



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

**“Seguimiento temporal de la interacción entre cepas *Killer* y  
cepas sensibles de *Saccharomyces cerevisiae* mediante  
fluorescencia funcional.”**

Tesis individual

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

Presenta:

María Guadalupe Martínez Hernández

Dirigida por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Querétaro, Qro. Septiembre, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Seguimiento temporal de la interacción entre cepas  
Killer y cepas sensibles de *Saccharomyces cerevisiae*  
mediante fluorescencia funcional.

**por**

María Guadalupe Martínez Hernández

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIC-246051



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología

“Seguimiento temporal de la interacción entre cepas *Killer* y cepas sensibles de *Saccharomyces cerevisiae* mediante fluorescencia funcional.”

Tesis individual

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

Presenta:

María Guadalupe Martínez Hernández

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez  
Presidente

Dra. Verónica Morales Tlalpan  
Secretaria

Dr. Juan Campos Guillen  
Vocal

Dr. Jorge Luis Chávez Servín  
Suplente

M. en C. Adriana González Gallardo  
Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Septiembre, 2023.  
México.

## **Dedicatorias**

A ustedes que constantes se encuentran en mis pensamientos. Siempre les llevo en mi corazón.

“Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.”

- Marie Curie.

## **Agradecimientos**

A mi familia por su apoyo y amor incondicional.

A mi madre, por todo su amor y compañía. Gracias por motivarme a seguir mis sueños, por apoyarme y guiarme en mi andar hacia ellos, y por ser una inspiración para volverlos realidad. No hay manera de describir lo agradecida que estoy por todo lo que haces por mí, ni de explicar todo el amor y toda la felicidad que significas en mi vida.

A mi hermana y mi hermano, Tania y Juve, por enseñarme a creer en mí y por ser un ejemplo de que todo se puede lograr con convicción. Agradezco cada momento compartido con ustedes y el conocer a su lado la complicidad, la amistad y la pureza del amor fraterno.

A mi padre, por su apoyo y cariño. Gracias por confiar en mí y apoyarme durante esta etapa de formación en mi vida; llevo conmigo recuerdos de felicidad a tu lado.

A Raúl, mi compañero de vida, por todo su amor, apoyo y amistad incondicional a lo largo de los años compartidos. Siempre has sido para mí una de las expresiones más sublimes del amor; atesoro cada momento vivido a tu lado. Gracias por siempre estar para apoyarme y motivarme a seguir adelante, por todos los sueños compartidos y metas por venir, por ser un pilar en mi vida y por ser para mí una fuente de inspiración constante.

A mis amigos y amigas, quienes también son mis colegas, por todos los momentos inolvidables a su lado. Gracias por permitirme crecer, aprender y vivir la belleza de la biología en su compañía, por enseñarme que la diversidad es tan exuberante tanto en la naturaleza como en las personas, y que siempre hay un lugar en dónde uno puede sentirse como en familia. Les llevo en mi corazón con gran cariño.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez, por abrirme las puertas de su equipo de trabajo y por confiar en mí. Agradezco infinitamente todas las pláticas y consejos recibidos, sus asesorías y su acompañamiento en el desarrollo de este trabajo y en el camino de la biología.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan, por toda su valiosa ayuda y paciencia en cada experimento realizado. Por recibirme como parte del equipo de trabajo y por siempre ayudarme a resolver dudas y buscar soluciones alternativas, y también, por compartir conmigo la emoción y la pasión por la ciencia.

A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica UNAM, Juriquilla, por los recursos brindados al proyecto y por su disposición a ayudar en lo necesario.

A mis sinodales por su asesoramiento y ayuda para mejorar este trabajo.

Al financiamiento del proyecto otorgado por SEP-CONACYT Ciencia Básica número A1-S-26966.

Al CONACYT LAVIS-UAQ y al Laboratorio de Biofísica de Membranas UAQ, por el espacio brindado para llevar a cabo los experimentos que conforman este trabajo.

Al FONDEC 2022, por el apoyo en el desarrollo del presente proyecto.

A Alexandra Elbakyan, la “Robin Hood de la ciencia” y fundadora del proyecto Sci-Hub, por su invaluable trabajo y lucha para hacer accesible el conocimiento científico de manera gratuita y sin restricciones.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Antecedentes</b> .....	5
<u>Sistema <i>Killer</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	5
<u>Toxina <i>Killer K1</i> y su mecanismo de acción</u> .....	6
<u>Interacción de competencia en el fenómeno <i>Killer</i></u> .....	8
<u>Genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	11
<u>Vectores virales en la modificación genética de células eucariotas</u> .....	12
<u>Proteínas fluorescentes y su importancia en estudios biológicos</u> .....	14
<b>Justificación</b> .....	16
<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>Objetivos</b> .....	17
<u>General</u> .....	17
<u>Particulares</u> .....	17
<b>Metodología</b> .....	18
<u>Experimentos microbiológicos</u> .....	18
<u>Condiciones de cultivo</u> .....	18
<u>Producción de <i>K1</i></u> .....	18
<u>Obtención del lentivirus</u> .....	19
<u>Infección de la cepa 5x47 con el vector lentiviral CMV GFP Puro</u> .....	20
<u>Ensayos de competencia en placa</u> .....	21
<u>Seguimiento de la fluorescencia funcional y análisis de imágenes</u> .....	21
<u>Análisis estadístico</u> .....	22
<u>Consideraciones bioéticas</u> .....	23
<b>Resultados</b> .....	24
<u>Expresión de GFP en levaduras sensibles</u> .....	24

<u>Modificación de la respuesta del efecto <i>Killer</i> en células con expresión de GFP</u>	25
<u>Seguimiento de la fluorescencia en pH determinante para la actividad de la toxina <i>K1</i></u>	31
<u>Observación de crecimiento celular en el halo de inhibición</u>	36
<b>Discusión</b>	36
<b>Conclusiones</b>	40
<b>Perspectivas</b>	41
<b>Referencias</b>	42
<b>Apéndices</b>	48

### Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Porcentajes de transfección de células sensibles 5x47 con GFP.	25
<b>Figura 2.</b> Experimentos de inhibición en placa del fenómeno <i>Killer</i> empleando levaduras expresando GFP en variación de pH.	27
<b>Figura 3.</b> Comportamiento general del efecto <i>Killer</i> y la distribución de los datos experimentales en los distintos tratamientos.	28
<b>Figura 4.</b> Clonas expresando GFP en experimentos realizados de competencia en placa.	30
<b>Figura 5.</b> Respuesta del efecto <i>Killer</i> en las clonas transfectadas con el lentivirus CMV GFP Puro frente a las distintas condiciones experimentales.	31
<b>Figura 6.</b> Variación en la intensidad de la fluorescencia relativa en las regiones de estudio y su comportamiento en las clonas seleccionadas.	35
<b>Figura 7.</b> Crecimiento celular en zona del halo de inhibición.	36



## Resumen

El fenómeno *Killer*, presente en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido estudiado por la interesante dinámica de competencia por interferencia que se presenta entre las cepas sensibles y productoras de la toxina, y por sus implicaciones en el entendimiento de los procesos de coevolución huésped-hospedero. Este organismo modelo constituye una de las herramientas biológicas más importantes para el conocimiento de diversidad de procesos que ocurren dentro de las células eucariotas, sin embargo, debido a su diminuto tamaño la identificación de las cepas requiere de técnicas de secuenciación genética para discernir entre sus fenotipos. Este trabajo tiene como finalidad generar la expresión de marcadores fluorescentes como mecanismo de identificación de las cepas de levaduras interactuantes en tiempo real, aumentando la eficacia del proceso de reconocimiento; así mismo analizar las variaciones en la fluorescencia funcional y determinar posibles modificaciones en el efecto *Killer* por la inserción de epítipo de marcaje. Para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), se utilizó el vector lentiviral CMV GFP Puro, mostrando una transducción exitosa en las células sensibles 5x47; el seguimiento de la fluorescencia se realizó empleando el microscopio de fluorescencia *Olympus MVX10* con una cámara XM10 del Laboratorio de Biofísica de Membranas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los resultados mostraron una modificación en la dinámica característica del fenómeno *Killer* en los experimentos de competencia en placa, sin embargo, no se identificaron diferencias significativas en el comportamiento de las levaduras expresando GFP y los controles en los valores medidos para el efecto *Killer*. Así mismo, los resultados referentes a la cuantificación de la fluorescencia presentan variaciones para cada una de las clonas (aumento/decremento), que estadísticamente no representan diferencias significativas entre las distintas clonas con el control, siendo que se requiere incrementar la expresión inicial de la GFP a porcentajes mayores del 50%.

**Palabras clave:** Levadura, toxina, *Killer*, proteínas fluorescentes, resistencia.

## **Abstract**

The *Killer* phenomenon found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, has been studied for the exciting dynamics of interference competition between sensitive and toxin-producing strains and for its implications in understanding host-host coevolution processes. This model organism constitutes one of the most critical biological tools for understanding the diversity of processes that occur within eukaryotic cells; however, due to its diminutive size, the identification of the strains requires genetic sequencing techniques to discern between their phenotypes. This work aims to generate the manifestation of fluorescent markers as a mechanism to identify interacting yeast strains in real-time, increasing the efficiency of the recognition process, as well as to analyze the variations in functional fluorescence and determine possible modifications in the *Killer* effect by inserting the marker epitope. The lentiviral vector CMV GFP Puro was used by the Green Fluorescent Protein (GFP) expression, showing successful transduction in 5x47 sensitive cells; the fluorescence tracking was performed using an *Olympus* MVX10 fluorescence microscope with an XM10 camera from the Membrane Biophysics Laboratory of the Autonomous University of Querétaro. The results showed a modification in the characteristic dynamics of the *Killer* phenomenon in the plate competition experiments; however, no significant differences were identified in the behavior of the GFP-expressing yeasts and the controls in the values measured for the *Killer* effect. Likewise, the results referring to the quantification of fluorescence present variations for each of the clones (increase/decrease), which statistically do not represent significant differences between the different clones with the control, being that it is required to increase the initial expression of GFP to percentages higher than 50%.

**Keywords:** Yeast, toxin, *Killer*, fluorescent proteins, resistance.

## Introducción

Las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* son un organismo modelo en el estudio de las células eucariotas, encontrando en ellas una herramienta invaluable y de gran accesibilidad a bajo costo para la investigación de los procesos biológicos que ocurren en organismos con mayor complejidad celular (Duina *et al.*, 2014). Con el descubrimiento de las proteínas fluorescentes los estudios relacionados al funcionamiento a nivel celular, molecular, bioquímico y fisiológico que acontecen dentro de las células, han tenido grandes avances gracias a las nobles cualidades que presentan estos epítomos, como lo son su capacidad autocatalítica sin requerimientos de moléculas adicionales para su formación y su baja toxicidad o alteración en los organismos marcados (Shimomura, 2009; Stepanenko *et al.*, 2008; Van Genechten *et al.*, 2021; Zimmer, 2002). Una técnica implementada para la expresión de proteínas fluorescentes es mediante constructos que tienen como base virus modificados, los cuales, además son muy utilizados en investigación para estudiar los mecanismos de acción de las proteínas y mutaciones puntuales en el genoma que derivan en enfermedades de importancia médica (Campeau *et al.*, 2009; Milone & O'Doherty, 2018); uno de estos vectores es el lentivirus CMV GFP Puro (658-5), el cual fue construido a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para el marcaje de células de mamífero (Campeau *et al.*, 2009), logrando ser expresado con éxito en levaduras sensibles de *S. cerevisiae* en el presente trabajo.

El sistema *Killer* se caracteriza por ser un evento de competencia por interferencia en donde las cepas productoras ( $K^+$ ) liberan al medio extracelular toxinas que inhiben el crecimiento de cepas sensibles ( $K^-$ ), generando un característico halo de inhibición (Boynton, 2019; Marquina *et al.*, 2002; McBride *et al.*, 2008). La capacidad *Killer* es producida por una doble coinfección viral persistente, localizada en el citoplasma de las levaduras: un virus *helper* (L-A) y un virus satélite (M) (Herring & Bevan, 1974; Schmitt & Breinig, 2006). Actualmente se tienen identificadas 4 tipos de toxinas *Killer* en *S. cerevisiae*: *K1*, *K2*, *K28* y *Klus* (Rodríguez-Cousiño *et al.* 2011; Schmitt & Breinig, 2002), de las cuales la toxina *K1*

es la más estudiada. Esta toxina interactúa en su forma madura (heterodímero  $\alpha$ - $\beta$ ) con los canales *TOK1* localizados en la membrana plasmática de las levaduras, promoviendo su apertura y ocasionando la pérdida de homeóstasis por la salida de iones de potasio que deriva en la muerte de las células sensibles (Ahmed *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2001), la cual se ve potenciada en valores de pH ácidos, idealmente pH 4.7 en donde alcanza su mayor actividad (Gier *et al.*, 2020; Molina-Vera, 2021); sin embargo, otro mecanismo de acción conocido para la toxina *K1* es la formación de poros intracelulares en la membrana plasmática en donde los componentes de la preprotoxina (pptoX) juega un papel elemental en la autoinmunidad de las levaduras *Killer* (Gier *et al.*, 2017). La producción de compuestos nocivos se encuentra grandemente diversificado en el grupo de los hongos (Boynton, 2019), y ahora se sabe que existen diferentes factores que median las interacciones competitivas entre los organismos involucrados como la estructura de los hábitats, la disponibilidad de recursos y la manera en que se encuentran distribuidos, las densidades poblacionales, así como las condiciones ambientales y la ploidía de las células (Boynton, 2019; Greig & Travisano, 2008; McBride *et al.*, 2008; Pieczynska *et al.*, 2016; Wloch-Salamon *et al.*, 2008).

Actualmente, y gracias al continuo estudio de los investigadores, existe un vasto conocimiento del fenómeno *Killer* y de cómo este se ve modulado ante distintos factores, sin embargo, la mayoría de los experimentos se han restringido a pruebas en laboratorio, dejando abierta la investigación *in situ* para conocer cómo se desarrolla la dinámica competitiva en ambientes naturales. A través del presente trabajo se busca generar alternativas a los mecanismos de modificación convencionales en *Saccharomyces cerevisiae*, para que, mediante el seguimiento de la expresión de proteínas fluorescentes se pueda realizar la diferenciación entre las cepas en competencia, posibilitando reconocer el comportamiento que sigue cada una de las cepas, así también determinar las posibles modificaciones generadas por la inserción del vector lentiviral y las variaciones obtenidas en la expresión de la GFP.

