

UCH-FC
MAG-Microbiología
S 194
C.1

**IDENTIFICACIÓN DE UN SISTEMA VIRAL
DEL TIPO dsRNA PRESENTE EN
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magister en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Mario Andrés Sanhueza Cubillos

Noviembre, 2008

**Director de Tesis
Dr. Marcelo Baeza Cancino**

**Co-Director de Tesis
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán**



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

MARIO ANDRÉS SANHUEZA CUBILLOS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 06 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:
Dr. Marcelo Baeza

.....

Co-Director de Tesis
Dr. Víctor Cifuentes

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Guiliani

.....

Dra. Margarita Carú

.....



[Handwritten signatures and scribbles over the signature lines]



A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

El término de un proceso de esta importancia implica hacer notorios los sentimientos de agradecimiento a las personas que permitieron de diversa forma, alcanzar el fin. Académicamente, la formación científica se la agradezco en gran parte a Marcelo, quien trató de corregir hasta el más mínimo detalle en el proceso de este trabajo. De la misma forma, el grupo de trabajo del Laboratorio de Genética ha formado parte de estos resultados, tanto a nivel de apoyo anímico, intelectual como material. La figura principal del Dr. Cifuentes dentro en este grupo será agradecida constantemente, ya que es tanto la base del funcionamiento del grupo, como de mi formación científica.

La compañía de mi grupo de amigos es constantemente una base, tanto para recordar cada aspecto aprendido, como para planear proyectos, ideas y felicidades futuras. Cada uno de estos objetivos cumplidos, se convierte en un objetivo colectivo, el cual es motivo de orgullo para cada uno de ellos.

Este objetivo sin embargo, es primeramente entregado a mi familia. Tanto por ser la base de mi vida, formadora de mis recuerdos y estímulo para mi futuro, como por ser el principal apoyo que me ha permitido llegar acá. El logro presentado en este momento será simplemente uno de los tantos motivos de unión, felicidad y orgullo de los cuales todos nosotros tenemos que sentirnos participes en gran medida. Los objetivos cada vez serán mayores y nos darán más felicidad, por lo que todo detalle que ha sido cultivado hasta ahora, nos permitirá conseguirlos de la mejor manera.

Agradezco finalmente a los proyectos FONDECYT N°1040450 y FONDECYT N°11060157 por el financiamiento para el trabajo realizado.



INDICE

Índice.....	iv
Índice de figuras.....	v
Índice de Tablas.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	x
1. Introducción.....	1
1.1 Sistema viral de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2 Replicación viral en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3 Relación con el huésped.....	6
1.4 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	8
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
2. Materiales y métodos.....	13
2.1. Materiales.....	13
2.2 Métodos.....	16
3. Resultados.....	24
4. Discusión.....	52
5. Conclusiones.....	60
6. Bibliografía.....	61



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura genómica de los virus dsRNA presentes en <i>S. cerevisiae</i>	3
Figura 2. Ciclo replicativo del sistema <i>killer</i> en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 3. Electroforesis de RNA total aislado desde cepas de <i>X. dendrorhous</i>	25
Figura 4. Hibridación por Dot-blot entre moléculas de dsRNA de <i>X. dendrorhous</i>	28
Figura 5. Comportamiento de los dsRNA de la cepa UCD 67-385 en medio YM.....	31
Figura 6. Comportamiento de los dsRNA de la cepa UCD 67-385 en medio mínimo glucosa.....	32
Figura 7. Comportamiento de los dsRNA de la cepa VKM-Y 2786 en medio YM.....	33
Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de <i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385.....	34
Figura 9. Verificación de los clones obtenidos utilizando oligonucleótidos de secuencia aleatoria.....	36
Figura 10. Secuencia del alineamiento de los clones de la molécula L-385.....	39
Figura 11. Alineamiento de la secuencia de la molécula L-385 con la base de datos nucleotídica.....	40
Figura 12. Alineamiento de la secuencia traducida de la molécula L-385 con la base de datos de nucleótidos traducida.....	41
Figura 13. Sitios de corrimiento del marco de lectura en la molécula L-385.....	43
Figura 14. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de RDRP de diversos virus de levaduras.....	47
Figura 15. Dendrograma del alineamiento de las secuencias de RDRP de distintos sistemas virales presentes en levaduras.....	48
Figura 16. Alineamiento de las secuencias de las moléculas L-385 y M ₁ -385.....	50
Figura 17. Reacción de RT-PCR utilizando partidores específicos a la secuencia de L-385.....	51



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>X. dendrorhous</i> utilizadas en este estudio.....	14
Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados en cada una de las reacciones.....	15
Tabla 3. Cepas de <i>X. dendrorhous</i> agrupadas según su origen geográfico y la presencia de moléculas de dsRNA.....	26
Tabla 4. Totivirus cuya secuencia genómica fue utilizada para comparar con la secuencia obtenida del genoma del virus XdV-L.....	45



ABREVIATURAS

cDNA	DNA copia
CML	Corrimiento del marco de lectura
DEPC	dietil pirocarbonato
EGE	elementos genéticos extracromosómicos
dsDNA	DNA de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
LB	medio de cultivo Luria Bertani
MM _v	medio mínimo Vogel
MWCO	rango de corte de peso molecular
ORF	marco abierto de lectura
RDRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
RT-PCR	reacción de transcripción reversa acoplada a PCR
SDS	dodecil sulfato de sodio
ssRNA	DNA de hebra simple
TAE	amortiguador tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador tris-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	luz ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β D-galactopiranosido
VLP	partícula tipo virus
YM	medio de cultivo completo

RESUMEN

En diversos microorganismos se ha descrito la existencia de moléculas de RNA de doble hebra encapsidadas en partículas tipo virus. Se ha asociado la presencia de estos elementos con características del huésped como la producción de toxinas. Tal es el caso del sistema *killer* de *Saccharomyces cerevisiae*, del cual se conoce su funcionamiento y estructura, y que está compuesto por 2 virus con genomas de RNA de doble hebra, que codifican para diversas toxinas y para las proteínas estructurales de estos virus.

En varias cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se ha observado la presencia de moléculas de RNA de doble hebra, pero en ninguna de ellas se han podido asociar a algún fenotipo. En este trabajo se caracterizaron las moléculas de dsRNA presentes en diversas cepas de *X. dendrorhous*, en términos de su origen, secuencias y relación con el huésped. Asimismo se analizó bioinformáticamente la secuencia de estas moléculas de dsRNA y su identidad con genomas virales ya descritos.

Al analizar las moléculas de dsRNA presentes en cada una de las cepas estudiadas, se logró agruparlas según su origen geográfico en 5 clases: las que presentan 4 moléculas de dsRNA (Grupo I: UCD 67-385 y CBS 5908); las que presentan 2 (Grupo II: CRUB 1149 y RV-4); las que presentan 1 de alto tamaño (Grupo III: VKM-Y 2059, VKM-Y 2266 y VKM-Y 2786); la que posee 1 molécula de menor tamaño (Grupo IV: UCD 68-653.3), y las que no poseen (Grupo V: CBS 6938 y UCD 67-210). Se observó que sólo la cepa UCD 67-210 no presenta el mismo patrón de moléculas que las cepas de su mismo origen.

Para determinar si existe algún grado de identidad entre las moléculas presentes en distintas cepas de *X. dendrorhous*, se realizaron experimentos de hibridación. No se observó similitud entre las moléculas de distinto origen, sin

embargo, se encontró identidad entre las moléculas L-dsRNA y M₁-dsRNA de las cepas de origen japonés, indicándonos un sistema distinto a los anteriormente caracterizados en otras levaduras, al presentarse al menos 2 moléculas con similar secuencia en el mismo huésped.

Para observar si la presencia de estas moléculas depende de factores propios del huésped, se realizaron curvas de crecimiento de 2 cepas de *X. dendrorhous*, cambiando las condiciones de cultivo. En la cepa UCD 67-385 se observó el aumento relativo de la molécula M₁-dsRNA respecto a la de L-dsRNA, sugiriéndonos nuevamente la presencia de 2 sistemas virales independientes coexistiendo en el mismo huésped.

Finalmente se logró clonar y secuenciar gran parte de las secuencias de las moléculas L-dsRNA y M-dsRNA de la cepa UCD 67-385. El análisis de las secuencias de la primera molécula, nos permitió definir un segmento que posee un alto nivel de identidad con RNA polimerasas dependientes de RNA, propias de otros sistemas virales de levaduras. La comparación de todas estas secuencias sugiere que el virus XdV-L, presente en esta cepa, pertenecería a la familia *totiviridae* y lo asocia por primera vez a otros sistemas virales de levaduras.

ABSTRACT

In several microorganisms the existence of double stranded RNA molecules encapsidated in virus like particles has been described. These elements have been associated with host features such as toxin production. This is the case of the *S. cerevisiae* killer system, composed by two viruses with double stranded RNA genomes that encode toxins and structural proteins of these viruses.

Strains of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* have double stranded RNA molecules, but their function or phenotype in the host is unknown. In this work the double stranded RNA molecules of *X. dendrorhous* were characterized in relation to source origin, sequence and relationship with the host. Also, the sequence of these molecules and their identity with previously described viral genomes were bioinformatically analyzed.

From the analysis of double stranded RNA molecules present in each strain, they can be grouped in 5 classes: strains with 4 double stranded molecules (Group I: UCD 67-385 y CBS 5908); with 2 (Group II: CRUB 1149 y RV-4); with a large size molecule (Group III: VKM-Y 2059, VKM-Y 2266 y VKM-Y 2786); with a smaller molecule (Group IV: UCD 68-653.3), and the strains that don't have any molecule (Group V: CBS 6938 y UCD 67-210). The strain UCD 67-210 was the only one that not shows the same molecules pattern of other strains from the same origin.

Hybridization experiments were performed to determine the existence of identity among the dsRNA molecules of different *X. dendrorhous* strains. No similarity was observed between molecules of the different origin, but identity was found between the L-dsRNA and M₁-dsRNA molecules of japanese strains, suggesting a different viral system of the previously characterized in other yeasts, because the presence of two molecules with similar sequence in the same host.

To determine if the presence of these molecules depends of host factors, growth curves under different conditions of two *X. dendrorhous* strains were made. In the UCD 67-385 strain, it was observed a increase of the ratio M_1 -dsRNA/L-dsRNA, suggesting us again the presence of two independent viral systems, coexisting in the same host.

Finally, the most part of the UCD 67-385 strain L-dsRNA and M_1 -dsRNA genomes were cloned and sequenced. The sequence analysis of the first molecule allow us to define a segment that posses a high identity with RNA dependent RNA polymerases of other yeast viral systems. The comparison of all these sequences predicts that XdV-L virus would belong to the *totiviridae* family and it is associate for the first time with other yeast viral systems.

