel con el protocolo de Wizard® (Promega Corporation, 2019), el cual se basa en columnas de sílice. Este procedimiento permitió eliminar componentes de la reacción de digestión, así como restos de agarosa.

Finalmente, para obtener los DNA recombinantes pcDNA3-EGFP+TOK1 y pcDNA3-EGFP+K1, se realizó la ligación del DNA vector (pcDNA3-EGFP) con el DNA inserto (TOK1 o K1), empleando el protocolo de Anza™ (Thermo Fisher Scientific, 2015). Para esto, se preparó una mezcla con DNA vector, DNA inserto, T4 DNA Ligase Master Mix Anza™ y agua libre de nucleasa. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se almacenó a una temperatura de 0-4°C.

#### 6.1.4 Transformación celular

Previo a la transformación, se generaron bacterias XL1-Blue y C2925H competentes por el método de CaCl<sub>2</sub>. El protocolo reportado por Inoue *et al.* (1990) fue utilizado con modificaciones para la generación de células competentes. Este procedimiento consistió en: cultivar las bacterias en placas de LB a 37°C durante la noche; después, se tomaron de 10 a 12 colonias y se cultivaron en un matraz con 250 mL de solución estéril SOB (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> y 10mM MgSO<sub>4</sub>) a 19°C en agitación vigorosa por 24 a 36 h, tras lo cual, se puso el matraz en hielo por 10 minutos; posteriormente, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron las células en 80 mL de solución estéril TB pH 6.7 (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> y 55

mM  $\text{MnCl}_2$ , ajustando pH con KOH o HCl) y 1.4 mL de DMSO; enseguida se realizaron alícuotas y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$ .

Una vez obtenidas las células competentes, estas fueron transformadas por choque térmico. El protocolo usado fue el reportado por Ausubel et al., (2003a). Por cada reacción de ligación se realizó lo siguiente (Fig. 7): primeramente, se descongelaron 50  $\mu\text{L}$  de células competentes, se les añadió el DNA recombinante y esto se mezcló; luego, la mezcla se dejó incubando por 10 minutos en hielo; después, la mezcla se sometió a choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 45 segundos para después dejar reposar las células en hielo por 2 minutos; a continuación, se añadió medio LB a las células y se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos; posteriormente, las células fueron centrifugadas, se decantó el medio y se resuspendieron las células; finalmente, se plaquearon las células en cajas con medio LB y ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), esto para seleccionar las células que fueron transformadas de las que no. Las células se incubaron entre 12 y 16 h a  $37^\circ\text{C}$ .

#### 6.1.5 Extracción de DNA

Para extraer el DNA recombinante de las células previamente transformadas, se siguió el protocolo de Zhou, *et al* (1997). En primer lugar, se inocularon 25 mL de medio LB-ampicilina y se cultivó a  $37^\circ\text{C}$  por 16-18 h a 150 rpm; posteriormente, el cultivo se centrifugó a 75000 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , se decantó, reconstituyó el pellet en el medio LB restante y se agitó en vórtex por 1 minuto; después, se resuspendieron las bacterias en 2 mL de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris pH 8.0 25 mM y EDTA 10mM) y se puso la mezcla en vórtex por 15 segundos, la cual se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se incorporó a la mezcla 4 mL del buffer de lisis (SDS 10% y NaOH 2N) y se dejó incubar 5 minutos en hielo; a lo anterior, se le añadieron 3 mL de solución de acetato de potasio (preparado al combinar 60 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético y aforar con agua a 100 mL), se mezcló y dejó incubar

por 5 minutos a temperatura ambiente; tras lo anterior, la solución se centrifugó a 9000 rpm por 15 minutos a 4° C

El sobrenadante obtenido del paso anterior, se pasó a otro tubo a través de un tamiz; la solución obtenida se mezcló con 5.4 mL isopropanol, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000 rpm por 15 minutos a 4° C. Tras la precipitación, se lavó la pastilla con 5 mL de etanol 75%, se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó a 9000 rpm por 3 minutos a 4° C; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de TE 1x; después, se pasó la solución a un tubo eppendorf, le fue añadido 2 µL de RNAsa (10mg/mL) y se dejó incubar la mezcla en un baño maría a 37° C por 30 minutos; a lo anterior, se le agregó 1 mL de PEG 13% en NaCl 1.6 M, esto se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y el tubo se enjuagó con 1 mL de etanol 75%; finalmente, se eliminó el sobrenadante y se disolvió el plásmido en TE.

## 6.2 Cultivo celular

Se emplearon dos líneas celulares provenientes de la especie *Homo Sapiens*: HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) MCF-12F (Michigan Cancer Foundation clona 12F, ATCC® CRL-10783) y MCF-7 (Michigan Cancer Foundation clona 7, ATCC® HTB22). Estas fueron amablemente proporcionadas por la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla. La importancia del uso de MCF-12F y MCF-7 residió en la factibilidad de contrastar resultados experimentales en células con un origen ontogenético común, pero con características diferenciales: una derivada de cáncer y la otra con un fenotipo sano, respectivamente.

Las células HEK-293 son utilizadas comúnmente como huésped para la expresión heteróloga de proteínas, como canales de membrana, debido a que presentan una alta eficiencia de transfección y traducen y procesan proteínas dando lugar a

estructuras muy similares a las del organismo de origen. Esta línea celular se obtuvo inicialmente en 1973 de un riñón embrionario humano y se transformaron posteriormente con DNA de Adenovirus tipo 5, el cual se incorporó al cromosoma 19. El tiempo aproximado de duplicación de esta línea celular es de 30 horas. (Lin *et al.*, 2014; Ooi *et al.*, 2016).

MCF-12F (ATCC® CRL-10783) es una sublínea celular de MCF-12, la cual fue obtenida mediante una mamoplastía de reducción en una mujer nulípara de 63 años. Posteriormente, MCF-12F fue producida después del cultivo de MCF-12 en medio libre de suero con baja concentración de Ca ++. MCF-12F se caracteriza por ser una línea celular epitelial no tumorigénica, con un tiempo de duplicación de 20 horas (ATCC, 2019a; Pauley, 1993).

Las células MCF-7 (ATCC® HTB22) son células epiteliales ductales obtenidas del tejido mamario de una mujer de 69 años con adenocarcinoma metastásico, tras un derrame pleural. La línea celular es positiva a receptores de estrógeno y progesterona, perteneciendo al subtipo molecular luminal A. El tiempo aproximado de duplicación es de 29 horas (ATCC, 2019b; Comşa *et al.*, 2015; Soule *et al.*, 1973).

Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar: 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. Las células se cultivaron en medio artificial DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco; número de catálogo Gibco: 11995065) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Para la producción continua de células se emplearon cultivos confluentes, los cuales fueron tratados con verseno (EDTA 0.6mM y solución amortiguadora de fosfatos o PBS 1x: NaCl 136.8 mM, KCl 2.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM) y tripsina (digestión enzimática) para ser disgregados mecánicamente y nuevamente sembrados a la confluencia deseada (Saldaña *et al.*, 2009).



### 6.3 Expresión heteróloga

A fin de llevar a cabo la expresión de *K1* y *TOK1*, se transfectaron células de mamífero con los DNA recombinantes previamente obtenidos (pcDNA3-EGFP+*TOK1* y pcDNA3-EGFP+91). Para ello, se empleó el método químico de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$ . Para iniciar la transfección, se colocaron vidrios de 1.1  $\text{cm}^2$  en cajas de 12 pozos y se sembraron células sobre los vidrios a una confluencia de 50% en 0.1 mL de DMEM, manteniendo el cultivo por 12 h. Posteriormente, se reemplazó el medio con DMEM complementado con SFB 5 % y libre de antibióticos, en el cual las células permanecieron 12 h más; esto tuvo como objetivo retener a las células en fase G0 del ciclo celular (previo a la fase S, donde se sintetiza el DNA).

Después de lo anterior, en tubos de 1.5 mL se colocaron 1.0, 2.0 y 5.0  $\mu\text{g}$  de DNA (pcDNA3-EGFP, pcDNA3-EGFP+*TOK1*, pcDNA3-EGFP+*K1*) y se añadieron 0.01 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.25 M. La solución resultante se mezcló vigorosamente para inducir la formación de complejos moleculares DNA- $\text{Ca}^{2+}$  y se incubó por 10 minutos. A cada mezcla se añadió 0.01 mL de HEPES 2X, a continuación, cada tubo se mezcló e incubó por 10 minutos más. Finalmente, se aforó a 0.1 mL con DMEM SFB 5% y libre de antibiótico. Una vez obtenida la mezcla de transfección, esta fue colocada lentamente en los vidrios con células (previamente, se retiró el medio cultivo). Tras lo anterior, las células se incubaron por 16-20 h; al finalizar el tiempo, el medio fue retirado y reemplazado con DMEM (Chen, 2012; DBH, 2014). Las células se observaron en el microscopio MVX10 Olympus a las 48 h post-transfección. Las transfecciones exitosas se fijaron en una solución de 4.0% de glutaraldehído diluido en PBS 1X a temperatura ambiente por 15 minutos, para eliminar el fijador las preparaciones fueron lavadas 3 veces con PBS 1X.

Para llevar a cabo la observación de las preparaciones y contrastarlas con estructuras celulares, se incubaron las células con DAPI (un indicador fluorescente que emite en la región azul del espectro de luz, se une a regiones de adenina-timina

en los surcos menores del DNA de doble cadena) (Kapusinski, 1995), y faloidina (un péptido biciclístico proveniente de *Amanita phalloides* de alta afinidad para actina tipo F, conjugado con el colorante fluorescente de color rojo-anaranjado, tetrametilrodamina (TRIC)) (Garcia et al., 2015). Este procedimiento consistió en permeabilizar a las células con 0.1% Triton X-100 en PBS 1X, seguido de 3 lavados con PBS 1X. A continuación, se colocó 0.1 mL de la preparación de sondas fluorescentes (1.0  $\mu$ L Phalloidine-TRIC 400X y 5.0  $\mu$ L de DAPI 0.1  $\mu$ g/mL DAPI diluido en 94  $\mu$ L PBS) por 15 minutos. Al término de la incubación, la solución fue retirada y se lavó 3 veces con PBS 1X para eliminar el excedente. Para finalizar, se colocaron 3  $\mu$ L de DAPCO (un polivinil alcohol usado como medio de montaje), se empalmó el vidrio en un portaobjetos (eliminando burbujas de aire y nivelando la superficie), y se selló con barniz. Las preparaciones fueron guardadas en refrigeración hasta su uso.