## **Antecedentes**

### Sistema *Killer* en *Saccharomyces cerevisiae*

El fenómeno *Killer* se encuentra ampliamente diversificado en hongos levaduriformes. Se caracteriza principalmente por la producción y secreción de toxinas letales por parte de las células *Killer* ( $K^+$ ). Las células productoras, al interactuar con las células sensibles o *Killer* - ( $K^-$ ) inducen una inhibición en su crecimiento. Sin embargo, también existen en la naturaleza, células reconocidas como neutrales (N, o también referidas como resistentes en la bibliografía) debido a que no manifiestan reacción a la toxina (Marquina *et al.*, 2002). De las especies conocidas en las que se presenta este evento, *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido la más estudiada; Bevan y Makower en el año de 1963 describieron el sistema *Killer* por primera vez (Bevan & Makower, 1963).

La capacidad de producir compuestos como las toxinas es el resultado de distintas estrategias empleadas por los organismos, por ejemplo, en diversos géneros de hongos, la producción de toxinas se debe a la incorporación de plásmidos lineales de DNA de cadena doble (dsDNA), o la incorporación de fragmentos de DNA libre, o bien, está codificada dentro de los cromosomas (Schmitt & Breinig, 2006). Para el caso específico de la levadura *S. cerevisiae*, la capacidad *Killer* es el resultado de una coinfección citoplasmática persistente de dos virus de RNA de cadena doble (dsRNA) los cuales pertenecen a la familia viral Totiviridae (Herring & Bevan, 1974; Schmitt & Breinig, 2006). Por un lado un virus satélite (M) que codifica a la preprotoxina *Killer* (pptox) y a sus determinantes de autoinmunidad; y por otro, el virus *helper* (L-A) que es responsable de la producción de la proteína viral Gag (acrónimo de “*Group-specific antigen*”, “Antígeno de grupo específico”) la cual es mediadora de los procesos capsoméricos y de la producción de otras proteínas virales estructurales, y así mismo, este segundo virus está a cargo de la codificación de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), siendo los

productos del virus *helper* indispensables en los procesos de replicación de ambos virus (Schmitt & Breinig, 2006).

Hasta la fecha se han identificado 4 tipos de toxinas en el sistema *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae*: *K1*, *K2*, *K28* y *Klus*, las cuales son sintetizadas por los virus ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28 y ScV-Mlus, respectivamente (Rodríguez-Cousiño *et al.* 2011; Schmitt & Breinig, 2002). Es importante mencionar que sí bien se tiene conocimiento de estas toxinas, los mecanismos de acción de cada una de ellas no han sido descritos por completo, sobre todo en lo que refiere a los sitios blanco de estas. Dentro de lo que se sabe de ellas, es que las toxinas *K1* y *K2* son parecidas en su mecanismo de acción ya que ambas inducen la salida de iones intracelulares de las células con las que interactúan; mientras que por otro lado, la toxina *K28* inhibe la síntesis de DNA de la célula huésped (Marquina *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 1996); en cuanto a *Klus*, actualmente no se cuenta con un mecanismo de acción descrito pero se ha logrado encontrar que esta toxina presenta 4 isotipos y la existencia de una variante del virus L-A, denominado L-A-lus (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013).

#### Toxina *Killer K1* y su mecanismo de acción

La estructura de la toxina proteica *K1* está conformada por cuatro subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), y en su forma madura corresponden a un heterodímero formado por las subunidades  $\alpha$ - $\beta$ , las cuales se encuentran estabilizadas por enlaces disulfuro (S-S). Esta proteína es la encargada de regular la citotoxicidad, pues en sí misma, es el componente que interactúa con el canal *TOK1* (“*Two Outwardly Potassium Channel*”, “Canal de Potasio con Dos Dominios de Poro en Tándem de rectificación saliente”) de las células sensibles (Ahmed *et al.*, 1999).

El canal *TOK1* es un canal iónico selectivo a potasio, su papel en la levadura es mantener la concentración interna de este ion mediante la corriente rectificadora de salida del mismo. En su estructura contiene 2 dominios P en tándem, que son los que conforman el poro; los poros están delimitados por 8 segmentos hidrofóbicos

enumerados de S1 al S8; *TOK* fue descrito como el primer integrante de una nueva familia de canales de potasio (Ketchum *et al.* 1995). Estos canales se encuentran localizados en la membrana plasmática de las levaduras y son el blanco molecular de la toxina *K1* (Ahmed *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2001).

A finales de los años 90's y principio de los años 2000, se demostró que la toxina *K1* actúa de forma externa, es decir, activa los canales *TOK1* ocasionando una corriente de salida de potasio que deriva en la muerte de las células sensibles (Ahmed *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2001). Se piensa que el mecanismo de acción a través del cual interactúan estas dos entidades consiste en la unión de la toxina *K1* en su forma madura, y mediante su subunidad  $\beta$ , al receptor 1,6- $\beta$ -D glucano de la pared celular de la levadura, y posteriormente la subunidad  $\alpha$  entra en contacto con los canales *TOK1* situados en la membrana plasmática promoviendo su apertura, y con ello, la salida de los iones de potasio (Sesti *et al.*, 2001).

En estudios posteriores se ha logrado demostrar que el efecto letal de la toxina *K1* no está restringido únicamente a la interacción mediante los canales *TOK1*, sino que esta proteína tiene la capacidad de inducir la formación de poros intracelulares en la membrana plasmática, y que un factor determinante en la autoinmunidad funcional por parte de las levaduras *Killer* se encuentra en los componentes de la preprotoxina (pptox), siendo que su toxicidad podría encontrarse particularmente en la subunidad  $\alpha$  (Gier *et al.*, 2017). Así mismo, mediante estos estudios se ha logrado determinar que Kre1p no juega un papel directo en la toxicidad ni inmunidad en la interacción presentada entre los fenotipos  $K^+$  y  $K^-$  como anteriormente había sido propuesto por Breinig y colaboradores (2002), dejando nuevamente abierta la incógnita del sitio específico con el que interacciona la subunidad  $\alpha$  de la toxina al entrar en contacto con la membrana plasmática de la levadura.

Una característica que presentan las toxinas *Killer* es que su actividad potencial estable se registra en ambientes con rangos de pH ácidos que rondan

entre valores de 4.0 a 5.0 (Magliani *et al.*, 1997; Marquina *et al.*, 2002; Boynton, 2019). En el caso de la toxina K1 el valor ideal en las condiciones de pH es a 4.7 (Chávez-Vega, 2023; Gier *et al.*, 2020; Molina-Vera, 2021; Trujillo-Barrientos, 2022), ya que en este valor es donde se observa un mayor efecto de la toxina sobre las células sensibles. Así como el valor de esta variable en el medio ha sido relacionada con la capacidad de acción de la toxina, también se ha propuesto que podría participar en la desestabilización del canal TOK1 (Saldaña *et al.*, 2002), por lo cual el valor del pH está siendo probado por el equipo de trabajo en el laboratorio como un factor determinante en la dinámica de interacción y competencia que se presenta en el fenómeno *Killer* (Molina-Vera, 2021).

#### Interacción de competencia en el fenómeno *Killer*

Entre los primeros estudios realizados referentes al daño ocasionado por la producción de compuestos con efectos nocivos por parte de unos microorganismos hacia otros, se encuentran los descritos en las bacterias. La interacción que se presenta entre los fenotipos productores de sustancias bactericidas y los susceptibles a ellas, han sido estudiados y han servido para sentar las bases de la investigación sobre las interacciones que acontecen en este tipo de dinámicas, siendo un importante punto de partida en la interpretación de lo que se observa en las levaduras productoras de toxinas, ya que ambos guardan similitudes en los principios de sus dinámicas. Estudios clásicos como los realizados por Chao y Levin (1981) con bacterias productoras de colicina; mecanismo alternativo de competencia a través de la interacción de toxinas, muestran que este fenómeno presenta características similares en otros grupos de microorganismos como en los hongos. La modificación en el crecimiento de las cepas sensibles generada por la liberación al medio extracelular de compuestos nocivos por parte de los organismos productores, genera ventajas selectivas en la competencia ante los demás microorganismos interactuantes, así como, que la estructura de los hábitats juega un papel de importancia en la evolución de los organismos (Boynton, 2019).



Los hongos con capacidad de producir toxinas han sido encontrados y aislados en una gran variedad de hábitats naturales, contando con presencia en las divisiones Ascomycota y Basidiomycota que integran el reino Fungi (Boynton, 2019), y representando porcentajes significativos dentro de las poblaciones (Starmer *et al.*, 1987; Wloch-Salamon *et al.*, 2008). Pese a ello, el papel ecológico y evolutivo de estos microorganismos y en sí, de las mismas toxinas y sus determinantes virales, no ha sido estudiado con amplitud. La mayoría de los estudios referentes al tema se encuentran limitados a trabajos realizados en laboratorios, que si bien nos permiten tener aproximaciones del comportamiento de estas dinámicas en la naturaleza y el rol que desempeñan en la estructura de las comunidades, aún existe un campo vasto para investigar el sistema *Killer in situ* en los ambientes naturales.

Los comportamientos de interacción competitiva, específicamente los de competencia por interferencia, se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, siendo el caso del mecanismo *Killer* un ejemplo de ello (Boynton, 2019; McBride *et al.*, 2008). Este mecanismo de competencia promueve la inhibición de uno de los organismos interactuantes por parte de otro, ocasionando así, una interferencia en su crecimiento y/o viabilidad (Boynton, 2019).

Diversos autores se han dedicado a realizar estudios para ayudar a la comprensión de lo que subyace bajo el fenómeno *Killer*. Como parte de los resultados de esos trabajos, se ha encontrado que la dispersión y disponibilidad de los recursos dentro de los ambientes median las interacciones competitivas que se dan entre las levaduras, a su vez, estas interacciones locales benefician el efecto *Killer* (Pieczyńska *et al.*, 2016; Wloch-Salamon *et al.*, 2008). Además, la producción de la toxina implica un beneficio respecto a su costo de producción, cuando esta se encuentra en concentraciones elevadas como resultado de densidades y frecuencias altas de células positivas a la infección viral en medios con presencia de individuos que actúen como competidores y como blanco de la toxina (Boynton, 2019; Greig & Travisano, 2008; Wloch-Salamon *et al.*, 2008). Asimismo, se ha

logrado determinar que las condiciones ambientales y la estructura de los hábitats desempeñan parámetros que impactan grandemente en la dinámica, siendo que los sitios estructurados y los rangos ácidos de pH promueven la aptitud física (*fitness*) del mecanismo *Killer* y mantiene la relación mutualista huésped-hospedero (Boynton, 2019; McBride *et al.*, 2008).

Las levaduras *Killer* han demostrado tener un gran potencial coevolutivo en laboratorio a dos niveles: 1) en la interacción que ocurre entre las cepas *Killer* ( $K^+$ ) y las cepas sensibles ( $K^-$ ), y 2) en la relación huésped-hospedero en las células portadoras de los componentes virales *Killer* (Pieczynska *et al.*, 2016). Los resultados encontrados en estudios recientes realizados por Gier y colaboradores (2020), sugieren que las toxinas *Killer* no sólo afectan a las células sensibles, sino que el aumento en la concentración extracelular de la toxina puede generar modificaciones en la capacidad de autoinmunidad de alguna de las células *Killer*. Estos eventos pueden afectar la secreción o favorecer la expresión de variantes de la toxina; y dichas variaciones se ha visto que podrían ser producidas por mutaciones dentro de las poblaciones de las cepas *Killer* como resultado de procesos evolutivos adaptativos no transitorios, además, se han observado modificaciones en la aptitud de las levaduras ante la existencia de presiones de selección adicionales dentro de las poblaciones de levaduras productoras de la misma toxina (Buskirk *et al.*, 2020). Si bien, estos procesos evolutivos están influenciados por factores ambientales y nutricionales, parecen ser una estrategia mediante la cual los organismos involucrados mantienen en sinergia la relación mutualista y/o aseguran su prevalencia en el medio (McBride *et al.*, 2008; Pieczynska *et al.*, 2016).

De igual manera, las levaduras con capacidades *Killer* han evidenciado ser muy importantes como factor modulador de la diversidad de las especies en las comunidades, y también que su presencia o ausencia impacta grandemente en la funcionalidad y estructura de los hábitats, desempeñando así, papeles como especies claves y dominantes (Boynton & Greig, 2016).

## Genética de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* son microorganismos unicelulares pequeños (aproximadamente de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que pertenecen al dominio Eukarya, por ello, han sido de gran importancia y ampliamente utilizados en la investigación como modelo de estudio para conocer diversos procesos celulares y moleculares que ocurren en las células eucariotas (Duina *et al.*, 2014). Convirtiéndose en el primer organismo eucarionte cuyo genoma fue secuenciado completamente, teniendo un total de 12,068 Kb contenidos en 16 cromosomas en su forma haploide y aproximadamente 6000 genes en total (Goffeau *et al.*, 1996).

*Saccharomyces cerevisiae* tiene tres tipos sexuales: a,  $\alpha$  y a/ $\alpha$ , mismos que son determinados por la presencia del tipo de apareamiento MAT (por sus siglas en inglés: *Mating Type*), y por dos loci adicionales HMRA y HML $\alpha$  conocidos como *cassettes* de tipo de apareamiento silencioso, los cuales funcionan como intermediarios en los procesos de interconversión en el tipo sexual mediante la interacción por recombinación homóloga con el locus MAT. Este proceso de cambio en el tipo sexual se da en la naturaleza en células madre homotáticas haploides que han sufrido más de una división mitótica, en donde se presenta de manera asimétrica el gen de la endonucleasa HO (“Homotalismo”, en su forma dominante), el cual se encuentra localizado en el cromosoma IV y cuya expresión depende del factor de transcripción Swi5 contenido en el núcleo celular, siendo el componente genético HO el que controla el patrón de linaje (Duina *et al.*, 2014; Haber, 2012; Herskowitz, 1988; Rine & Herskowitz, 1980).