1. INTRODUCCION

Una amplia gama de microorganismos posee elementos genéticos extracromosómicos (EGEs), mantenidos en forma estable y que solo en pocos casos se han podido asociar con fenotipos distinguibles o algún cambio a nivel fisiológico del huésped (Magliani y col., 1997; Schmitt y Breinig, 2002). Los fenotipos asociados a EGEs conocidos hasta ahora corresponden a virulencia, senescencia, apareamiento y la producción de toxinas. En levaduras y hongos filamentosos, los EGEs pueden ser del tipo DNA de doble hebra (dsDNA) circular o lineal, o RNA de doble hebra (dsRNA) encapsidadas en partículas tipo virus (VLPs, del inglés **Virus-Like Particles**). Estas son partículas icosaédricas de un tamaño aproximado de 40 nm que, a diferencia de otros virus como los de mamíferos, no poseen un ciclo infectivo extracelular y no son nocivos para el huésped, siendo transferidos solo a la descendencia o a otras células mediante apareamiento (Schmitt y Breinig, 2002). Los virus de dsRNA se han agrupado en 8 familias según la presencia de una cápside que proteja su genoma, o por la segmentación de su genoma en distintas partículas. La familia mejor caracterizada corresponde a la *Totiviridae*, que agrupa virus con un genoma no segmentados, que codifican para las 2 proteínas esenciales para su replicación (Ghabrial, 1998). Dentro de esta familia se encuentran los virus presentes en las levaduras *Ustilago maydis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

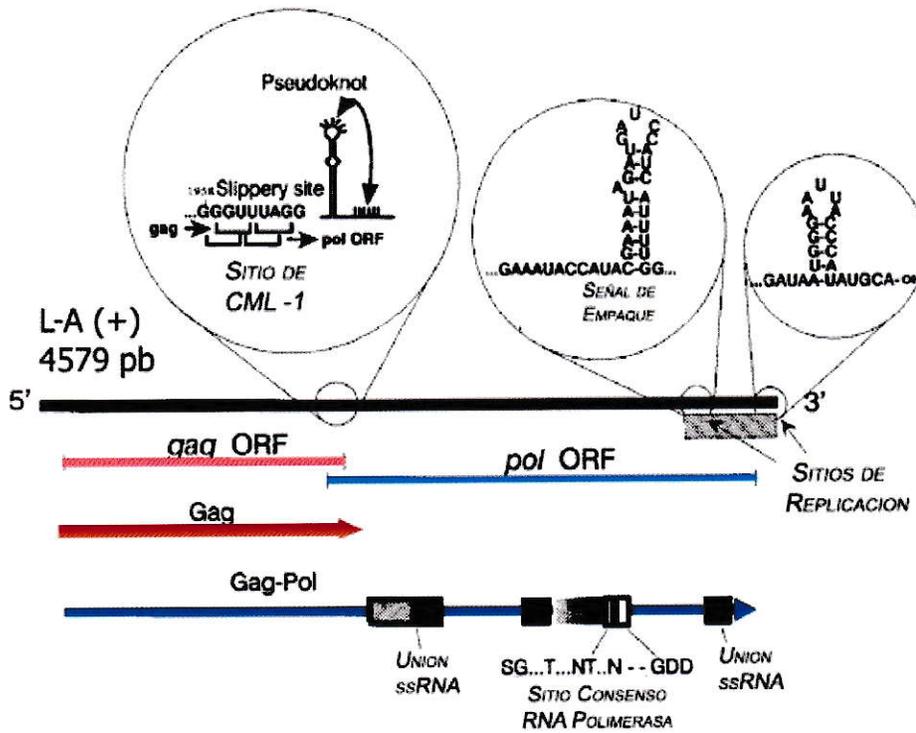
Sistema viral de *Saccharomyces cerevisiae*

Los virus de levaduras mejor caracterizados son los responsables del fenotipo *killer* de *S. cerevisiae*, descrito por primera vez en 1963 (Makower y Bevan, 1963) y que corresponde a la producción de toxinas de naturaleza proteica con la capacidad de matar a levaduras sensibles de la misma especie o cercanamente relacionadas (Wickner, 1996). Posteriormente, se definió que el fenotipo *killer*, solo se expresa

cuando están presentes dos virus de dsRNA del género *Totivirus* en una misma célula: un virus con un genoma de 4,6 kb denominado ScV-L, que codifica para una RNA Polimerasa dependiente de RNA (RDRP, Gag-Pol) y para la proteína estructural de la cápside viral (Gag); y otro virus dsRNA con genoma de menor tamaño (1.6 kb, ScV-M), que codifica para la toxina y para la inmunidad contra la misma (Schmitt y Breinig, 2006). La presencia del virus ScV-L y la expresión de los genes codificados en su genoma son necesarias para la replicación y propagación del virus ScV-M, por lo que este último se ha denominado como virus "Satélite". En cambio, el virus ScV-L o virus "Helper" puede permanecer autónomamente, pero es incapaz de producir alguna toxina o efecto apreciable en la célula blanco (Wickner, 1986).

En relación a su organización genómica, el virus ScV-L posee 2 marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés Open Reading Frame) que se sobreponen en 130 pb (Fig. 1) (Diamond y col., 1989). Hacia la región 3' de la molécula se presenta un *loop* de 35 bases que está involucrado en el reconocimiento de la proteína de la cápside y el empacamiento del RNA en la partícula viral. En el extremo 3' se presenta otro *loop*, la cual es necesaria para la replicación de la molécula una vez dentro de la partícula viral (Ribas y Wickner, 1992; Routhier y Bruenn, 1998). Estas zonas son claves en el ensamblaje y replicación de los virus, por lo que constituyen las únicas secuencias con un alto grado de identidad en los distintos genomas de virus dsRNA (Ribas y Wickner, 1992).

A. ScV-L



B. ScV-M

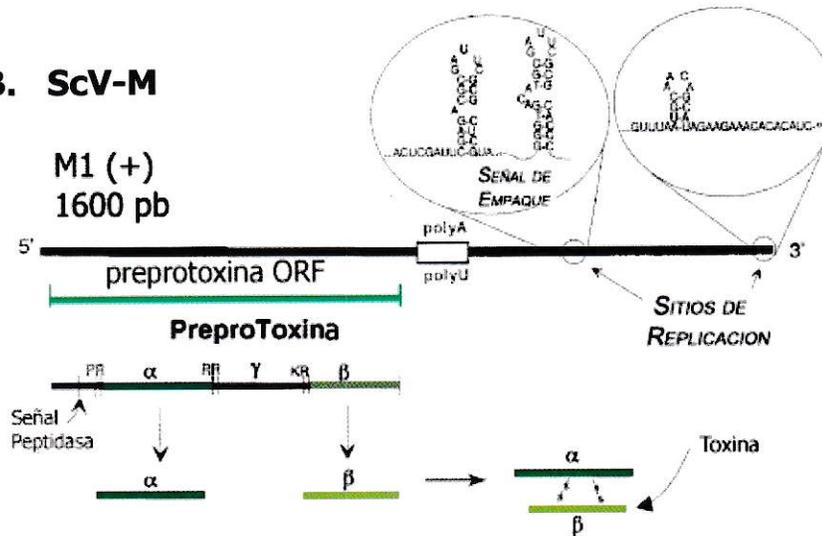


Figura 1. Estructura genómica de los virus dsRNA presentes en *Saccharomyces cerevisiae* A. ScV-L. En rojo se presenta el ORF codificante para la proteína de la cápside, Gag; y en azul, el ORF codificante del segmento Pol de la proteína de fusión Gag-Pol. B. ScV-M. En verde se muestra el ORF codificante para la preprotoxina del sistema *killer*. (Adaptado de Wickner, 1996)

Replicación Viral en *S. cerevisiae*.

Los viriones son partículas icosaédricas de un diámetro de 39 nm formadas por 60 dímeros de la proteína Gag y un dímero de Gag-Pol, que en el caso de ScV-L, poseen en su interior una copia del genoma L-dsRNA (Schmitt y Breinig, 2006). Para el virión ScV-M, éste puede contener hasta dos moléculas del genoma M-dsRNA. El ciclo de replicación viral se inicia con la síntesis y posterior expulsión de la molécula (+) ssRNA por parte del virión. En el citoplasma del huésped, ésta molécula puede ser traducida para formar las proteínas virales, o bien puede ser encapsidada en una nueva partícula viral. Una vez encapsidada, el ssRNA es replicado por la proteína Gag-Pol, formando un nuevo virión maduro (Fig. 2) (Ribas y Wickner, 1998; Schmitt y Breinig, 2002).

La proporción de las proteínas Gag y Gag-Pol presentes en el citoplasma celular, es regulada mediante un evento de corrimiento de marco de lectura (CML) a nivel ribosómico (Dinman y Wickner, 1992). Ambos ORFs del genoma del virus ScV-L presentan una sobreposición de 130 nucleótidos, por lo que el segundo ORF sólo es traducido si el ribosoma cambia de marco de lectura una base hacia el extremo 5' (CML -1) al verse dificultado de avanzar por la presencia de una estructura secundaria (horquilla o *pseudoknot*) en el (+) ssRNA (Fig. 1) (Dinman, 1995). De esta forma el segundo ORF codificante para la RDRP, se traduce como una proteína de fusión Gag-Pol. Con este mecanismo de control, la concentración de la proteína Gag es aproximadamente 50 veces mayor a la de Gag-Pol, relación necesaria para el correcto ensamblaje de los viriones. Un exceso de moléculas Gag implica la formación de VLPs vacíos; en cambio una carencia de la misma proteína provoca un ensamblaje de VLPs incompletos, proceso iniciado por la proteína Gag-Pol. (Dinman y Wickner, 1992).

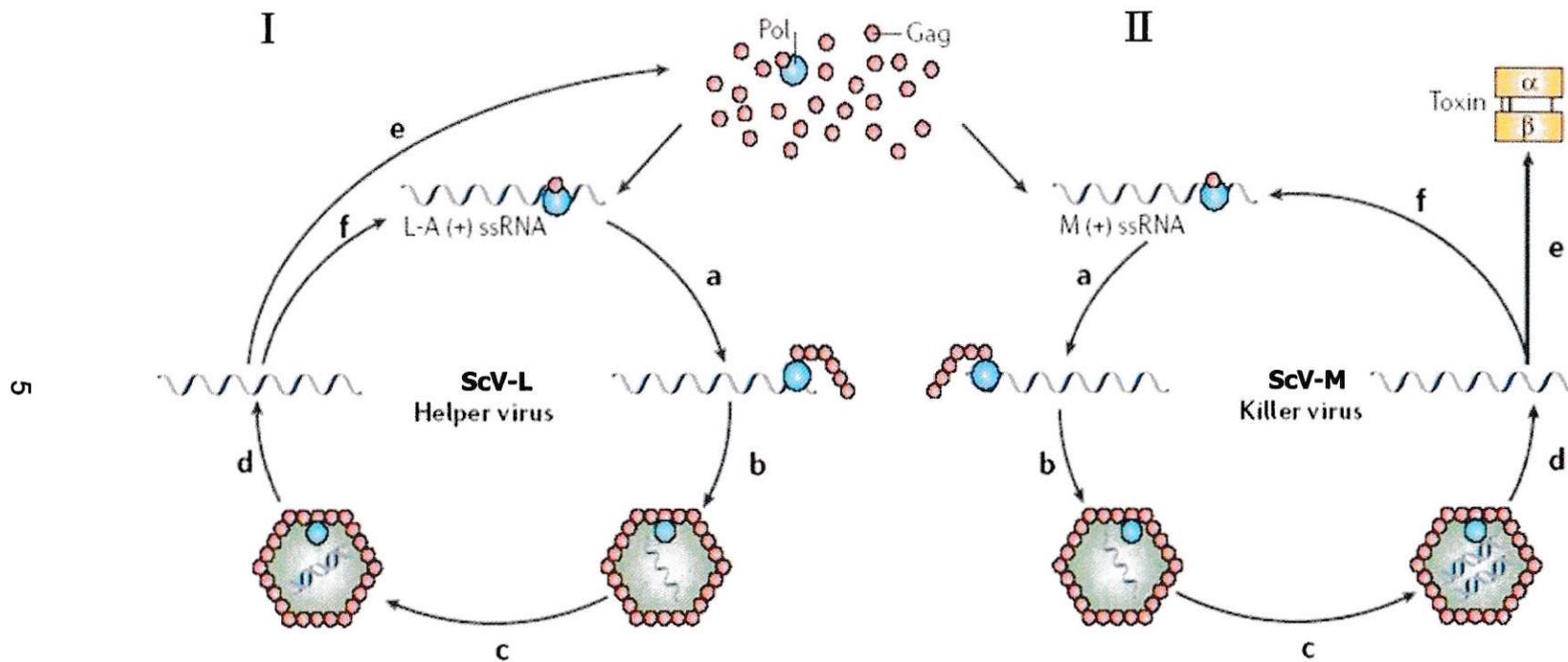


Figura 2. Ciclo replicativo del sistema *killer* en *Saccharomyces cerevisiae*. I: Ciclo del virus ScV-L, o virus Helper, donde la expulsión de la molécula (+)ssRNA de la partícula viral (d) lleva a la traducción de las proteínas Gag y Gag-Pol (e), y a la encapsidación de una nueva molécula (f, a, b). Una vez encapsidado, el genoma viral es replicado por la RNA polimerasa Gag-Pol (c). II. Ciclo del virus ScV-M o virus *killer*, el cual utiliza el mismo mecanismo para traducir la preprotoxina (e). En este caso, el virus es capaz de encapsidar hasta 2 moléculas de dsRNA (c). (Schmitt y Breinig, 2006).