La captura de imágenes se efectuó con el programa Olympus Cell P, obteniendo archivos en formato TIFF. El análisis de las imágenes se realizó en el programa Image J versión 1.53a (software de libre acceso, disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/>), en el cual se analizaron las regiones de interés (ROIs) del campo visual de las células para obtener los datos cuantitativos de la intensidad de la fluorescencia reportadas como Unidades de Fluorescencia Arbitraria (UFAs) (Saldaña et al., 2009).

Todos los datos obtenidos fueron procesados en los programas SPSS versión 25 y OriginPro 2017.

#### 6.4 Ensayos de halos inhibición en placa

Este tipo de ensayo se basa en el método de Kirby-Bauer, con modificaciones de acuerdo a las características específicas de los microorganismos utilizados, en este caso: levaduras (Bauer et al., 1959).

Por su parte, las cepas de *S. cerevisiae* fueron conservadas en medio YPD sólido (agar 2.0%) y guardadas a 4° C. Previo a los experimentos, las cepas 42300 (productora de toxina *K1*) y 5x47 (sensible) se cultivaron 24 y 48 h, respectivamente, en medio YPD a 28° C en agitación (120 rpm) (Mohamudha Parveen & Ayesha Begum, 2010). Posteriormente, la cepa 42300 se transfirió a MI para favorecer la producción de toxina y se mantuvo en cultivo por 24 horas más (Flegelová *et al.*, 2002).

Respecto al cultivo de células sensibles, se tomaron alícuotas de 1 mL y se depositaron en microtubos de ensayo previamente pesados y marcados con el número de la cepa. Estas alícuotas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos para separar las células del sobrenadante y obtener un botón de células, el cual se pesó. Una vez obtenida la masa de las células, se agregó el volumen necesario de medio YPD líquido para que por cada 50 µl hubiera 1 mg de células. De igual forma, el procedimiento para la cepa *Killer* consistió en separar las células y el sobrenadante después de las 24 horas en MI.

En placas de medio YPD sólido con diferentes pH (4.0, 4.5, 4.7, 5.0, 6.0 y 7.0) se sembraron 3 mg de células sensibles como fondo. Después, se colocaron círculos de papel filtro uniformemente en las placas y, sobre estos, diferentes volúmenes de sobrenadante de células *Killer*; así mismo, también se agregaron diferentes volúmenes de células 42300 directamente sobre el césped de células sensibles.

Para poder determinar el tamaño del halo de inhibición, se tomaron diferentes fotografías de las cajas de cultivo a las 0, 8, 16, 24 y 48 horas. Estas fueron analizadas a través del programa Image J versión 1.53a

## 6.5 Producción de toxina *K1* en levaduras

La producción de toxina se llevó a cabo en dos fases: la primera consistió en hacer crecer las levaduras *Killer*, cepas 42300 hasta alcanzar la fase estacionaria en medio

YPD líquido (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa) con pH 4.5. A *posteriori*, las células fueron colectadas y transferidas a MI. Para agilizar la producción de toxina, se utilizaron 20 mg células por mL de MI (Flegelová, 2002). En estas condiciones, las células comenzaron la producción de toxina a las 5 h teniendo un pico máximo a las 14 h. Posterior a la inducción, el caldo de cultivo fue centrifugado a 14,000 rpm por 10 min, produciendo dos fracciones: el botón celular y el sobrenadante. El sobrenadante contiene la toxina, y para mantenerlo estéril fue filtrado y almacenado en alícuotas a -20°C, mientras que, con el botón celular se obtiene el peso húmedo.

La cantidad de toxina fue determinada por el método colorimétrico de Lowry. Este método emplea el reactivo de Folin (mezcla de tungstato de sodio, molibdato y fosfato), junto con una solución de sulfato de cobre. A la mezcla se agregó la solución con la toxina de tipo proteica, produciendo un color azul violáceo que se puede cuantificar a 660 nm. Para llevar a cabo este procedimiento, se añadió Tris, tampones de ion híbrido (Hepes) y EDTA. El método se fundamenta en la reacción de Biuret: en medio alcalino, los iones de  $\text{Cu}^{+2}$ , se unen a la parte amino de los enlaces peptídicos, provocando la exposición de los grupos R de los aminoácidos aromáticos. Posteriormente, el reactivo de Folin es reducido por los aminoácidos aromáticos, pasando de fosfomolibdotungstato a heteropolimolibdeno (color azul intenso) (Walker 2010).

## 6.6 Viabilidad celular

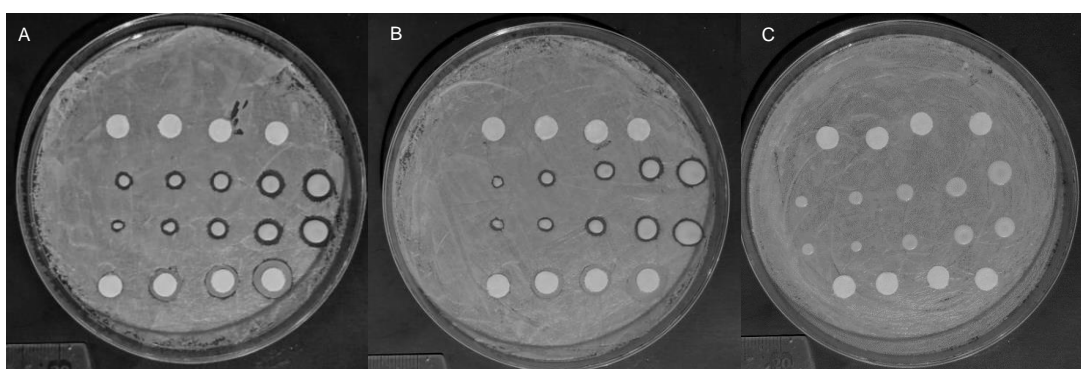
Para evaluar el efecto del MI sobre la viabilidad de células de mamífero, se utilizó el método de Alamar Blue, el cual detecta el ambiente redox de las células vivas. El compuesto activo de este método es la resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-io-3-ona), la cual es soluble en agua, estable en el medio de cultivo y es de color azul. Cuando la resazurina se reduce, se obtiene resorufina, la cual es de color rosa y es fluorescente. Es importante tener en cuenta que la cantidad de resorufina presente es proporcional al número de células viables (Rampersad, 2012).

En una caja de 96 pozos se sembraron, por pozo, 5000 células de la línea celular MCF-7 y se dejaron en cultivo por 18 h. Después, se añadieron diferentes volúmenes de medio inductor (MI o JG) u otro tratamiento (Tx-100, capsaicina y taspigargina). Luego, se añadió Alamar Blue al 10% y se dejó incubar por 60 minutos. Posterior a este tiempo, se tomaron las medidas de fluorescencia en un lector de placas multimodo multimodo.

## VII. Resultados y discusión

### 7.1 Clonación de *K1* y TOK1

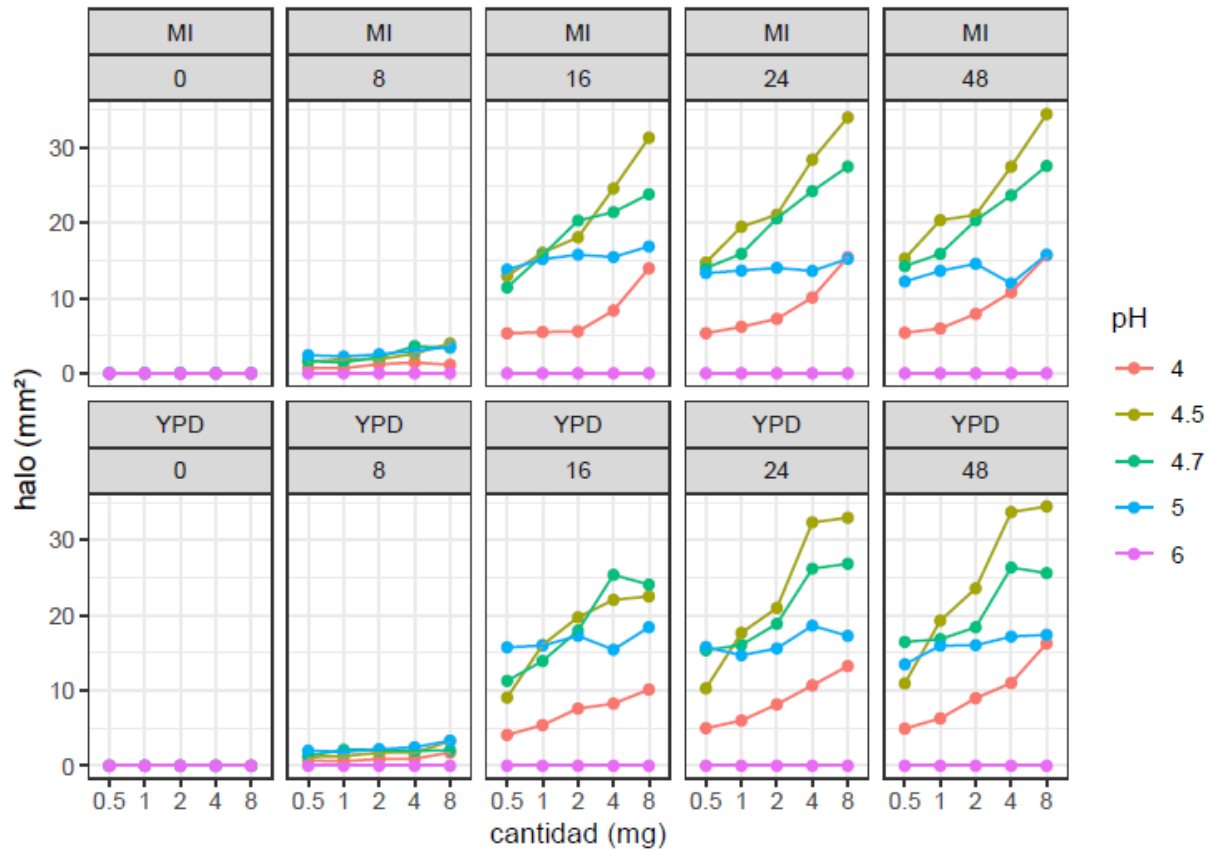
Como parte del proceso de clonación de la toxina *K1*, primeramente, se realizaron ensayos con células *Killer* por el método Kirby-Bauer. Para ello, se probó la eficiencia de la toxina *K1*, producida por la levadura *Killer* 42300, a través de ensayos de inhibición en placa bajo diferentes pH (Fig. 8 y 9).