La reproducción en esta levadura puede darse de manera asexual en células haploides a y  $\alpha$  (MATa y MAT $\alpha$ , respectivamente) y diploides a/ $\alpha$  (MATa/MAT $\alpha$ ) a través de procesos mitóticos en donde se produce la gemación de una célula madre para producir una célula hija de menor tamaño y con el mismo genotipo, o bien, de manera sexual por el apareamiento entre células haploides opuestas genéticamente a (MATa) y  $\alpha$  (MAT $\alpha$ ), cuya unión complementaria es mediada por la acción de los

factores  $a$  y  $\alpha$  los cuales activan la síntesis de proteínas que participan en el apareamiento, permitiendo una interacción feromonas-receptores, y así, originar una célula diploide  $a/\alpha$ ; MAT $a$ /MAT $\alpha$ . Estas células diploides tienen la capacidad de entrar en procesos meióticos de esporulación para producir 4 esporas contenidas en una ascospora, dos esporas con genotipo  $a$  y dos con genotipo  $\alpha$  (Duina *et al.*, 2014; Haber, 2012; Herskowitz, 1988), las cuales son estructuras de resistencia que se producen ante condiciones de estrés o por la deficiencia de nutrientes en el medio, preservando el material genético en espera de condiciones óptimas de germinación (Neiman, 2011). Así también, la reproducción en las levaduras de *S. cerevisiae* puede darse por homotalismo de la célula haploide ( $a$  o  $\alpha$ ) durante la gemación, en donde la célula hija (de segunda generación) experimenta la expresión del RNAm codificante del gen Ash1 (represor cuesta arriba la actividad de Swi5), permitiendo un cambio hacia el genotipo sexual contrario en la célula hija y cuya conjugación con la célula madre, origina una célula heterotálica diploide MAT $a$ /MAT $\alpha$  con la actividad HO reprimida (Haber, 2012).

McBride y colaboradores (2008), demostraron que la genética juega un papel importante sobre el comportamiento y capacidad del sistema *Killer*. Siendo que el *fitness* además de ser modificado siguiendo los gradientes de pH, también se ve influenciado por la ploidía de las células en competencia la cual podría tener distintas implicaciones en la respuesta a la toxina por parte de las cepas sensibles y en la capacidad de síntesis por parte de las cepas productoras. Siendo que las células diploides muestran ser más susceptibles a la toxina y con mayor capacidad de producción de toxina respecto a las haploides, por lo que la dinámica entre las cepas presenta modificaciones en las diferentes combinaciones posibles de interacción, y posiblemente también en la estrategia reproductiva empleada.

### Vectores virales en la modificación genética de células eucariotas

Una de las técnicas de modificación genética empleadas en distintos grupos de organismos consiste en inserción de secuencias de aminoácidos que codifican

o inhiben la síntesis de diferentes proteínas y/o de sus funciones para estudiar sus mecanismos de acción, así como para registrar y estudiar mutaciones puntuales en regiones específicas del genoma (Campeau *et al.*, 2009; Milone & O'Doherty, 2018). En este sentido, y de la mano con el uso de marcadores genéticos, se han llevado a cabo distintos estudios en los cuales se hace uso partículas virales para la inserción de secuencias genéticas de interés en organismos vivos. La generación de estos constructos, como en el caso particular del vector lentiviral CMV GFP Puro (658-5) de tercera generación, han sido desarrollados para estudiar la dinámica que acontece en células de mamíferos mediante fluorescencia, de igual manera, otras estructuras de modificación genética similares a esta han sido probadas con éxito en células de insectos y aves de corral (Campeau *et al.*, 2009).

Los lentivirus son un grupo de virus que pertenecen a la familia Retroviridae, la cual se encuentra clasificada en el grupo VI de Baltimore (Baltimore, 1971; Hulo *et al.*, 2009). Los retrovirus son virus envueltos que se caracterizan por presentar un RNA de cadena sencilla positiva que se replica mediante retrotranscripción (ssRNA-RT); dentro de su genoma se encuentran codificadas dos regiones LTR (“*Long Terminal Repeats*”, “Repeticiones Terminales Largas”) en los extremos 5' y 3' (Hulo *et al.*, 2009), las cuales favorecen la inserción de constructos de interés menores a 800 pb (Campeau *et al.*, 2009). Su mecanismo de unión con las células huésped ocurre en las membranas celulares a través de procesos de fusión mediados por glicoproteínas; posteriormente al cambio del ssRNA a dsDNA realizado por la retrotranscriptasa, el material genético viral entra al núcleo por los poros nucleares en donde se integra aleatoriamente como provirus en el genoma celular y pasa por procesos de transcripción generando RNA viral, el cual al ser traducido origina la síntesis de distintas proteínas virales fundamentales en el ciclo de vida del virus. Las nuevas partículas virales, se ensamblan en la membrana celular del huésped para ser liberadas mediante gemación (Hulo *et al.*, 2009).

A partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se han generado vectores lentivirales que posibilitan la modificación de células eucariotas lo cual ha

ayudado a generar avances en temas de relevancia para la investigación y terapia clínica génica (Milone & O'Doherty, 2018). De manera general, los vectores lentivirales presentan tres componentes estructurales indispensables en sus procesos de replicación: un plásmido de transferencia lentiviral que codifica al gen de interés (cDNA, gRNA o shRNA), el cual está flanqueado por las secuencias LTR, mismas que median su integración en el genoma viral y que pueden presentar delecciones en LTR 3' para que presente propiedades autoinactivantes después de integrarse, además de un plásmido de empaquetamiento (Gag-Pol y Rev) y otro que codifica la proteína de la envoltura viral (Env). Los vectores lentivirales de tercera generación presentan estos componentes contenidos en 4 plásmidos, lo cual incrementa la seguridad contra virus recombinantes debido a que el sistema de empaquetamiento se divide en un plásmido conteniendo la proteína viral Rev y otro conteniendo a Gag-Pol; además de presentar una sustitución de Tat, encontrada en los de vectores lentivirales de segunda generación, por la adición de un LTR 5' que se encuentra deletado y unido a un promotor heterólogo (Campeau *et al.*, 2009; Dull *et al.*, 1998; Milone & O'Doherty, 2018; Zufferey *et al.*, 1998).

### Proteínas fluorescentes y su importancia en estudios biológicos

El descubrimiento de las proteínas fluorescentes ha establecido una de las herramientas más importantes para el estudio de una gran variedad de procesos celulares, moleculares, fisiológicos y bioquímicos los cuales han ayudado a desentrañar poco a poco los secretos detrás de la maquinaria celular de la vida. A principios de la década de 1960, Osamu Shimomura llevó a cabo el descubrimiento y purificación de una proteína de 238 aa denominada como GFP (acrónimo de "*Green Fluorescent Protein*", "Proteína Verde Fluorescente") de la medusa *Aequorea victoria*, lo cual le valió el Premio Nobel de Química en el año 2008 en conjunto con Martin Chalfie y Roger Tsien por sus contribuciones a la expresión exitosa del cGFP en organismos vivos (1994) y por la generación de mutantes de la proteína verde fluorescente original que emiten diferentes colores (1994-1998), respectivamente (Shimomura, 2009).

Las proteínas fluorescentes (PF) se caracterizan principalmente por la emisión de distintivas luces fluorescentes a diferentes rangos de longitud de onda. Dentro de las ventajas que proporcionan las proteínas fluorescentes al ser utilizadas experimentalmente, se encuentra que son estables y que la formación de los cromóforos dentro del blanco de interés se da de manera independiente ya que estos no requieren de ningún tipo de cofactor, ni de enzimas adicionales o sustratos más allá del oxígeno y de la presencia de cationes, preferentemente  $\text{Ca}^{2+}$ , aunado a que, generalmente, su unión a las proteínas u organismos blanco no repercute en la función de las mismas ni genera alteraciones en los complejos celulares de los organismos (Shimomura, 2009; Stepanenko *et al.*, 2008; Zimmer, 2002).

Las proteínas mutantes generadas a partir de la GFP *wild-type* ofrecen ventajas frente a la proteína nativa, ya que estas no presentan complicaciones de plegado a 37° C, además de que muestran un incremento importante en la intensidad de fluorescencia que emiten y en su tasa de expresión en diferentes tipos celulares (Stepanenko *et al.*, 2008). Una de las proteínas mejoradas más empleadas, por las características expuestas anteriormente, es la EGFP (“*Enhanced Green Fluorescent Protein*”, “Proteína Verde Fluorescente Mejorada”) que es el resultado de la sustitución de dos aminoácidos en el genotipo de la GFP: Phe64 a Leu que resulta en una mejor tolerancia a temperaturas utilizadas en cultivos celulares (37° C) y en conjunto con la sustitución Ser65 a Thr genera un brillo entre 20 y 35 veces mayor que la proteína nativa (Cormack *et al.*, 1996); además esta proteína mejorada (EGFP) tiene una mayor estabilidad contra la desnaturalización generada por los pH ácidos. Cabe mencionar, que, si bien las propiedades de fluorescencia de las PF están influenciadas por el valor del pH del medio, la GFP nativa a valores de pH ácidos (entre rangos de pH 4.0 a 6.0) sufre un decremento en su actividad en un 50% debido a que favorece los procesos de desnaturalización y disminuye la capacidad de plegado (Stepanenko *et al.*, 2008).

Actualmente el repertorio de moléculas con propiedades fluorescentes es vasto y cuenta con cromóforos especializados para ciertos tipos celulares, así como

para ciertos grupos de organismos que son de particular interés en líneas de investigación médica y referentes al desarrollo de nuevos fármacos. Uno de los campos de aplicación de las proteínas fluorescentes es en el estudio del grupo de los hongos debido al alto nivel de conservación que existe entre las células fúngicas y las de los mamíferos, pues el estudio de estos organismos provee valiosa información sobre la dinámica que acontece en distintos eventos celulares en eucariotas, facilita el reconocimiento de interacciones a nivel molecular, celular y entre organismos, además de que permite llevar a cabo el mapeo de genes, así como identificar posibles sitios blancos de fármacos para el tratamiento de enfermedades, y a su vez, comprender lo que acontece detrás de procesos de mutagénesis que resultan en enfermedades como el cáncer (Van Genechten *et al.*, 2021).

### **Justificación**

El estudio del sistema *Killer* ha permitido conocer, de manera directa y con mucha accesibilidad, la dinámica que se presenta entre organismos cuyo mecanismo de interacción se basa en la competencia por interferencia, así como estudiar los procesos evolutivos en acción y la importancia de los factores abióticos como agentes reguladores en la modificación del comportamiento y la biología de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en las que se presenta este interesante fenómeno; además de permitir también, un acercamiento a las relaciones mutualistas huésped-hospedero proveyendo valiosa información para ampliar el conocimiento sobre las implicaciones de la presencia de los virus en las células eucariotas.

Una de las principales complejidades al trabajar con este microorganismo es su pequeño tamaño, que, al ser de dimensiones micrométricas, dificulta el reconocimiento de las cepas, haciendo necesario el uso de pruebas de secuenciación para distinguir entre ellas. En el presente trabajo se busca generar una alternativa en el proceso de diferenciación entre los fenotipos de las cepas del



sistema *Killer* de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el seguimiento de la fluorescencia funcional, permitiendo esto, visualizar con mayor efectividad y en tiempo real la dinámica de interacción y competencia que se presenta en este fenómeno, posibilitando obtener información sobre cómo se comporta el sistema *Killer* desde el punto de vista de la cepa *Killer* y de la cepa sensible, y pudiendo observar posibles eventos de interacción entre organismos que son promovidos bajo la recombinación y la formación de estructuras de resistencia.

### **Hipótesis**

La expresión de las proteínas fluorescentes en *Saccharomyces cerevisiae* facilitará el reconocimiento del fenotipo de las cepas del cultivo en competencia, haciendo seguimiento del marcador fluorescente.

### **Objetivos**

#### General

Efectuar la expresión de proteínas fluorescentes en *Saccharomyces cerevisiae* para visualizar la dinámica de interacción que se presenta en el fenómeno *Killer*.

#### Particulares

- Identificar el fenotipo expresado de las células en competencia de *Saccharomyces cerevisiae*, haciendo seguimiento del marcador fluorescente.
- Determinar las modificaciones en el efecto *Killer* en respuesta a las modificaciones genéticas inducidas por la inserción de la GFP mediante el vector lentiviral CMV GFP Puro.
- Analizar la dinámica de interacción del cultivo en competencia haciendo uso de la expresión de la fluorescencia funcional.

- Determinar las variaciones en la intensidad de la fluorescencia de las levaduras infectadas, haciendo seguimiento del marcador GFP.

## **Metodología**

### Experimentos microbiológicos

#### *Condiciones de cultivo*

Se utilizaron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* 5x47 (sensible; MATa/MAT $\alpha$  his1/+ trp1/+ ura3/+ [KIL-o], donada por la Dra. Rosa Esteban de la Universidad de Salamanca, España) y 42300 (*Killer*; MAT $\alpha$  Ade2/+ Thr1/+ sKi2-1/+ [KIL-k1], proveniente de ATCC (no. de catálogo 1382)). Las cepas fueron mantenidas en YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Para el crecimiento en placa se empleó YPD-Agar: YPD líquido con agar al 2.5%; las variaciones en los medios de siembra en YPD-Agar a pH 4.7 y pH 6.0 se realizaron empleando KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M como agente amortiguador, el ajuste de pH se realizó con ácido cítrico 1 M o KOH 1 M, según fuera el caso.

#### *Producción de K1*

Para la producción de toxina por parte de la cepa 42300 K<sup>+</sup>, las levaduras fueron crecidas a temperatura ambiente en medio YPD líquido con agitación de 120 revoluciones por minuto (rpm) durante 48 horas; posteriormente las células se recolectaron por centrifugación y para inducir la producción de toxina se empleó medio inductor (MI) el cual contiene: extracto de levadura 0.75%, peptona 0.5%, glucosa 1%, FeCl<sub>3</sub> 0.5x10<sup>-3</sup>%, MgSO<sub>4</sub> 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, KCl 0.08%, CaCl<sub>2</sub> 0.03%, glicerol 5.2% (Flegelová *et al.*, 2002; Gier *et al.*, 2019) (adaptados); el pH fue ajustado de acuerdo a lo descrito en la sección “Condiciones de cultivo”. La cantidad inicial de células *Killer* en MI fue de 200 mg/mL, los cultivos se colocaron en agitación de 120 rpm a temperatura ambiente durante 16 horas. Al finalizar este periodo se determinó el peso húmedo de las células en cultivo.