El fenotipo *killer* de este sistema viral se basa en 3 tipos distintos de toxinas, denominados K1, K2 y K28; cada uno codificado por su genoma dsRNA respectivo (M1, M2 y M28). Además, estas moléculas poseerían su propia inmunidad, cuyo mecanismo de acción aún no ha sido totalmente identificado (Breinig y col., 2006). La producción de la toxina se inicia con la traducción del ssRNA viral, obteniéndose una proteína sin procesar o pre-toxina, la cual tras una serie de modificaciones realizadas en el citoplasma del huésped, es exportada en forma de toxina madura (Riffer y col., 2002). Las toxinas del tipo K1 y K2 son reconocidas por la pared celular de la célula sensible y forman un canal iónico en la membrana citoplasmática, provocando la muerte celular por choque osmótico. En cambio, la toxina del tipo K28 es capaz de ingresar al núcleo de la célula sensible y provocar la muerte mediante el arresto del ciclo celular en la fase G2 (Schmitt y Tipper, 1995; Schmitt y Breinig, 2006).

Relación con el huésped

La permanencia de las VLPs en el citoplasma del huésped depende tanto de la correcta traducción de los RNA virales como de la estabilidad de los productos formados. Ambos aspectos se encuentran determinados tanto del metabolismo como de factores propios del huésped que condicionan la cantidad de partículas formadas, toxina producida, y el tiempo en que éstas son formadas (Wickner, 1996).

A lo largo del estudio de la biología de *S.cerevisiae*, se describieron una serie de mutantes en los cuales su actividad micocida se encontraba alterada tanto positiva como negativamente. Se denominaron mutantes SKI (**S**uper **K**iller) a los que presentaban un mayor efecto tóxico. Posteriormente, se determinó que los genes relacionados con estos mutantes, en su estado silvestre disminuían el efecto micocida de la levadura, por lo que la alteración de ellos significaba un aumento en la toxicidad (Wickner y col., 1991). Por otra parte se describieron los mutantes MAK (**M**antencion del **K**iller), los cuales perdían actividad *killer*, por lo que se definió que las alteraciones se presentaban en genes que normalmente aumentaban o mantenían el efecto *killer*

de la levadura (Wickner y Leibowitz, 1979). El análisis de los mutantes permitió determinar que estaban relacionados con genes involucrados en la formación y estabilidad del ribosoma, ya sea al codificar proteínas ribosómicas o bien, ser genes cuyos productos forman la subunidad 60S del ribosoma. Al encontrarse una baja cantidad de la subunidad 60S en estos mutantes, la maquinaria celular favorece la traducción de genes celulares que poseen una cola poli A, disminuyendo la cantidad de mRNA viral traducido, eliminándose de esta forma los genomas virales del sistema *killer* (Ohtake y Wickner, 1995).

Por otra parte, los genes *SKI* se relacionaron con la interacción del ribosoma con los mRNA externos al huésped, y con la estabilidad de los mismos, los cuales a diferencia de los mensajeros del huésped, carecen de 5'Cap y una cola poli A en el extremo 3'. En la levadura se presentan nucleasas que degradan específicamente mRNA sin 5'Cap, lo cual forma parte de un mecanismo de regulación de la calidad de los mRNA celulares, y al mismo tiempo constituye una defensa natural del huésped contra el sistema viral (Widner y Wickner, 1993). Estas proteínas podrían tener mayor importancia en algún punto del ciclo celular del huésped, como mecanismo regulatorio, alterando de esa manera la concentración temporal de partículas virales en el huésped (Wickner, 1996).

De la misma forma, variaciones y escisiones de genes expresados en fases específicas del crecimiento celular, tales como genes codificantes de porinas mitocondriales, aumentan hasta 50 veces la producción de la proteína Gag, llegando a formar hasta el 20% de las proteínas totales presentes en el huésped (Dihanich y col., 1989). Asimismo, las condiciones metabólicas del huésped y la fuente de carbono que utilice, podrían tener una gran importancia en la presencia y estabilidad de estas partículas. Se ha definido que la síntesis de L-dsRNA es favorecida hasta 3 veces cuando *S. cerevisiae* crece en un medio con etanol, el cual es una fuente de carbono no fermentable (Oliver y col., 1977).

Todos estos factores, junto con la búsqueda de genes involucrados en la formación del ribosoma, han permitido definir en gran parte la relación existente entre este sistema viral y la levadura huésped. El sistema descrito en *S. cerevisiae* constituyó la base para el estudio de otros sistemas virales de levaduras, como el caso de *Ustilago maydis* y *Kluyveromyces lactis*, y la herramienta que más contribuyó para esta finalidad fue el clonamiento de las moléculas de dsRNA que componen estos sistemas. Ante la imposibilidad de una secuenciación directa de las moléculas, el clonamiento resulta fundamental como primer paso en el estudio de algún nuevo sistema de EGE en levaduras. Para este propósito se han propuesto diversos métodos que abordan las principales complicaciones encontradas, como son la alta variabilidad nucleotídica presente en diversos sistemas virales, y la naturaleza de las moléculas de dsRNA, lo cual implica el desarrollo de protocolos con un alto número de pasos y una baja eficiencia, que finalmente dificultan la identificación de un sistema viral.

Utilizando estos métodos se ha logrado identificar distintos sistemas virales de levaduras, los cuales en algunos casos poseen similitudes con el sistema *killer* de *S. cerevisiae*. Sin embargo existen otras levaduras de importancia industrial o médica que poseen moléculas de dsRNA pero que aun no han sido caracterizadas, como el caso de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Xanthophyllomyces dendrorhous

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete de importancia biotecnológica, ya que es uno de los mayores organismos productores de astaxantina, pigmento ampliamente utilizado en la acuicultura y la industria de salmones (Kuscera y col., 2000). Actualmente, además se utiliza este pigmento en la industria farmacéutica como un potente antioxidante con efectos beneficiosos para la salud. Esta levadura se ha aislado desde exudados de árboles encontrados en regiones frías del planeta. Se reporta la presencia de cepas originarias de Alaska, Finlandia y Argentina, pero la

mayor cantidad de las cepas encontradas en los bancos de cultivos se han aislado desde Japón y Rusia.

Estudios han mostrado diferencias entre cepas de diversos orígenes geográficos, tanto en el patrón de marcadores genéticos como en parámetros fisiológicos. Para el caso de la cepa UCD 67-210, se ha definido como cepa tipo de *Phaffia rhodozyma*, especie que corresponde al estado fisiológico imperfecto de *X. dendrorhous*. Marcadores genéticos (ITS, RAPD, RFLP) avalan la separación filogenética de esa cepa, aunque posee el mismo origen geográfico y producción de pigmentos que otras cepas de *X. dendrorhous* (Fell y Blatt, 1999). Pese a esto, no se ha alcanzado consenso para definir si esta cepa corresponde a una especie distinta o si el origen geográfico condiciona la diversidad de caracteres dentro de la misma especie.

Anteriores trabajos han definido la presencia de moléculas de dsRNA y de VLPs en cepas de *X. dendrorhous* mantenidos de manera estable a nivel citoplasmático (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y col., 1996). Se ha observado un polimorfismo de las moléculas de dsRNA a nivel de número (0 a 4) o de tamaño (0,7 a 4,8 kb). Por otra parte, se ha tratado de definir una relación entre este polimorfismo con el origen geográfico de estas cepas (Sanhueza, 2007), sin embargo aún no se ha asociado la presencia de estas moléculas con algún fenotipo reconocible, ni el origen geográfico de ellas ha sido relacionado con este polimorfismo encontrado, tal como si ha sido descrito en otros sistemas virales de dsRNA (Myers y col., 1988; Tooley y col., 1989)

No existen estudios orientados a identificar la estructura genómica de las moléculas de dsRNA. De la misma forma, no se ha logrado relacionarlas con la formación de las partículas virales, ni con algún otro sistema anteriormente descrito en levaduras. Tampoco se ha definido el comportamiento de estos virus en relación al huésped y su efecto en el crecimiento del mismo, tal como se definió de la relación entre el sistema *killer*, los genes propios de *S. cerevisiae* y su metabolismo.

En el presente trabajo se caracterizaron las moléculas de dsRNA presentes en distintas cepas de *X. dendrorhous*, buscando identificar su secuencia mediante el clonamiento de estos dsRNA. Por otra parte, se relacionaron mediante experimentos de hibridación las cepas aisladas de diversos orígenes en relación a las moléculas de dsRNA que presenten y la similitud entre ellas.

HIPOTESIS

Las moléculas de dsRNA presentes en *X. dendrorhous* forman parte de a lo menos un sistema viral, codificando las proteínas necesarias para su formación. Este sistema sería distinto según el origen geográfico de cada cepa y estaría relacionado con factores propios del estado metabólico del huésped.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las moléculas de dsRNA presentes extracromosómicamente en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Objetivos Específicos

- Clonar y secuenciar las moléculas de dsRNA presentes en *X. dendrorhous*. Analizar bioinformáticamente las secuencias obtenidas y determinar una posible relación con virus encontrados en otras levaduras.
- Analizar si existe una relación entre los dsRNA presentes en cepas con diversos orígenes geográficos. Determinación de polimorfismo viral mediante técnicas de hibridación.
- Determinar el número y la concentración de dsRNA durante la curva de crecimiento de *X. dendrorhous*. Determinar presencia y morfología de VLPs en el huésped durante sus fases de crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

I.1. Células

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas están enlistadas en la tabla 1. Para la transformación de los cDNA obtenidos se utilizó la cepa electrocompetente de *Escherichia coli*, DH5 α .

I.2. Ácidos Nucleicos

Como estándar de peso molecular se utilizaron el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind*III, y el marcador 1 kb, adquirido a New England Biolabs. Los partidores utilizados en las reacciones de transcripción reversa, PCR y secuenciación son indicados en la Tabla 2.

I.3. Plasmidios

Para el clonamiento en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* se utilizó el plasmidio pBluescript SK⁻ (pBS).

I.4. Enzimas

Las enzimas DNasa I, RNasa A, RNasa H, Nucleasa S1, T4 DNA ligasa, T4 RNA ligasa, transcriptasa reversa de M-MLV, DNA polimerasa I, DNA Polimerasa I fragmento Klenow, Taq DNA Polimerasa, y las endonucleasas de restricción *EcoRV* y *NotI* y fueron adquiridas de las empresas Promega, New England BioLabs, Sigma y Gibco-BRL

Tabla 1. Cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este estudio.

Cepa	Otros bancos	Origen	Sustrato
UCD 67-385	ATCC 24230 CBS 7919 VKM Y-2791	Honshu, Japón	<i>Betula tauschii</i>
UCD 67-210	ATCC 24202 CBS 5905 VKM Y-2274	Honshu, Japón	<i>Fagus crenata,</i>
UCD 67-383	ATCC 24203 VKM Y-2790 CBS 5908	Honshu, Japón	<i>Alnus japonica,</i>
CBS 6938	ATCC 74438 VKM Y-2793	Finlandia	<i>Betula sp.,</i>
VKM-Y 2059	ATCC 96814	Moscú, Rusia	<i>Betula verrucosa</i>
VKM-Y 2266	UCD 76-18	Moscú, Rusia	<i>Betula verrucosa</i>
VKM-Y 2786	CBS 7918	Moscú, Rusia	<i>Betula verrucosa</i>
UCD 68-653.3	ATCC 24228 VKM Y-2814	Alaska, USA	<i>Betula papyrifera</i>
CRUB 1149	No disponible	Bariloche, Argentina	Muestras de agua Lago Ilón

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en cada uno de los pasos especificados.