**Figura 7.** Ensayos de inhibición en placa. Las cajas de cultivo presentan un césped de levadura sensible 5x47. De izquierda a derecha se colocaron 0.5, 1, 2, 4 y 8  $\mu$ L de levaduras *Killer* o medio extracelular en papeles filtro; las primeras dos filas presentan un cultivo en MI y las últimas dos filas un cultivo en medio YPD. A) Ensayo en medio YPD con pH 4.5. B) Ensayo en medio YPD con pH 4.7. C) Ensayo en medio YPD con pH 6.0.

Diversos estudios han mostrado la importancia que tiene el pH en la estabilidad de las toxinas *Killer*. Algunas de ellas, tienen un rango de estabilidad amplio que va de 3.0 a 7.0; en el caso de las toxinas producidas por la especie *S. cerevisiae*, estas muestran un rango de estabilidad menor que va de pH 4.0 a 5.0, pareciendo ser más estables entre pH 4.6 y 4.8 (Marquina *et al.*, 2001; Melvydas *et al.*, 2016; Palfree & Bussey, 1979; Tan *et al.*, 2018; Woods & Bevan, 1968). Como se muestra en las cajas de cultivo de las figuras 8A y 8B, a pH 4.5 y 4.7 se observan halos de inhibición en comparación con la caja de cultivo con un pH de 6.0. Estos resultados indican la

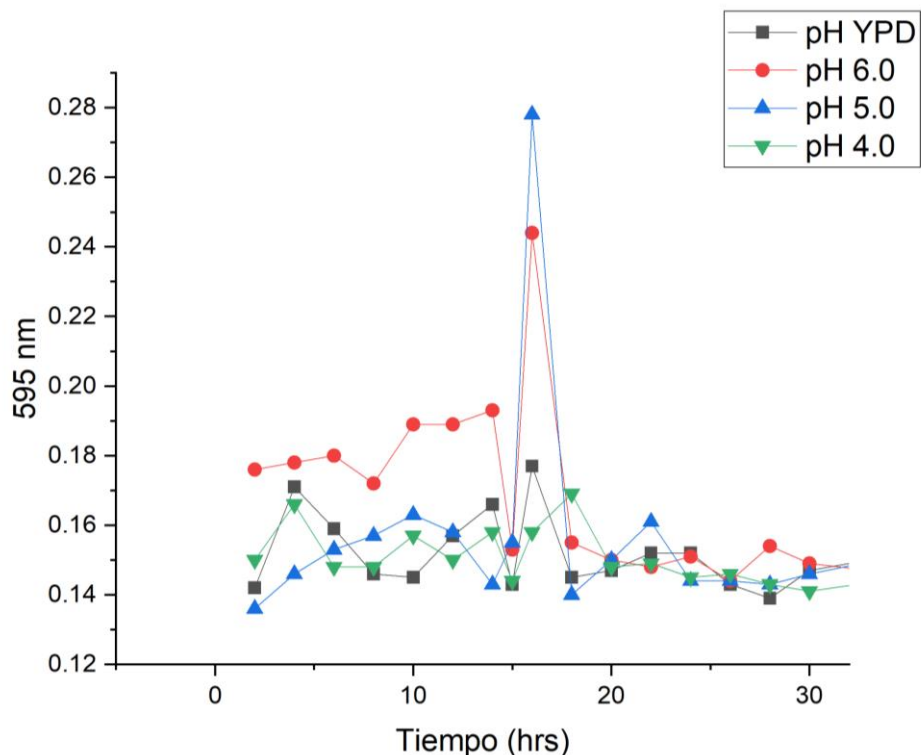
importancia del pH en la estabilidad de *K1* para que esta pueda llevar a cabo su acción.



**Figura 8.** Área de inhibición producida por la levadura *Killer K1* 42300. El área de inhibición en placa fue obtenida de la porción que incluye el botón celular y el espacio con ausencia de crecimiento de levaduras. En cajas de cultivo que contenían medio agar YPD con diferentes pH de 4.0 a 6.0, se sembraron céspedes de levaduras sensibles 5x47; a estas se les añadieron diferentes cantidades de levaduras *Killer* 42300 que habían sido previamente cultivadas en medio YPD y MI o exclusivamente en medio YPD. Se examinaron a las 0, 8, 16, 24 y 48 h.

Otro factor importante a estudiar es el tiempo en que la toxina ejerce su efecto, si bien su acción es visible a partir de las 16 h, es hasta las 24 y 48 h donde se observa un efecto superior, lo cual se refleja en un halo de inhibición con mayor área (Fig. 9). Se ha reportado que los halos de inhibición pueden crecer hasta las 72 h y,

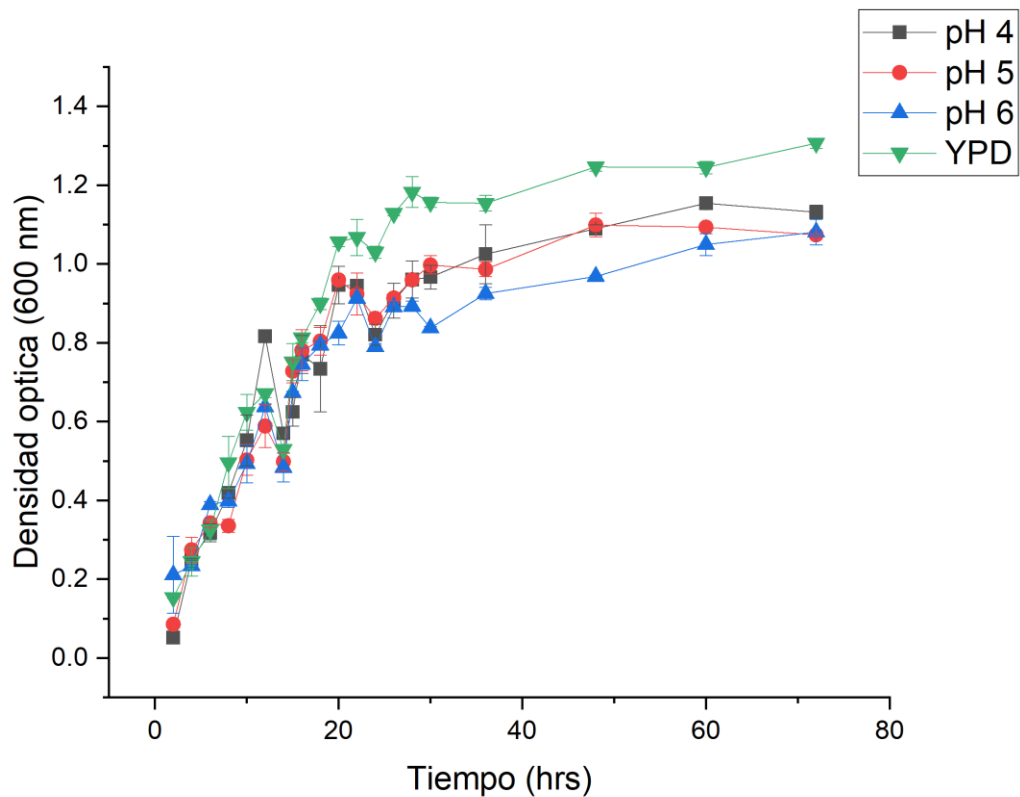
posterior a este tiempo, el tamaño del halo se mantiene por semanas en los medios de cultivo con pH ácido, evitando así que las células sensibles colonicen el área de inhibición (Ramírez-Villarreal, 2018).



**Figura 9.** Cuantificación proteica de la toxina *K1* en la levadura *Killer 42300*. Medición de la cantidad de toxina *K1* producida por la cepa 42300 en un lapso de 30 h, los cultivos de levadura se llevaron a cabo en diferentes pH.

Tras observar el efecto de *K1* en relación al tiempo, se buscó conocer el pH y el tiempo óptimos en los cuales la levadura producía una mayor cantidad de toxina. En este sentido, los datos obtenidos indican que la levadura genera una mayor cantidad de toxina a las 16 h, lo que se relaciona con el momento en el que el halo de inhibición empieza a ser claramente visible (Figs. 9 y 10).