### *Obtención del lentivirus*

Brevemente, la generación de estas partículas se realizó en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México a partir de una doble transfección: el genoma a empacar y los plásmidos empaquetadores. En este caso el genoma a empacar está contenido en el plásmido pLenti CMV GFP Puro (A) obsequiado generosamente por Eric Campeau y Paul Kaufman (*Addgene* plasmid #17448; <http://n2t.net/addgene:17448>; RRID: *Addgene\_17448*), mientras que los plásmidos destinados a generar las proteínas empaquetadoras son: (B) pMDLg/pRRE (expresa la proteína HIV-1 Gag/Pol), (C) pRSV/REV (expresa la proteína HIV-1 Rev), y (D) pMD2.G (expresa la glicoproteína VSV). La producción de las partículas virales se realizó en células HEK293 (*Human Epithelial Kydney* clona 293). Las células fueron sembradas a baja densidad  $2.5 \times 10^6$  células en cajas Petri de 150 mm en medio DMEM (medio estándar en cultivo de tejidos de mamífero), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina. Las células fueron mantenidas en condiciones de cultivo rutinarias (37° C y 10% CO<sub>2</sub>), hasta que alcanzaron una densidad del 70% de confluencia. Dos horas antes del inicio de la transfección el medio fue retirado y reemplazado por 15 mL de medio DMEM sin antibióticos y con 5% de suero fetal bovino. A continuación se realizó: 1) la mezcla de los plásmidos (2 µg de A, 7.5 µg de B y C, y 5 µg de D), 2) se adicionó lo necesario de OPTI-MEM para llevar esta mezcla a 500 µL; el OPTI-MEM es un medio mínimo con los componentes esenciales y elementos traza que aumentan la eficiencia de la transfección, 3) a la mezcla se le agregaron 88 µL de polietilenimina (PEI; un polímero derivado de la etilenamina, que favorece la formación de complejos con el DNA, ingresa a la célula por endocitosis y puede liberar el DNA en el núcleo porque interactúa con las membranas nucleares). La mezcla de DNA, OPTI-MEM y polietilenimina, se agitó suavemente para permitir la formación de los complejos DNA-PEI y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de formación de los complejos, esta mezcla se agregó gota a gota a las cajas Petri,

anteriormente descritas. Se mezcló por agitación circular y se incubó por 16 horas en condiciones de cultivo rutinarias. Al finalizar el período de incubación con los DNAs, el medio fue reemplazado con DMEM normal amortiguado con 25 mM de HEPES, con lo cual el pH del ambiente se mantuvo constante por 48 horas. En este punto, la producción de virus por parte de las células comenzó y para obtenerlos se tomó el sobrenadante. Para obtener mayor cantidad de virus las cajas fueron inoculadas con 5 mL de DMEM y el segundo lote de virus fue colectado. Los sobrenadantes fueron filtrados con membranas de 0.22 micras y congelados hasta su uso o titulación.

#### *Infección de la cepa 5x47 con el vector lentiviral CMV GFP Puro*

Se realizó la transfección de las levaduras 5x47 (*K*; MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ ) de *Saccharomyces cerevisiae* siguiendo el protocolo “VVC - 3<sup>rd</sup> generation VSV.G pseudotyped lentiviral packaging protocol” publicado en internet por *Salk Institute for Biological Studies* (2015). Como mecanismo de transfección para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) se empleó el vector lentiviral CMV GFP Puro (658-5).

Para la infección viral de la cepa 5x47, se pusieron en contacto 1 mg de células en 5 mL de YPD líquido con 100  $\mu$ L de partículas del lentivirus CMV GFP Puro por 96 horas, al finalizar el tiempo de la incubación las células fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia *Olympus MVX10* con una cámara XM10 con el filtro selectivo para GFP; la infección inicial fue de más del 10% de las células. Posteriormente 100  $\mu$ L de células fueron sembradas en cajas de YPD agar, las cuales fueron esparcidas sobre la superficie de tal manera que se obtuvieron colonias individuales. La caja completa fue monitoreada en el microscopio con el filtro selectivo para GFP, y las colonias que mostraron mayor cantidad de fluorescencia fueron seleccionadas, nuevamente fueron resembradas en YPD agar para crecerlas individualmente. Posteriormente, cada clona se probó en ensayos de inhibición con la cepa *Killer<sup>+</sup>* como parte de los experimentos microbiológicos.

### *Ensayos de competencia en placa*

Se realizaron los experimentos correspondientes a la competencia entre las levaduras 5x47 transfectadas ( $K^-$ ; MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ ; GFP+) y las levaduras *Killer* 42300 ( $K^+$ ; MAT $\alpha$ ), así como con la toxina *K1*. Para ello, se realizó la siembra de un césped equivalente a 3 mg de células a manera de parches rectangulares de 3.12 cm<sup>2</sup> con ayuda de pipetas Pasteur de vidrio, de cada una de las distintas clonas seleccionadas de las levaduras 5x47 GFP+ transfectadas con el lentivirus y como controles negativos se establecieron parches de las células sensibles 5x47 sin transfectar dentro de las cajas con medio YPD-Agar con valores de pH 4.7 y pH 6.0. Sobre cada uno de los céspedes, se colocaron por separado, botones celulares de 2 mg de las levaduras 42300 y círculos de papel filtro (con diámetro de 0.5 cm) con 2 mg de la toxina *K1* producida en el MI. Las cajas se sellaron con *parafilm* y se mantuvieron a una temperatura constante de 27° C por un periodo de 24 horas.

### *Seguimiento de la fluorescencia funcional y análisis de imágenes*

La visualización de la fluorescencia de la GFP, emitida por las levaduras 5x47 transfectadas, se realizó empleando el programa *cellSens* para *Windows* y el microscopio de fluorescencia *Olympus MVX10* con una cámara XM10 del Laboratorio de Biofísica de Membranas de la UAQ, con el filtro selectivo para GFP. A partir de las imágenes obtenidas se cuantificaron los porcentajes de transfección con ayuda de *Image J*, utilizando el método de gradillas.

La captura de imágenes resultantes de la interacción entre las levaduras modificadas de la cepa sensible con la cepa *Killer* o con la toxina *K1* en los diferentes pH considerados, se realizó empleando el equipo y programa mencionados anteriormente, bajo parámetros de alta resolución. Posteriormente, y con ayuda del programa *Image J* para *Windows*, se evaluaron las dimensiones del área del halo de inhibición y el área correspondiente a los botones celulares sembrados de las células *Killer*, así como el ocupado por el círculo de papel filtro conteniendo a la

toxina *K1*. El valor resultante de la diferencia entre las mediciones corresponde al efecto *Killer* observado, mismo que se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto } \textit{Killer} = (\text{Área de inhibición}) - (\text{Área de botón } K^+ \text{ o Área de papel filtro}).$$

Para medir la diferencia en la intensidad de la fluorescencia relativa entre las distintas regiones de interés en las imágenes (césped de células *K<sup>-</sup>*, halo de inhibición, botón de células *K<sup>+</sup>*), se empleó la herramienta *Plot Profile* de *Image J*, la cual proporciona un gráfico de dos dimensiones que permite conocer el valor de las intensidades de los píxeles (*Gray Value*) en función de la distancia en la imagen analizada. Partiendo de los valores arrojados, correspondientes a los gráficos de dos dimensiones, se procedió a la identificación y cálculo de la media de las regiones de interés empleando gráficos de dispersión en el programa *Excel* para *Windows*; de esta manera, se obtuvo la compilación de los datos necesarios para los respectivos análisis estadísticos.

Los valores de la intensidad del césped de células *K<sup>-</sup>*, del halo de inhibición y del botón de celular *K<sup>+</sup>*, fueron representados mediante la herramienta *Surface Plot* de *Image J* para obtener una representación detallada de los experimentos de competencia en placa.

### Análisis estadístico

A partir de los datos recolectados en el programa *Excel* derivados del procesamiento de imágenes en *Image J* de los experimentos de inhibición en placa, se realizaron las pruebas estadísticas pertinentes en el programa *Past* 4.11. De igual manera, a través de dicho programa se generaron los gráficos correspondientes a los análisis realizados, los cuales posteriormente fueron editados en el programa de código abierto *Inkscape*, junto con las imágenes representativas de los experimentos.

Los datos recabados fueron sometidos a análisis de estadística descriptiva, así como a pruebas de normalidad para, a partir de los resultados, seleccionar la prueba estadística adecuada para analizar los datos conforme a los objetivos planteados. De acuerdo con lo anterior, para comparar el efecto *Killer* generado por las levaduras productoras 42300 *K<sup>+</sup>* y la toxina *K1* sobre los céspedes de las levaduras sensibles a pH 4.7 y pH 6.0 tras 24 horas de competencia en placa, se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Para determinar la significancia de la respuesta obtenida del efecto *Killer* entre las clonas seleccionadas con respecto al control 5x47 *wild-type* en las distintas condiciones experimentales, se realizaron las pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA) o no paramétricas (Kruskal-Wallis) para el análisis de los datos, según fuera el caso.

Los datos correspondientes a las variaciones de la intensidad en la fluorescencia en las regiones de interés (césped de células sensibles, halo de inhibición y botón celular de levaduras 42300), siguiendo lo establecido anteriormente, se sometieron a un análisis ANOVA para poder conocer las varianzas que se presentan entre las regiones a estudiar. En cuanto al análisis correspondiente a la comparación entre las magnitudes de la fluorescencia relativa (*Gray Value*) de las clonas seleccionadas resultantes del proceso de transfección y el control negativo (5x47 *wild-type*) a pH 4.7, también se realizó un análisis estadístico paramétrico (ANOVA) para poder determinar la existencia de diferencias significativas en la manifestación de la fluorescencia por parte de las levaduras portadoras de la GFP.

### Consideraciones bioéticas

Los procedimientos realizados en el apartado metodológico “Experimentos microbiológicos”, fueron realizados en el Laboratorio de Biofísica de Membranas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y en la Unidad de Proteogenómica Campus Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los residuos procedentes de los experimentos, así como los entes

biológicos y los diversos componentes empleados en las diferentes etapas de crecimiento y mantenimiento, en los procedimientos de modificación y transfección, al igual que en lo referente a la siembra y montaje en placa de los mismos, se sometieron a procesos de inactivación con cloro al 70% durante 24 hrs. (medios líquidos, material biológico contenidos en recipientes, puntas de micropipetas), o bien, adicionando cal (CaO) y sellando con *parafilm* en el caso de los medios sólidos (cultivos en placa); ambos tipos de desechos fueron contenidos en bolsas de RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos), siguiendo las indicaciones de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para su debida eliminación. Los instrumentos de materiales punzocortantes empleados en alguna etapa de la fase experimental fueron inactivados por calor, seguido de cloro al 70% para la neutralizar al agente biológico, y en caso de ser desechables, se contuvieron en el debido depósito para objetos punzocortantes RPBI. En el caso del material de laboratorio reutilizable, en su mayoría material de cristalería, se realizaron procedimientos de inactivación con cloro al 70% por 24 horas para posteriormente ser lavado con detergente extran al 10%, seguido del proceso de esterilización en autoclave.

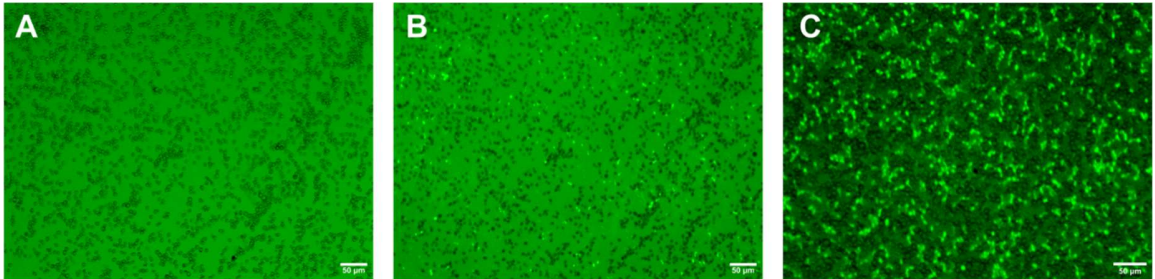
## **Resultados**

### Expresión de GFP en levaduras sensibles

Como parte de los resultados obtenidos, se muestra la expresión exitosa del marcador fluorescente resultante de la transfección de las levaduras sensibles 5x47 (MATa/MAT $\alpha$ ) con el lentivirus CMV GFP Puro (658-5) (**Figura 1**), siguiendo lo referido en la sección metodológica “Infección de la cepa 5x47 con el vector lentiviral CMV GFP Puro”. Se realizó el procesamiento de imágenes correspondiente para calcular el porcentaje de transfección obtenido en los experimentos llevados a cabo para la expresión de GFP en las levaduras sensibles 5x47, los cuales mostraron un valor inicial reducido ( $\bar{X}$ =14.06%) (**Figura 1B**); por ello se procedió a la selección y crecimiento de algunas clonas que evidenciaban un marcado efecto fluorescente



dentro de las muestras analizadas, con lo cual se obtuvo un incremento en el porcentaje con un valor promedio de 48.93% (**Figura 1C**).



**Figura 1.** Porcentajes de transfección de células sensibles 5x47 con GFP.

Imágenes representativas de la variación de los porcentajes de transfección observados inicialmente y posteriores al crecimiento de las de clonas seleccionadas.

**A.** Control; **B.** Expresión inicial de GFP obtenida de la transfección con el agente lentiviral; **C.** Expresión correspondiente tras la selección de clonas infectadas.

