

**RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE VIRUS DE dsRNA Y LA ACTIVIDAD
MICOCIDA EN *Xanthophyllomyces dendrorhous***

Memoria de Título
Entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular
Facultad de Ciencias



Oriana Isabel Flores Díaz
Diciembre 2008
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino
Co-director: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

UCH-FC
Biotecnología

F 634
C-1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE VIRUS DE dsRNA Y LA
ACTIVIDAD MICOCIDA EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

ORIANA ISABEL FLORES DÍAZ

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Director Seminario de Título

Dr. Victor Cifuentes Gúzman
Co-Director

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Rosalba Lagos
Presidenta Comisión

Dr. Francisco Chávez
Corrector



Santiago de Chile, Diciembre de 2008



Nací un 9 de enero de 1984 en la ciudad de la eterna primavera, Arica. Aunque muchas veces no fue fácil, desde ese lugar en que viví durante 18 años me traje los lindos recuerdos. Inicié mi educación en el Liceo Domingo Santa María y finalicé mi enseñanza media en el North American College el año 2001. El esfuerzo realizado me permitió emprender otros rumbos en búsqueda de mi identidad, fue así como llegué al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile que fue el puente para iniciar mi carrera universitaria. Allí me conocí en nuevas facetas y aprendí a compartir experiencias con amigos que hasta hoy me acompañan. Aunque la inquietud por la ciencia proviene desde mi infancia, sólo en esta etapa logré definir el siguiente paso. El ingreso a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular marcó un nuevo desafío que valió la pena enfrentar ya que obtuve las herramientas necesarias para comprender el mundo científico y darme cuenta que el fin de esta etapa es solo un nuevo comienzo.



A MIS PADRES... ISABELY LUIS
A MI PRIMA SOLANGE Y SU FAMILIA

AGRADECIMIENTOS



A mis padres Isabel y Luis por confiar siempre en mí, por motivarme a seguir este rumbo, por apoyarme incondicionalmente cuando decidí estudiar en esta ciudad, y por todas las veces que tuvimos que superar inconvenientes, todo esto es para ustedes. A mi hermano Luis y su familia que fue una inspiración a seguir. A mi prima Solange y toda su familia por los fines de semana que me adoptó en su casa...fuiste un gran apoyo durante mis primeros años acá en Santiago. Al Dr. Victor Cifuentes por permitirme trabajar en su laboratorio y por su apoyo. A mi tutor Dr. Marcelo Baeza por sus consejos, preocupación, críticas, paciencia y amistad que me ayudaron a encaminar este seminario. A todos los que forman o formaron parte del mítico Laboratorio de Genética: Dony, Mary, Carla, Aniela, Jenny, Pilar, Andrés, Rafa, Salvador, Mauricio, Mario y Vicente, con los que he compartido muchas jornadas de trabajo y momentos de esparcimiento, encontrando a buenos amigos y convirtiéndose en una segunda familia. A mis amigos de la "Era Bachitec" que compartimos momentos de estudio y ocio, especialmente a Carlos, Salvador, Inelia, Felipe y su familia por las jornadas de estudio en su casa. A mis amigas Bachi Ale y Nelly por estar conmigo siempre. A mis amigos que conocí durante la carrera, Claudia, Jorge, Isabel. A mis compañeras y amigas de departamento Estefanía y Carola que me apoyaron cada día. A cada una de mis queridas y adoradas amigas del club, especialmente a Fernanda, Francisca y Lore y amigos Matías, Jorge, Mauricio y Pato por su amistad incondicional, preocupación, consejos y apoyo. Todas estas personas han sido importantes durante mi formación académica y personal, de cada una de ellas me llevaré lo mejor y lo recordaré siempre. Financiado por proyecto FONDECYT 11060157.

INDICE



Índice General.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
1. Introducción.....	1
1.1. Material genético extracromosómico.....	1
1.2. Virus de dsRNA en levaduras.....	2
1.3. Sistema viral de <i>S. cerevisiae</i>	3
1.3.1. Genomas virales.....	3
1.3.2. Ciclo de replicación viral.....	5
1.3.3. Actividad micocida: Producción y acción de la toxina.....	7
1.4. Sistema viral de <i>Ustilago maydis</i>	7
1.5. Totivirus: Ensamble y propagación.....	8
1.5.1. Corrimiento de marco de lectura en virus de levaduras.....	10
1.6. Curación de virus de dsRNA.....	11
1.7. Presencia de dsRNA en <i>X. dendrorhous</i>	14
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	17
2. Materiales y Métodos.....	18
Materiales.....	18
Métodos.....	18
2.2.1 Condiciones de cultivo.....	18
2.2.2 Optimización de la extracción de RNA.....	19



2.2.3 Digestiones enzimáticas.....	20
2.2.4 Determinación de la actividad micocida.....	20
2.2.5 Experimentos de curación.....	21
2.2.6 Análisis de proteínas extracelulares.....	22
3. Resultados.....	24
3.1 Optimización del método de extracción de RNA.....	24
3.1.1. Lisis de esferoplastos <i>in situ</i>	24
3.1.2. Extracción de RNA por ruptura mecánica.....	27
3.2. Experimentos de curación con anisomicina.....	31
3.2.1. Determinación de la concentración óptima de antibiótico.....	31
3.2.2. Aplicación de anisomicina en placas y análisis del contenido de dsRNA.....	35
3.2.3. Actividad micocida de las colonias.....	37
3.2.4. Análisis de las cepas curadas de S ₂ -dsRNA.....	37
3.3. Análisis de las proteínas exportadas.....	42
4. Discusión.....	44
5. Conclusiones.....	48
6. Bibliografía.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presente en <i>S. cerevisiae</i>	4
Figura 2. Ciclo de replicación viral en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figura 3. Estrategias utilizadas durante la traducción de proteínas, ensamble y propagación virales y ensamble de ScV-L.....	9
Figura 4. El pseudoknot provoca resistencia en el movimiento del ribosoma.....	12
Figura 5. Análisis de ácidos nucleicos totales mediante lisis de esferoplastos <i>in situ</i>	26
Figura 6. Optimización del protocolo de extracción de RNA por ruptura mecánica.....	28
Figura 7. Electroforesis de muestras tratadas con nucleasa S1.....	30
Figura 8. Efecto inhibitorio de la anisomicina sobre el crecimiento de <i>X. dendrorhous</i>	32
Figura 9. Electroforesis de RNA.....	34
Figura 10. Electroforesis de RNA y análisis del contenido de dsRNA.....	36
Figura 11. Ensayo de actividad micocida de las colonias obtenidas por tratamiento con anisomicina.....	38
Figura 12. Análisis del contenido de dsRNA de la cepa UCD 67-385 y la cepa curada.....	39
Figura 13. Ensayo de actividad micocida de cepas curadas.....	41
Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43

ABREVIATURAS

CML	Corrimiento del marco de lectura
DEPC	dietil pirocarbonato
dsDNA	DNA de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGE	Elemento genético extracromosómico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
ORF	marco de lectura abierto
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
RPDR	RNA polimerasa dependiente de RNA
ScV	virus de dsRNA de <i>S. cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
ssRNA	RNA de hebra simple
VLP	partícula tipo virus

RESUMEN

Los Elementos Genéticos Extracromosómicos descritos en las levaduras corresponden principalmente a moléculas de RNA de doble hebra asociados a partículas tipo virus. Estos micovirus están clasificados dentro del género *Totivirus* que en especies como *Saccharomyces cerevisiae* son responsables de la actividad micocida. Esta actividad se encuentra definida por la presencia de dos virus de RNA de doble hebra que codifican para la toxina responsable del fenotipo y para las proteínas virales. La utilización de drogas como la anisomicina ha permitido la eliminación de la actividad micocida que se correlaciona con la eliminación de estas moléculas.

En la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, existe un polimorfismo en los tamaños de las moléculas de RNA de doble hebra de acuerdo al origen geográfico de las cepas. La existencia de un nexo entre la presencia de estos RNAs con algún fenotipo en el huésped no ha sido establecida en forma clara. Para analizar la posible participación de los RNAs de doble hebra en un sistema viral que pueda estar involucrado en la actividad micocida, se realizaron experimentos de curación de los RNA de doble hebra en *X. dendrorhous*. Cultivos de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fueron tratados con anisomicina y el contenido de RNA de los clones resultantes fue determinado mediante ruptura mecánica y extracción con fenol ácido. Desde células de *X. dendrorhous* tratadas con una alta concentración de anisomicina en placas YM/agar se pudo obtener dos clones que carecen de S₂-dsRNA. Estos clones aun mantienen la actividad micocida, lo que nos permite concluir que S₂-dsRNA no participa en el fenotipo micocinogenico observado en *X. dendrorhous*. La pérdida de S₂-dsRNA se correlaciona con un incremento de L-dsRNA, mientras que el nivel del resto de las moléculas de RNA de doble hebra (S₁ y M) se mantiene constante. Como se ha

observado en otras levaduras este resultado sugiere que S₂-dsRNA es satélite del virus L-dsRNA.

No se encontraron variaciones en el perfil de las proteínas extracelulares entre la cepa UCD 67-385 y UCD 67-385ΔS₂, por lo que S₂-dsRNA no codificaría para proteínas de exportación. Se encontraron 3 proteínas que tienen un tamaño de 22,5, 17,7 y 15 KDa las que pueden corresponder a la toxina. Considerando estos tamaños y lo observado en *Ustilago maydis* la micotoxina podría estar codificada en la molécula S₁-dsRNA.

ABSTRACT

The existence of Extracromosomal Genetic Elements has been described in a wide variety of yeast, and mainly corresponds to molecules of double strand RNA packed into virus-like particles. These micovirus are classified in the *Totivirus* genus, and in species like *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for the *killer* phenotype. This is defined by the presence of two double strand RNA viruses encoding the toxin responsible for the micocida activity and the viral proteins. Treatments of yeast with drugs as anisomycin produce the loss of killer activity that correlates with the elimination of dsRNAs from the cell.

In *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a polymorphism in the sizes of double strand RNA molecules has been related to the geographical origin of the strains. A nexus between this RNAs and any phenotype in the host has not clearly established. In this work, we analyze the possible involvement of double strand RNAs virus in a micocide system, by performing curation experiment of dsRNA from *X. dendrorhous*. Cultures of strain UCD 67-385 of *X. dendrorhous* were treated with anisomycin, and the RNA content of the clones were determined by mechanical rupture and acid phenol extraction. From cells of *X. dendrorhous* treated with a high concentration of anisomycin in YM/agar plates, two clones lacking S₂-dsRNA were isolated. These clones still have the micocida activity, that allow us to conclude that S₂-dsRNA dont participates in the micocinogenic phenotype. The loss of S₂-RNA correlates with an increase in the L-dsRNA level, while the level of others double strand RNA molecules (S₁ and M) remains constant. This result suggests that S₂-dsRNA is a satellite of L-dsRNA virus.

No differences were observed in the comparison of extracellular proteins of strains UCD 67-385 and UCD 67-385 Δ S₂, by PAGE-SDS, no differences was observed. Therefore the S₂-dsRNA coded for intracellular protein. In the profile, we found 3 bands that have size 22,5, 17,7 and 15 KDa which may correspond to the toxin. Considering these sizes and what has been observed in *Ustilago maydis* the mycotoxin could be encoded in the molecule S₁-dsRNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Material genético extracromosómico

Muchos microorganismos portan información genética en moléculas que no corresponden a su genoma y que se propagan establemente a la descendencia. La existencia de estos Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs) se ha descrito en una amplia variedad de hongos filamentosos y levaduras. Principalmente corresponden a moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) encapsidadas en partículas tipo virus (VLPs) o a plasmidios lineales de DNA de doble hebra (dsDNA). Sólo en algunos casos se ha determinado una asociación entre EGEs y algún fenotipo en el huésped, como por ejemplo, resistencias, factores de virulencia, senescencia y mecanismos de toxicidad. En las levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansemula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces*, se ha demostrado la participación de EGEs en la producción de micotoxinas (Schmitt y Breing, 2002). En el caso de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*, varias cepas portan moléculas de dsRNA, pero su función en el hospedero aún no se conoce con claridad (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeifer y cols., 1996). Por ello, el objetivo del presente seminario de título fue relacionar la presencia de dsRNAs con algún fenotipo en *X. dendrorhous*, específicamente la micocinogenia.