Partidor	Secuencia (5' → 3')	Función
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Específicos al plasmidio pBS. Secuenciación y análisis por PCR
M13 rv	AACAGCTATGACCATG	
T3	ATTAACCTCACTAAAG	
T7	AATACGACTCACTATAG	
13.1	GCCATACAGTTCTCCATAAG	Secuenciación clon L13
13.2	CTGACACATCGGACTATCTA	
13.3	GGCAGAACTAATCAGAGGCG	
SR	TAAGCGTAGCTCTCGTACAG	
SR2	TAGTGCATGCCTATCCTAGG	
SR3	TCCTTACAGGTCTTGTAC	
SR4	AAGCGCATCTTCTGGGCTCA	
13.IF	GCTTAGGGTGGCTCAAATGT	
13.IR	TAGTTCTGCCATCTGATCAC	
13.4	ATTCAGAGACAGATTCCCCG	
13.5	GCTCGTAAATAGAATCGACG	
13.6	ATAGTCAACACAGCTCGGG	
13.7	GCTACATACGAAGCTGTCTC	
13.8	GGTATTTTAGCTCTACACGG	
L6.19F	TTCGCATTGGAAGTGTGGG	
13.4R	CTGACTGTCTGTTTCCTTC	Secuenciación de nuevos clones
13.5R	CCGAGCTGTGTTGACTATTG	
13.7R	CTTTTGCGTCAGCGAATCTG	
L7.2F	GCAGAGAAATGCCTGATGCA	
L8.2F	CCGTGTAGAGCTAAAATACC	
L6.19R	TCCGTTGTGCAAGCTATCAC	
L14F	GCTCGCACATCTGCATGACT	Secuenciación clon L14
L14R	TTCCTCTACCCATATGTGCG	
L17F	GCCGACAGACAAATTCCTT	Secuenciación clon L17
L17IF	AACTCCCATCTGTTGCCCGT	
L17R	TCAGCACTTGCATAGGTGTG	
L17IR	CCAAATTCACGGCCCATGAA	
M19IF	TTGAGCCACCCTAAGCGCAT	Secuenciación clon M19
M19F	GCTCCGTCAATGGTATTACC	
M19IR	GGCAGAACTAATCAGAGGC	
M19R	CTGTACGAGAGCTACGCTTA	
M19.F1	GGTAATACCATTGACGGAGC	
M19R1	TAAGCGTAGCTCTCGTACAG	
M19.R2	ACTTCGGCAGCTCCTCCATT	
M19.F2	GATAGGCATGCACTACTTCA	

I.5. Reactivos Químicos

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos, fueron adquiridos de Sigma Chemical, Merck y Difco Laboratories.

I.6. Kits de Purificación y marcaje radioactivo.

Los kits de purificación plasmidial Miniprep y purificación de productos de PCR fueron adquiridos a Promega. El kit de purificación de DNA a partir de geles de agarosa, GeneClean II, fue adquirido de la compañía Bio 101. Para la eliminación de marca radiactiva no incorporada en la sonda, se utilizaron las microcolumnas ProbeQuant G-50 de GE Healthcare.

II. Métodos

II.1. Condiciones de Cultivo.

II.1.1 Cultivos en medio completo.

X. dendrorhous.

Se utilizó el medio YM que contiene 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de malta y 0,5% de Peptona, suplementado con 2% P/V de Glucosa. En forma sólida se adicionó 1,5% de Bacto-Agar.

E. coli.

Se utilizó el medio Luria Bertani (LB) que contiene 1% de Triptona, 0,5% de extracto de levadura y 0,5% de NaCl. Para los medios sólidos se agregó 1,5% de Bacto-Agar. Para el reconocimiento de transformantes, al medio LB-agar, se le agregó 100 µg/ml de ampicilina y 75 µg/ml de X-Gal (Placas LB-amp-X Gal)

II.1.2 Cultivos en medio Mínimo.

Se utilizó el medio MMv (Vogel, 1956), suplementado con 2% de glucosa.

II.1.3 Cultivos en Fermentador.

Para obtener una alta cantidad de biomasa de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, ésta se creció en 8 l de medio YM en un fermentador New Brunswick Scientific. Este medio fue inoculado con 400 ml de cultivo en fase exponencial y se creció a 20°C con un flujo de aire de 8 l/min y agitación de 200 rpm durante 120 h.

II.2 Purificación de Ácidos Nucleicos

II.2.1 Purificación de RNA total de *X. dendrorhous*.

Se colectaron las células de cultivos de 200 ml a 22°C crecidos hasta la fase estacionaria. Las células se lavaron 2 veces con solución amortiguadora TE y se resuspendieron en 3 ml de solución amortiguadora TE. Se adicionó 2 ml con microesferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y un volumen de fenol a pH 4.0, se agitó en vortex durante 30 min y luego se centrifugó a 10000 g durante 10 min. La fase acuosa fue traspasada a un tubo limpio donde se realizó una extracción fenólica adicional y posteriormente una extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para eliminar residuos fenólicos. Las moléculas de RNA se precipitaron con 3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche, tras lo cual se centrifugó a 15000 g durante 20 min y se resuspendió en 500 µl de H₂O-DEPC.

II.2.2 Purificación de DNA plasmidial.

Se utilizó el Kit de extracción de DNA Plasmidial MiniPrep adquirido a Promega y se siguieron las instrucciones que recomienda el fabricante.

II.3.1 Electroforesis de ácidos nucleicos.

A las muestras se les agregó el buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 15% ficoll, 30% glicerol), y se resolvieron en geles de agarosa al 1% que contenían 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y buffer TAE (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8.0), el que también se utilizó como buffer de corrida. La cuantificación de la concentración de los ácidos nucleicos se realizó con el software Kodak 1D Science (Kodak scientific Imagen System) y con el software Image J (Rasband, 1997).

II.4 Purificación de ácidos nucleicos mediante GeneClean.

Las moléculas a purificar fueron separadas en un gel de agarosa al 1% tras lo cual se cortó el fragmento de interés con un bisturí en un transiluminador de luz UV. El fragmento cortado se depositó en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 500 µl de 6M KI y se incubó durante 10 min a 55°C para disolver la agarosa. Se agregaron 10 µl de sílica de vidrio para permitir la adherencia de los ácidos nucleicos y tras 10 min de incubación con agitación suave, la solución se centrifugó a 10000 g por 1 min. Tras esto, se realizaron 2 lavados con el buffer de lavado NewWash (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 50 % etanol), se resuspendió en 10 µl de H₂O estéril (H₂O-DEPC para el caso de los dsRNA) y se incubó a 55°C por 10 min. El sobrenadante obtenido después de una centrifugación a 10000 g por 2 min se transfirió a un tubo eppendorf limpio y el ácido nucleico se analizó y cuantificó en un gel de agarosa. Cuando fue necesario, las moléculas de dsRNA fueron concentradas mediante columnas de celulosa Microcon YM-100 de corte 100000 MWCO (Milipore). Se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min hasta obtener un volumen final aproximado de 20 µl.

II.5. Digestiones Enzimáticas

II.5.1 Digestión con RNasa A.

Se realizaron digestiones con buffer SSC (0,3M NaCl y 0,03M citrato de sodio, pH 7,0) a alta (2 x SSC) y baja (0,01 x SSC) fuerza iónica para diferenciar la digestión de los ssRNA y los RNA totales, respectivamente. Se incubó a 37°C durante 1 h con una concentración de enzima de 10 µg por ml de reacción.

II.5.2 Digestión con RNasa H.

Se usó 1 U de enzima por µg de ácido nucleico, incubando durante 1 h a 37°C en buffer 20mM Tris HCl, 0,1M KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT , 5% sacarosa, pH 7,5.

II.5.3 Digestión con DNasa I.

Se utilizó 1 U de enzima por µg de ácido nucleico, y se incubó durante 1 h a 37°C en buffer 50 mM acetato de sodio, 10 mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, pH 6,5, en un volumen final de 20 µl.

II.5.4 Digestión con Nucleasa S1.

La reacción se realizó a 37°C en buffer acetato de potasio 30 mM pH 4.5, 0,3M NaCl, 1mM sulfato de zinc y 5% de glicerol en un volumen final de 20 µl. Se utilizó 1 U de enzima por µg de ácidos nucleicos.

II.5.5 Digestión con Endonucleasas de Restricción

Las enzimas *EcoRV* y *NotI*, se utilizaron con el buffer dispuesto por el proveedor para cada una de ellas. Se digirieron 500 ng de DNA en un volumen final de 20 µl a 37°C durante 2 h.

II.6. Hibridaciones

II.6.1 Preparación de las membranas

Las moléculas de dsRNA de cada cepa estudiada de *X. dendrorhous* se purificaron individualmente mediante GeneClean. Estas moléculas se desnaturaron en presencia de DMSO 18% a 94°C durante 10 min antes de enfriar en hielo. 10 µl (200 ng) de las moléculas de cada cepa fueron depositadas en una membrana de nylon Biotodyne B (Pall) tras lo cual el RNA fue fijado a 80°C durante 15 min.

II.6.2 Preparación de las sondas

Estas sondas fueron preparadas mediante transcripción reversa con una marca radiactiva. A partir de 500 ng de las moléculas individuales de dsRNA se formó el cDNA incubando estas moléculas durante 10 min a 94°C y luego se incubó con la enzima M-MuLV Transcriptasa reversa y hexanucleótidos de secuencia aleatoria. Para el marcaje de estas sondas se utilizó una mezcla de nucleótidos que incluía P³²-dCTP.

II.6.3 Hibridación

La membrana se incubó en un tubo de hibridación a 65°C por 5 min con 10 ml de solución de hibridación (0,5 M Na₂HPO₄, 7% SDS, pH 7,2), y se agregó la sonda previamente desnaturada a 94°C y se incubó con agitación suave durante 16 h a 65°C. Se realizaron 2 lavados con 10 mL de una solución 40 mM Na₂HPO₄, 5% SDS, pH 7,2, y 2 lavados con 10 ml de una solución de Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,2, 1% SDS, y se incubó 1 h a 65°C para cada uno de ellos. La membrana ya lavada se retiró y se guardó sobre una placa autorradiográfica dentro de un casete de exposición a -80°C. A diversos tiempos se revelaron las placas en un equipo Curix 60 (AGFA).

II.7. Clonamiento de moléculas de dsRNA

II.7.1 Formación de la primera hebra de cDNA

500 ng de dsRNA purificado se incubaron a 94°C durante 8 min y enfriaron en hielo. La reacción de RT se realizó con 200U de transcriptasa reversa de M-MuLV y hexanucleótidos de secuencia aleatoria. El ssRNA se hibridó con la mezcla de partidores a 25°C durante 5 min previos a la adición de la enzima. La reacción se realizó a 42°C durante 90 min.

II.7.2 Formación de la segunda hebra de cDNA

Se utilizaron 4U de RNasa H durante 90 min a 37°C para degradar el RNA molde y se sintetizó la segunda hebra de cDNA rellenando con 50U de la DNA polimerasa I. La segunda hebra formada fue reparada con 200 U de la enzima T4 DNA ligasa y posteriormente completada en sus extremos mediante el uso de 5U de Klenow (Sambrook et al, 1989).

II.7.3 Purificación de los productos

Una vez obtenidas las moléculas de doble hebra de cDNA, la mezcla de reacción se purificó utilizando el kit de limpieza de producto de PCR y se resuspendió en un volumen final de 10 µl.

II.7.4 Clonamiento y secuenciación de los cDNA

El DNA obtenido por este método se ligó al vector pBS digerido con la enzima *EcoRV*, mediante la enzima T4 DNA ligasa durante 16 h a 22°C. Este ligado se dializó con membranas de nitrocelulosa (Millipore) y se transformó en la cepa electrocompetente de *E. coli* DH5α.

II.8. Transformación mediante electroporación

II.8.1 Preparación de células electrocompetentes

Se crecieron 200 ml de medio LB de la cepa de *E. coli* DH5 α hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,5 y 0,8. Posteriormente, se centrifugó a 5000 g por 10 min a 4°C. Las células se lavaron una vez con 200 ml y otra con 100 ml de agua destilada estéril fría y luego una vez con 5 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, y se centrifugó a 5000 g por 10 min a 4°C cada vez. Las células se resuspendieron en 500 μ l de glicerol al 10 % estéril frío, se alicuotaron 40 μ l en tubos Eppendorf y luego, guardadas a -80°C.