#### Modificación de la respuesta del efecto *Killer* en células con expresión de GFP

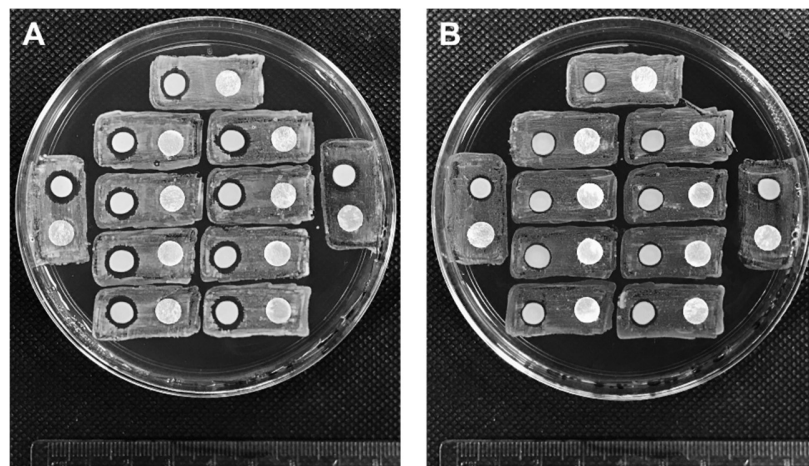
Con el fin de corroborar la eficiencia competitiva de las levaduras sensibles expresando el inserto de la GFP, se realizó la transfección con el agente lentiviral CMV GFP Puro (658-5) como se describe el apartado de la metodología “Infección de la cepa 5x47 con el vector lentiviral CMV GFP Puro”. Una de las interrogantes que existía al respecto de los efectos de la expresión de la GFP en las levaduras, se encontraba en si estas modificaciones pudiesen resultar en la interferencia del fenómeno *Killer*, debido a que las mutaciones se manifiestan en la inserción aleatoria dentro del genoma de la levadura. Para investigar lo anterior, se llevaron a cabo los experimentos correspondientes de inhibición en placa a pH 4.7 y a pH 6.0, en donde se sembró a manera de césped el equivalente a 3 mg de células sensibles 5x47 (MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ ), sobre los cuales se adicionaron 2 mg de levaduras 42300 (*Killer*, MAT $\alpha$ ) y 2 mg de la toxina K1 contenida en círculos de papel filtro (**Figura 2**).

En los resultados de los experimentos de inhibición en placa se observó que el fenómeno *Killer* presenta algunas modificaciones en cuanto a su dinámica de

interacción característica, ya que este no responde completamente conforme a lo descrito previamente en este tipo de experimentos. En valores experimentales a pH 4.7 se observó un marcado efecto *Killer* distinguible mediante la formación de halos de inhibición en presencia de los botones celulares de las levaduras 42300 ( $\bar{X}=0.29599 \text{ cm}^2$ ) y, en dimensiones inferiores como respuesta a la toxina K1 ( $\bar{X}=0.01433 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 2A; Figura 3A**). Mientras que a valores de pH 6.0, la formación de zonas de inhibición en el crecimiento de las levaduras sensibles ante la competencia directa con las levaduras *Killer* es inferior al observado a pH 4.7 bajo las mismas condiciones de competencia ( $\bar{X}=0.12569 \text{ cm}^2$ ) y nulo ante la aplicación de la toxina concentrada ( $\bar{X}=0 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 2B; Figura 3A**), siguiendo el comportamiento observado generalmente en estos experimentos, en donde el crecimiento de las levaduras sensibles se ve influenciado negativamente en mayor proporción al ser expuestas ante la competencia directa con las células *Killer* que ante la toxina concentrada. De la misma manera, el valor promedio de las zonas de inhibición como respuesta a las condiciones experimentales de competencia entre las células sensibles contra las células *Killer* a pH 6.0, normalmente tienden a ser menores que las observadas en los experimentos de competencia de las células sensibles ante toxina K1 concentrada a valores de pH 4.7. Así pues, al estudiar la respuesta de las células sensibles ante el tratamiento competitivo con los botones celulares de la cepa *Killer* 42300 y contra la toxina K1 a pH 4.7 y pH 6.0, se observó que los datos muestran diferencias significativas en el área que corresponde al efecto *Killer* generado a las 24 horas de competencia entre los grupos experimentales (prueba Kruskal-Wallis  $p=1.604 \times 10^{-34}$ ,  $\alpha < 0.05$ ) (**Figura 3B**).

Por otra parte, en cuanto al estudio del comportamiento de las diferentes clonas que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) contra el control 5x47 *wild-type* dentro de las diferentes condiciones experimentales trabajadas, no se encontró una alteración en la dinámica del efecto *Killer*, siendo que este se mantiene homogéneamente entre la respuesta obtenida de las clonas sometidas a los experimentos y sus respectivos controles (**Figura 4**). Los valores obtenidos de los

análisis realizados en cada una de las condiciones experimentales muestran resultados con estimaciones no significativas entre las comparaciones realizadas ( $p > 0.05$ ). Se determinó que la clona 8 es la que parece ser más afectada al ser sometida a las pruebas de competencia contra las células *Killer* a ambos valores de pH, ya que esta clona muestra los valores promedio más altos en el área del halo de inhibición de crecimiento (pH 4.7:  $\bar{X} = 0.32945 \text{ cm}^2$ ; pH 6.0:  $\bar{X} = 0.13892 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 5A**; **Figura 5B**); mientras que en la competencia contra la toxina concentrada a pH 4.7, esta clona muestra el valor promedio más bajo en el efecto *Killer* ( $\bar{X} = 0.00601 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 5C**), y a valor de pH 6.0, la toxina no genera ningún tipo de daño al igual que en las demás clonas y en sus respectivos controles (**Figura 5D**). Por su parte, la clona 4 mostró una mayor resistencia ante la competencia directa con las células 42300 a pH 4.7 ( $\bar{X} = 0.25437 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 5A**) y, en competencia directa con las células 42300 a valores de pH 6.0, la clona 15, parece ser la que menor daño sufre en su crecimiento ( $\bar{X} = 0.11473 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 5B**); y, en contraparte, la clona 14 resultó ser más susceptible ante la aplicación directa de la toxina *K1* en los experimentos de competencia en placa a pH 4.7 ( $0.03633 \text{ cm}^2$ ) (**Figura 5C**).

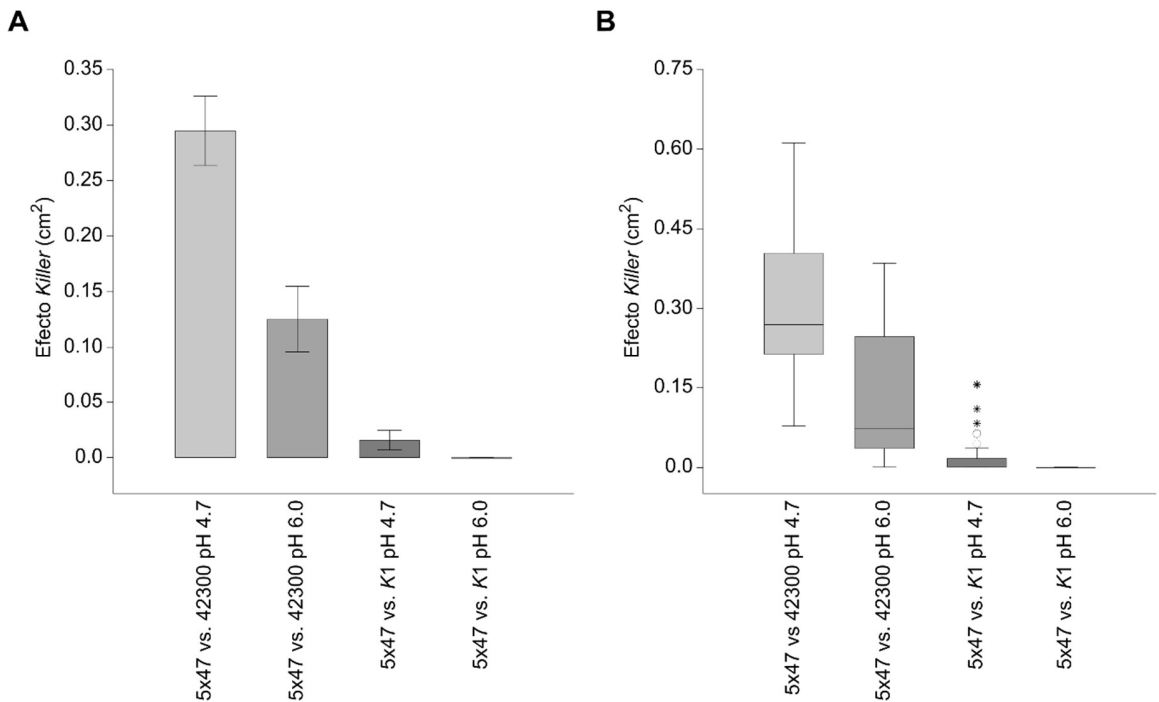


**Figura 2.** Experimentos de inhibición en placa del fenómeno *Killer* empleando levaduras expresando GFP en variación de pH.

Imágenes alusivas a los experimentos de competencia realizados. En la parte superior del área de siembra se observa el control de los experimentos (*5x47 wild-type*) y en los parches

contiguos, las clonas seleccionadas expresando GFP. En el extremo izquierdo de cada parche se localizan los botones celulares de la levadura *Killer* y en el extremo derecho, los círculos de papel filtro con la toxina *K1* (n=6).

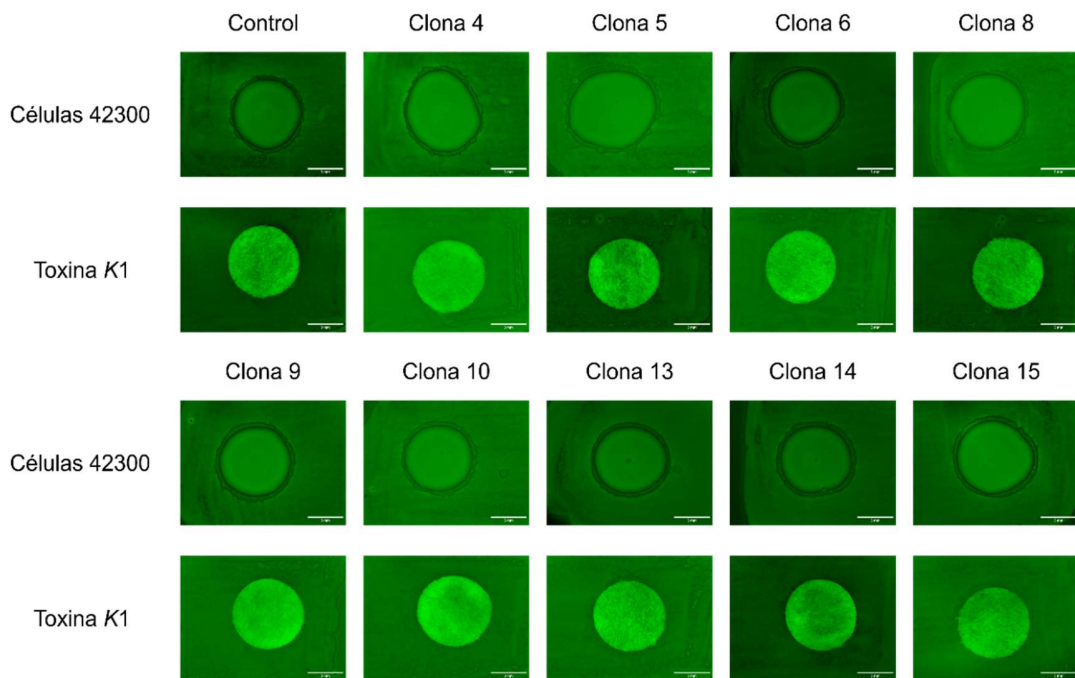
**A.** Efecto *Killer* a pH 4.7 a las 24 hrs. de competencia; **B.** Efecto *Killer* a pH 6.0 a las 24 hrs. de competencia.



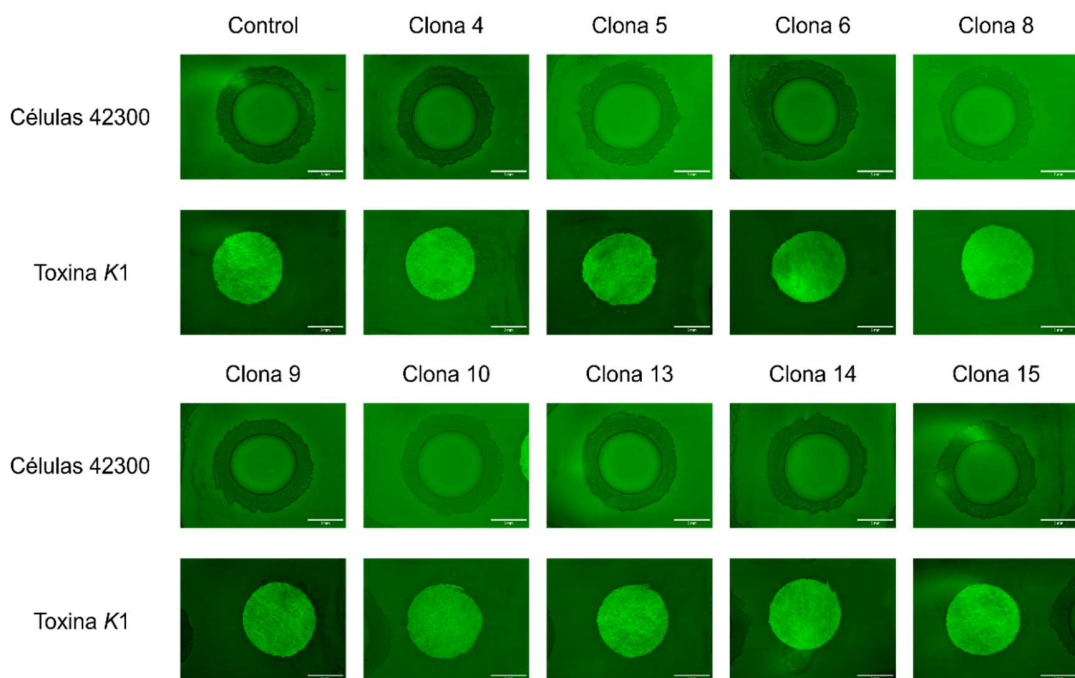
**Figura 3.** Comportamiento general del efecto *Killer* y la distribución de los datos experimentales en los distintos tratamientos.

**A.** Valores promedio del área de inhibición como resultado del efecto *Killer* ( $p < 0.05$ ) en las distintas condiciones experimentales tras 24 horas de competencia en placa. (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **B.** Gráfico de dispersión de los datos en los experimentos de competencia entre las células sensibles expresando GFP tras 24 horas de competencia ante la presencia de las células *Killer* o de la toxina *K1* en pH 4.7 y 6.0. Los valores atípicos están denotados por el signo ortográfico de asterisco (\*) (n=6; método de rango intercuartil por interpolación).