1.2 Virus de dsRNA en levaduras.

Los dsRNAs presentes en las levaduras están asociados a partículas tipo virus (VLPs) que se encuentran en el citoplasma. Estos micovirus se diferencian de los virus de bacterias, plantas y mamíferos por ser latentes o crípticos y son transmitidos *in vivo* citoplasmáticamente durante la fusión celular o formación del heterocarion careciendo de una ruta extracelular de infección (Pfeiffer y cols., 1996; Schmitt y Breining, 2006). Según el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV), existen ocho familias distintas de virus de dsRNA: *Birnaviridae*, *Varicosavirus*, *Cystoviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae* y *Totiviridae*, de las cuales las tres últimas tienen como hospedero a los miembros del reino fungi. Los micovirus presentes en las levaduras se encuentran actualmente clasificados dentro del género *Totivirus* perteneciente a la familia *Totiviridae*, caracterizados por ser los únicos virus cuyo genoma no se encuentra segmentado (Ghabrial y Patterson, 1999; Mertens, 2004). Presentan una cápside de una sola cubierta con un diámetro aproximado de 40 nm compuesta por 60 dímeros de la proteína de cápside Gag (76 KDa). Los viriones encapsidan sólo una molécula de dsRNA correspondiente al genoma viral entre 4,7 y 6,7 kpb y además pueden encapsidar separadamente a otros dsRNA satélites (Ghabrial y Patterson, 1999).

En especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces baili*, presentan sistemas virales que son responsables de la producción de micotoxinas. Este fenómeno denominado actividad micocida o *killer*, fue descrito por primera vez en la década del 60'y se define por la secreción de una toxina proteica de bajo peso molecular, capaz de matar a otras levaduras "sensibles" de su misma o distinta especie (Magliani y cols., 1997).

1.3 El Sistema viral de *S. cerevisiae*

1.3.1 Los Genomas virales

El sistema viral responsable de la actividad micocida mayormente investigado corresponde al descrito en *S. cerevisiae*, el que ha permitido establecer modelos de estudio acerca de los micovirus y su relación con el hospedero. Se encuentra definido por la presencia de dos moléculas de dsRNA, L-dsRNA (4,6 kb) y M-dsRNA (1,6 kb) que forman parte de VLPs denominados ScV-L y ScV-M respectivamente (ScV, Virus de *S. cerevisiae*). El genoma viral L-dsRNA contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) sobrepuestos en 130 nucleótidos: el 5' que codifica para la proteína de la cápside (Gag) necesaria para la encapsidación de las partículas virales, y el 3' que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RPDR) (Figura 1). La polimerasa es expresada como una proteína de fusión Gag-Pol (180 kDa) a través de un evento de corrimiento del marco de lectura en una base (CML -1) durante al proceso de traducción. El genoma M-dsRNA contiene sólo un ORF que codifica para una preprotoxina, un precursor de la toxina responsable de la actividad micocida que también participa en la inmunidad a la misma (Schmitt y Breinig, 2006).

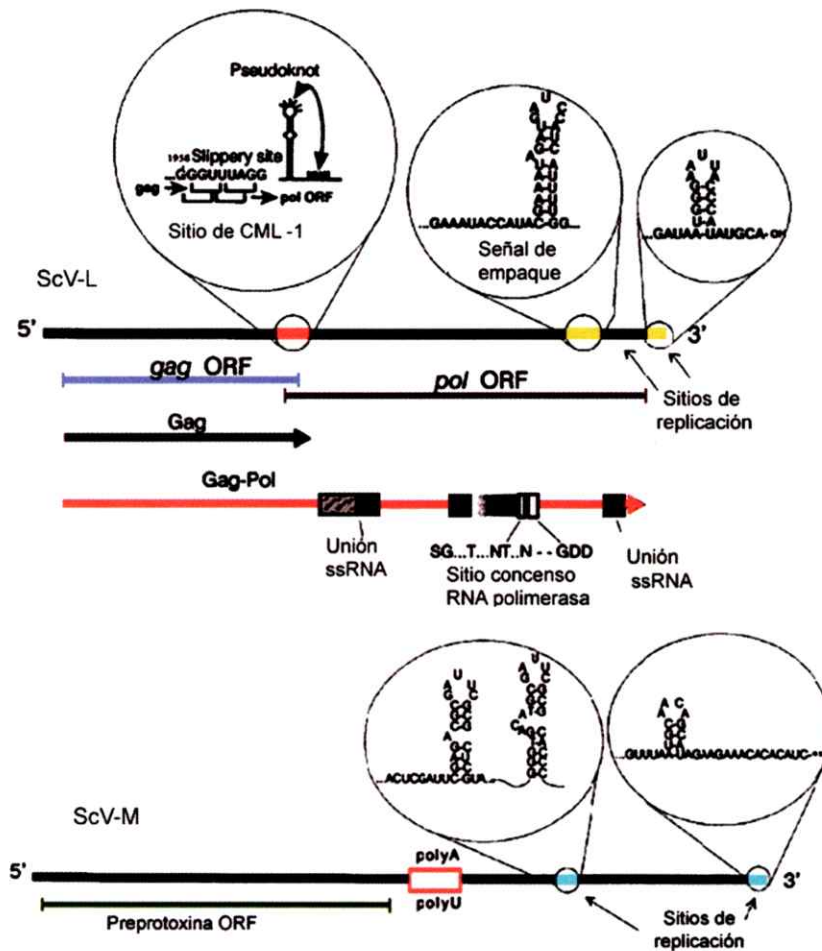


Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presente en *S. cerevisiae*. ScV-L, correspondiente al genoma viral, presenta dos ORFs sobrepuestos en 130 nucleótidos: el ORF 3' codifica para la proteína de la cápside Gag y el ORF 5' que codifica para la proteína de fusión Gag-Pol correspondiente a RPDR. ScV-M o satélite presenta un ORF que codifica para una preprotoxina. Se destacan secuencias de interés presentes en ambos genomas como sitios de replicación, señales de empaque y secuencias que participan en CML -1 y de unión a ssRNA presente en ScV-L. (Wickner, 1996)

1.3.2. Ciclo de Replicación viral

La propagación viral se produce por un ciclo de replicación conservativa como se muestra en la Figura 2. Se inicia con la síntesis de un (+) ssRNA a partir del dsRNA por la actividad transcriptasa de la RPDR. El ssRNA sale hacia el citoplasma celular, en donde puede ser utilizado como RNA mensajero para la síntesis de las proteínas virales o encapsidado en una nueva partícula viral. Una vez que el ensamble de la partícula viral es completado, la actividad replicasa de la RPDR sintetiza un (-) ssRNA a partir del (+) ssRNA, para formar el genoma del dsRNA presente en el virus maduro, completando el ciclo de replicación viral. Para el caso del virus satélite ScV-M, este utiliza las proteínas virales provenientes de la traducción del L (+) ssRNA para la formación de sus partículas. Estos son capaces de aceptar dos copias de los M-dsRNA a través del fenómeno descrito como empaquetamiento por “llenado de cabeza” (Schmitt y Breinig, 2006).

Para el mantenimiento del nivel citoplasmático de las partículas que conforman el sistema viral, son necesarios los productos génicos de ScV-L en la replicación y encapsidación de los viriones. Es por esto que el ScV-M o virus “satélite” requiere de la presencia de ScV-L o virus “helper” para su propagación, mientras que ScV-L puede permanecer autónomamente. La carencia del virus “helper” lleva a una pérdida progresiva de los virus “satélites” (Wickner, 1996).

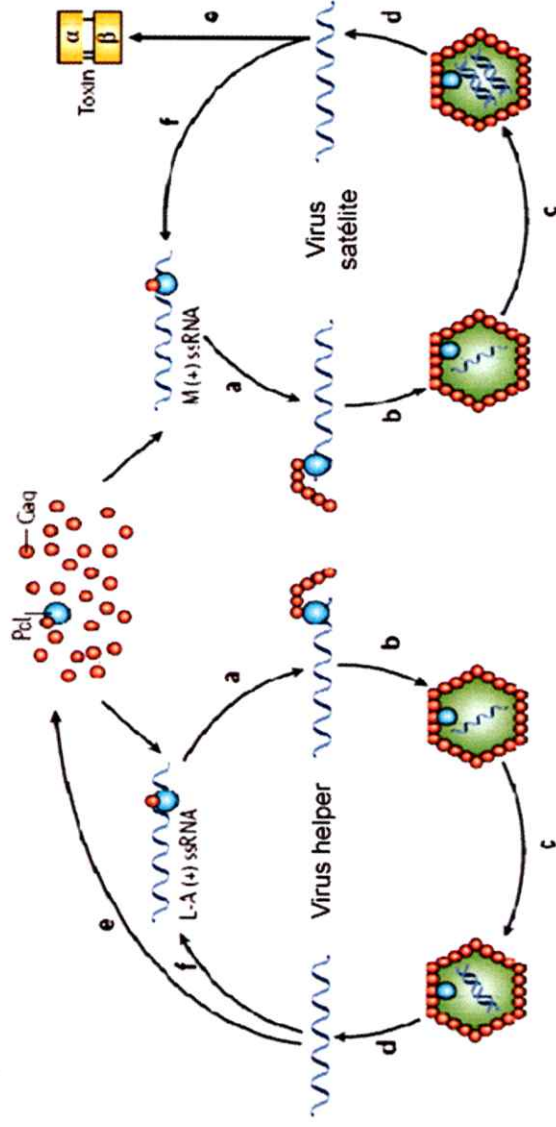


Figura 2. Ciclo de replicación viral en *Saccharomyces cerevisiae*

(a) La encapsidación de los virus satélite (M) y helper (L) requiere de las proteínas virales Gag y Gag-pol, esenciales para el empaquetamiento del ssRNA. Posterior al ensamble del virion (b), el (-) ssRNA es sintetizado (replicación) (c) formando el genoma dsRNA completo. El siguiente paso es la síntesis de (+) ssRNA (transcripción) y salida desde la partícula viral al citoplasma (d). El (+) ssRNA puede ser utilizado como mRNA para traducción de las proteínas virales (e) y además se puede unir a las mismas para la formación de una nueva partícula viral (Schmitt y Breining, 2006).

1.3.3. *Actividad micocida: Producción y acción de la toxina.*

La actividad micocida requiere la presencia de ambos virus ScV-L y ScV-M, siendo el virus de M-dsRNA el que confiere el fenotipo. La traducción del (+) ssRNA genera una preprotoxina que luego de una serie de modificaciones post-traduccionales se transforma en la toxina madura que es exportada. Los mecanismos de acción incluyen la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática o el arresto del ciclo celular (Marquina y cols., 2002). Parámetros como la temperatura, pH y concentración salina influyen en la actividad de la toxina, variables que hay que tener en cuenta para lograr la detección de la actividad micocida en el laboratorio.