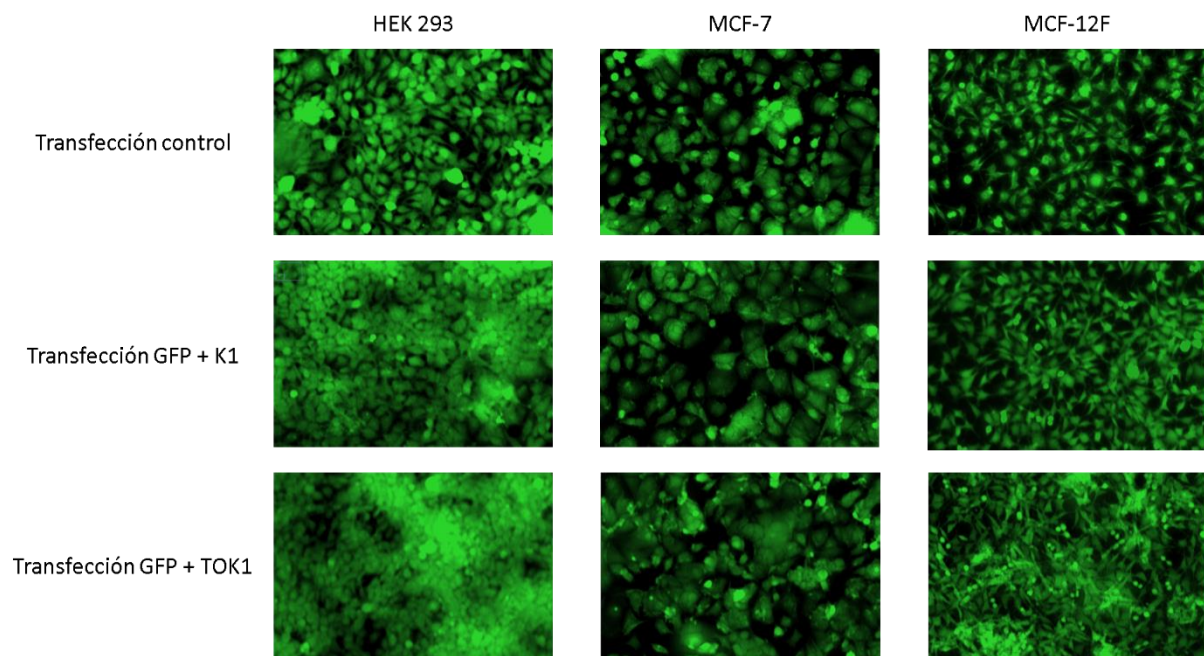


**Figura 10.** Efecto del pH en el crecimiento de la levadura *Killer K1 42300*. Se cultivaron cepas 42300 en medios YPD a diferentes pH, la curva de crecimiento se construyó midiendo la densidad óptica a 600 nm durante 80 h.

En la figura 11 se muestra que la levadura *Killer* mantiene un crecimiento exponencial que dura alrededor de 20 h, tras este tiempo, el cultivo se establece en una fase estacionaria. En este caso, el pH del medio de la levadura no parece tener mayor influencia en el crecimiento, pero se puede observar que el pH del medio YPD ( $\text{pH } 6.5 \pm 0.2$ ) podría tener una mayor influencia en el crecimiento de la levadura. En general, las células de *S. cerevisiae Killer* mostraron una fase log prolongada y con una menor tasa de crecimiento en comparación con otras curvas de crecimiento de levaduras de *S. cerevisiae* (Alsuhaime *et al.*, 2012; Mensah & Ayorkor Tagoe, 2018)

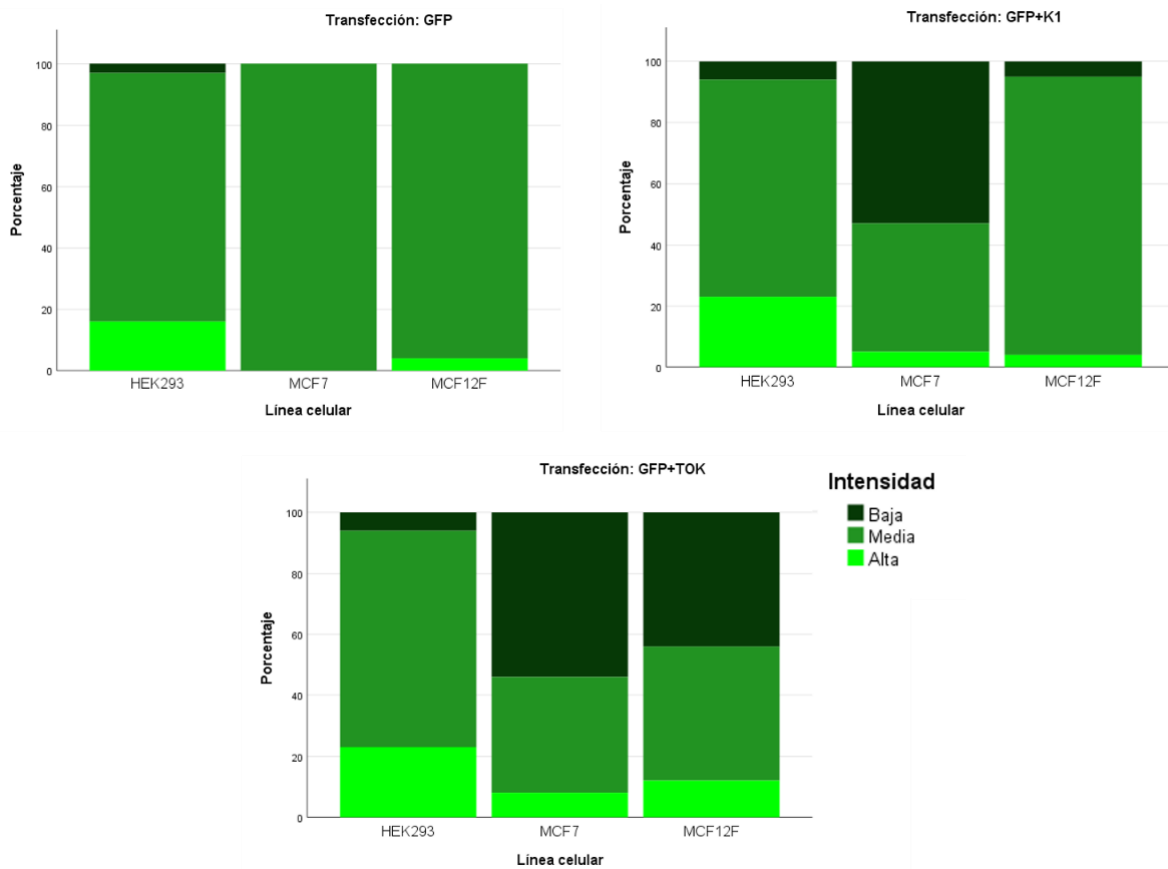
## 7.2 Expresión heteróloga

Los sistemas de expresión heteróloga son herramientas que permiten la expresión de un material genético en una especie distinta a la célula de origen. El desarrollo de un sistema heterólogo se lleva a cabo mediante el empleo de un organismo hospedero y un vector de expresión que poseen elementos genéticos necesarios para la transcripción y traducción de la proteína de interés (Ferrer-Miralles *et al.*, 2015)



**Figura 11.** Células de mamífero transfectadas. Las líneas celulares de mamífero HEK293, MCF-7 y MCF-12F fueron transfectadas por el método de cloruro de calcio con pcDNA3-EGFP (control), pcDNA3-EGFP+K1 o pcDNA3-EGFP+TOK1. Las imágenes fueron tomadas 48 horas post transfección.

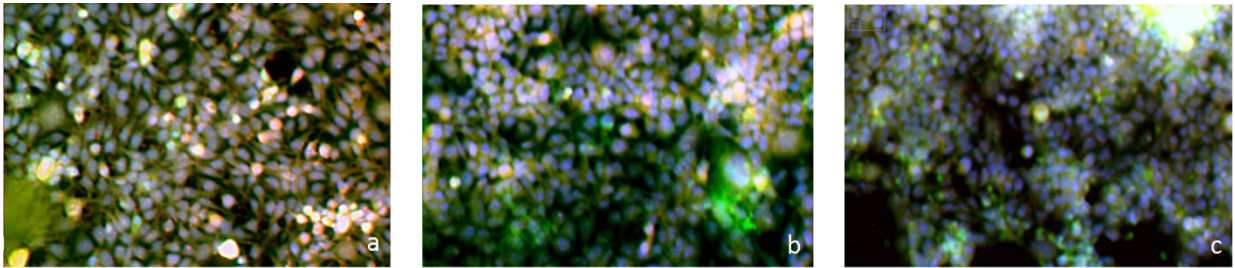
Con el fin de generar un sistema que permita el estudio de la resistencia a la toxina K1, propia de las levaduras de *S. cerevisiae* productoras de esta toxina, se planteó expresar de forma heteróloga K1 y TOK1. Para esto, el método de transfección de cloruro de calcio permitió que las células endocitaran las construcciones moleculares y posteriormente los resultados se observaron al microscopio (Fig. 12).



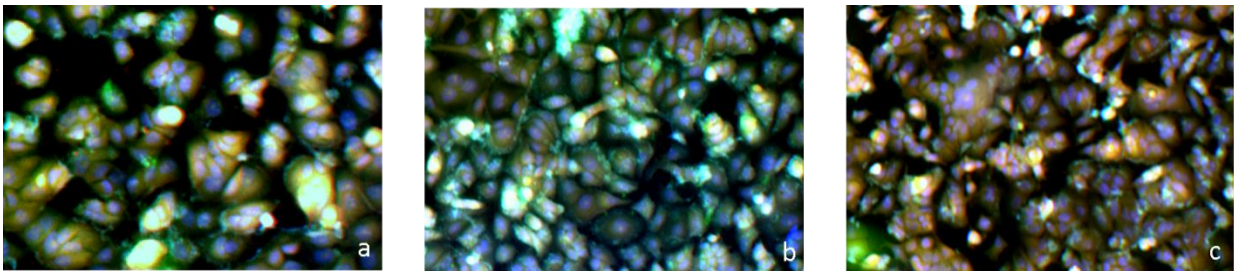
**Figura 12.** Intensidad de fluorescencia de las transfecciones con pcDNA3-EGFP y sus diferentes construcciones moleculares en células de mamífero. Para obtener la intensidad de fluorescencia, se utilizó el programa Image J versión 1.53r, las imágenes se trabajaron con formato de 8 bits. La clasificación sobre la intensidad de fluorescencia se basó en lo reportado por Lin y colaboradores (intensidad de fluorescencia de 30-100, intensidad baja; 100- 199, intensidad media; 200 a 255, intensidad alta, siendo 255 el valor de intensidad máxima) (Lin *et al.*, 2015).

En un estudio previo, se dio a conocer que era posible transfectar una parte del canal TOK1 en líneas celulares de mamífero HEK 293 y CHO (Saldaña *et al.*, 2002); en el presente trabajo, demostramos que el canal TOK1 puede ser transfectado en su totalidad en líneas celulares de mamífero.