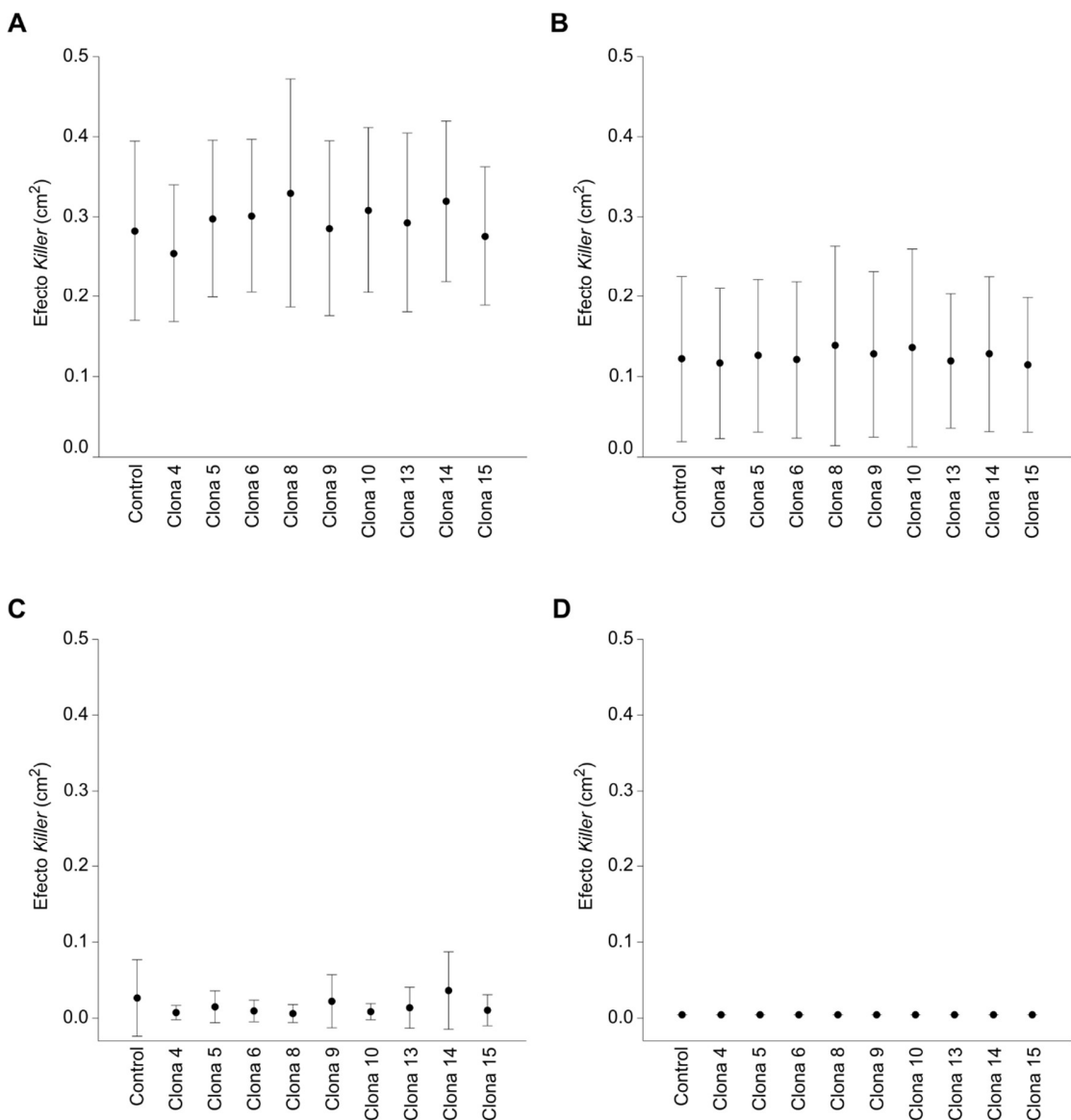
**Competencia en placa a pH 6.0**



**Competencia en placa a pH 4.7**



**Figura 4.** Clonas expresando GFP en experimentos realizados de competencia en placa. Imágenes representativas de la dinámica observada en el fenómeno *Killer* en los experimentos de competencia en placa a valores de pH de 4.7 y 6.0 entre las levaduras sensibles que expresan GFP (5x47 GFP+) y las células 42300 productoras o contra la toxina K1 concentrada a las 24 horas. Capturas realizadas en el programa *cellSens*, utilizando filtro selectivo para GFP en el microscopio de fluorescencia *Olympus MVX10* con una cámara XM10 (n=6).



**Figura 5.** Respuesta del efecto *Killer* en las clonas transfectadas con el lentivirus CMV GFP Puro frente a las distintas condiciones experimentales.

Comparación del efecto *Killer* observado en las nueve clonas expresando la proteína verde fluorescente (GFP+) en valores de pH 4.7 y 6.0 tras 24 horas de competencia en placa contra las células 42300 y la toxina K1.

**A.** 5x47 (*wild-type* y GFP+) vs. 42300, pH 4.7 (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **B.** 5x47 (*wild-type* y GFP+) vs. 42300, pH 6.0 (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **C.** 5x47 (*wild-type* y GFP+) vs. K1, pH 4.7 (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **D.** 5x47 (*wild-type* y GFP+) vs. K1, pH 6.0 (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%).

#### Seguimiento de la fluorescencia en pH determinante para la actividad de la toxina K1

Para analizar las fluctuaciones que experimenta la intensidad de la fluorescencia emitida por las levaduras transfectadas con el vector lentiviral, se realizó la visualización en tiempo real a las 24 horas de competencia a pH 4.7, con la finalidad de determinar las variaciones que se presentan en la magnitud de la fluorescencia emitida en las regiones que corresponden al césped de las levaduras sensibles, al halo de inhibición y al botón celular de la cepa *Killer*. Para lo anterior, se realizaron los experimentos descritos en el apartado de la metodología "Ensayos de competencia en placa", a partir de los cuales se recolectó una serie de imágenes que fueron capturadas en el microscopio de fluorescencia del Laboratorio de Biofísica de Membranas de la Universidad Autónoma de Querétaro, para posteriormente proceder con el respectivo análisis de las imágenes siguiendo lo descrito en el apartado de métodos "Seguimiento de la fluorescencia funcional y análisis de imágenes", seguido por el correspondiente análisis estadístico de los datos recolectados.

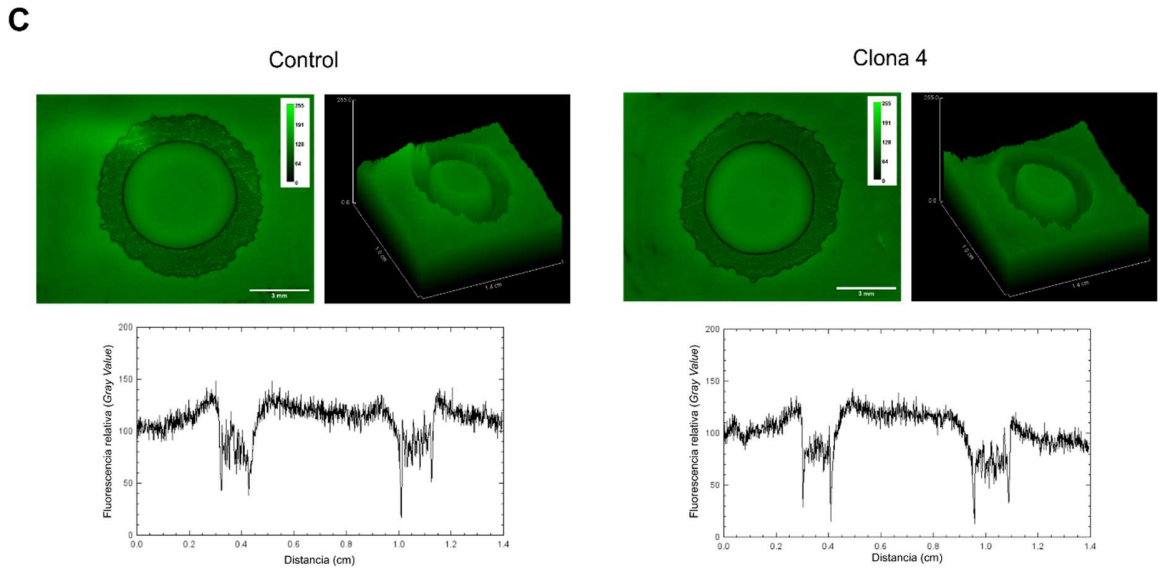
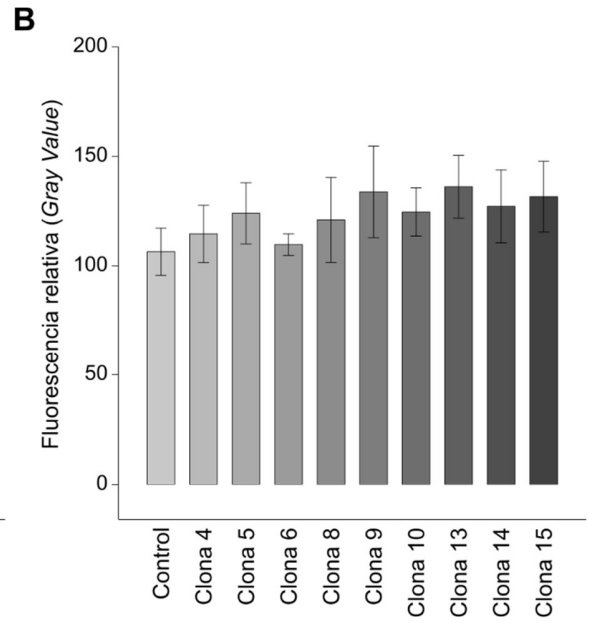
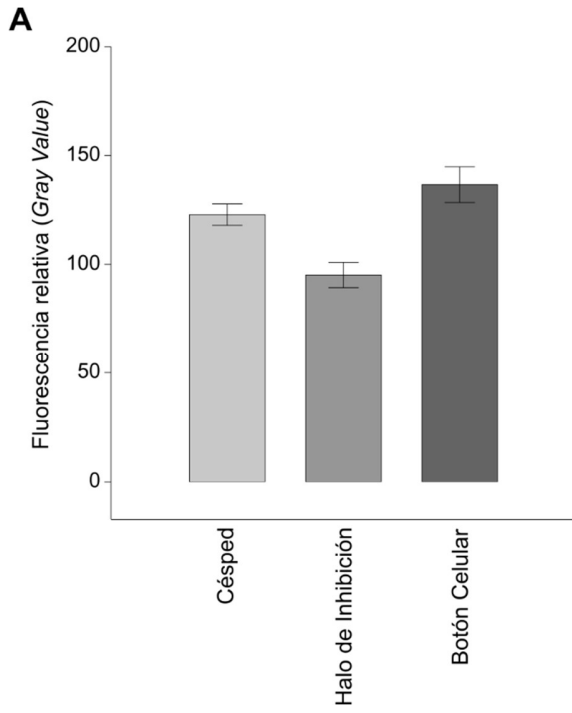
Los datos que corresponden a la intensidad de la fluorescencia relativa (*Gray Value*) en las tres regiones de interés en los experimentos de competencia en placa, muestran diferencias significativas entre sus varianzas (prueba de Welch,  $F=36.48$ ,

df=102.2,  $p=1.105 \times 10^{-12}$ ,  $\alpha < 0.05$ ), siendo que la región que corresponde al botón celular de las levaduras 42300 es la que alcanza mayores valores en la fluorescencia media ( $\bar{X}=138.841$ ), seguido de la zona que pertenece al césped de las levaduras sensibles expresando la GFP ( $\bar{X}=124.710$ ), y valores menores en el espacio que corresponde al halo de inhibición generado por el efecto *Killer* ( $\bar{X}=96.872$ ) (**Figura 6A**). Estos resultados muestran que el valor de la fluorescencia está influenciado por cada una de las zonas estudiadas y que, estas a su vez, generan un impacto que podría deberse a las propiedades que expresan, mismas que pueden relacionarse a las modificaciones genéticas producto de la inserción del lentivirus o a algunos factores como la densidad celular y su distribución.

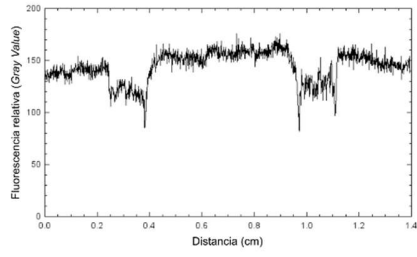
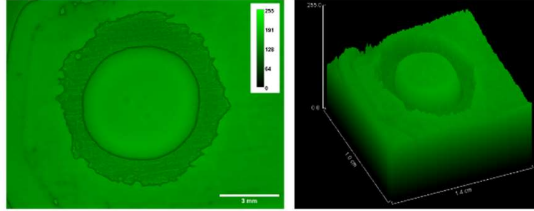
En cuanto al estudio de la fluorescencia emitida en la región del césped, analizada de manera independiente para cada una de las clonas, se encontró que, si bien se presenta una diferencia entre el valor observado en los distintos céspedes respecto al control, estos valores no son significativos ( $p=0.09718$ ,  $\alpha < 0.05$ ). El valor promedio de la fluorescencia relativa mostrado por las clonas, posiciona a la clona 13 como aquella que manifiesta una mayor magnitud en el valor del *Gray Value* ( $\bar{X}=136.1021$ ), seguida por las clonas 9 y 15 ( $\bar{X}=133.7731$  y  $\bar{X}=131.5475$ , respectivamente); las clonas con menores rendimientos en la fluorescencia registrada fueron la clona 6 ( $\bar{X}=109.6907$ ) y la clona 4 ( $\bar{X}=114.6129$ ), siendo la primera aquella que manifiesta valores muy cercanos a los medidos en el control de los experimentos ( $\bar{X}=106.4217$ ) (**Figura 6B**; **Figura 6C**).