1.4 Sistema viral de *Ustilago maydis*

Otro sistema viral *killer* estudiado es el de *Ustilago maydis* en el que se han encontrado múltiples segmentos de dsRNA clasificados como totivirus y separados de acuerdo a su tamaño en tres grupos: H, M y L, donde el número de cada segmento varía de acuerdo a la cepa. La secuenciación de estos elementos (UmV) permitió determinar que el genoma viral corresponde al segmento H (6 kb) que codifica para los polipéptidos virales esenciales: la proteína de la cápside y la RPDR, encontrando además identidad entre segmentos H (H1-H2) de una misma cepa sugiriendo la coexistencia de dos totivirus independientes. Los segmentos M (0,98, 1,2 y 1,4 kb) codifican para toxinas *killer* que corresponden a polipéptidos de bajo peso molecular de 11, 17,7 y 19 kDa de acuerdo a la cepa. Los segmentos L presentan la misma secuencia del extremo 3' de (+) ssRNA del segmento M, por lo que es probable que estos segmentos sean el resultado del procesamiento de M seguido por su

empaquetamiento y replicación. Estos segmentos no muestran regiones codificantes por lo que su función es desconocida (Bruenn, 2002).

Los polipéptidos de la cápside no han sido bien caracterizados, pero presenta un peso molecular similar al ScV. Las partículas de UmV presentan actividad transcriptasa y replicasa, y al menos en un caso, la replicación y transcripción es semiconservativa (Yie y cols., 1998). Mientras que los sitios de iniciación y transcripción presentan secuencias similares a los ScV dsRNAs.

1.5 Totivirus: Ensamble y propagación.

En general los virus requieren del aparato traduccional del hospedero para la formación de sus proteínas compitiendo con los RNA mensajeros celulares. Los (+) ssRNA carecen 5' Cap y en el 3' la cola de adeninas (poli (A)) en sus extremos lo que presenta una desventaja competitiva forzando a adoptar estrategias que permitan tanto la traducción de sus proteínas como la evasión del sistema antiviral del huésped. Estudios realizados en *S. cerevisiae*, permitieron establecer un modelo que comprende la decapitación de los mRNAs celulares. La actividad catalítica que presenta la proteína Gag remueve el cap de los mRNA celulares creando sustratos para la exoribonucleasa que reconoce específicamente a los mRNA sin cap. La disponibilidad de los (+) ssRNAs como sustrato único para la enzima se ve disminuida frente a los mRNAs celulares sin cap, permitiendo que la expresión de los (+) ssRNAs pueda proceder (Figura 3 I) (Masison y cols., 1995).

El mecanismo de ensamble de los ScV (Figura 3 II) surge del descubrimiento de los sitios de unión al ssRNA en el dominio Pol de la proteína de fusión Gag-Pol.

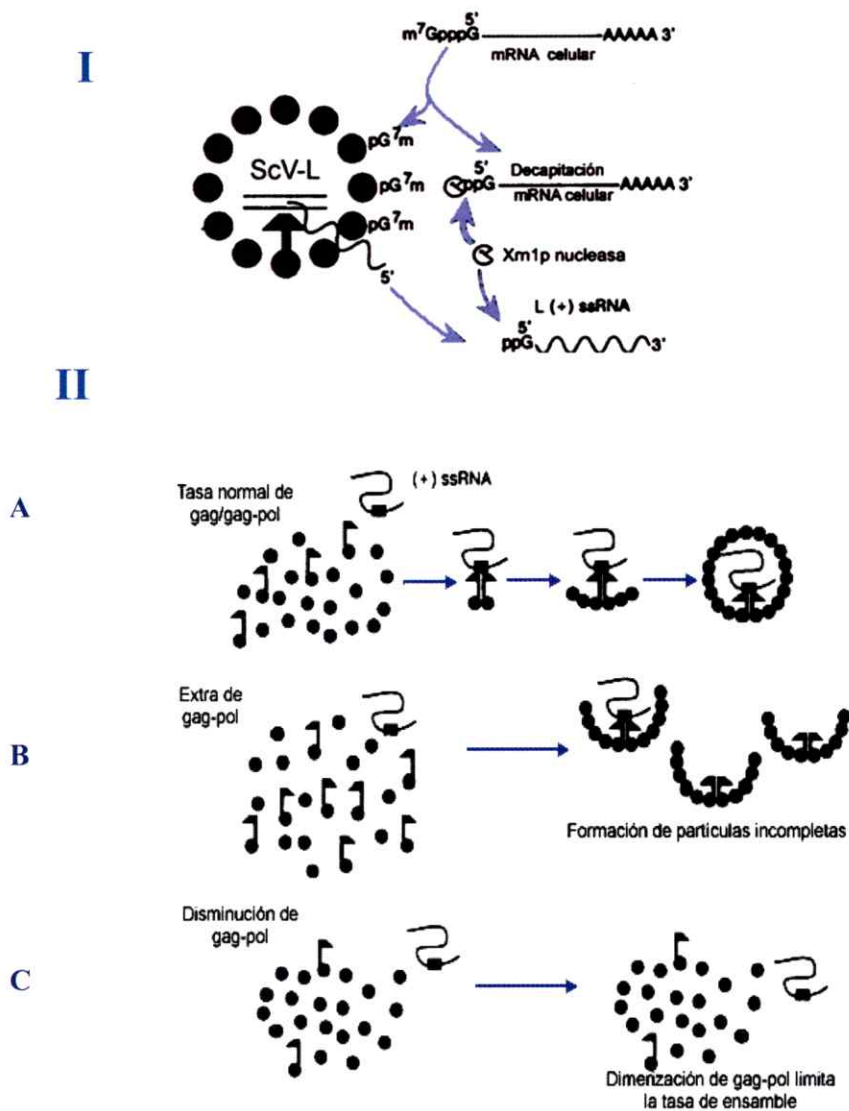


Figura 3. Estrategias utilizadas en la traducción, ensamble y propagación del ScV-L. I, La actividad catalítica de Gag remueve el cap del extremo 5' de los mRNA celulares formando sustratos para la exoribonucleasa (Xrn1p), permitiendo la traducción de (+) ssRNAs (Masison y cols, 1995). II, Los dímeros de la proteína Gag-Pol inician la polimerización produciendo el ensamble de las partículas (A). Un exceso de la proteína de Gag-Pol resulta en la formación de muchas partículas incompletas (B). Mientras que si la concentración decrece, disminuyen los dímeros no produciéndose el ensamble (C) (Dinman y Wickner, 1992).

Según este modelo, el dominio Pol se uniría a (+) ssRNA mientras que el dominio Gag se asocia con los monómeros Gag ensamblando los viriones, asegurando de esta forma la encapsidación del (+) ssRNA en cada nuevo virus (Fujimura y cols., 1992).

La naturaleza crítica del ensamble y la propagación viral proviene de la importancia de la tasa de producción de la proteína Gag-Pol determinada por la eficiencia del CML -1 durante su traducción. Un exceso de la proteína Gag-Pol puede resultar en la formación de partículas incompletas, mientras que una disminución de la proteína de fusión puede provocar que las partículas no se produzcan. En ambos casos se tiene como resultado una baja gradual en los niveles de dsRNA (Dinman y Wickner, 1992).

1.5.1 Corrimiento del marco de lectura -1.

El CML -1 se ha descrito en varios tipos de virus retrovirus, coronavirus, giardiavirus entre otros (Farabaugh, 1996). Este sistema produce proteínas de fusión en el cual los dominios N- y C-terminal están codificados en dos marcos de lectura abiertos distintos y sobrepuestos (Dinman, 1995) durante el proceso de traducción como respuesta a señales del mRNA en el que el ribosoma retrocede en una base.

Mediante experimentos de mutagénesis en retrovirus, ScV y virus de (+)ssRNA se encontraron las señales involucradas en el CML -1. Una secuencia llamada "sitio resbaladizo" o de corrimiento que corresponde al heptámero de la forma X XXY YYZ, donde X puede ser cualquier nucleótido, mientras que Y sólo puede ser adenina o uracilo. El CML ocurre cuando la secuencia XXY se encuentra en el sitio P del ribosoma apareado con el peptidil-tRNA, y la secuencia YYZ en el sitio A junto con el aminoacil-tRNA. Esta organización permite que los tRNA de los

sitios P y A retrocedan en una base produciéndose el CML -1 (Farabaugh, 1996). La otra señal corresponde a la estructura de horquilla llamada RNA “pseudoknot”, que puede aparearse con una región cercana ubicada río abajo. Este último es esencial para la eficiencia del CML ya que produce la pausa del ribosoma sobre el sitio de corrimiento. El conocimiento de estas secuencias llevó al planteamiento de un modelo conocido como corrimiento simultáneo (Figura 4), llamado así por el movimiento y reordenamiento coordinado de los sitios P y A durante la pausa del ribosoma (Dinman, 1995; Farabaugh, 1996)

Para los virus que utilizan el CML la eficiencia de éste es crítica, y la modificación de su frecuencia tiene consecuencias directas en la propagación del virus. En general los parámetros que pueden afectar al CML incluyen: cambios en la estabilidad del ribosoma unido al tRNAs, defectos en la habilidad de reconocimiento del aparato traduccional, y los cambios en el tiempo de residencia del ribosoma durante la traducción (Meskauskas y cols., 2003). El uso de drogas que interfieran durante alguno de estos pasos puede afectar la eficiencia del CML -1 promoviendo la pérdida de los virus de dsRNA (Dinman y cols., 1997).

1.6 Curación de los virus dsRNA

Experimentos realizados principalmente con agentes químicos y físicos han resultado en la pérdida de los dsRNA presentes, transformándolas en cepas “curadas” y sensibles a micotoxinas (Wickner, 1974). La pérdida de la actividad micocida puede resultar por una mutación en cualquiera de los genes nucleares del hospedero, incapacitando la mantención de los dsRNAs.

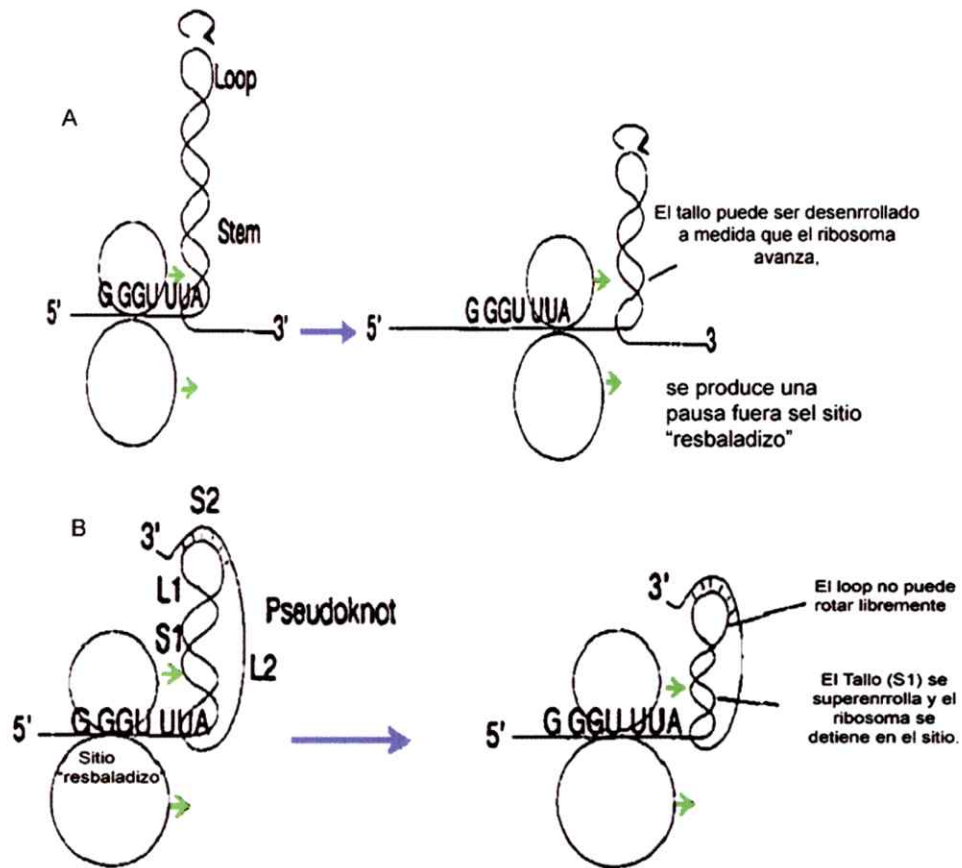


Figura 4. El pseudoknot provoca resistencia al movimiento del ribosoma.