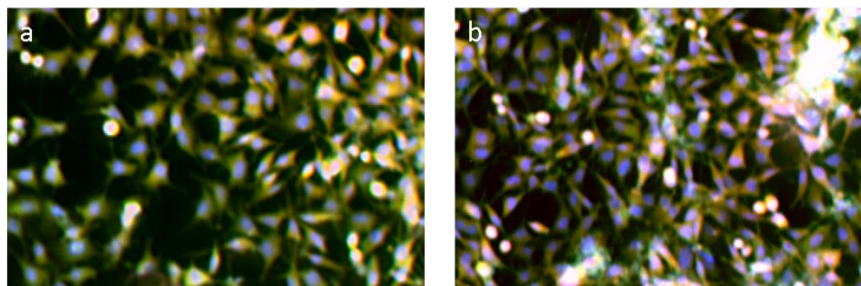
Por otro lado, si bien se habían llevado a cabo transfecciones de toxinas Killer de *S. cerevisiae* en otro tipo de levaduras (Eiden-plach et al., 2004; Goto et al., 1991), esta es la primera vez que se ha reportado que una toxina *Killer* es transfectada en células de mamífero.



**Figura 13.** Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular HEK293. Las células HEK293 transfectadas fueron puestas en contacto con los indicadores fluorescentes DAPI y Phalloidine-TRC. a) Transfección con pcDNA3-EGFP. b) Transfección con pcDNA3-EGFP+TOK1. c) Transfección con pcDNA3-EGFP+K1.



**Figura 14.** Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular MCF-7. Las células MCF-7 transfectadas fueron puestas en contacto con los indicadores fluorescentes DAPI y Phalloidine-TRC. a) Transfección con pcDNA3-EGFP. b) Transfección con pcDNA3-EGFP+TOK1. c) Transfección con pcDNA3-EGFP+K1.



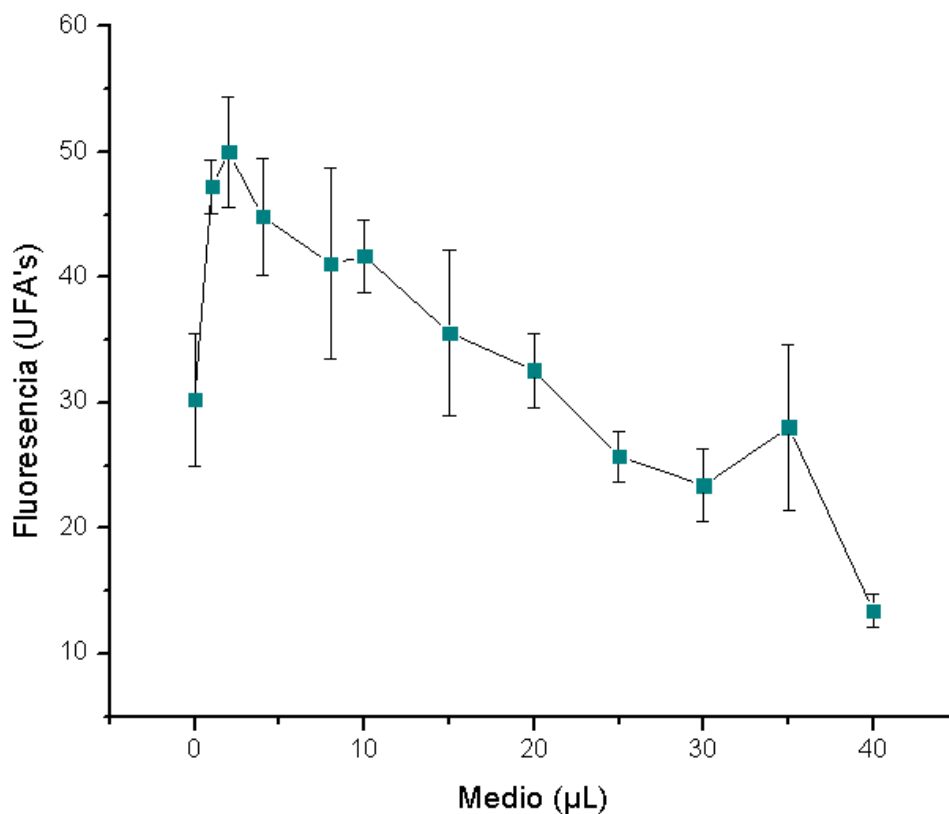
**Figura 15.** Contraste de indicadores fluorescentes (GFP, DAPI y Phalloidine-TRIC) en la línea celular MCF-12F. Las células MCF-12F transfectadas fueron puestas en contacto con los indicadores fluorescentes DAPI y Phalloidine-TRC. a) Transfección con pcDNA3-EGFP+TOK1. b) Transfección con pcDNA3-EGFP+K1.

En las figuras 14, 15 y 16 se muestran diferentes imágenes de las líneas celulares de mamífero, las cuales tienen al centro una estructura azul (refleja la presencia de DNA de doble cadena) y hacia la periferia un color verde/anaranjado (el anaranjado representa el espacio perimembranal). Esta gama de colores permite contrastar las células con algunas de sus estructuras. De manera general y, complementando con lo observado en las gráficas de la figura 13, las líneas celulares HEK 293 y MF12F llegan a presentar mayor intensidad del color verde fluorescente en el área perimembranal; mientras que, las células MCF-7 (células de cáncer) tienden a verse morfológicamente diferentes y a expresar con menor intensidad la proteína GFP, en general las estructuras no se perciben claramente como en las otras imágenes.

### 7.3 Ensayos de toxicidad en células de mamífero.

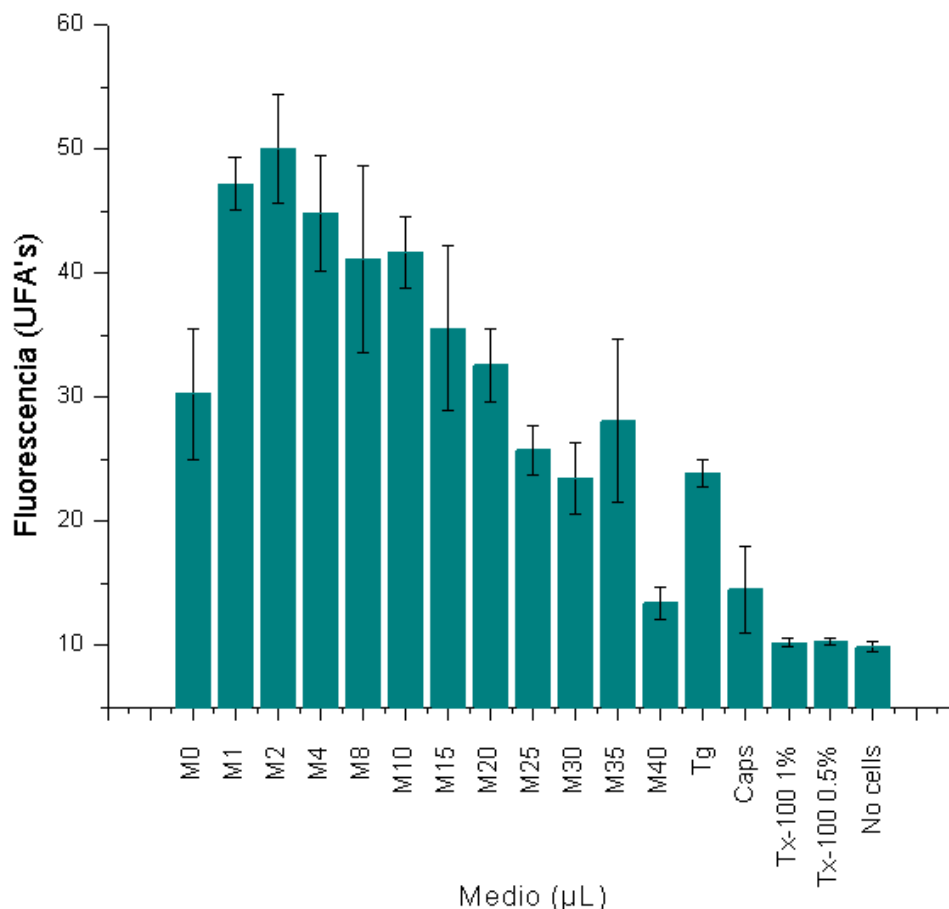
Las toxinas *Killer* han mostrado tener un efecto negativo en diferentes microorganismos. En este sentido, la toxina *K1* es bien conocida por su efecto letal sobre diferentes levaduras y bacterias como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (Fredericks et al., 2021; Palpacelli et al., 1991; Ramírez-Villarreal, 2018). Por otra parte, las toxinas *Killer* no han mostrado tener un efecto sobre organismos eucariotas pluricelulares, tal es el caso de la actividad nula de *K1*

observada sobre la línea celular HeLa (células de adenocarcinoma cervical humano) (Carboni et al., 2020; Fredericks et al., 2021).



**Figura 16.** Dosis-respuesta del MI en células MCF-7. Se reporta la viabilidad de las células MCF-7, a través de las UFA's, con relación a diferentes volúmenes de MI. Las células fueron cargadas con AlamarBlue. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar.

Debido a lo anterior, podemos considerar que las células de mamífero son un excelente modelo de expresión para el estudio del sistema *Killer*. Sobre este modelo, una de las perspectivas es conocer si la toxina *K1* tendría un efecto una vez expresado el canal TOK1 y, a su vez, si la co-expresión de *K1* y TOK1 generarían una resistencia a *K1*, la cual, en condiciones experimentales, es obtenida en MI.



**Figura 17.** Efecto de diferentes soluciones sobre la viabilidad de células MCF-7. Se reporta la viabilidad de las células MCF-7, a través de las UFA's, con relación a diferentes volúmenes de MI y de controles de muerte celular (Tg, Caps y Tx-100). Las células fueron cargadas con AlamarBlue. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar.