Los gráficos de los datos generados mediante la herramienta *Surface Plot* del programa de procesamiento de imágenes *Image J*, permiten visualizar en un plano de 3 dimensiones el fenómeno *Killer*. Dichas representaciones muestran una particularidad en el comportamiento de crecimiento del botón celular de las levaduras 42300, ya que al parecer la presencia competitiva que significan las levaduras sensibles 5x47, promueve que las levaduras *Killer* se mantengan concentradas en un punto y sigan patrones de formar una estructura cóncava a manera de cilindro (**Figura 6C**).

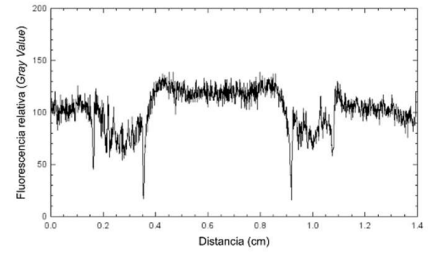
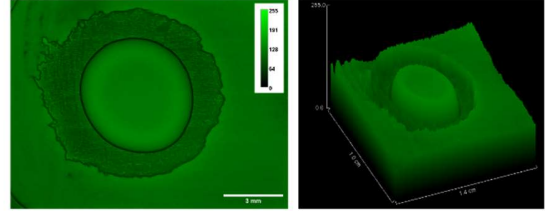




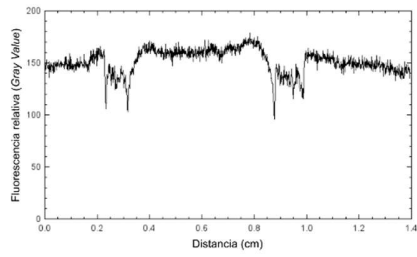
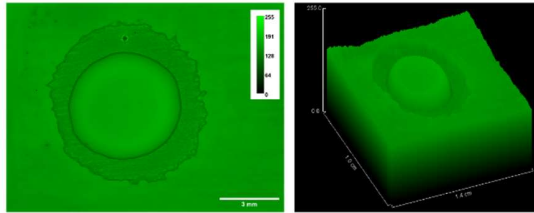
Clona 5



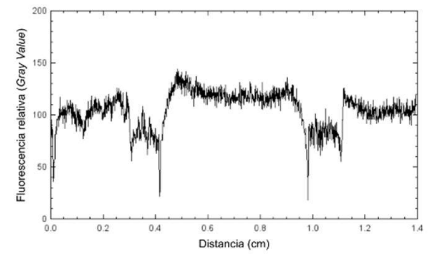
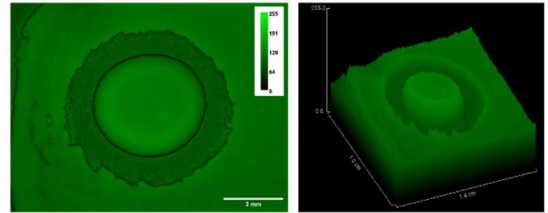
Clona 6

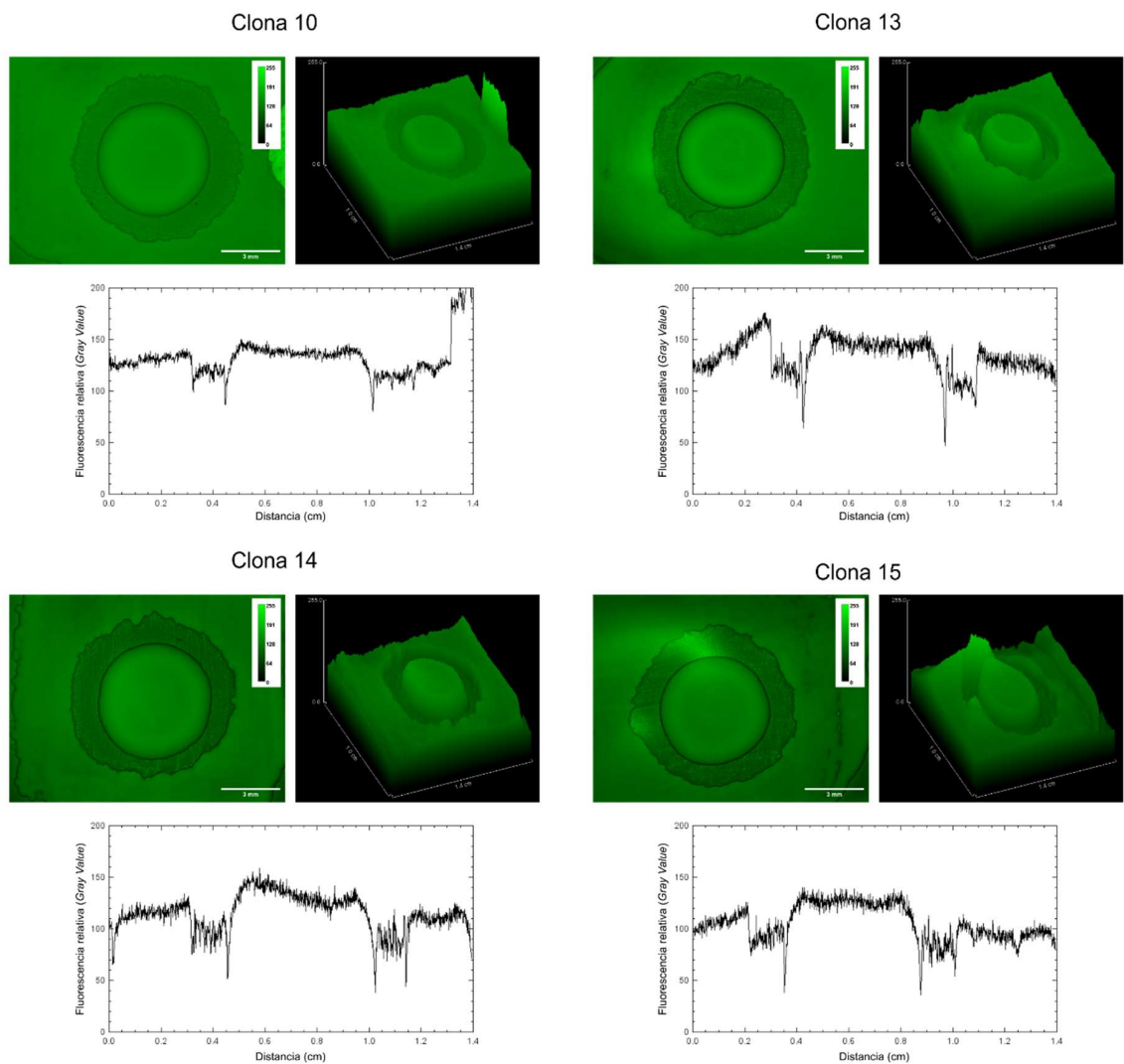


Clona 8



Clona 9





**Figura 6.** Variación en la intensidad de la fluorescencia relativa en las regiones de estudio y su comportamiento en las clonas seleccionadas.

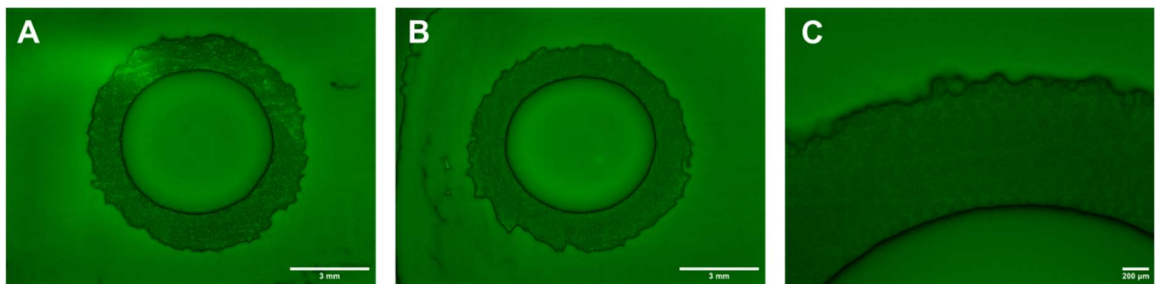
Datos de la fluorescencia en experimentos de competencia en placa a pH 4.7 entre células 5x47 vs. células 42300 a las 24 horas de interacción directa.

**A.** Magnitud promedio de la fluorescencia relativa registrada en las regiones correspondientes al césped de siembra de las levaduras 5x47, halo de inhibición en el crecimiento celular y botón celular de levaduras 42300 (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **B.** Gráfico del valor medio de la fluorescencia relativa correspondiente a la región del césped de las distintas clonas expresando GFP (n=6; media  $\pm$  error estándar; intervalo de confianza para la media al 95%); **C.** Imágenes

representativas de las clonas obtenidas como parte de los experimentos de competencia en placa con barra de calibración (esquina superior izquierda), gráfico de superficie (*Surface Plot*, esquina superior derecha) y gráfico de comportamiento de la intensidad de la fluorescencia relativa en regiones de interés (*Plot Profile*, inferior) (n=6).

### Observación de crecimiento celular en el halo de inhibición

Como parte de los descubrimientos realizados, se distinguió crecimiento celular en las áreas correspondientes al halo de inhibición (HI) posterior a las 24 horas de competencia en placa entre la cepa 5x47 contra la cepa 42300 (**Figura 7C**). Las células encontradas en el HI en experimentos con la cepa 5x47 *wild-type* a simple vista parecen ser de mayor diámetro (**Figura 7A**) comparados con los que se observan en los experimentos en donde se utilizaron las clonas transfectadas (**Figura 7B**). Sin embargo, para poder determinar si estas corresponden al fenotipo sensible o *Killer* se requieren de experimentos posteriores.



**Figura 7.** Crecimiento celular en zona del halo de inhibición.

Imágenes representativas de los halos de inhibición registrados en experimentos de competencia en placa a pH 4.7 entre césped de levaduras 5x47 (*wild-type* y GFP+) contra botón celular de cepa 42300.

**A.** Control; **B.** Clona 9; **C.** Acercamiento al halo de inhibición de la clona 9.

### **Discusión**

Partiendo de los resultados obtenidos en el proceso de transducción de *Saccharomyces cerevisiae* para la expresión de la proteína fluorescente GFP, se ha demostrado que el lentivirus CMV GFP Puro es funcional en este grupo de células,

que de acuerdo a las citas vinculadas sobre este constructo en el sitio web de *Addgene* (<https://www.addgene.org/17448/citations/>), no cuenta actualmente con información disponible sobre su expresión en levaduras y se restringen mayormente a referencias en líneas celulares de mamíferos, ya que inicialmente se diseñó para ellas (Campeau *et al.*, 2009). La expresión de este vector lentiviral en *S. cerevisiae*, al igual que otros vectores virales, se integran aleatoriamente dentro del genoma de las células por lo que conocer su localización precisa requiere de herramientas de secuenciación. Sin embargo, podemos tener la certeza de que el lentivirus CMV GFP Puro ingresó exitosamente al núcleo celular, debido a su naturaleza como retrovirus (Campeau *et al.*, 2009; Hulo *et al.*, 2009) y, que mediante los procesos de selección de clonas individuales para incrementar los porcentajes de transfección, se promovió una mejor inducción en el patrón de expresión de la GFP en las células 5x47 sensibles, tal como menciona Campeau y colaboradores en su trabajo de investigación (2009), pasando de valores iniciales de expresión de la GFP del 14.06% a 48.93%. Además, el inserto muestra ser estable a través del tiempo, coincidiendo con el comportamiento de vectores virales basados en lentivirus del VIH (Dull *et al.*, 1998).

La respuesta del efecto *Killer* en los experimentos de competencia en placa mostraron ciertas modificaciones en el comportamiento esperado, obteniendo un mayor valor promedio en el área que corresponde al halo de inhibición en los experimentos de competencia directa entre las levaduras 5x47 contra las levaduras 42300 a pH 6.0 ( $\bar{X}=0.12569 \text{ cm}^2$ ) que en la condición experimental que corresponde a la interacción entre las células sensibles 5x47 contra la toxina K1 concentrada a pH 4.7 ( $\bar{X}=0.01433 \text{ cm}^2$ ); lo cual lleva a pensar que en los experimentos realizados, la acción de la toxina concentrada parece tener efectos transitorios no mantenidos que disminuyen conforme al tiempo y que el primer marco modulador de la dinámica competitiva es la interacción local que se da entre las cepas, la cual puede verse potenciada por el valor del pH (McBride *et al.*, 2008; Wloch-Salamon *et al.*, 2008).

Así mismo, al contrastar los resultados con lo obtenido por Molina-Vera (2021), se observa un notable incremento en el área de inhibición del crecimiento celular del césped bajo las condiciones a pH 6.0, lo que resulta curioso pues el comportamiento normal habría sido nulo. Lo anterior podría deberse a que la toxina produce un efecto proporcionalmente lineal que se mantiene hasta ciertas concentraciones (Molina-Vera, 2021) y su letalidad radica en niveles de producción constante (Gier *et al.*, 2020), además de que el efecto *Killer* tiene como factor determinante las densidades poblacionales de las cepas interactuando, ya que la presencia de las levaduras sensibles “estimulan” de alguna manera la producción de la toxina al ser el blanco molecular de la misma (Wloch-Salamon *et al.*, 2008).

Los hallazgos encontrados en cuanto al comportamiento general de las diferentes condiciones experimentales trabajadas son interesantes pues pareciera indicar que existen algunas mutaciones en las clonas de la levadura 5x47 GFP+ que las hace más susceptibles a la presencia de levaduras productoras de la toxina, siendo inclusive que se presenta halo de inhibición en experimentos a pH 6.0 en donde normalmente la toxina no es funcional. Sin embargo, al estudiar el comportamiento de las clonas seleccionadas derivadas de la transducción con el agente lentiviral CMV GFP Puro tomando como punto de comparación los controles negativos a la modificación genética en cada una de las condiciones experimentales, arroja valores no significativos estadísticamente ( $p > 0.05$ ), aunque al observar los datos se puede percibir que la magnitud del efecto *Killer* parece aumentar y/o disminuir en cada una de las clonas (**Figura 5**). Así también, esto podría atribuirse al gran potencial coevolutivo que existe entre las cepas *Killer* y sensibles, que promueve y modula la prevalencia de ambas cepas en el medio (Pieczynska *et al.*, 2016), posiblemente como una estrategia de supervivencia al verse influenciada de alguna manera por las alteraciones derivadas de la inserción del vector viral seleccionado, o a la suma de distintos factores en las condiciones experimentales. Se sugiere seguir realizando pruebas adicionales, como

secuenciación y localización del inserto, para determinar si las clonas GFP+ de la cepa 5x47 podrían utilizarse normalmente en experimentos del fenómeno *Killer*.