A. El ribosoma puede fácilmente desenrollar el loop formado ya que no es restrictivo en su rotación. B. El ribosoma encuentra resistencia por S1, ya que este no puede ser rotado fácilmente. Si el "pseudoknot" está apropiadamente localizado, el ribosoma pausa sobre el sitio "resbaladizo" y el corrimiento ocurre. S1, Tallo 1; S2, Tallo 2; L1, Loop 1; L2, Loop 2. (Dinman, 1995)

En experimentos realizados en *Yarrowia lipolytica* la radiación UV permitió la eliminación de los dsRNAs destruyendo a los virus o productos celulares necesarios para la propagación viral (Tréton y cols., 1987), mientras que la temperatura, puede inducir la formación de citoplasmas reducidos en *S. cerevisiae*, afectando la mantención viral (Wickner, 1974). Agentes intercalantes de ácidos nucleicos como la naranja de acridina y el bromuro de etidio, también son utilizados en la curación de ScV logrando perder los M-dsRNA y la actividad micocida, (Fink y Styles, 1972; Cansado y cols., 1989; Carroll y Wickner, 1995).

La utilización de drogas que interfieran en el proceso de traducción han permitido eliminar los dsRNAs. La ciclohexamida, un conocido inhibidor de la síntesis de proteínas que actúa en la subunidad ribosómica 60S, afecta a la propagación viral. Experimentos en *S. cerevisiae* han demostrado que una disminución en la concentración de la subunidad 60S provoca la reducción de la traducción de ScV-L, lo que resulta en una pérdida selectiva de ScV-M (Carroll y Wickner, 1995). Inhibidores antivirales de la peptidil-transferasa, afectan la eficiencia del CML -1 (Meskauskas y cols., 2003) y alteran la tasa de síntesis de la proteína Gag-Pol. Entre éstos se encuentran la anisomicina, que inhibe la unión del aminoacil-tRNA con el sitio aceptor del centro de la peptidil-transferasa, desestabilizando la unión en el sitio A entre el tRNA y el ribosoma. Dinman y cols. (1997) adicionaron a cultivos de *S. cerevisiae* concentraciones subletales de anisomicina, para analizar la actividad micocida y contenido de dsRNA. Los resultados mostraron que la pérdida de la actividad micocida se correlaciona con la eliminación de ambos virus de dsRNAs, los que no son detectados a partir de colonias en ninguno de los cultivos tratados con el antibiótico.

1.7 Presencia de dsRNA en *X. dendrorhous*

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete aislada desde exudados de árboles de regiones frías, principalmente Japón y Rusia. Posee una gran importancia biotecnológica debido a que produce pigmentos de alto valor comercial tal como la astaxantina, un pigmento utilizado en la industria farmacéutica y de los salmones (Jhonson, 2003).

La determinación de los ácidos nucleicos totales presente en la cepa UCD 67-385 de esta levadura, permitió detectar EGEs del tipo dsRNA, describiéndose 4 moléculas: L (4,8 kb), M (3,2 kb), S1 (0,8 kb) y S2 (0,6 kb) las cuales fueron asociadas con la existencia de VLPs de tamaño similar a los totivirus (Castillo y Cifuentes, 1994). El análisis de otras cepas de *X. dendrorhous* da cuenta de un polimorfismo en los tamaños de dsRNA, hasta la ausencia de estos elementos (Pfeiffer y cols., 1996). Estudios posteriores permitieron establecer una relación entre el origen geográfico de las cepas y el número de moléculas de dsRNA presentes, encontrándose dos sistemas virales distintos, en donde las cepas de origen japonés poseen 4 moléculas de dsRNA y la de origen ruso poseen un sistema viral compuesto por sólo una molécula de 4,8 kb (Sanhueza, 2007). En *X. dendrorhous* la asociación de los dsRNAs con algún fenotipo incluyendo la actividad micocida, no ha sido establecido en forma clara (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y cols., 1996), demostrándose también que los virus no tienen efecto en la tasa de crecimiento durante la replicación vegetativa de esta levadura (Pfeiffer y cols., 2001). Aunque no se ha detectado algún fenotipo relacionado con la presencia de VLP (Pfeiffer y cols., 1996), en estudios recientes de nuestro laboratorio se ha detectado una actividad

micocida de la cepa UCD 67-385 sobre las levaduras del género *Rhodotorula* (Oviedo, 2007).

A diferencia de *S. cerevisiae* que cuenta con 2 dsRNA correspondiente al genoma viral y su satélite, en *X. dendrorhous* no se han podido relacionar los dsRNAs con algún sistema viral. La similitud en términos de tamaño entre ScV-L (4,6 kb) y las cepas estudiadas de *X. dendrorhous* (L-dsRNA, 4,8 kb), hacen suponer que esta molécula correspondería al virus "helper". Posiblemente en las cepas que poseen tres o cuatro dsRNAs, la molécula M corresponde a un virus "helper" distinto e independiente de L-dsRNA y no a un satélite de este último (Tipper y Bostian, 1984; Magliani, 1997), donde los tamaños de M-dsRNA que varían de 3,1 a 3,7 Kb son mucho mayores a los descritos en *S. cerevisiae* (1,6 a 1,8 Kb). El tamaño de las moléculas S-dsRNA varía de 0,75 a 0,97 Kb (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y cols., 1996), y que es mucho menor que los virus satélites de *S. cerevisiae*, pero son similares a los virus satélites descritos en *Ustilago maydis* (desde 0,98 a 1,4 kb) que codifican para una toxina responsable de la actividad micocida (Koltin y Peery, 1980; Shelbourn y Buck, 1988).

La presencia de diferentes tipos de dsRNA, de VLPs y la actividad micocida encontrada *X. dendrorhous*, hace necesario determinar la participación de cada una de las moléculas dsRNA en el sistema viral, donde los S-dsRNA corresponderían a virus satélites, y M y L-dsRNA a los virus helper.

HIPÓTESIS

En *Xanthophyllomyces dendrorhous* existiría más de un sistema viral compuesto por 2 virus “helper” y 2 virus satélites, donde al menos uno de estos estaría involucrado en una actividad micocida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la relación entre los dsRNA presente en *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su asociación con la producción de micotoxina.

Objetivos específicos

- Optimización del protocolo de extracción de dsRNA.
- Curación de dsRNAs de la cepa UCD 67-385 de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.
- Determinación de la actividad micocida de la cepa UCD 67-385 y comparación de fenotipo con las cepas curadas.
- Comparar las proteínas exportadas por la cepa UCD 67-385 y cepas curadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Células. Las cepas utilizadas fueron: UCD 67-385 (ATCC 24230) y CBS 5908 de *X. dendrorhous*. Como cepa sensible se utilizó *Rhodotorula sloffiae*.

Ácidos nucleicos. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1kb y el DNA del bacteriófago lamda digerido con la enzima de restricción *HindIII*, ambos adquiridos de New England Biolabs.

Enzimas. La enzima Nucleasa S1 adquirida de Promega.

Reactivos Químicos. Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos puntuales, se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios. El antibiótico anisomicina fue adquirido de Sigma.

2.2. Métodos

Métodos de biología molecular y bioquímica. Electroforesis y PAGE-SDS, fueron realizados de acuerdo al manual Sambrook y cols., (1989)

2.2.1. Condiciones de cultivo

Cultivos en medio completo. Para *X. dendrorhous* se utilizó el medio YM que contiene 2% de Glucosa, 0,3% de Extracto de levadura, 0,3% de Extracto de malta y 0,5% de Peptona. Para la forma sólida se adicionó 1,5 % de agar microbiológico (Oxoid).

2.2.2 Optimización de la extracción de RNA.

Lisis de esferoplastos *in situ*. La metodología fue adaptada desde el protocolo utilizado por Stark y Boyd (1986). A partir de 1ml de cultivo de *X. dendrorhous* crecido durante 3 días a 22 °C, se colectaron las células por centrifugación a 10.000 g por 1 min. Se lavaron 2 veces con 500 µl de amortiguador SE (1M sorbitol, 0,25 mM EDTA) y se resuspendieron en 40 µl de solución SE (50 mM DTT, 25 µg de Lysing Enzymes de *Trichoderma haizianum*, Sigma). Se incubó a 37 °C por 4 h para la obtención de los protoplastos. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 1,5% que posee 2 filas de pocillos paralelas separados por 1 cm. En los pocillos de la fila superior se depositaron 50 µl de amortiguador de lisis (TAE 1%, SDS 10%) y 10 µl de amortiguador de carga (0,25% azul de bromofenol, 15% ficoll, 30% glicerol). En los pocillos de la fila inferior se cargaron 40 µl de los protoplastos. El gel se corrió a 50 V con TAE 1% como amortiguador hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Para la visualización de las muestras, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) en TAE 1X y se fotografía bajo luz UV. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó desde la foto del gel con el software Kodak 1D Science (Kodak scientific Image System).

Extracción por fenol ácido y ruptura mecánica. Desde 7 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* crecido durante 3 días a 22°C, se colectaron las células por centrifugación a 10.000 g por 1min. Se lavaron 2 veces con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) y se resuspendieron en 400 µl de TE. La ruptura se realizó mediante agitación en vortex usando 250 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y un volumen de fenol a pH 4,0. La fase acuosa se colectó en un

tubo limpio y se realizó una extracción con un volumen de fenol ácido, y otra con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se adicionó 1 ml de isopropanol absoluto y se incubó a -20°C durante 1 h, se centrifugó a 15.000 g durante 10 min y se resuspendió en 10 µl de H₂O-DEPC.

2.2.3. Digestiones enzimáticas

Digestión con Nucleasa S1. La reacción se realizó a 37°C en 30 mM de amortiguador acetato de potasio pH 4,5, 0,3 M NaCl, 1 mM ZnSO₄ y 5% de glicerol en un volumen final de 20 µl. Se utilizó 1 unidad de enzima por µg de ácido nucleico.

2.2.4. Determinación de la actividad micocida

Preparación del césped sensible

Los ensayos de actividad micocida se confeccionaron céspedes de *R. sloffiae* (cepa sensible) según la metodología de Oviedo (2008). Para esto 10 ml de un cultivo con aproximadamente 10⁷ células/ml se mezcló con 100 ml de medio YM /agar (1,5%) fundido (a 35-40 °C) y con 1 ml de azul de metileno (0,3%). Aproximadamente 25 ml de la mezcla homogeneizada se vertió en un placa petri y se dejó gelificar a temperatura ambiente. En las placas se ajustó el pH a 4,6 con el amortiguador fosfato-citrato. En este tipo de ensayos una actividad micocida positiva se observa por la formación de halos de muerte que se visualizan como un precipitado de azul de metileno alrededor de la muestra sembrada. Se realizaron ensayos con las colonias de *X. dendrorhous* provenientes de placas YM/agar de las cuales se obtiene una muestra con un moldadiante estéril y se aplica en la superficie

del césped. Los céspedes se incubaron a 15 °C hasta la observación de los halos de inhibición.