II.8.2 Electroporación

Cada tubo de células electrocompetentes se descongeló y se agregó entre 5 y 10 μ l de reacción de ligación. La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad). Con el equipo Gene Pulser BioRad se realizó un pulso (25 μ F, 200 Ω y 2.5 kV) tras el cual las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB e incubadas a 37°C por 1 h. Se sembraron 100 μ l de células en placas con medio LB-Amp-XGal y se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias. Los clones recombinantes se reconocieron por la incapacidad de degradar el sustrato X-Gal debido a la interrupción del gen lacZ del plasmidio pBlueScript. Así, se aislaron las colonias de color blanco que poseían esta interrupción.

II.9 Secuenciación

Para verificar la identidad de los fragmentos clonados, algunos clones seleccionados se secuenciaron automáticamente utilizando el kit de secuenciación *AbiPrism Big dye terminator cycle sequence* (Applied Biosystems) y el equipo 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems)..

II.10 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa Vector NTI Suite 10 y la herramienta de búsqueda de alineamientos BLAST. La predicción de sitios de corrimiento del marco de lectura (CML), se realizó con la aplicación FSFinder 2 (Moon y col. 2007). El alineamiento de secuencias aminoacídicas fue obtenida con el programa AlignX, y el posterior agrupamiento de ellas en un cladograma, mediante el programa ClustalW.

II.11. Microscopía electrónica

Las células se fijaron en glutaraldehído al 3% (p/v) en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de esto se realizó un lavado en el mismo amortiguador por 6 h a 4°C. La post fijación se realizó con tetraóxido de osmio al 1% (p/v) en amortiguador fosfato de sodio pH 7,0 durante 120 min a temperatura ambiente. Se lavó durante 15 min con agua destilada y luego se realizó una tinción en bloque de acetato de uranilo acuoso al 1% (p/v) durante 90 min. Después de otro lavado con agua destilada las células se deshidrataron usando acetona al 50, 70, 95, 95, 100, 100 y 100% (v/v) durante 20 min con cada solución. Se realizó una preinclusion con Epon:acetona (1:1) durante toda la noche y luego con Epon puro durante 4-6 h con exposición al aire. La etapa final de inclusión se realizó con Epon fresco a 60°C durante 48 h. Los cortes se hicieron en un microtomo Sorvall MT-2 usando cuchillos de diamante. La tinción se realizó con acetato de uranilo al 4% (p/v) en metanol por 2 min y luego con citrato de plomo por 15-60 s

3. RESULTADOS

Polimorfismo de dsRNA en *X. dendrorhous*.

Para determinar tanto el número como el tamaño de las moléculas de dsRNA presentes en distintas cepas de *X. dendrorhous*, se realizaron extracciones de RNA total, las que fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 3). Se observó un polimorfismo a nivel de número y tamaño de las moléculas de dsRNA presentes, pudiendo las cepas ser agrupadas en 5 clases: I, Cepas que presentan 4 moléculas de dsRNA (cepas UCD 67-385 y CBS 5908); II, las que presentan 2 (cepas CRUB 1149 y RV-4); III, las que presentan 1 de alto tamaño (cepas VKM-Y 2059, VKM-Y 2266 y VKM-Y 2786); IV, la que presenta 1 molécula de menor tamaño (UCD 68-653.3), y V, las que no poseen moléculas (cepas CBS 6938 y UCD 67-210).

El polimorfismo encontrado comprende un total de 5 distintas moléculas de tamaño 4,8 (L-dsRNA), 3,4 (M₁-dsRNA), 1,2 (M₂-dsRNA), 0,9 (S₁-dsRNA) y 0,7 kb (S₂-dsRNA). La molécula L-dsRNA se presenta en los grupos I, II y III, mientras el grupo I además posee las moléculas M₁, S₁ y S₂-dsRNA. La cepa de origen norteamericano UCD 68-653.3 posee únicamente la molécula M₁-dsRNA, siendo la única representante del grupo IV. Finalmente las cepas sudamericanas, pertenecientes al grupo II, son las únicas que poseen la molécula M₂-dsRNA, además de la ya mencionada L-dsRNA.

Podemos de esta forma relacionar este polimorfismo con el origen geográfico de cada cepa (Tabla 3) al considerar que las cepas con 4 moléculas corresponden en su totalidad a cepas con origen japonés; las cepas con la molécula L-dsRNA son de origen ruso (VKM-Y 2059, VKM-Y 2266, VKM-Y 2786), argentino (CRUB 1149) y chileno (RV-4), mientras que la cepa que porta la molécula M₁-dsRNA es la cepa de Alaska (UCD 68-653.3). Finalmente las cepas sin moléculas corresponden a la cepa de origen finlandés (CBS 6938), y a la de origen japonés UCD 67-210.

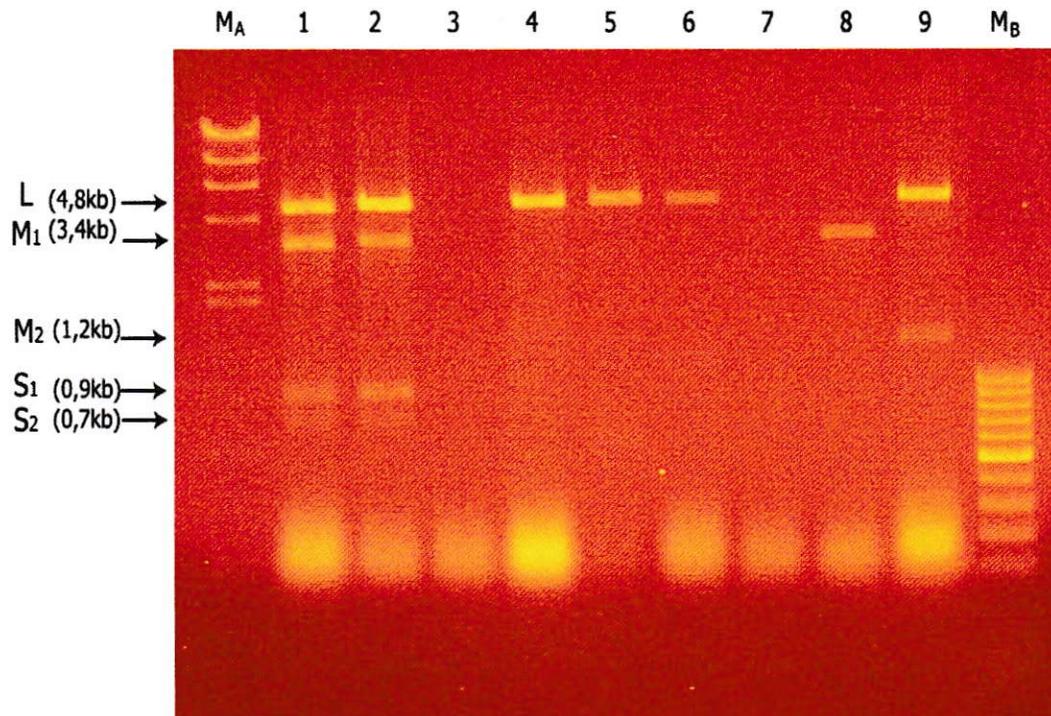


Figura 3. Electroforesis de RNA total aislado desde diferentes cepas de *X. dendrorhous*. 1, UCD 67-383; 2, UCD 67-385; 3, UCD 67-210; 4, VKMY-2059; 5, VKMY-2266; 6, VKMY-2786; 7, CBS 6938; 8, UCD 68-653.3; 9, CRUB 1149. M_A marcador de peso molecular *NHind*III; M_B, marcador de peso molecular 100 bp. L, L-dsRNA; M, M₁-dsRNA; M₂, M₂-dsRNA; S₁, S₁-dsRNA; S₂, S₂-dsRNA.

Tabla 3. Cepas de *X. dendrorhous* agrupadas según su origen geográfico y la presencia de moléculas de dsRNA

Origen	Cepa	Nº dsRNA	dsRNA presentes	Tamaños (kb)	Designación Moléculas
Rusia	VKM-Y 2059	1	L-dsRNA	4,8	L-2059
	VKM-Y 2266				L-2266
	VKM-Y 2786				L-2786
Alaska	UCD 68-653.3		M ₁ -dsRNA	3,4	M ₁ -653.3
Argentina	CRUB 1149	2	L-dsRNA	4,8	L-1149
			M ₂ -dsRNA	1,4	M ₂ -1149
Japón	UCD 67-383	4	L-dsRNA	4,8	L -383
			M ₁ -dsRNA	3,4	M ₁ -383
	S ₁ -dsRNA		0,9	S ₁ -383	
UCD 67-385	S ₂ -dsRNA	0,7	S ₂ -383		
	UCD 67-210				L -385
Finlandia	CBS 6938	0			M ₁ -385
					S ₁ -385
					S ₂ -385

Ésta última es la única cepa que difiere con el patrón descrito a su origen, lo cual se relaciona a lo anteriormente propuesto por análisis genéticos (Fell y Blatt, 1999).

Relación entre los dsRNA presentes en distintas cepas de *X. dendrorhous*.

Una vez definidas las moléculas de dsRNA presentes en cada una de las cepas estudiadas, se estudió la existencia de similitudes entre éstas. De esta forma se determinó si una misma molécula podía encontrarse en cepas con distinto origen geográfico o bien, si las moléculas poseían diferencias de acuerdo al lugar de aislamiento de cada cepa. Para este propósito, se diseñó una adaptación al método de hibridación por Dot-blot (Pfeiffer y col., 2004), que consistió en la fijación en un filtro de nitrocelulosa de alícuotas de los distintos dsRNA individualmente purificados y previamente desnaturados. Los RNA de este filtro se hibridaron con las sondas marcadas con P^{32} , preparadas a partir de cada molécula de dsRNA utilizando la enzima transcriptasa reversa y hexanucleótidos de secuencia aleatoria.

En un inicio, se compararon 2 moléculas del mismo tamaño pero aisladas de cepas de distinto origen. Se realizaron sondas de la molécula L-dsRNA de la cepa de origen japonés UCD 67-385 (molécula L-385) y de la molécula L-dsRNA de la cepa rusa VKM-Y 2059 (L-2059). La hibridación de ellas con los dsRNA purificados individualmente desde las mismas cepas, nos muestra que no se presenta hibridación entre estas moléculas del mismo tamaño (Fig. 4.A). Sin embargo se puede observar que la molécula L-385 hibrida con la molécula M_1 -385, indicándonos un sistema distinto a los descritos en la literatura anteriormente, ya que con la excepción de un par de casos (Kang y col., 2001) no se observan 2 moléculas de dsRNA con la secuencia similar presentes en un único huésped.