A través del ensayo de Alamar Blue, en células MCF-7 que fueron puestas en contacto con diferentes volúmenes de MI, se observó que, a mayor volumen del medio, menor era la viabilidad celular (Figs. 17 y 18). Estos resultados se atribuyen a un probable estrés hiperosmótico. De manera general, las células se cultivan en medio DMEM con una osmolaridad aproximada de 290 osm (Huttu et al., 2012); si bien no se conoce la osmolaridad del medio al que fueron sometidas las células, conocemos que el medio YPD (medio base del medio MI) tiene alrededor de 250 mOsm (Gustin et al., 1998), aunado a esto se agrega glicerol y diferentes sales para

obtener el medio MI, teniendo como consecuencia un aumento en la osmolaridad del medio. De acuerdo a lo anterior, se conoce que un estrés hiperosmótico puede influir directamente en las formas de la célula y afectar la viabilidad celular (Fujisawa et al., 2012).

## **VIII. Conclusiones**

En este estudio, demostramos que es posible realizar la expresión heteróloga de los componentes clave del sistema Killer de levaduras en células de mamífero para la caracterización de la resistencia de este sistema. Futuras investigaciones podrán beneficiarse de las construcciones generadas y las células transfectadas al valorar los efectos de viabilidad en cocultivo, entre ellas y con células cotransfectadas.



## IX. Bibliografía

- Addgene. (n.d.). pcDNA3-EFGP. Retrieved from <https://www.addgene.org/13031/>
- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L., & Goldstein, S. A. N. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, *99*(3), 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81659-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81659-1)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Cells and genomes. In *Molecular biology of the cell* (6th ed., pp. 1–41). Garland Science.
- Alsuhaím, H., Vojisavljevic, V., & Pirogova, E. (2012). Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *IFMBE Proceedings*, *39*, 48–51. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29305-4>
- Arnold, W. N. (2018). Introduction. In Wilfred Niels Arnold (Ed.), *Yeast cell envelopes: Biochemistry, biophysics, and ultrasctructure* (pp. 1–3). CRC Press.
- ATCC. (2019a). MCF-12F (ATCC® CRL-10783™). Retrieved from ATCC website: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-10783.aspx#generalinformation>
- ATCC. (2019b). MCF7 (ATCC® HTB-22™). Retrieved from ATCC website: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#generalinformation>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2003a). *Escherichia coli*, plasmids, and bacteriophages. In *Current protocols in molecular biology* (pp. 1.0.1-1.16.21). John Wiley & Sons, Inc.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2003b). Preparation and analysis of DNA. In *Current protocols in molecular biology* (pp. 2.0.1-2.12.7). John Wiley & Sons, Inc.
- Barnett, J. A. (1998). A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789-1850. *Yeast*, *14*(16), 1439–1451. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z)

- Barr, P. J. (1991). Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*, *66*(1), 1–3. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90129-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90129-M)
- Bauer, A. W., Perry, D. M., & Kirby, W. (1959). Single-disk antibiotic-sensitivity testing staphylococci. *A. M. A Archives of Internal Medicine*, *104*(208–216).
- Bevan, E. A., & Makower, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, *1*, 202–203.
- Biggin, P. C., Roosild, T., & Choe, S. (2000). Potassium channel structure: Domain by domain. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*(4), 456–461. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00114-7)
- Boone, C., Bussey, H., Greene, D., Thomas, D. Y., & Vernet, T. (1986). Yeast killer toxin: Site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component. *Cell*, *46*(1), 105–113. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90864-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90864-0)
- Bortol, A., Nudel, C., Fraile, E., de Torres, R., Giulietti, A., Spencer, J. F. T., & Spencer, D. (1986). Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *24*(5), 414–416.
- Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Bum, V., Smith, A., & Tipper, D. J. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*, *36*(3), 741–751. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90354-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90354-4)
- Bostian, K. A., Hopper, J. E., Rogers, D. T., & Tipper, D. J. (1980). Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell*, *19*(2), 403–414. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90514-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90514-0)
- Bostian, K. A., Jayachandran, S., & Tipper, D. J. (1983). A Glycosylated Protoxin in Killer Yeast: Models for Its Structure and Maturation. *Cell*, *32*, 169–180. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90507-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90507-x)
- Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, *189*(3), 695–704.

<https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>

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*, 298(4), 868–875. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90391-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90391-x)

Carboni, G., Fancello, F., Zara, G., Zara, S., Ruiu, L., Marova, I., ... Mannazzu, I. (2020). Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108883. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108883>

Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>

Chen, Y. (2012). Calcium Phosphate Transfection of Eukaryotic Cells. *Bio-101*, 1(7), E86. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.86>

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line : 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.

Cooper, G. M. (2019). Introduction to cells and cell research. In *The cell. A molecular approach* (8th ed., pp. 3–43). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9917/>

DBH. (2014). *AAV triple transfection (OTTTC)*.

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.

Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D. Y., & Bussey, H. (1987). Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and  $\alpha$ -factor precursor processing. *Cell*, 50(4), 573–584. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90030-4)

- Eiden-plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F., & Schmitt, M. J. (2004). Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 961–966. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.961>
- El-Banna, A. A., Malak, A. E., & Shehata, M. G. (2011). Yeasts Producing Killer Toxins : An Overview. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, *8*(2), 41–53.
- Esteban, R., & Wickner, R. B. (1986). Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: In vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(5), 1552–1561.
- Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, R. A., & Fincher, G. B. (2009). Heterologous and cell-free protein expression systems. In J. P. Gustafson, P. Langridge, & D. J. Somers (Eds.), *Plant genomics. Methods and protocols* (Vol. 513, pp. 175–198). <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8>
- Feldman, H. (Ed.). (2012). Yeast cell architecture and functions. In *Yeast. Molecular and cell biology* (2nd ed., pp. 5–23). Wiley-Blackwell.
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology*, *1258*, 1–24. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1)
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. In E. García-Fruitós (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1258, pp. 1–24). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5>
- 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>
- Fredericks, L. R., Lee, M. D., Eckert, H. R., Li, S., Shipley, M. A., Roslund, C. R., ... Rowley, P. A. (2021). *Vaginal Isolates of Candida glabrata are Uniquely*

- Susceptible to Ionophoric Killer Toxins Produced by Saccharomyces cerevisiae* . (May). <https://doi.org/10.1128/AAC.02450-20>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, P. M., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*, 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Fujisawa, M., Tokuda, M., Morimoto-Yamashita, Y., Tatsuyama, S., Arany, S., Sugiyama, T., ... Torii, M. (2012). Hyperosmotic stress induces cell death in an odontoblast-lineage cell line. *Journal of Endodontics*, *38*(7), 931–935. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.023>
- García Cortés, V. (1995). Los hongos. In *Introducción la microbiología* (2nd ed., pp. 83–120). Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=K\\_ETVnqnMZIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=K_ETVnqnMZIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false)
- Garcia, J., Costa, V. M., Carvalho, A., Baptista, P., Guedes de Pinho, P., Bastos, M. de L., & Carvalho, F. (2015). Amanita phalloides poisoning: mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology*, *86*, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.008>
- 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*(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), E345. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>
- Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2020). Analysis of yeast killer toxin K1 precursor processing via site-directed mutagenesis: implications for toxicity and immunity. *MSphere*, *5*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00979-19>
- Giesselmann, E., Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Production of fluorescent and cytotoxic K28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, *16*, 228.

<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0844-0>

- Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among Yeasts. In G. Peter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. (pp. 197–220). [https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_10)
- Gómora Martínez, J. C., & Fernández de Miguel, F. (2010). Canales iónicos: función y estructura. In M. L. Fanjul & M. Hiriart (Eds.), *Biología funcional de los animales II* (pp. 40–85). Siglo XXI.
- Goto, K., Fukuda, H., Kichise, K., Kitano, K., & Hara, S. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *55*(8), 1953–1958.
- Goto, K., Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T., & Hara, S. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(4), 979–984.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, *36*(2), 116–117. <https://doi.org/10.4103/JOC.JOC>
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., & Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(4), 1264–1300.
- Guyard, C., Dehecq, E., Tissier, J., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Cailliez, J., & Menozzi, F. D. (2002). Involvement of  $\beta$ -Glucans in the Wide-Spectrum Antimicrobial Activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 Killer Toxin. *Molecular Medicine*, *8*(11), 686–694.
- Heintel, T., Zagorc, M. J., & Schmitt, T. (2001). Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*, 165–172. <https://doi.org/10.1007/s002530100633>
- Hutchins, K., & Bussey, H. (1983). Cell Wall Receptor for Yeast Killer Toxin: Involvement of (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -d-Glucan. *Journal of Bacteriology*, *154*(1), 161–169.
- Huttu, M., Turunen, S., Sokolinski, V., Tiitu, V., Lammi, M., & Korhonen, R. K. (2012). Functional of medium and temperature on cellular responses in the superficial zone of hypo-osmotically challenged articular cartilage. *Journal of Functional Biomaterials*, *3*, 544–555. <https://doi.org/10.3390/jfb3030544>

- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- Invitrogen. (2010). *pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+)* *pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)*. *User Manual*. Retrieved from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcdna3\\_1\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcdna3_1_man.pdf)
- Izgü, F., & Altınbay, D. (2004). Isolation and Characterization of the K5-Type Yeast Killer Protein and Its Homology with an Exo-  $\beta$  -1 , 3- glucanase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68(3), 685–693. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.685>
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (1998). Characterization of an Exo-  $\beta$  -1 , 3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K , Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples. *Phytopathology*, 88(4), 335–343.
- Kagan, B. L. (1983). Mode of action of yeast killer toxins: Channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*, Vol. 302, pp. 709–711. <https://doi.org/10.1038/302709a0>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Kaufman, R. J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Molecular Biotechnology*, 16, 151–160. <https://doi.org/10.1385/MB>
- 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, 690–695. <https://doi.org/10.1038/376690a0>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection : the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kinal, H., Park Chung-Mo, Berry, J. O., Koltin, Y., & Bruenn, J. A. (1995). Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: Evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell*, 7(6), 677–688. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.6.677>
- Lin, C., Huang, Z., Wen, W., Wu, A., Wang, C., & Niu, L. (2015). Enhancing Protein

- Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLoS Genetics*, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123562>
- Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., ... Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*, 5(4767). <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
- Lobato Tapia, C. A. (2019). Resistencia a antibióticos: cuando nuestro armamento se torna ineficiente. *Revista Digital Universitaria*, 20(5).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Diversidad de los organismos eucariotas. In *Brock, Biología de los microorganismos*. (14th ed., pp. 583–608). Pearson.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 369–400.
- Makower, M., & Bevan, E. A. (1963). The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, 1, 202.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., ... Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(5), 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., & Peinado, J. M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological Research*, 156, 387–391. Retrieved from [https://pdf.sciencedirectassets.com/273181/1-s2.0-S0944501300X00195/1-s2.0-S094450130470052X/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEKf%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIARKCYQM9moPu2rKeZsLxBG6OoCza4IJN N0kkQIZVLTCAiEAKqWZzJAAgoYhPeGnJ1HYN4PFIGLd13fkA%2FpcXsCAKREq2wQIsP%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FARAEGgwwNTkwMDM1NDY4NjUiDOSZhfvl87bcxtu%2BjSqvBlj0HWfeqK4zUFMTAgGtMGshpCt1xPPm%2FRldxvIGpehFbOn3gYvzpeYgpFVEntK3vB1gfhGoTYTailMXEH9](https://pdf.sciencedirectassets.com/273181/1-s2.0-S0944501300X00195/1-s2.0-S094450130470052X/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEKf%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIARKCYQM9moPu2rKeZsLxBG6OoCza4IJN N0kkQIZVLTCAiEAKqWZzJAAgoYhPeGnJ1HYN4PFIGLd13fkA%2FpcXsCAKREq2wQIsP%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FARAEGgwwNTkwMDM1NDY4NjUiDOSZhfvl87bcxtu%2BjSqvBlj0HWfeqK4zUFMTAgGtMGshpCt1xPPm%2FRldxvIGpehFbOn3gYvzpeYgpFVEntK3vB1gfhGoTYTailMXEH9)



e76XT%2BF8FHplYR1PiEUVKKGMtu039GkZrpUe6rCEybMj832aa3XzU8gU  
%2BHreJClfzH23UhFFBEEedEKVQxAKsHq14Owr95fEWFx9QkJdAFkZs4FcO  
S%2FUmwayxdqGz7cyOOnLtPdbNPISTjSyGbvIzxx4yiPQUAWplSySeXhGQ9  
9Bx%2B%2FIKcxH3F2rSG%2BtIDMbxNrrDqriDnxOXI12cNaGoRoNsmaoqSZ  
MSS35gGPwHyhp%2BusRzkHDOO61%2BKZqWSvRyGNn%2BUYHXyqYQ  
O05fBMXYefo72%2FP6CiOt%2FKwNk70AZUpvUfwTyXluSFxCPwLZK1DD7  
B5tnKBS0jS%2FbxK9fHh7C1BKsGNqV0y85qeauqnF3t1ykJJlwl4dlpqs3NWv  
GonCyghm1S990RpWaDNIJV%2FnhMLP2ANzgXrXhp4l6ZQfTzTf1oPzBATD  
MxVILSBv789PhjzhiGMO8uEtmSbUCs7rFTQPfbDgxUFjMaLKs93xDGCSdC  
Ara5ulpAC8HSidmrRElXhrD8ScN5pAlpUb%2F3p%2FK9GEk5oxL8QsZhUak  
mMkzbJ9k2KpZZpkOIAulPhrVH%2FpkIwPqkyGy7jqAg7vtlek%2BiHMpS%2  
FoNr7u4ulEuGncVftERAjHPOYGGWM4dNm%2FtEjAtn9RbYbWo47pxmNyu  
HmAWVgw3MGplQY6qQGtFgeeG%2FqQGe0SoLizKvLyxztUMTBveEwflz7zb  
Y15WUYbObT7t4YNmRe8A8B0GaxK7qhvmaT6bDgJmE0t8s3ZFxbi92yKJx6  
pRBe3uKUaMY19LyOnDh7f1wWLTsxeNhgHtQ1Fmda6Bg6HHB2lww8p6wSN  
Ti0aV1TMX8Ghh1x45Ostw7DIiKiVzWM1HI2vH%2F%2BMJTKEs7XenpeHUL  
xVNI%2Bjvx3HnfeWjv0V&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-  
Date=20220615T225047Z&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-  
Expires=300&X-Amz-  
Credential=ASIAQ3PHCVTYQ2WJOZVB%2F20220615%2Fus-east-  
1%2Fs3%2Faws4\_request&X-Amz-  
Signature=ef332f23d7fa7a5c7b02b44b8c3ca79d27d1b34e87210e3b98edd9e  
c82b8f99e&hash=1310dbc2e1b8f34c4f122a623ecc64d30adc0fd619a1a5ddc5  
56527ddb31b02e&host=68042c943591013ac2b2430a89b270f6af2c76d8dfd0  
86a07176afe7c76c2c61&pii=S094450130470052X&tid=spdf-49ae3e72-df25-  
4779-b60d-  
5d6fee29885c&sid=76f8ff8783a2b84e71895d657d18178d780fgxrqa&type=cli  
ent&ua=4d570500040303000f0053&rr=71bedddcae4fecbf

Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>

- Mathie, A., Veale, E. L., & Holden, R. G. (2021). Heterologous expression of ion channels in mammalian cell lines. In M. Dallas & D. Bell (Eds.), *Patch clamp electrophysiology. Methods in molecular biology* (pp. 51–65). Humana Press.
- Melvydas, V., Bružauskaitė, I., Gedminienė, G., & Šiekštelė, R. (2016). A Novel *Saccharomyces cerevisiae* Killer Strain Secreting the X Factor Related to Killer Activity and Inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 Killer Toxins. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0589-1>
- Mensah, T. A., & Ayorkor Tagoe, S. M. (2018). Measurement of yeasts growth using spectrophotometer. In *Experiment findings* (pp. 1–10). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15418.03527>
- Mohamudha Parveen, R., & Ayesha Begum, J. (2010). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive yeast and fungal pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *3*(1), 127–129.
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, *3*, 588–611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>
- National Human Genome Research Institute. (2019). Clonación. Retrieved from Clonación website: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Clonación>
- O'Connell, A. D., Morton, M. J., & Hunter, M. (2002). Two-pore domain K<sup>+</sup> channels - Molecular sensors. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1566*(1–2), 152–161. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00597-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00597-7)
- Ochigava, I., Collier, P. J., Walker, G. M., & Hakenbeck, R. (2011). Williopsis saturnus yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *99*(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9524-3>
- Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in Physiology*, *7*(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00300>
- Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugelavicius, R., & Bamford, D. H.

- (2016). K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 16(2), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>
- Palfree, R. G. E., & Bussey, H. (1979). Yeast Killer toxin: purification and characterisation of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 93, 487–493.
- Palpacelli, V., Ciani, M., & Rosini, G. (1991). Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 84). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04572.x>
- Pauley, R. J., Paine, T. J., & Soule, H. D. (1993). *Patent No. 5,206,165*. United States.
- Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F., & Morace, G. (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia*, 96(2), 103–107. <https://doi.org/10.1007/BF00436668>
- Promega Corporation. (2019). *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*.
- Ramírez-Villarreal, J. (2018). *Estudio de la relación estructura-función de la toxina Killer (K1) de Saccharomyces cerevisiae en TOK1 y sus posibles homólogos en microorganismos de importancia biomédica*.
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12, 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rapley, R. (2010a). Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed., pp. 138–194). Cambridge University Press.
- Rapley, R. (2010b). Recombinant DNA and genetic analysis. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed., pp. 195–262). Cambridge University Press.
- Rivera-de-Torre, E., Rimbault, C., Jenkins, T. P., Sørensen, C. V., Damsbo, A., Saez, N. J., ... Laustsen, A. H. (2022). Strategies for heterologous expression, synthesis, and purification of animal venom toxins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811905>

- Robles, J., & Doers, M. (1994). pGEM®-T vector systems troubleshooting guide. *Promega Notes*, 45, 19–20. Retrieved from <https://wenku.baidu.com/view/2bcdffff910ef12d2af9e754.html?re=view>
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1822–1832. <https://doi.org/10.1128/AEM.02501-10>
- Saldaña, C., Díaz-Muñoz, M., Antaramián, A., González-Gallardo, A., García-Solís, P., & Morales-Tlalpan, V. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells express ryanodine receptor type 1: functional characterization and subcellular localization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323(1–2), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9962-7>
- Saldaña, C., Naranjo, D., Coria, R., Peña, A., & Vaca, L. (2002). Splitting the two pore domains from TOK1 results in two cationic channels with novel functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4797–4805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107957200>
- Sandoval Rodríguez, A. S., Mena Enríquez, M., & Márquez Aguirre, A. L. (2013). Vectores de clonación y expresión. In A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez, & J. S. Armendáriz Borunda (Eds.), *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (1°, pp. 127–138). McGraw Hill.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., & Marquina, D. (2009). PMKT2 , a new killer toxin from *Pichia membranifaciens* , and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155(2), 624–634. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023663-0>
- Schmitt, M. J. (1995). Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Molecular and General Genetics*, 246, 236–246.
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>

- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schönig, I., & Tipper, D. J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, 142, 2655–2662.
- Selitre, C. P. (2001). Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883–2894. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001>
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N., & Goldstein, S. A. N. (2001). Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. In *Cell* (Vol. 105).
- Somers, J. M., & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetical Research*, 13(1), 71–83. <https://doi.org/10.1017/S0016672300002743>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416.
- Stratford, M. (1994). Another brick in the wall ? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast*, 10(13), 1741–1752. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/yea.320101307>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA*, 50(1), 20–28.
- Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Lin, S., Yu, G., & Yang, S. (2018). Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 365, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny038>
- Thermo Fisher Scientific. (2015). *Anza™ Restriction Enzyme Cloning System* (No. MAN0014593).
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (No. MAN0012876).