2.2.5. Experimentos de curación

Determinación de la concentración óptima de antibiótico. Cultivos de la cepa UCD 67-385 fueron tratados con concentraciones variables de anisomicina (0 a 30 μ M). El crecimiento de los cultivos se registró por 5 días, mediante medición de la D.O. a 600 nm y recuento de células viables en placas YM.

Tratamiento de *X. dendrorhous* con anisomicina Desde un cultivo en fase exponencial de la cepa UCD 67-385 se realizaron diluciones seriadas decimales las que se sembraron en placas YM suplementadas con 15 y 30 μ M de anisomicina. Las placas se incubaron a 22 °C por 5 a 7 días hasta el desarrollo de colonias, las que fueron posteriormente sembradas en placas YM/agar. Éstas últimas se incubaron a 22 °C y se conservaron a 4 °C hasta su estudio.

A las colonias obtenidas por el tratamiento se les realizaron ensayos de actividad micocida por duplicado. Además se realizaron cultivos de cada colonia en un volumen de 7 ml de medio YM para extraer el RNA total. Estas muestras se analizaron electroforéticamente para observar los tipos de dsRNAs, utilizándose como control el RNA total de la cepa 67-385. Las colonias que presentaban irregularidades en el patrón de las bandas de dsRNA, fueron analizadas nuevamente para descartar problemas durante la extracción de RNA total y confirmar así los resultados encontrados.

2.2.6. Análisis de las proteínas extracelulares

La obtención de muestras y de extractos proteicos se realizó de acuerdo a los protocolos de Santos de la Sen (1999).

Obtención de las muestras. Se realizaron cultivos (600 ml, medio completo YM sin extracto de levadura) de las distintas cepas de interés. El crecimiento de los cultivos a 22 °C se registró por 7 días, mediante medición de la absorbancia a 600 nm y recuento de células viables en placas YM. En dicho periodo se extrajeron alícuotas representativas de las distintas fases de crecimiento para la precipitación de las proteínas y obtención de precipitado celular.

Obtención de extractos proteicos. Volúmenes de 50 ml del cultivo se centrifugaron por 10 min a 10.000 g. El sobrenadante se filtró con una membrana de PVDF (Millipore, 0,45 µm de poro), se le adicionó etanol a una concentración final de 70% y se incubó en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g por 40 min y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador citrato-fosfato, pH 4,6 y se mantuvieron a -20°C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)

Preparación de las muestras. 40 µl de las muestras se disolvieron en el amortiguador de carga que contiene 0,25 Tris-HCl pH 6,8, 0,1% glicerol, 0,001% azul de bromofenol, 2% SDS y 0,008% de 2-mercaptoetanol. La mezcla se incubó a 100 °C durante 5 min y se cargó en el gel. Para la determinación de la masa molecular se utilizó el marcador MarkerTM Low Range de Sigma, con un rango de tamaño de

6.500 a 66.000 Da. Se construyó una curva de calibración representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a su movilidad electroforética (Rf). De esta forma, determinando el valor del Rf de una proteína se interpola su masa molecular.

Condiciones de corrida y tinción de geles. Se utilizaron geles de poliacrilamida Precise™ (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la electroforesis se utilizó un voltaje constante de 100 V. El gel se tiñó con azul de coomasie (0,25 %, 45% metanol: 10% ácido acético) durante 30 min en agitación. Se retiró el colorante y el gel se destiñó con una solución descolorante formada por metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:7) hasta observar la mayor cantidad de bandas.

3. RESULTADOS

3.1 Optimización del método de extracción de RNA

Para los experimentos de curación se requiriere establecer el contenido de dsRNA presente en cada colonia tratada con anisomicina. Por ello la gran cantidad de muestras que se necesitan analizar demanda un método de extracción de RNA eficiente que debe permitir su análisis en el menor tiempo posible.

Dentro de los métodos de extracción de RNA utilizados en levaduras, la ruptura mecánica con perlas de vidrio (Castillo y Cifuentes, 1994), es el que presenta mejores resultados en *X. dendrorhous* (Sanhueza, 2007). Sin embargo, los volúmenes de células y reactivos que requiere impide el análisis de cientos de muestras en un tiempo prudente. Otro factor a considerar es que en ocasiones se obtiene una baja concentración de las moléculas de RNA observándose solamente los dsRNA de mayor tamaño (L-dsRNA y M-dsRNA). Esta irregularidad impide la utilización del método para detectar la pérdida de dsRNA en las posibles cepas curadas. Por estas razones se procedió a la búsqueda y optimización de los métodos de extracción y/o visualización de los RNA que asegure la presencia de los 4 tipos de dsRNA cumpliendo con los requerimientos experimentales mencionados.

3.1.1 Lisis de esferoplastos *in situ*

Este método ha sido utilizado para determinar la presencia de EGEs en *Kluyveromyces lactis* (Stark y Boyd, 1986). Consta de dos pasos principales que son la obtención de los esferoplastos y la posterior lisis de ellos, la cual se realiza directamente en un gel de agarosa. Los esferoplastos son formados mediante

tratamiento enzimático con enzimas que degradan la pared celular. En un gel de agarosa que posee dos filas de pocillos se deposita el amortiguador de lisis (fila superior) y los esferoplastos (fila inferior). Cuando se aplica la diferencia de potencial, el amortiguador de lisis pasa a través de los esferoplastos provocando su ruptura y liberación de los ácidos nucleicos totales, los cuales ingresan al gel inmediatamente y son separados por el tamaño.

En el análisis de los ácidos nucleicos totales de la cepa UCD 67-385 se espera observar al menos 5 bandas correspondientes al DNA genómico y a los 4 tipos de dsRNA. Sin embargo, como se muestra en la figura 5, en todas las muestras analizadas no se observa un patrón constante en el número de bandas visualizándose en el mejor de los casos 3 bandas que por su migración corresponderían al DNA genómico, L-dsRNA y M-dsRNA. Debajo de estas no se observan otras que pueden corresponder a los S-dsRNAs. La realización de nuevos ensayos no permitieron mejorar la resolución del método, apareciendo en algunas ocasiones una serie de bandas no identificadas, mientras que en otros casos no se observaban bandas. Producto a estos contratiempos y a las irregularidades observadas, el método no aprobó los objetivos planteados, por lo que se procedió a revisar nuevos protocolos.

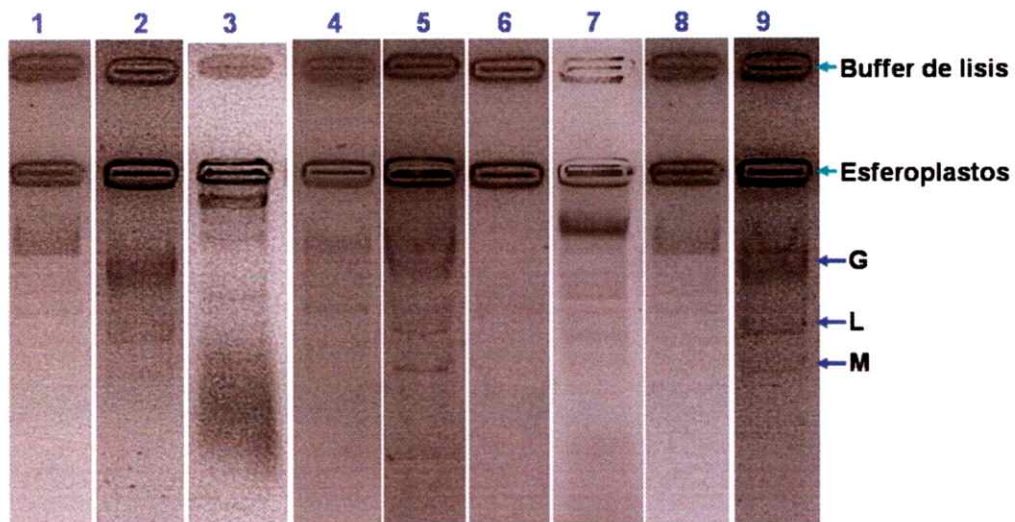


Figura 5. Análisis de los ácidos nucleicos totales mediante lisis de esferoplastos *in situ*. Las muestras provienen de diferentes ensayos realizados con la cepa UCD 67-385. La fotografía del gel muestra las dos filas de pocillos mencionados en la metodología. La resolución del método permite observar 3 bandas (Carril 1, 2, 4, 8 y 9) que por la migración corresponderían al DNA genómico (G), L-dsRNA (L) y M-dsRNA (M). En ocasiones aparece se observa una serie de bandas (Carril 3, 5 y 7) y en otras no se observa ninguna (Carril 6).

3.1.2 Extracción del RNA por ruptura mecánica

Se varió el tiempo de ruptura de las células y los volúmenes utilizados con el fin de buscar una mejoría en los resultados. Como propuesta inicial se decidió mantener las proporciones de los reactivos en un volumen final de 1 ml para efectuar la ruptura en tubos de 1,5 ml, que permiten la manipulación experimental de un número mayor de muestras. Para encontrar las condiciones óptimas de ruptura, que constituye el paso crítico de la extracción, se analizaron dos variables:

Cantidad de células. Es necesario utilizar un volumen mínimo de células que asegure una extracción que permita observar los distintos dsRNA. Para esto se colectaron las células a partir de un cultivo de 50 ml de la cepa UCD 67-385 en fase exponencial de crecimiento y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador TE. Se extrajeron alícuotas de 0,1, 0,2 y 0,3 g de peso húmedo, obteniendo las células para realizar la extracción del RNA considerando un tiempo de ruptura de 15 min. Finalizada la extracción, las muestras se resuspendieron en 20 μ l los que fueron utilizados en la electroforesis

Los resultados de la figura 6A muestran que 0,1 g del concentrado celular son suficientes para observar los dsRNA de mayor tamaño, mientras que en las otras muestras se observan las mismas bandas pero menos intensas. Aunque la extracción no permitió inicialmente observar los 4 tipos de dsRNA, se considerará este resultado para estudiar la siguiente variable de optimización. Considerando el volumen mínimo de células estimado, se determinó arbitrariamente utilizar cultivos de células de 7 ml para realizar los experimentos de curación, del que se obtiene un precipitado celular de alrededor de 0,1 mg.

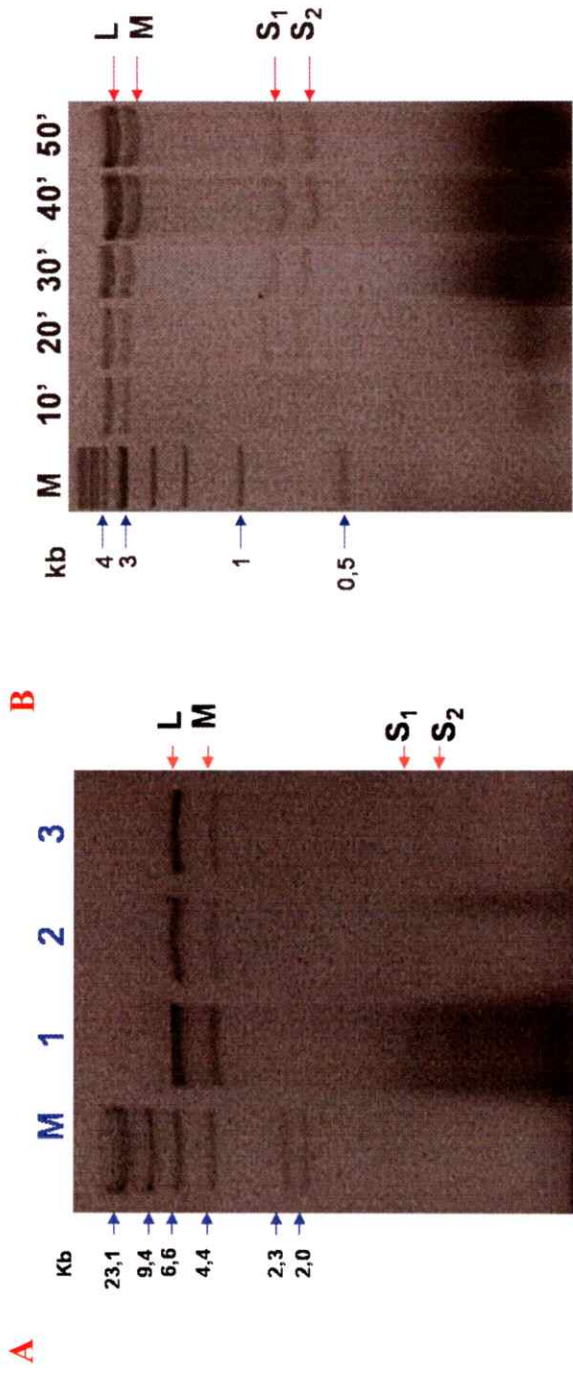


Figura 6. Optimización del protocolo de extracción de RNA por ruptura mecánica. A. Determinación del volumen celular mínimo para la extracción de RNA. Se utilizaron pesos distintos del concentrado celular: 0,1 g (1), 0,2 g (2), 0,3 g (3) (peso húmedo). M: estándar de peso molecular λ Hind III. B. *Determinación del tiempo de ruptura.* Volúmenes de 50 μ l del extracto celular se sometieron a tiempos de ruptura variables para la extracción de RNA. M, estándar de peso molecular 1 kb.