Posteriormente se hibridaron sondas realizadas a partir de las moléculas L-385, M_1 -385, L-2786 y M_1 -653.3 con los dsRNA purificados desde cepas de todos los orígenes estudiados. Los resultados (Fig. 4.B) nos indican que la sonda de la molécula

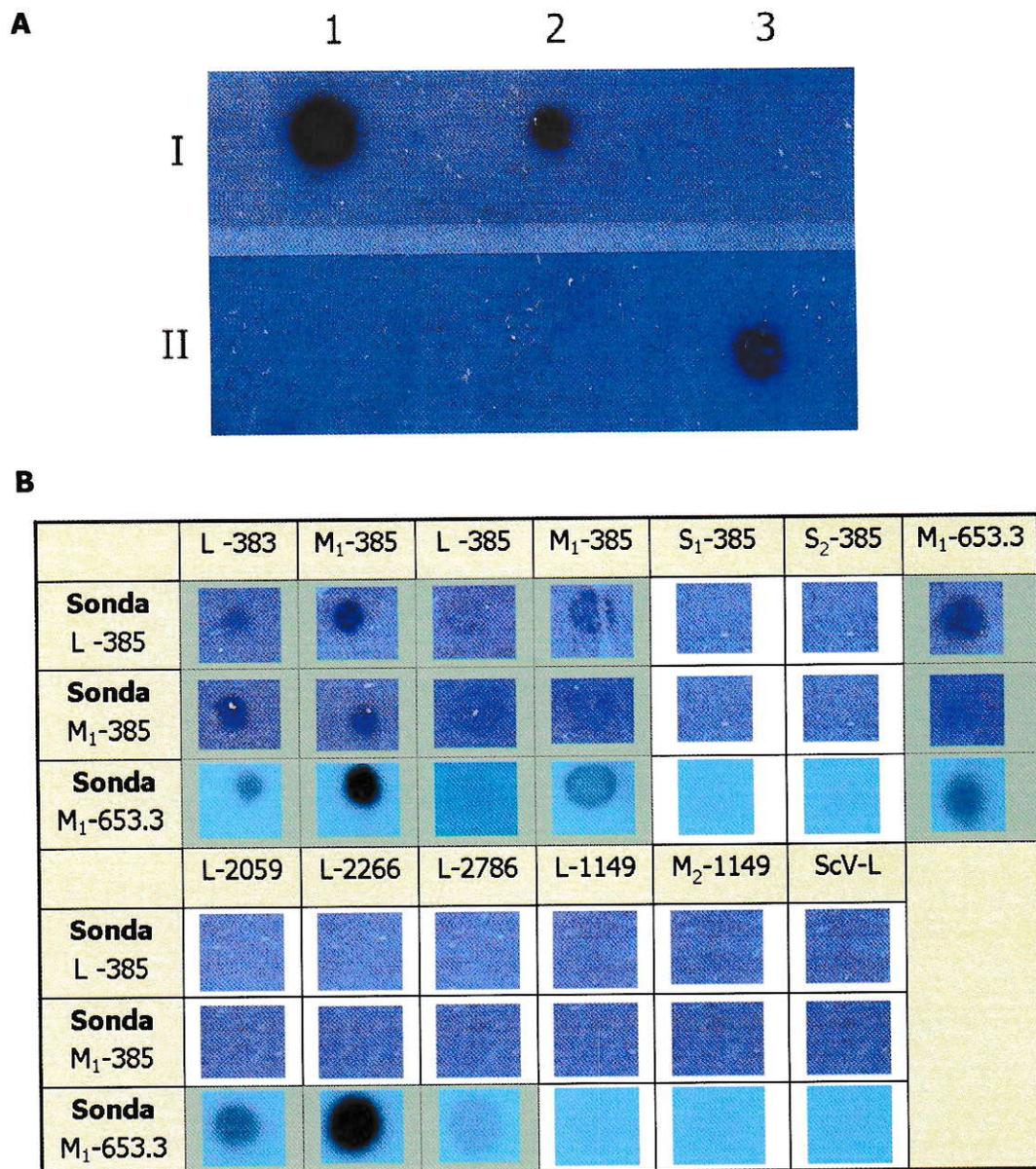


Figura 4. Hibridación por Dot-blot entre moléculas de dsRNA de *X. dendrorhous*.
 A. Hibridación entre las sondas de las moléculas L-385 (I) y L-2059 (II) con las moléculas L-385 (1), M₁-385 (2) y L-2059 (3). B. Hibridación entre las sondas de las moléculas L-385, M₁-385 y M₁-653.3, con los RNA aislados de diversas cepas. En fondo verde se presentan esquemáticamente los resultados positivos.

L-385 hibrida consigo mismo y con la molécula del mismo origen y tamaño L-383. Sin embargo no se observó hibridación entre esta sonda y las moléculas L-dsRNA de las cepas rusas, pese a que ellas poseen el mismo tamaño (4,8 kb) el cual es a su vez similar al observado en la molécula ScV-L, de *S. cerevisiae*. Por otra parte, esta sonda hibridó con las moléculas M₁-385, M₁-383, M₁-653.3, resultado interesante al observarse similitud entre moléculas de distinto tamaño.

La sonda de la molécula M₁-385 hibridó consigo misma, con M₁-653.3, con la cual comparten tamaño, y con la molécula del mismo tamaño y origen, M₁-383. Para el caso de esta sonda, se confirma el resultado de hibridación entre moléculas de distinto tamaño pero de mismo origen (L-385 y L-383), lo cual constituye un resultado importante ya que implica la presencia de 2 virus de distinto genoma que comparten algún grado de identidad coexistiendo en el mismo huésped

Para el caso de la molécula M-653.3 se observa una señal de hibridación tanto con las cepas de origen japonés como con las de origen ruso. Esto es relevante ya que pese a que esta molécula presenta similitud con ambas, no se logró confirmar hibridación entre las moléculas de esos 2 orígenes. Finalmente cabe considerar que la cepa de origen argentino no presenta identidad con las cepas anteriormente analizadas y comparadas. Estos resultados nos muestran que la secuencia de las moléculas aisladas desde diversas cepas de *X. dendrorhous* no se mantiene constante entre todos los orígenes y que sólo en cepas que comparten el lugar de aislamiento es posible encontrar moléculas con secuencias similares.

Determinación la presencia de dsRNA en distintos estados celulares de *X. dendrorhous*.

Con el objeto de estudiar el comportamiento de las moléculas de dsRNA durante la curva de crecimiento de *X. dendrorhous* y su posible dependencia de factores propios del huésped, realizamos curvas de crecimiento de 2 cepas representativas de esta levadura. Las cepas UCD 67-385 y VKM-Y 2786 (de origen japonés y ruso, respectivamente), fueron cultivadas en medio completo y en medio mínimo utilizando glucosa como fuente de carbono fermentable. Al realizar una extracción de RNA de cada uno de los puntos representativos de estas curvas (Fig. 5 a Fig.7), se encontró que el número de moléculas presentes no se cambia durante la curva de crecimiento. Para el caso de la cepa japonesa se logró observar un aumento de la relación relativa de las concentración de la molécula M frente a la molécula L, indicándonos un aumento de la primera molécula respecto a la concentración de L-dsRNA.

A partir de la curva de la cepa UCD 67-385 realizada en medio completo YM (Fig. 5), se obtuvieron muestras representativas de la fase estacionaria de crecimiento. Éstas fueron procesadas y observadas mediante microscopía electrónica de transmisión con la finalidad de encontrar partículas tipo virus. Los resultados (Fig. 8) muestran los cortes de una célula en estado exponencial y en su interior, partículas similares a lo descrito previamente tanto por morfología como por tamaño (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer, 1996).

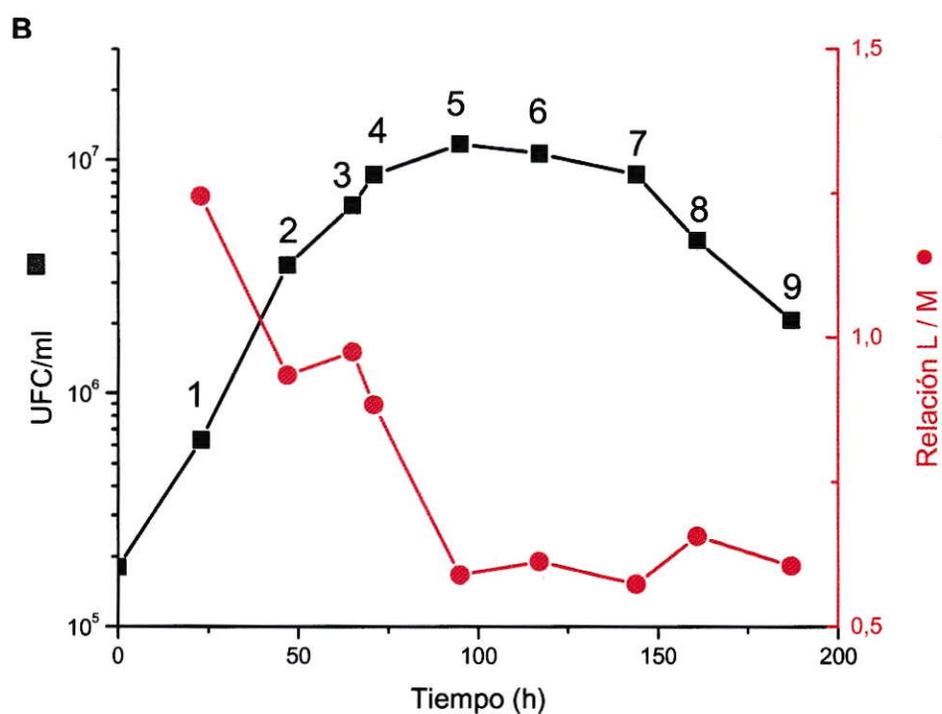
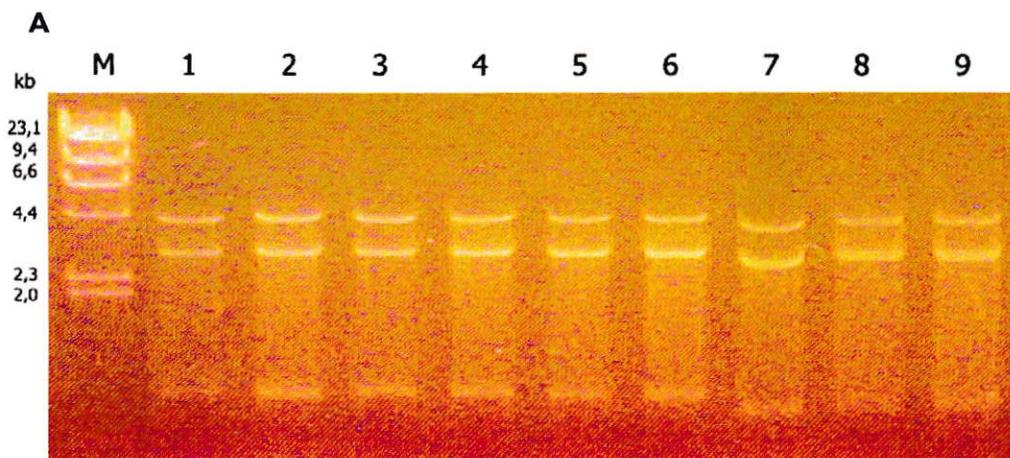


Figura 5. Comportamiento de los dsRNA de la cepa UCD 67-385 en medio completo. A. Extracción de RNA total de los puntos de la curva, graficada en B. M, marcador de peso molecular λ HindIII. B. Relación entre las concentraciones de las moléculas L-385 y M-385 (en rojo) según la etapa de crecimiento de la cepa (en negro).