En cuanto a los valores obtenidos mediante el seguimiento de la fluorescencia funcional en pH 4.7 para cada una de las áreas de interés, se observa que si bien la mayor intensidad de fluorescencia relativa pertenece al botón celular de las levaduras 42300 esto podría deberse a la forma característica de agrupamiento en donde se da un crecimiento a manera de torre a pilada (**Figura 6C**), siendo que la fluorescencia intrínseca que poseen las células influya en estos resultados. La fluorescencia relativa promedio, obtenida en la zona que corresponde al césped celular de las clonas de levadura 5x47 GFP+, muestran un aumento respecto a los valores cuantificados para el control negativo, que, al analizarse en conjunto para cada una de las clonas, no implica diferencias generales entre el comportamiento de las levaduras *wild-type* y las levaduras transfectadas. Lo anterior, podría vincularse al porcentaje de transfección logrado con la inserción del vector lentiviral con el que se estuvo trabajando en donde menos de la mitad de las levaduras expresaban el marcador fluorescente, así como a algún tipo de interferencia en la fluorescencia ocasionada por la fluorescencia de fondo (Zimmer, 2002).

Dentro de las posibles explicaciones del crecimiento de células en la zona de inhibición se encuentran: 1) radica en que las mismas levaduras *Killer* comienzan a expresar mutaciones acumuladas las cuales se manifiestan en la toxina producida o en su capacidad de resistencia ante la toxina, ya sea a la producida por ellas mismas o por células vecinas de la colonia, lo que permite que éstas colonicen la zona del halo de inhibición en la que primeramente redujeron la presencia de competencia (Buskirk *et al.*, 2020; Chávez-Vega, 2023; Gier *et al.*, 2020), y 2) que la ploidía de las levaduras sensibles (células diploides a/ $\alpha$ ) las vuelve más resistentes a la cantidad de toxina secretada por las células haploides de la cepa 42300, permitiendo así que estas incrementen su densidad poblacional antes de intentar recolonizar el área de donde fueron desprovistas previamente (McBride *et*

al., 2008). Así mismo, podría considerarse que una de las estrategias que emplean las levaduras *Killer* 42300 ( $K^+$ ; haploides  $\alpha$ ) utilizadas en los experimentos es la recombinación sexual con sus congéneres sensibles de 5x47 haploides  $a$ , los cuales son resultado del proceso de esporulación, constituyendo así un planteamiento mediante el cual el fenómeno *Killer* prevalece en los cultivos y una razón para que no se dé una exclusión completa de las células sensibles.

## Conclusiones

La transfección de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* para la expresión del epítipo verde fluorescente se realizó exitosamente utilizando el vector lentiviral CMV GFP Puro, constituyendo este, un nuevo mecanismo de inserción de proteínas de interés para visualizar las dinámicas celulares y de competencia que se presentan en el sistema *Killer* en este organismo modelo. La expresión de la GFP en las levaduras debe incrementarse a mayores porcentajes para poder determinar su funcionalidad como mecanismo de seguimiento en experimentos de fluorescencia funcional, ya que, en los experimentos realizados, no se obtuvieron resultados contundentes que permitan diferenciar eficazmente entre las levaduras *wild-type* y las transfectadas.

La dinámica característica de interacción en el efecto *Killer* presentó ciertas modificaciones, las cuales podrían estar relacionadas a alteraciones vinculadas a la modificación genética producida por la inserción del vector lentiviral o a un conjunto de distintos factores, que se ven impactados *per se* por la interacción que acontece entre las cepas en competencia, en donde, la acción de la toxina se ve favorecida por una producción constante y modulada con respecto al valor del pH del medio; siendo que en valores de pH ideales para su funcionamiento incrementa su letalidad (pH 4.7). Las clonas generadas mediante el proceso de transducción con el lentivirus CMV GFP Puro, muestran un comportamiento similar a las levaduras 5x47 *wild-type*, lo que lleva a pensar que las alteraciones son mínimas y que estas no están localizadas en regiones que interfieran con su comportamiento normal en



experimentos de competencia en placa. Una de las hipótesis que se tiene sobre el evento, es que debido al gran potencial coevolutivo que han mostrado las cepas, aunado al nivel coevolutivo huésped-hospedero, lo observado podría ser respuesta de una estrategia para garantizar la continuidad del sistema *Killer*.

Un punto interesante a resaltar es la forma distintiva en que se da el crecimiento de las levaduras contenidas en el botón celular de la cepa 42300 en competencia, en donde, a manera de muralla parece liderar la competencia contra sus vecinas sensibles cercanas. Así mismo, la presencia de células en el halo de inhibición genera curiosidad ya que este evento podría ser la visualización de procesos de adaptación por parte de alguno de los dos fenotipos o de recombinación genética entre ambas cepas.

Así pues, este trabajo constituye una forma alternativa de expresión de marcadores fluorescentes para el estudio de *Saccharomyces cerevisiae* empleando vectores lentivirales como agentes de modificación. Además, de que también contribuye al estudio de los procesos que acontecen en la dinámica de los eventos modulados mediante interacción por interferencia, y denota observaciones particulares en el fenómeno *Killer*, como el crecimiento celular en el halo de inhibición y el crecimiento cóncavo de las levaduras productoras de toxina en ambientes competitivos.

## **Perspectivas**

Bajo la consideración sobre la importancia que implica el sistema *Killer* en temas concernientes a la investigación y desarrollo de tratamientos de terapia génica dirigidos a mejorar la salud, así como a su potencial en otros tantos campos de estudio como en el alimenticio en donde se busca el mejoramiento de obtención de productos fermentados, en el agrícola con implicación en el desarrollo de productos que mejoren la calidad de los cultivos frutales controlando la presencia de ciertos agentes patógenos, inclusive en el entendimiento de los procesos de sucesión de microorganismos en ambientes naturales y la interpretación de la

modificación de los procesos como reflejo de la calidad de los ecosistemas, se destaca el interés de darle continuidad al estudio de algunos datos y situaciones particulares que surgieron en el desarrollo de este trabajo:

- Realizar el proceso de transducción con agentes virales que expresen otro epítipo para mejorar la distinción entre las cepas en los experimentos en competencia.
- Identificar el fenotipo expresado por las células creciendo en la zona del halo de inhibición.
- Describir y diagnosticar la forma de crecimiento que adquieren las cepas en competencia.
- Cuantificar las variaciones en la secreción de la toxina *K1* en diferentes estratos del botón celular en competencia con las levaduras sensibles.
- Identificar los marcadores moleculares que inducen la producción de la toxina en levaduras *Killer* y establecer gradientes denso dependientes.
- Determinar las posibles modificaciones inducidas por la inserción del vector viral en el material genético de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, así como si estas impactan en sitios implicados en la dinámica *Killer* entre las cepas en competencia, favoreciendo o reduciendo su nivel de sensibilidad y/o producción de la toxina.
- Identificar sitios homólogos entre las levaduras de *S. cerevisiae* y las líneas celulares de mamíferos expresando el lentivirus CMV GFP Puro (658-5).

## Referencias

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L. & Goldstein, S. A. (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99(3): 283-291. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81659-1
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35(3): 235-241. DOI: 10.1128/br.35.3.235-241.1971

- Bevan, E. A. & Makower M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. Proc. 11<sup>th</sup> Int. Congr. Genet. 1: 203 (Abstr.).
- Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. Yeast 36(8): 1-13. DOI: 10.1002/yea.3398
- Boynton, P. J. & Greig, D. (2016). Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. Fungal Ecol. 22: 61-72. DOI: 10.1016/j.funeco.2016.04.008
- 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. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00634-7
- Buskirk, S. W., Rokes, A. B. & Lang, G. I. (2020). Adaptive evolution of nontransitive fitness in yeast. Elife 9: e62238. DOI: 10.7554/eLife.62238
- Campeau, E., Ruhl, V. E., Rodier, F., Smith, C. L., Rahmberg, B. L., Fuss, J. O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P. K. & Kaufman, P. D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. PLoS One 4(8): e6529. DOI: 10.1371/journal.pone.0006529
- Chao, L. & Levin, B. R. (1981). Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(10): 6324-6328. DOI: 10.1073/pnas.78.10.6324
- Chávez-Vega, A. (2023). Producción de toxina killer de *Saccharomyces cerevisiae* y su relación en la regulación de volumen. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene 173: 33-38. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00685-0

- Duina, A. A., Miller, M. E. & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* 197(1): 33-48. DOI: 10.1534/genetics.114.163188
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72(11): 8463-8471. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998
- Flegelová, H., Novotná, D., Vojtíšková, 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 Res.* 2(1): 73-79. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00070.x
- Gier, S., Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2017). Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins* 9(11): 345. DOI: 10.3390/toxins9110345
- Gier, S., Simon, M., Gasparoni, G., Khalifa, S., Schulz, M. H., Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2020). Yeast viral killer toxin K1 induces specific host cell adaptations via intrinsic selection pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 86(4): e02446-19. DOI: 10.1128/AEM.02446-19
- Gier, S., Simon, M., Nordström, K., Khalifa, S., Schulz, M. H., Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2019). Transcriptome kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in response to viral killer toxin K1. *Front Microbiol.* 10: 1102. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01102
- Goffeau, A., Barrel, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S. G. (1996). Life with

- 6000 genes. *Science* 274(5287): 546-567. DOI: 10.1126/science.274.5287.546
- Greig, D. & Travisano, M. (2008). Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution* 62(3): 521-527. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2007.00292.x
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191(1): 33-64. DOI: 10.1534/genetics.111.134577
- Herring, A. J. & Bevan, E. A. (1974). Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Virol.* 22(3): 387-394. DOI: 10.1099/0022-1317-22-3-387
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52(4): 536-553. DOI: 10.1128/mr.52.4.536-553.1988
- Hulo, C., Masson, P., de Castro, E. & Le Mercier, P. (2009). Retroviridae. *ViralZone*. Swiss Institute of Bioinformatics. <https://viralzone.expasy.org/71>
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sella, A. J., Kaczmarek, L. K. & Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376(6542): 690-695. DOI: 10.1038/376690a0
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. & Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(3): 369-400. DOI: 10.1128/cmr.10.3.369
- Marquina, D., Santos, A. & Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5(2): 65-71. DOI: 10.1007/s10123-002-0066-z
- McBride, R., Greig, D. & Travisano, M. (2008). Fungal viral mutualism moderated by ploidy. *Evolution* 62(9): 2372-2380. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2008.00443.x

- Milone, M. & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32(7): 1529-1541. DOI: 10.1038/s41375-018-0106-0
- Molina-Vera, C. A. (2021). Estabilidad y efecto de la toxina K1 recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189(1): 737-765. DOI: 10.1534/genetics.111.127126
- Pieczynska, M. D., Wloch-Salamon, D., Korona, R. & de Visser, J. A. G. M. (2016). Rapid multiple-level coevolution in experimental populations of yeast killer and nonkiller strains. *Evolution* 70(6): 1342-1353. DOI: 10.1111/evo.12945
- Rine, J. & Herskowitz, I. (1980). The trans action of HMRA in mating type interconversion. *Mol. Gen. Genet.* 180(1): 99-105. DOI: 10.1007/BF00267357
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P. & Esteban, R. (2013). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(15): 4661-4674. DOI: 10.1128/AEM.00500-13
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(5): 1822-1832. DOI: 10.1128/AEM.02501-10
- 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. *J. Biol. Chem.* 277(7): 4797-4805. DOI: 10.1074/jbc.M107957200

- Salk Institute for Biological Studies. (2015). VVC - 3rd generation VSV.G pseudotyped lentiviral packaging protocol. <https://www.salk.edu/wp-content/uploads/2015/11/3rdgenLentiTransfectionprotocol.pdf>
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(3): 257-276. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(3): 212-221. DOI: 10.1038/nrmicro1347
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schönig, I. & Tipper, J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* 142(2): 2655-2662. DOI: 10.1099/00221287-142-9-2655
- Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N. & Goldstain, S. A. (2001). Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell* 105(5): 637-644. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00376-2
- Shimomura, O. (2009). Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int.* 48(31): 5590-5602. DOI: 10.1002/anie.200902240
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A. & Phaff, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeast. *Can. J. Microbiol.* 33(9): 783-796. DOI: 10.1139/m87-134
- Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N. & Turoverov, K. K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9(4): 338-369. DOI: 10.2174/138920308785132668

- Trujillo-Barrientos, J. G. (2022). Proteínas homólogas del canal TOK1 de *Saccharomyces cerevisiae* en microorganismos patógenos: Su papel como posibles blancos moleculares de las toxinas killer (K1). (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Van Genechten, W., Van Dijck, P. & Demuyser, L. (2021). Fluorescent toys 'n' tools lighting the way in fungal research. *FEMS Microbiol. Rev.* 45(5): fuab013. DOI: 10.1093/femsre/fuab013
- Wloch-Salamon, D. M., Gerla, D., Hoekstra, R. F. & de Visser J. A. G. M. (2008). Effect of dispersal and nutrient availability on the competitive ability of toxin-producing yeast. *Proc. Biol. Sci.* 275(1634): 535-541. DOI: 10.1098/rspb.2007.1461
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102(3): 759-781. DOI: 10.1021/cr010142r
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72(12): 9873-9880. DOI: 10.1128/JVI.72.12.9873-9880.1998

## **Apéndices**

**Apéndice 1.** Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.





Campus Juriquilla, Qro, septiembre 06 del 2023.

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

**Tesista:**

María Guadalupe Martínez Hernández

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

<b>Título</b>	<b>Resolución</b>
Cambio de título de: "Expresión de proteínas fluorescentes en cepas killer de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y su evolución en cultivo" a " <b>Seguimiento temporal de la interacción entre cepas <i>Killer</i> y cepas sensibles de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante fluorescencia funcional</b> " (89FCN2021)	<b>APROBADO</b>

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

Atentamente,  
"Salud, Naturaleza y Sustentabilidad"

**MSIA. Elba Orozco Estrada**  
Presidenta del Comité de  
Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales

Ccp. Archivo