Tiempo de ruptura. Se procedió a variar el tiempo de ruptura en vortex esperando obtener variaciones en la cantidad de RNA y analizar así cualitativamente la presencia de los 4 tipos de dsRNA. El tiempo de ruptura utilizado en el protocolo original corresponde a 3 min (Castillo y Cifuentes, 1994). A partir del concentrado celular utilizado en el ensayo anterior, se tomaron alícuotas de 0,1 g para realizar las extracciones con distintos tiempos de ruptura: 10, 20, 30, 40 y 50 min. Las muestras se resuspendieron en 15 μ l y analizaron mediante electroforesis. Como se observa en la figura 6B, la concentración de los dsRNA aumenta al incrementar el tiempo de ruptura. A los 10 min ya es posible observar claramente los dsRNA de mayor tamaño, mientras que a los 40 y 50 min se obtiene una concentración de dsRNA que permite identificar los 4 tipos de dsRNA. De acuerdo a estos resultados se escogió como tiempo de ruptura 40 min para asegurar de esta forma la visualización de los dsRNA, especialmente los S-dsRNA (S_1 y S_2).

Con el fin de confirmar que las bandas de menor tamaño observadas corresponden a dsRNAs, se trataron las muestras con la enzima Nucleasa S1 que permite eliminar los ácidos nucleicos de hebra simple. Para esto se realizaron las extracciones de RNA con el método anteriormente establecido. De los 20 μ l utilizados para resuspender el RNA, 10 μ l fueron digeridos con la enzima por una hora a 37°C. La electroforesis de las muestras con o sin tratamiento enzimático (Figura 7) no presenta diferencias en el número de bandas, por lo que todas las bandas corresponden a moléculas de dsRNA.

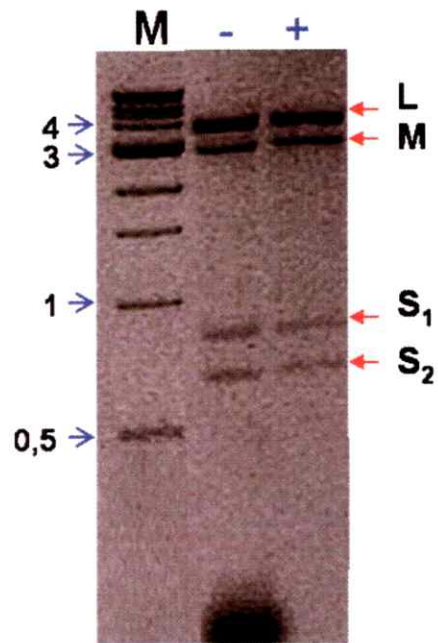


Figura 7. Electroforesis de las muestras tratadas con nucleasa S1. Las muestras analizadas provenientes de la extracción de RNA de la cepa UCD 67-385 presentan las 4 bandas correspondientes a las moléculas de dsRNAs. Las muestras fueron tratadas (+) y no tratadas (-) con la enzima; Carril M, estándar de peso molecular 1kb.

3.2 Experimentos de curación con anisomicina.

Varios tratamientos han permitido eliminar en las levaduras el carácter *killer*, uno de ellos es el tratamiento con anisomicina cuya acción promueve la pérdida de los virus de dsRNA en las levaduras al afectar la eficiencia del CML -1, obteniendo cepas “curadas”. La utilización de este antibiótico permitiría eliminar a los virus de dsRNA en *X. dendrorhous* y determinar su posible asociación con la actividad micocida. Al no existir antecedentes en los que se utiliza este antibiótico en cepas de *X. dendrorhous*, es necesario inicialmente determinar la concentración de anisomicina requerida en los experimentos de curación.

3.2.1 Determinación de la concentración óptima de antibiótico.

En experimentos realizados en cultivos de *S. cerevisiae* con una concentración de anisomicina de 3,8 y 7,6 μM se logra la pérdida del sistema viral completo (Dinman y cols, 1997). Teniendo en cuenta este antecedente la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fue tratada con 0, 3,8 y 7,6 μM de anisomicina y se registró el crecimiento mediante D.O. (600 nm) y recuento de las células viables. Como se muestra en la figura 8A el antibiótico tiene un efecto negativo sobre el crecimiento, el cual es mayor a 7,6 μM que muestra una fase latencia de 22 h. Sin embargo, el efecto no es tan marcado a las 64 h, lo que indica que la concentración del antibiótico no es suficiente para conseguir una mayor inhibición. Se realizaron nuevas curvas con 15, 20, 25 μM de anisomicina, utilizando como control un cultivo sin antibiótico pero con DMSO (cantidad equivalente a la adicionada para solubilizar el antibiótico), con el fin de ver su efecto sobre el crecimiento.

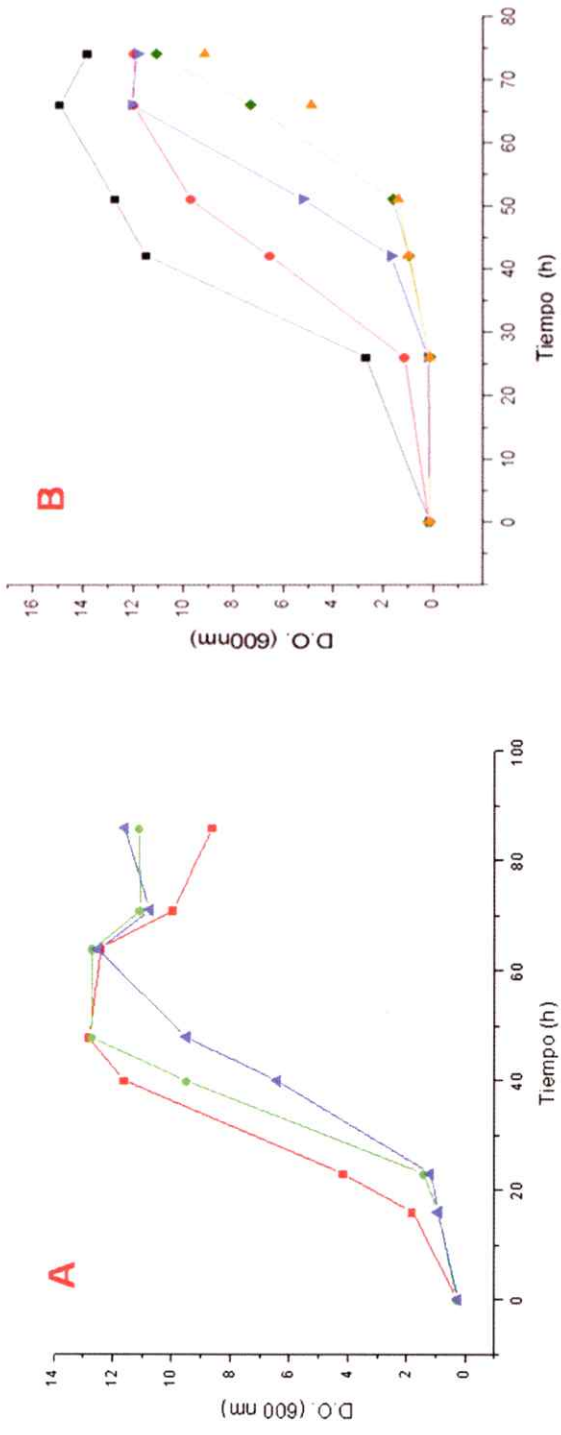


Figura 8. Efecto inhibitorio de la anisomicina sobre el crecimiento de *X. dendrorhous*. Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa 67-385 en medios completos suplementados con anisomicina. A, concentraciones de anisomicina que producen la pérdida de los genomas virales en *S.cerevisiae*: 0 μM (■); 3,8 μM (●); 7,6 μM (▲). B. Se utilizaron concentraciones de anisomicina mayores y se analizó el efecto del DMSO en el crecimiento de la cepa. Control 1, Medio YM 0 μM (■); Control 2, Medio YM con DMSO (●), 0 μM ; 15 μM (▲); 20 μM (◆); 25 μM (▼).

Los resultados de la figura 8B muestran que el DMSO posee un efecto inhibitorio sobre el crecimiento que permanece durante toda la curva, siendo este efecto menor en comparación con el comportamiento de los cultivos con antibiótico. Con 20 y 25 μM de anisomicina se logró inhibir el crecimiento hasta las 51 h, periodo correspondiente a una mayor fase de latencia comparado con el control. Las alícuotas de estos cultivos fueron sembradas hasta el desarrollo de las colonias. Se extrajo RNA de 150 colonias en total, las que fueron analizadas en geles de agarosa. Los resultados obtenidos fueron negativos en cuanto a la obtención de una colonia que carezca de 1 o más dsRNAs (Figura 9).

El recuento de células viables realizado para todos los cultivos tratados o no con el antibiótico no muestra diferencias significativas en el título celular, indicando que la anisomicina actúa como un agente inhibidor del crecimiento celular y no presenta toxicidad sobre la cepa de *X. dendrorhous*.



Figura 9. Electroforesis de RNA. Desde el cultivo de la cepa 67-385 tratado con 25 μ M de anisomicina, se colectaron las colonias a partir del recuento de las células viables para su posterior análisis del contenido de dsRNA. En la electroforesis se observan las 4 moléculas de dsRNA característicos en todas las muestras, por lo que el tratamiento con el antibiótico no permitió la pérdida de moléculas de dsRNA. En total se analizaron 150 colonias no encontrando variación en los resultados. Carril 1 al 11, colonias analizadas provenientes del tratamiento; Carril 12, UCD 67-385; Carril M, marcador de peso molecular 1kb.

3.2.2 Aplicación de la anisomicina en las placas y análisis del contenido de dsRNA.

Se realizó un nuevo ensayo mediante placas YM/agar con concentraciones mayores del antibiótico, con las que se realizaron recuentos de las células viables de un cultivo de la cepa UCD 67-385. Con este propósito se utilizaron tres concentraciones de anisomicina (0, 15 μM y 30 μM) para evaluar la viabilidad de la cepa en estas placas. El análisis de los recuentos sobre estas placas no muestran variaciones significativas en el título celular, al comparar las placas con antibiótico con el control (placa YM), indicando que las concentraciones utilizadas resultan subletales para *X. dendrorhous*. Cabe destacar las diferencias en el tiempo de incubación de las placas necesario para el desarrollo de las colonias. En la placa control, este tiempo corresponde a 3 días, mientras que en las placas suplementadas con 15 μM y 30 μM de anisomicina requieren de 5 y 7 días respectivamente.