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019a). Microbial growth. In *Microbiology: an introduction* (13th ed., pp. 151–177). Pearson.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019b). The eukaryotes: fungi, algae, protozoa, and helminths. In *Microbiology: an introduction* (13th ed., pp. 323–360). Pearson.
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. In *Desk encyclopedia of microbiology* (2nd ed., pp. 1174–1187). Academic Press/Elsevier.
- Walker, Graeme M. (1998). Introduction to yeasts. In Graeme M Walker (Ed.), *Yeast physiology and biotechnology* (1st ed., pp. 1–10). John Wiley and Sons.
- Walker, J. (2010). Protein structure, purification, characterisation and function analysis. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed., pp. 300–351). Cambridge University Press.
- Wickner, R. B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Microbiology*, 46(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002023>
- Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 51(1), 115–126.
- Young, T. W. (1981). The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 87(5), 292–295. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb04039.x>
- Yu, X., Geng, W., Zhao, H., Wang, G., Zhao, Y., Zhu, Z., & Geng, X. (2017). Using a commonly down-regulated cytomegalovirus (CMV) promoter for high-level expression of ectopic gene in a human B lymphoma cell line. *Medical Science Monitor*, 23, 5943–5950. <https://doi.org/10.12659/MSM.906240>
- Zhou, A., Jiang, X., & Xu, X. (1997). Improved alkaline lysis method for rapid isolation of plasmid DNA. *BioTechniques*, 23(4), 592–594. <https://doi.org/10.2144/97234bm06>
- Zhu, Y., Kane, J., Zhang, X., Zhang, M., & Tipper, D. J. (1993). Role of the  $\gamma$  component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. *Yeast*,

9(3), 251–266. <https://doi.org/10.1002/yea.320090305>

Zhu, Y., Zhang, X., Cartwright, C. P., & Tipper, D. J. (1992). Kex2-dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Molecular Microbiology*, 6(4), 511–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01496.x>

## X. Anexos

### 10.1 Secuencia de K1

```
ATGACGAAGCCAACCCAAGTATTAGTTAGATCCGTCAGTATATTATTTTCATC
ACATTACTACACCTAGTCGTAGCGCTGAACGATGTGGCCGGTCCTGCAGAAA
CAGCACCAGTGTCACTACTACCTCGTGAAGCGCCGTGGTATGACAAGATCTG
GGAAGTAAAAGATTGGCTATTACAGCGTGCCACAGATGGCAATTGGGGCAAG
TCGATCACCTGGGGTTCATTCGTAGCGAGCGATGCAGGTGTAGTAATCTTTG
```

GTATCAATGTGTGTAAGAAGCTGCGTGGGTGAGCGTAAGGATGATATCAGTAC  
GGACTGCGGCAAGCAAACACTTGCTTTACTAGTCAGCATTTTTGTAGCAGTTA  
CATCCGGCCATCATCTTATATGGGGTGGTAATAGGCCGGTGTGCGCAGTCAGA  
TCCTAATGGCGCTACCGTTGCTCGTGTGACATTTCTACTGTGCGCAGACGGG  
GATATTCCACTGGACTTTAGTGCGTTGAACGACATATTAATGAACATGGTATT  
AGTATACTCCCAGCTAACGCATCACAATATGTCAAAGATCAGACACAGCCGA  
ACACACGACAAGTTTTGTAGTGACCAACAACACTACTTCTTTGCATACCGACC  
TGATTCATCATGGTAATGGAACATATAACCACGTTTACCACACCTCACATTCCAG  
CAGTGGCCAAGCGTTATGTTTATCCTATGTGCGAGCATGGTATCAAGGCCTCA  
TACTGTATGGCCCTTAATGATGCCATGGTGTGCGGCTAATGGTAACCTGTATGG  
ACTAGCAGAAAAGCTGTTTGTAGTGAGGATGAGGGACAATGGGAGACGAATTAC  
TATAAATTGTATTGGAGTACTGGCCAGTGGATAATGTGCGATGAAGTTTATTGA  
GGAAAGTATTGATAACGCCAATAATGACTTTGAAGGCTGTGACACAGGCCACT  
AG

## 10.2 Secuencia de TOK1

TTGATAGAATATAAATAATACAACCTTCGTAATAATAATAATCGTTGGTATCATT  
GATGTGTGCTTTAGCAACAAGAGATGATATAATAAGCGAACAGTTTTTGT  
TATTTCCCTTACTGGAGCTCAGCCACATTAATGCGAGACGCAACGGGTGCAT  
AATATTGAAAGCGCATTACAGCAGAAAAATGCTTTCAGTATTTATTTGAGAT  
GCTGAATATAAATATTTAGAGAATACATCCGTAGTAGTCTACAGTAAGATATAA  
ATCAATGCTTCGGGTGTTTGTATATCAAAGTGTCTTTCTATGCTCACCCAAAA  
TTTTCTTTGCTTATAACTTTATAAAGCTCTTCGTCTTCTACTAGATTACCACT  
AATTCTTCTATGTTCTTGAAAAGCATCATAAAAGCAAATGAGGTTCAATTAAC  
GGGAACCTTGAGGGGCGTATCAGGTGATATCCAAAATTCGGGTCCGCGTGTGT  
ACTCCTCAATATCTGTAATGTTCTCAAATGTAGTTTATGAATGTACGACCAGT  
CGGAAAACTAAGTGTGTAATCTTTATCCGCCAGACATATCCGATGTAGTTTTT  
TGACGGCTTTAAGTAGCTCTTGCAAGTTCCTTAAATTACAGGTCCCCGAGTCC  
TGTAGTGCATATTCAGCAGAAAGAAACATATTCTAGAGGAAGTATTCCTCTGG  
GCTAGATGCTTTTGATAATGAAGAAAATGATTCTTGCAAGGCTTGCAAGGAGGG  
ATGTCACTCCAGAATCATTCTTCTGAATTATTATCGTTGAATTCAGAAATTTG  
ACTGGATTGTGAGCTCGTTGTATTTTCTTCCAGATCACCATCAGCTGTGTGAG  
ATTCTTCGAAAATTTCTCCAGTGTTCCACCATAAAGGAAAGTGTCTTTGACGCC  
CATTA AAAACGATGGACTTGACTTTATTATTGAATGATTCACCGATCTTAATAT  
CCAGAGAAGTGGAAATGTCAAACAACAGATCACCGACTGTAGATAGGATAGC  
CCCCATTAATGGCACGGCTCCCAACGCCCAAATCACAAAAAAGCACGGCCT  
GCACCAGTCTTGGAGCATAGTCTCCGTATCCAATGGTTAATAAGCACAAAGAA  
ACAAAAGTAAATACAATTGAAGTACGACCAATTTTCTGCGAATTTGAATACAAG  
AGCTCCCAATAACCAAAAAGCCATGAAAATTGCAATAGTCACCGACAAAGAAA  
ACCAATGCTGCTTCCCTGAGGCCGTTTGTGCGATACACTTCATTAAGTCGAAC  
GCTTCCCTTTGAGATAAATTTTACTACTATCCATATAATGTTTCCACGATTTGG  
ACCTGCCTTTTTCACTCTGTGGAAAAAGAAAATTGGGCCAGAGGACTTTTGA  
ATGATGGATCTTGTGATAAACACTATTAACCCATCAAGACAACACCAGATAG  
CGAAAAGATTA AACCATGATTTTGGCGCCAACCGACTTGGGCAGGATGTCA  
CCTAGTCCCACGGTTAATAATGATACCGTGCAGAAATATAATGCATTTCCGTA



AGTGATGTGCAATAAACCGCTAACATACCCGCACCCCAAATCAACCATAAAG  
ACAATAGTACAGTGTATGCCATGATACTTCTTTCATTGGGCAAAAGGTTGAAC  
GTTGGAGGATATTTTCCTAATTTATATCCAATAAAATGTATTGTTAAAATAATGG  
TGCATACCAAATATAGACCAGAACTGATACAGGCAAACCAAATCCGATAGTC  
TACTGTAGATGCTGGGCATGTCATTCAAGGAGCATACAATCACGTCCACCAA  
AAGCATCCCTCCAGCTATTGTCCATCCTGTTATATTTATTAAGTAACTGAGATTTAAG  
ATACGTCAACTTCTTACTGAAATGTAGCATTAGTATAATATTTGACGTAAAACC  
CAGTACCAAAGAGATGATATTAACGGCAAAAATACCAGGAGGATCAAAAACCTG  
TCTTACTTGATTCATCAAACATCGGTGTCATTGCTTCGTGGATTTGTCACCA  
CGGAGTTGTTCTTTAAGGATCTCCATTTTTCAACTACACAGGCTATCGAGATA  
GTGTTAGCTACGGGACCCAAGCAGGCAGTAATCACAGGGAAATAGCATGAAA  
CCACAAACCAAAGACGAACAGTGTGAAGAAGGCTCTGCATTAATAACTA  
ACTCTTTCGTCCCGGAACCGCAATGCATCCTTTAGTTCCTCTGCAAGAACACC  
CTTAGCTTGCTTCGGTGTGTTGTTTGAATGAGAATCAACAGCCTGAGCTGAGC  
TCTCTTGCTCCACTGTCGCCATATTGCCATATCCAGCGTTTGTGGCAAAG  
CTGTTTCATGAACCTTGTCATATATAGAAATCGGTAAAATAAATACAAGAAAT  
ATGCTTTGTTATACTGCTAGAAAGGAGTGAAGACATCTGCTCACGATCTACGA  
GATGCGGCTATTTTTGATGGAAAAAGATACATAGGGTCAGGCATTTTTGCCAT  
ATTGAATAACCAAGATGGTACTGAGTACTCAGGTAATGTATATTACATTGAGTA  
CTTCACTTGTATACACAACCACTGCTTCGTATTGTATATCAAGTATCTAACTGT  
TGATAAACTACAACCTTCTCTTCAACCATAATGATAGCGCCGCTTAAAACATGC  
TAGGGTAACGAGACGCGAATGCGAAAAACTCCCAAAAAAACCAAACAAACAA  
AAGTGACAACAATTAGAACGATGCTGAAGAAGAATAGGAGCGAGTTTAGAGTT  
ACCTCCAGCTATCCTGATACTACTGCTTAGGCTACCTTCGCAGAGTCTCGATA  
AATTTGCAGTCGGCAAGATAAGAATATTTCTCTACAGCTTTTAGACAGCTTCT  
GTCCCTCTAGTTTCTTTTGGCCATCCATAATTGTACTCTGCACTTTGAGTATCAT  
TCCAATTTGATCTTTCTTCTACCGGTAAGGATAGCAA