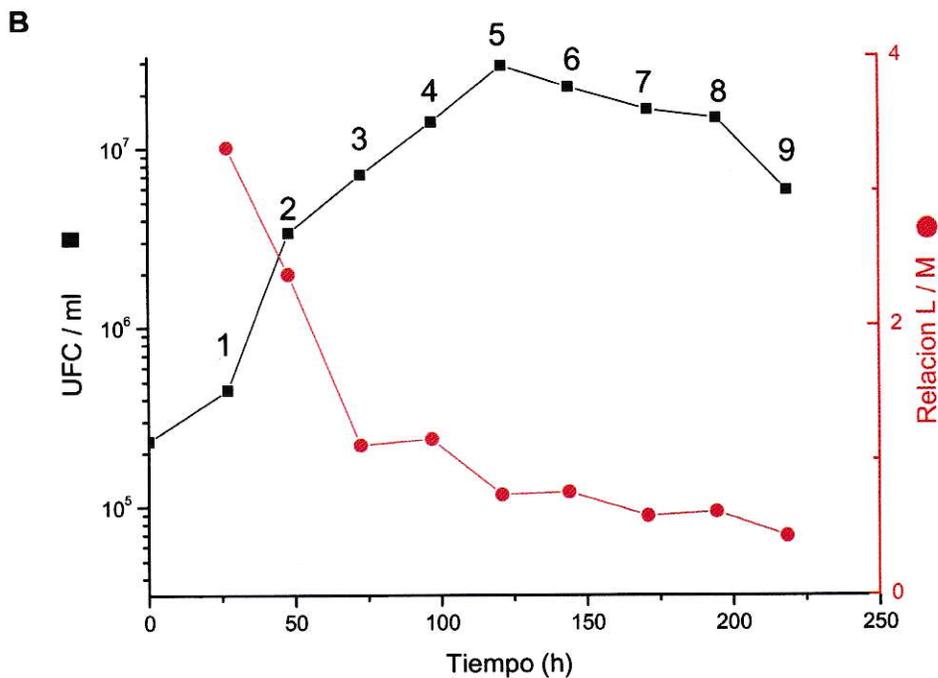
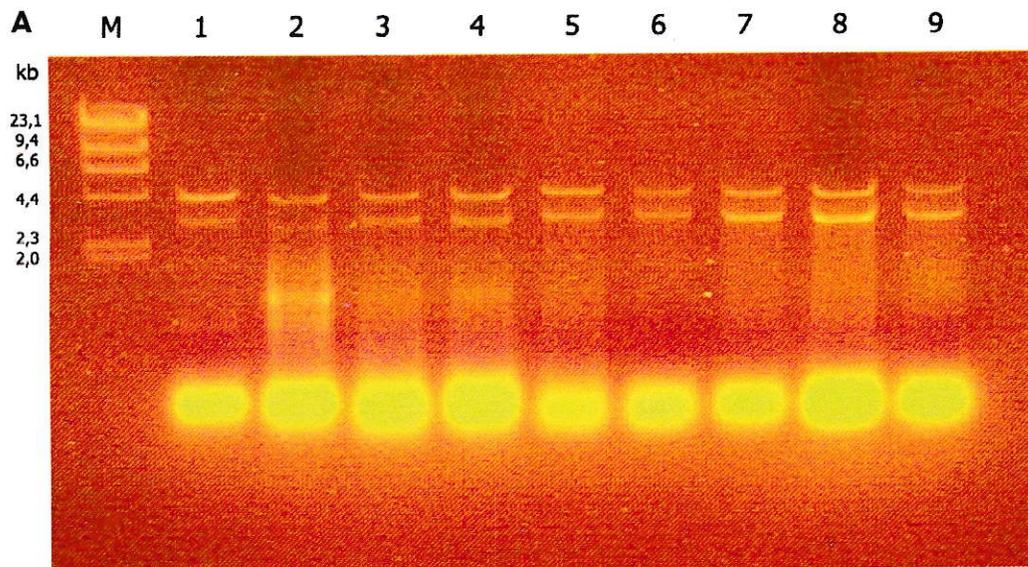


Figura 6. Comportamiento de los dsRNA de la cepa UCD 67-385 en medio mínimo glucosa. A. Extracción de RNA total de los puntos de la curva, graficada en B. M, marcador de peso molecular *NHindIII*. B. Relación entre las concentraciones de las moléculas L-385 y M-385 (en rojo) según la etapa de crecimiento de la cepa (en negro).

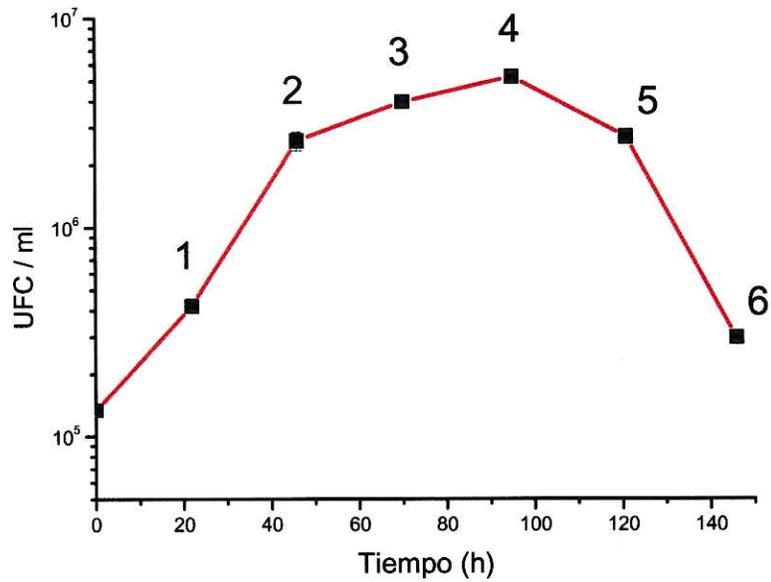
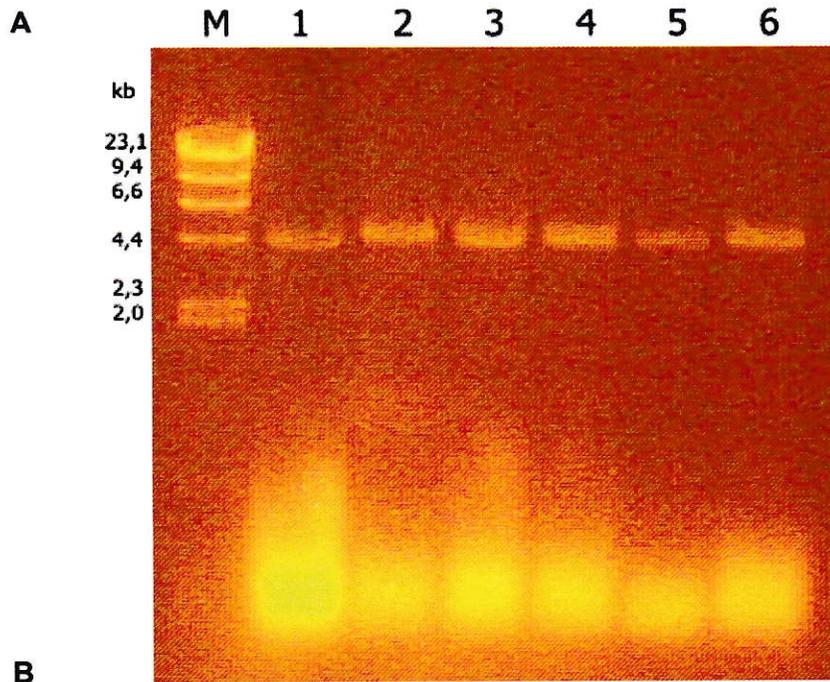


Figura 7. Comportamiento de los dsRNA de la cepa VKM-Y 2786 en medio completo. A. Extracción de RNA total de los puntos de la curva, graficada en B. M, marcador de peso molecular *λHindIII*. B. Curva de crecimiento de la cepa VKM-Y.

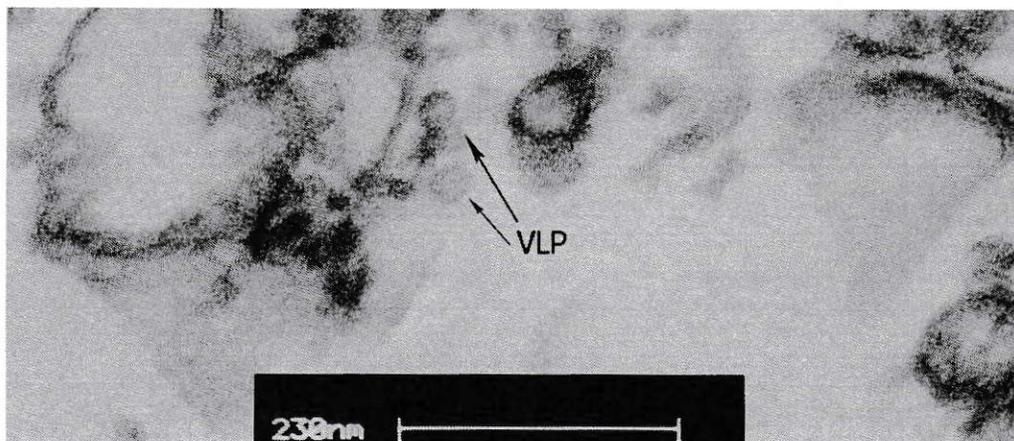
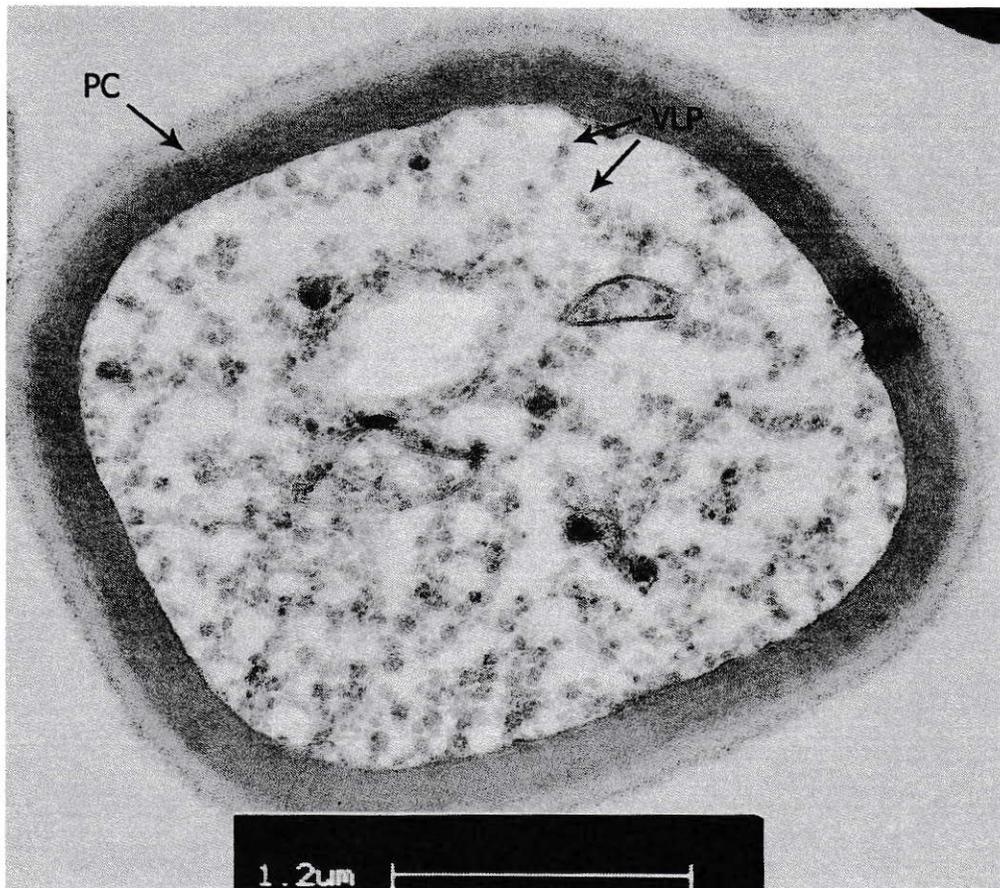


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de *X. dendrorhous* UCD 67-385. La muestra fue obtenida desde un cultivo en fase estacionaria y después procesada, fue teñida utilizando acetato de uranilo. PC, pared celular. VLP, Partícula tipo virus.

Clonamiento de moléculas de dsRNA

Con la finalidad de identificar la secuencia de las moléculas de dsRNA presentes en *X. dendrorhous* y estudiar la información contenida en ellas, se planteó clonar los dsRNA encontrados en la cepa UCD 67-385, para su posterior secuenciación. Considerando el desconocimiento de la secuencia de alguna zona de estas moléculas y la falta de identidad entre moléculas anteriormente publicadas en bases de datos, se propuso la construcción de una genoteca mediante transcripción reversa de las moléculas de dsRNA utilizando hexanucleótidos de secuencia aleatoria. Tanto el alineamiento de las secuencias de los distintos clones obtenidos como el posterior diseño de nuevos partidores desde la zona de secuencia conocida, nos entregó la posibilidad de completar en gran parte la secuencia de las moléculas presentes en esta la cepa.