Todas las colonias obtenidas por el recuento en las placas con antibiótico fueron conservadas a 4 °C. Se comenzó el análisis con las colonias provenientes de la placa con mayor concentración de anisomicina (30 μM). Con cada una de las colonias se realizaron cultivos sin antibiótico a los que se les extrajo RNA total. Las muestras se analizaron mediante electroforesis (Figura 10). En total se evaluó el contenido de dsRNA de 160 colonias, encontrándose sólo dos colonias que carecen de S₂-dsRNA. Estas cepas curadas fueron nuevamente crecidas en cultivos sin antibiótico analizadas nuevamente para confirmar la pérdida de la molécula.

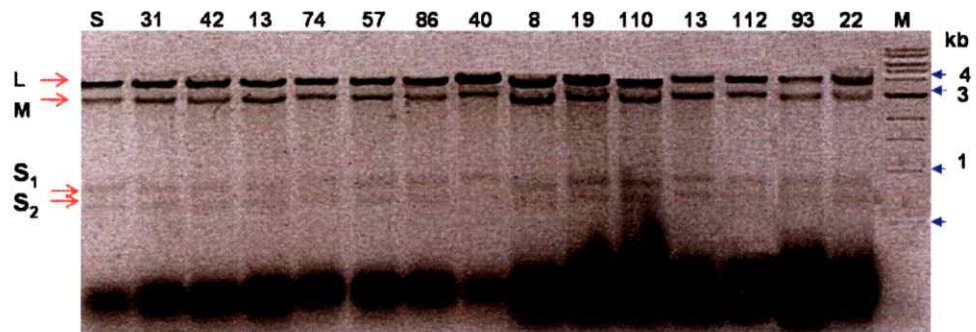


Figura 10. Electroforesis de RNA y análisis del contenido de dsRNA. Cultivos de las colonias crecidas en placas YM/agar con 30 μ M de anisomicina fueron utilizados en la extracción de RNA. Los resultados son un ejemplo de los análisis realizados y muestran la presencia de las 4 moléculas de dsRNA, excepto por la muestra 40 que presenta 3 bandas correspondientes a L-dsRNA, M-dsRNA y S₁-dsRNA. Carril S, UDC 67-385; Carril M, marcador de peso molecular 1kb.

3.2.3 Actividad micocida de las colonias

En el ensayo anterior, paralelamente se realizaron ensayos de actividad micocida para todas las células obtenidas por el tratamiento con anisomicina, ya sea a partir de los cultivos o de las colonias (300 aproximadamente). Para esto cada colonia fue sembrada en el césped de células sensibles con el fin de detectar posibles diferencias de actividad con respecto a la cepa silvestre. Las colonias que presentaban irregularidades en la visualización de su actividad, fueron nuevamente analizadas para descartar otros factores que alteren la observación del fenotipo.

Los resultados obtenidos (Figura 11) muestran actividad micocida en todas las colonias analizadas, no encontrándose diferencias entre las colonias provenientes de las distintas formas de aplicación del antibiótico. El tratamiento con anisomicina no permitió la eliminación del carácter micocida de la cepa.

3.2.4 Análisis de las cepas curadas de S₂-dsRNA

Las dos colonias que presentaban sólo 3 bandas de dsRNA se analizaron nuevamente para confirmar el contenido de dsRNA y la actividad micocida. La extracción de RNA para ambas cepas curadas (40 y 44) confirma la pérdida de S₂-dsRNA. Por esta razón y por la actividad micocida encontrada anteriormente, las cepas serán consideradas como una sola llamada UCD 67-385ΔS₂. La electroforesis se muestra en la figura 12 confirma la pérdida de S₂-dsRNA y la presencia de los todas las moléculas de dsRNA en la cepa silvestre.

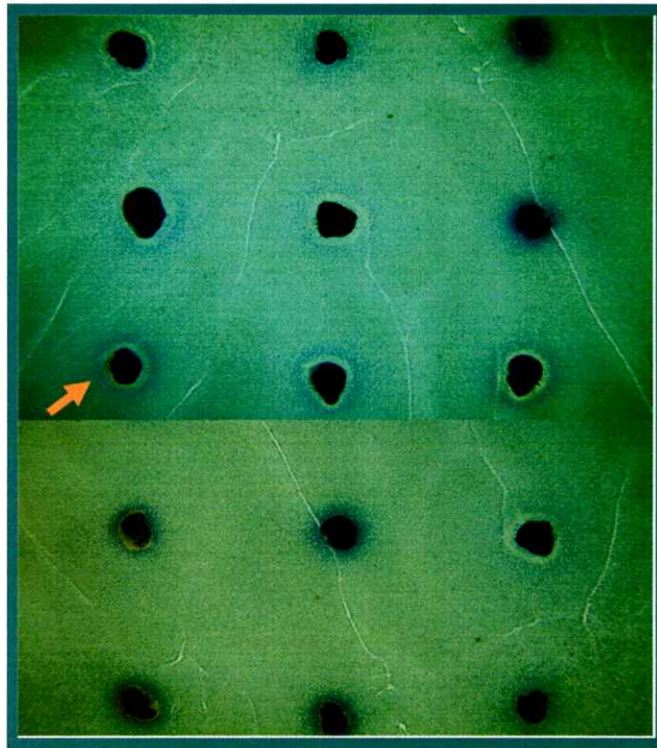


Figura 11. Ensayo de la actividad micocida de las colonias obtenidas por tratamiento con anisomicina. Se realizaron ensayos de actividad en césped de células sensibles con las colonias obtenidas por el tratamiento con anisomicina. Las placas muestran las colonias sembradas y los halos de muerte alrededor de ellas. Las muestras que no presentaban resultados claros se analizaron nuevamente confirmando su actividad. La flecha indica halo de muerte de la cepa UCD 67-385.

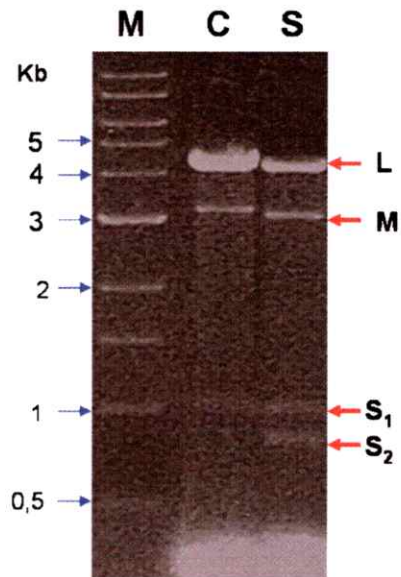


Figura 12. Análisis del contenido de dsRNA de la cepa UCD 67-385 y la cepa curada. Se extrajo RNA de las cepas UCD 67-385 y UCD 67-385 Δ S₂ para comparar el contenido de dsRNA. Se confirma que la cepa curada carece de S₂-dsRNA. Carriles 1: cepa UCD 67-385 Δ S₂; Carril 2: UCD 67-385; Carril M: estándar de peso molecular 1 kb.

En experimentos en *S. cerevisiae* (Carroll y Wickner, 1995) la pérdida progresiva de los dsRNA satélites lleva a un incremento del número de copias del dsRNA helper. En la electroforesis realizada (Figura 12) se observan diferencias en la intensidad de la banda de L-dsRNA entre la cepa UCD 67-385 Δ S₂ y la cepa silvestre, mientras que las bandas de M y S₁-dsRNA son similares. Ante estas diferencias, se determinó la razón entre L/M-dsRNA para la cepa curada y la silvestre mediante cuantificación de las moléculas, encontrándose que en la cepa UCD 67-385 Δ S₂ la razón L/M fue 5, mientras que para la cepa silvestre fue 2. Este incremento de la razón L/M se debe al aumento del número de copias de L-dsRNA, ya que el nivel citoplasmático de M-dsRNA no varía entre las cepas, descartando la disminución de la concentración de M-dsRNA.

En los ensayos de actividad micocida anteriores no se observaron diferencias en ninguna de las colonias analizadas, en los cuales las cepas curadas presentaban el fenotipo. Nuevamente se realizaron céspedes en el cual se sembraron distintas cepas de *X. dendrorhous*: UCD 67-385, CBS 5908, que presentan los 4 dsRNAs; y la cepa UCD 67-385 Δ S₂. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados confirman la actividad micocida en las cepas curadas por lo que concluimos que la molécula S₂-dsRNA no participa en el fenotipo (Figura 13).

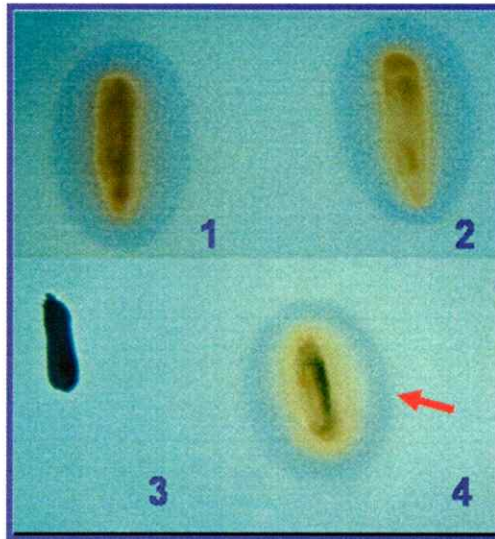


Figura 13. Ensayo de la actividad micocida de las cepas curadas. Para el ensayo se utilizaron colonias de las cepas UCD 67-385 (1), CBS 5908 (2), que presentan los 4 dsRNAs, más la cepa curada que carece de S_2 -dsRNA (4), y como control negativo se utilizó *R. sloffiae* (3). Se observan los halos de muerte (precipitado azul) alrededor de las cepas UCD 67-385, CBS 5908 y las curadas, lo que indica que la pérdida de S_2 -dsRNA no afecta la actividad micocida. La placa se incubó a 15 °C. La flecha indica el halo de muerte

Análisis de las proteínas exportadas

Para elaborar un perfil de las proteínas exportadas por las cepas UCD 67-385 y UCD 67-385 Δ S₂ de *X. dendrorhous*, se realizaron cultivos a los cuales se les registró su crecimiento mediante D.O (600nm) y recuento de células viables. En distintas fases del crecimiento del cultivo se obtuvieron las proteínas extracelulares mediante precipitación con etanol y las muestras se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). El resultado de la figura 14 muestra que ambas cepas presentan el mismo contenido de proteínas extracelulares, observándose 3 bandas que tienen un tamaño aproximado de 22,5-17,8 y 16 KDa las que podrían corresponder a la micoxina. La pérdida de S₂-dsRNA no produce variaciones en el perfil de las proteínas extracelulares, por lo que esta molécula no codificaría para las proteínas exportadas.

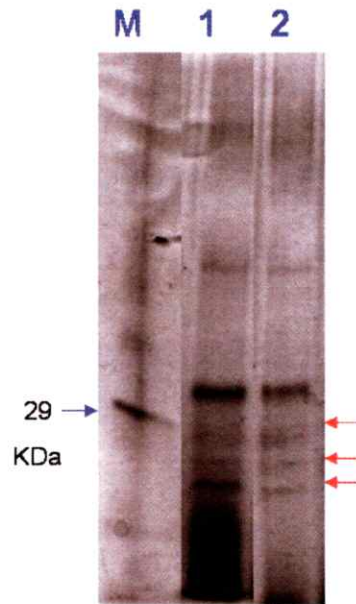


Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los extractos proteicos analizados provienen de cultivos en fase exponencial de las distintas cepas de *X. dendrorhous*, de los cuales se extrajeron alícuotas libre de células para precipitar las proteínas extracelulares con etanol. Las flechas indican las proteínas de interés. Carril 1: Cepa UCD 67-385 Δ S₂; Carril 2: Cepa UCD 67-385; M: Marcador de peso molecular.

DISCUSION

Optimización del protocolo de extracción de RNA

La cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* presenta 4 moléculas de dsRNA, cuya función se desconoce (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeifer y cols 1996). Una forma de abordar este problema es la curación de una o más moléculas de dsRNA y determinar el fenotipo resultante. La realización de ensayos de actividad micocida de las colonias obtenidas en los experimentos de curación, no permitiría relacionar la pérdida de una o más moléculas con algún fenotipo en el huésped. Esto implica el análisis de una gran cantidad de muestras para determinar el contenido de dsRNA, lo que demanda un método de extracción de RNA eficiente. El protocolo de lisis *in situ* (Stark y Boyd, 1986) nos permitió observar los L y M-dsRNAs a pesar de que estos se encontrarían encapsidados en VLPs. La ausencia de los S₁ y S₂-dsRNAs, se puede deber a la degradación de estas moléculas o a la falta de lisis de los protoplastos no produciendo una concentración suficiente de dsRNA para su visualización.

La extracción de RNA por ruptura mecánica con perlas de vidrio utiliza fenol ácido como reactivo principal, el cual permite desnaturar y precipitar proteínas, mientras que el pH ácido permite solubilizar el DNA. La optimización de este método disminuyen el volumen de células/reactivos, lo que permitió aumentar el número de muestras analizadas simultáneamente además de asegurar una concentración de dsRNA para observar constantemente las 4 moléculas en todas las muestras analizadas. De esta forma se contó con una metodología que pudo ser utilizada en los experimentos de curación.

Tratamiento con anisomicina

La anisomicina interfiere el CML -1 durante el proceso de traducción del genoma viral lo que lleva a la pérdida de las moléculas de dsRNA (Dinman y cols, 1997; Meskauskas y cols, 2003). Al no existir antecedentes del uso la anisomicina en cepas de *X. dendrorhous*, se utilizó inicialmente concentraciones probadas en *S. cerevisiae* (Dinman y cols, 1997), las que no resultaron tóxicas para la cepa UCD 67-385. En las curvas de crecimiento con anisomicina, sólo se observa un incremento en la fase latencia, efecto que se agudiza al aumentar la concentración del antiviral. Un periodo de inhibición en el crecimiento mayor aumentaría la probabilidad de que las células sobrevivientes hayan perdido algún dsRNA. Con este fin, se incrementó la concentración hasta 7 veces mayores a las utilizadas en *S. cerevisiae*. A pesar de esto las curvas no muestran una inhibición permanente del crecimiento, diferencia que podría ser por la mayor resistencia de la pared celular en *X. dendrorhous* y/o por una menor afinidad del antibiótico al ribosoma lo que disminuyen su efectividad.

La aplicación del antibiótico al medio de cultivo no permitió la curación de la cepa, a diferencia de lo observado en *S. cerevisiae* a concentraciones menores (0,4 - 3,8 μ M) que inducen la eliminación del sistema viral completo (Dinman y cols, 1997). Sólo en la exposición permanente durante la formación de las colonias en placas suplementadas con anisomicina se obtuvieron cepas que carecen de S₂-dsRNA. Las concentraciones de anisomicina utilizadas en *X. dendrorhous* permitieron eliminar sólo la molécula S₂-dsRNA. Un incremento en la concentración del antibiótico en los experimentos de curación permitiría conseguir la pérdida de las otras moléculas de dsRNA y de la actividad micocida. La pérdida de los dsRNA requiere de una disminución progresiva en el número de los virus, por lo que la

exposición de generaciones sucesivas al antibiótico incrementaría la probabilidad de encontrar células que carezcan de estos elementos. Por esta razón actualmente se están realizando nuevos experimentos con mayores concentraciones del antibiótico, además de analizar colonias obtenidas a partir de la fase exponencial tardía de crecimiento desde cultivos suplementados con el anisomicina.

La curación de la cepa de *X. dendrorhous* mediante tratamiento con anisomicina indicaría que algunos de los virus presentes requieren del CML -1 durante la traducción del genoma viral para la mantención de las partículas virales (Dinman y cols, 1997; Dinman y Wickner, 1992). La molécula S₂-dsRNA, aunque no participa en la actividad micocida presente en la cepa, correspondería a un dsRNA satélite de un genoma viral de mayor tamaño (L ó M-dsRNA).

La mantención y propagación de los niveles de micovirus requiere de las proteínas virales Gag y Gag-Pol codificadas por el genoma viral L-dsRNA en *S. cerevisiae* las que sólo serían proporcionadas para la propagación del dsRNA satélite (M-dsRNA) después que los requerimientos del virus Helper sean cubiertos (Carroll y Wickner, 1995). Según esto la pérdida de los dsRNA satélites lleva a un incremento del número de copias del dsRNA helper. En las cepas curadas de S₂-dsRNA, la razón L/M es mayor al de la cepa silvestre. Un incremento en el número de copias de L-dsRNA sugiere que esta molécula cumple la función de virus helper para la propagación de S₂-dsRNA satélite. La mantención de M-dsRNA y S₁-dsRNA a pesar del tratamiento con anisomicina hace suponer que el nivel citoplasmático de estas moléculas no se ve afectado, por lo que podrían constituir un sistema viral independiente en donde M sería el virus helper y S₁-dsRNA el satélite. La presencia de dos sistemas virales independientes en una misma célula huésped es un fenómeno

poco descrito, siendo el único caso el sistema viral presente en *Ustilago maydis* en el que se encuentran mayores antecedentes. No se han realizado experimentos de curación en esta levadura, por lo que no hay informes del comportamiento de sus sistemas virales que permitan comparar con los resultados de este trabajo.

Actividad micocida de *X. dendrorhous*

Las condiciones de temperatura y pH utilizados en los ensayos de actividad micocida permitieron detectar el fenotipo en la cepa UCD 67-385, las que son similares a las utilizadas en otras levaduras con actividad micocida. La detección del fenotipo depende de la estabilidad de la micotoxina las que se caracterizan por ser inestables y necesitan condiciones específicas para su actividad (Santos de la Sen, 1999).

En el análisis de proteínas extracelulares no se encontraron variaciones en el número de bandas detectadas entre la cepa UCD 67-385 y UCD 67-385 Δ S₂, por lo que S₂-dsRNA no codificaría para las proteínas de exportación. De acuerdo a lo descrito en *Ustilago maydis*, las toxinas responsable del fenotipo *killer* (Koltin y Peery, 1980; Shelbourn y Buck, 1988) tienen un tamaño de 19-11-17,7 KDa, las que son codificadas en genomas de 1,4-0,98 y 1,2Kb respectivamente (Magliani y cols, 1997). Considerando estas observaciones y las proteínas detectadas que tienen un tamaño 22,5-17,7 y 15 KDa las que corresponderían a la toxina. La micotoxina podría estar codificada en la molécula S₁-dsRNA. Para definir este sistema, es necesaria la realización de nuevos tratamientos de curación que permita la eliminación de S₁-dsRNA y determinar la correlación con la actividad micocida.

CONCLUSIONES

1. La pérdida de S₂-dsRNA incrementa el número de copias de L-dsRNA, sugiriendo que su propagación depende de los productos traducidos a partir del L-dsRNA. Ambas moléculas constituirían un sistema viral formado por el virus satélite (S₂) y helper (L).
2. La molécula S₂-dsRNA no es responsable de la actividad micocida presente en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.
3. El CML-1 participa durante el proceso de traducción de las proteínas virales en *X. dendrorhous* ya que la disminución de su eficiencia provocada por la anisomicina afectó la propagación de S₂-dsRNA.
4. La molécula S₂-dsRNA no codifica para las proteínas de exportación.

1. BIBLIOGRAFÍA

Bruenn J. 2002. The double-stranded RNA viruses of *Ustilago Maydis* and their killer toxins. dsRNA Genetics elements. Tavantzis S. CRC Press. Boca Ratón.

Cansado J., Longo E., Agrelo D., Villa T. 1989. Curing of the killer character of *Saccharomyces cerevisiae* with acridine orange. FEMS Microbiol. Lett. 65: 233-238.

Carroll, K., Wickner, R. 1995. Translation and M1 double-stranded RNA propagation: MAK18-RPL41B and cycloheximide curing. J. Bacteriol. 177: 2887-2891.

Castillo, A., Cifuentes, V. 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. Curr. Genet. 26: 364-368.

Dinman, JD. 1995. Ribosomal frameshifting in yeast viruses. Yeast 11: 1115-1127.

Dinman, JD., Ruiz-Echevarria, M., Czaplinski, K., Peltz, S. 1997. Peptidil transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: development of model systems. Proc. Natl. Acad. USA. 94: 6606-6611.

Dinman, JD., Wickner R. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. J. Virol. 66: 3669-3676.

Farabaugh P. 1996. Programmed translational frameshifting. Microbiol. Rev. 60: 103-134

Fink G., Styles C. 1972. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 2846-2849.

Fujimura T., Ribas J.C., Makhov M., Wickner R. 1992. Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature* 359: 746-749.

Ghabrial S., Patterson J. 1999. Totiviruses (Totiviridae). Granoff A., Webster R. (eds). *Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition. pp 1808-1817. Academic Press. New York, USA.

Johnson, E. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol* 6: 169-174.

Koltin, Y., Levine, R. and Peery, T., 1980. Assignment of functions to segments of the dsRNA genome of the *Ustilago maydis* virus. *Mol. Gen. Genet.* 178: 181-186.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiol. Rev.* 10: 369-400.

Marquina D., Santos A., Peinado J. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5: 65-71.

Masison D., Blanc A., Ribas J.C., Carrol K., Sonenberg N., Wickner R. 1995. Decoying the cap-mRNA degradation system by double-stranded RNA virus and poly(A)-mRNA surveillance by yeast antiviral system. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2763-2771.

Mertens P. 2004. The dsRNA viruses. *Virus Res.* 101: 3-13.

Meskauskas, A., Harger, JW., Muldoon., KL., Dinman, J. 2003. Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9: 982-992.

Oviedo V. 2008. Espectro de actividad micocida de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Memoria de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Pfeiffer, I., Kuscera, J., Varga, J., Párduez, A., Ferenczy, L. 1996. Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 30: 294-297.

Sanhueza M. 2007. Caracterización genética de moléculas de dsRNA presentes en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Memoria de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Santos de la Sen A. 1999. Estudio de la actividad killer de *Pichia membranifaciens* CYC 1106: Producción y Caracterización Bioquímica. Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Shelbourn, S.L., Day, P.R. and Buck, K.W., 1988. Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 killer strain of *Ustilago maydis*. *J. Gen. Virol.* 69: 975-982.

Schmitt, M., Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 257-276.

Schmitt, M., Breinig, F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 212-220.

Stark M., Boyd A. 1986. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J.* 5: 1995-2000.

Tipper D., Bostian K. 1984. Double-Stranded Acid Killer Systems in Yeast. *Microbiol. Rev.* 48: 125-156

Tréton B., Le Dall M., Heslot H. 1987. UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* 12: 37-39

Yie S., Podila G., and Bozarth R. Semiconservative strand-displacement transcription of the M2 dsRNA segment of *Ustilago maydis* virus. *Vir Res*, 2: 221-238

Wickner R. 1974. "Killer Character" of *Saccharomyces cerevisiae*: Curing by Growth at Elevated Temperature. *J. Bacteriol.* 117: 1356-1357.

Wickner R., 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60: 250-265