Inicialmente se obtuvieron 14 clones para la molécula L-385 y 3 para M-385, de un tamaño promedio de inserto de 600 pb. El alineamiento de estas secuencias nos permitió definir una secuencia conocida total de 1,6 kb para la primera molécula y 1,5 kb para la segunda. Para confirmar que estos clones provengan de la molécula de dsRNA, se realizó una reacción de RT-PCR con la molécula L-385 como molde y con los partidores 13.1 y SR, diseñados a partir de la secuencia de uno de los clones obtenidos. El producto de PCR verificado en un gel de agarosa (Fig. 9) demuestra que la secuencia obtenida en estos clones, corresponde a la molécula L-385, lo cual respalda el uso de esa secuencia para el diseño de nuevos partidores, y la posterior obtención de nuevos clones de la molécula sin la utilización de partidores aleatorios. La misma confirmación se realizó para los clones de la molécula M-dsRNA de esta misma cepa.

De esta forma se caminó sobre las moléculas de dsRNA diseñando partidores desde los extremos del alineamiento formado. Mediante transcripción reversa ahora se obtenían cDNAs anclados a este alineamiento, ampliando así la secuencia total conocida. Por cada transcripción reversa realizada con un nuevo partidor, se

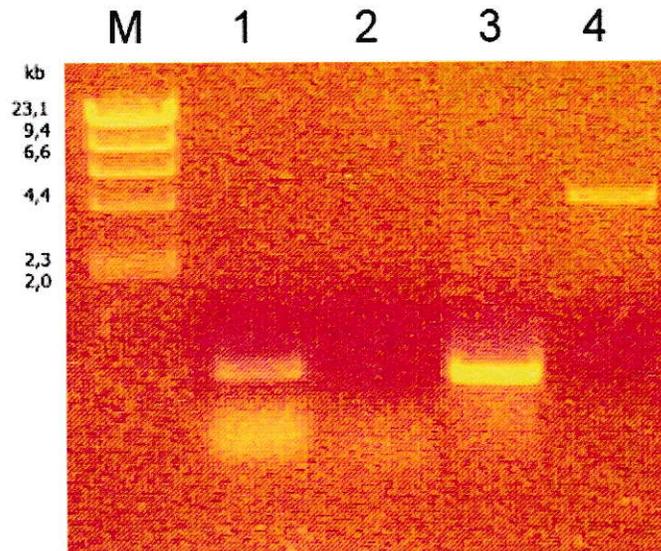


Figura 9. Verificación de los clones obtenidos utilizando oligonucleótidos de secuencia aleatoria. Carril 1: RT-PCR de la molécula L-dsRNA de la cepa UCD 67-385, con los partidores específicos 13.1 y SR. Carril 2: PCR con los mismos partidores y la molécula L-dsRNA como molde, utilizado para descartar una amplificación independiente del RNA. Carril 3: PCR con los mismos partidores y el DNA plasmidial del clon 385L-R1 como molde. Carril 4: L-dsRNA utilizado en la reacción de RT. M, marcador de peso molecular λ HindIII.

obtuvieron aproximadamente 3 clones de tamaño cercano a 500 pb, los cuales fueron secuenciados y acoplados al alineamiento ya formado.

Utilizando este procedimiento se logro obtener un alineamiento final de 3,6 kb para la molécula L-dsRNA y 1,3 kb para M-dsRNA. Estas secuencias fueron analizadas bioinformaticamente para determinar la información incorporada.

Análisis bioinformático de la secuencia de la molécula L-385.

La secuencia del alineamiento obtenido comprende un tamaño total de 3630 pb (Figura 10) presentando 1 ORF principal, el cual consta de un tamaño de 2800 pb, de acuerdo a la homología observada con los ORF descritos en bases de datos. Esta zona reconocida, abarca desde los 1217 hasta las 3168 pb y que codificaría para una proteína de 646 aa de peso estimado en 73,5 kDa. El alineamiento fue comparado con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank, tanto a nivel nucleotídico (Fig. 11) como con la base de datos de secuencia traducida (Fig. 12). La molécula posee identidad con secuencias asociadas a RDPR virales de levaduras, pero con niveles de identidad bajos, resultado esperable considerando la alta variabilidad nucleotídica observada en moléculas de dsRNA analizadas anteriormente (Ghabrial, 1998; Bamford, 2005). Sin embargo el análisis de la secuencia traducida con la base de datos proteica de GenBank muestra un alto grado de identidad con RNA polimerasas de sistemas virales de levaduras, entre los que se encuentra con mayor identidad, la RDRP del sistema viral de *S. cerevisiae*. La zona con el mayor grado de identidad coincide con el ORF anteriormente predicho en toda su extensión, exceptuando una zona de 300 pb aproximadamente que no posee identidad continua con el resto del ORF.

1 TGGAAGTGTG GGACAAAGTC GATAACGCAA GTCGTGATTG CAAAATTTGC TCCGTGTAGA GCTAAAATAC CTTCTAACCT GGAAGGTGAG GCTATGGTGA
 101 CAGACATGGA TGCGCACGAT TTCGTACTGG ACGAGACTAA AACTCCCAGG AAAGCACTGT TTTCTGGAGC CATGATTAAC TATCTAGCTT TTATGGGCCT
 201 ACATGCGATA CTTTCAAATT ACGCTTCTAG GCACGAAAAT TGGAGATCAG CCTTTTACAG CAGCCACGAA GAACTTGCTA TACTTCACGA TAGGACCGTA
 301 AGGGCTGCAT TAACCAGTGT CATAACTGGC AAAGAAATGG TTACTTTTCAT GAACCCAAAT CTCTTTGTAT CTTATGATGT TACTCCGATG GTCAACGTAA
 401 GTAAAGTAAG CTTCGAAGAA GTGTTAGAGA GGGGATACCC GTCATCTTTG CCCGTACACG GCGTGGTGCC AATGGTGTCA GGATCCCTCT TCTTGTCCGC
 501 TAACGCATCA GACGTGCTC CACAGTGTCA CCTTGAAACA GGGCATGAAG GTCACGGTAG ATGAATATGG CACTGTGAGC CCAGAAGATG CGCTTAGGGT
 601 GGCTCAAATG TATAGAATGT TTGGTCACGA ACTTGAAATA AGATCGGAAA AGACTGAGGA AATACATGAA CTGTTCCGCTC CGGTGCAAGA GTGCGTCATT
 701 TACCCCTCGG CACTACTTTA CAACACGAGG GACACAGATA GATTAAAGCT AGTGTCTGTC CTGCGGAGAC CTGGCCGAG TAGCACTATA CCAGACGTTT
 801 CGGCTCTGAC CGCTGGACAA ACAATCACCA TCGATTACAC GATACCTAGG ATAGGCATGC ACTACTTCAA CAAAAGGGTG CTCCCATAG CTCCGTCAAT
 901 GGTATTACCT CAAAGGAAAA GGGAAATAAC GTTCAGGGTC AAAGGCCATA CAGTTCCTCA TAAGGTCAAA ATGAACGCTT CAAACGTGAC AAGACCTGTG
 1001 AAGGATTTTC ACGGAGGCGA AATACAGGTG GCACCTTTGT TGCCAGTTCT AAGGAATGCT CGTGTGCCAA TCCAAGTCAA TCAGACTTCG GAGGAGGACG
 1101 TAACTGCCGA AGATGTAGAG TAGAACTATA AAAACTCCAA ATACACGGGA ACTGACACAT CGGACTATCT ATCGCAATAC GGACAACATAT ATAACAGGAA

V Q P C E G E E S T G N R W E F A D R Q I P L T I S L
 1201 TTCATTGATA GGGCTTAACG TGCAGCCATG TGAAGGTGAG GAAAGCACGG GCAACAGATG GGAGTTTGCC GACAGACAAA TTCCCTTAAC GATATCTCTA

T S R G N I E A V P F S E A Q Y A F L D R E S S N K F G I F E A S K
 1301 ACAAGCCGGG GAAACATTGA AGCAGTACCG TTTTCAGAAG CTCAGTATGC CTTCCCTGGAC CGGGAAAGCT CAAATAAATT CGGCATATTC GAGGCAAGTA

S V Y G V T M S G L V I A N G K A K F F F A S I K Q Y L L T Q S K
 1401 AAAGCGTGTA TGGGGTAACA ATGTCTGGGT TGGTGATAGC TAATGGTAAG GCTAAATTTT TCTTCGCCCTC AATCAAGCAA TATTTGCTAA CCAATCTAA

A M L I A M T R H F S S L Y E S Y A Y D D P T S P V N L F R D R F
 1501 AGCAATGTTA ATAGCCATGA CCAGACACTT CTCTAGCCTG TACGAGAGCT ACGCTTATGA TGATCCTACG TCACCGGTAA ACCTATTCAG AGACAGATTC

P G R S E N E A M T F K Q M E E L P K S K I S G A H H F H F T P M Q
 1601 CCCGGTAGAA GCGAAAATGA AGCGATGACA TTCAAGCAAA TGGAGGAGCT GCCGAAGTCT AAAATTTTCAG GAGCGCACCA TTTTCACTTC ACACCTATGC

V L K S I G R G R L E R A I Q A S R L P K D A E M T F A T G M L L
 1701 AAGTGTGAA ATCGATAGGG AGAGGGAGAC TGGAAAGGGC GATCCAGGCA TCACGGCTAC CAAAGGACGC CGAAATGACG TTTGCCACAG GGATGCTACT

W Y T S I S D Q M A E L I R G A G I F K C D S V R E Y V K E M K Q
 1801 GTGGTACACA TCTATTAGTG ATCAGATGGC AGAACTAATC AGAGGCGCGG GAATATTCAA GTGTGATAGT GTGAGGGAAT ACGTAAAAGA AATGAAACAG

L S V E A K S L Q N L V T D D L R T V F E L E V L V N R I D G V V D
 1901 CTATCAGTGG AGGCGAAGTC GCTGCAAAAC CTCGTGACCG ATGACCTAAG AACAGTATTC GAGTTAGAGG TGCTCGTAAA TAGAATCGAC GGTTAGTAG

W E K E K E N R Q S V N V T N I K D S D V F R S A C K I F E D A K
 2001 ACTGGGAGAA AGAGAAGGAA AACAGACAGT CAGTAAACGT GACAAACATA AAGGATTCAG ATGTGTTTAG ATCTGCGTGT AAGATATTTG AAGACGCCAA

```

      G I G R R P K S F S W E S Y W A N R W Q W S A A G S I H S Q Y P R
2101 AGGTATAGGC CGGCGCCCGA AGAGCTTCAG TTGGGAGAGC TATTGGGCTA ACAGGTGGCA ATGGAGTGCT GCGGGCAGCA TACACTCACA ATATCCCAGA

      D M E Y V I R D Q Q S L K N K F I T I S N M P K C T V D Y F S D R E
2201 GACATGGAGT ACGTAATTAG GGACCAACAG TCACTTAAAA ACAAGTTTAT AACTATATCC AATATGCCCA AATGTACAGT AGACTACTTT TCGGACAGGG

      P Q V Q G W S S T K Y E W G K Q R A I Y G T D L T S Y V L S N F A
2301 AGCCGCAGGT GCAAGGTTGG TCGTCAACGA AGTATGAATG GGGCAAGCAA AGAGCAATAT ATGGGACAGA TCTGACTAGC TACGTACTGT CTAATTTCCG

      F Y N C E N V L P N Q F P V G R D A N D E N V V N R V S G V L N N
2401 GTTTTACAAT TGTGAGAACG TACTACAAA TCAATTTCCA GTCGGACGAG ATGCCAATGA CGAAAACGTG GTGAACAGAG TTTCGGGAGT GCTAAATAAC
      R M P F C L D F E D F N S Q H S S G N M K A V I Y A Y I E T F I D C
2501 AGAATGCCTT TCTGTCTTGA CTTTGAGGAC TTCAATAGTC AACACAGCTC GGGCAACATG AAGGCTGTAA TATACGCTTA TATCGAGACT TTCATAGATT

      L T P E Q E Q A A M W T A A S L D K Q I I N D N V G T K T T Y E S
2601 GTCTTACTCC GGAACAAGAG CAAGCGGCAA TGTGGACCGC AGCGTCATTA GACAAACAGA TAATCAATGA CAACGTTGGA ACCAAGACTA CGTATGAATC

      K G T L L S G W R L T T F T N S V L N Y I Y T T K L A A E E K R P
2701 TAAAGGAACG CTACTTTCGG GGTGGAGGCT GACGACTTTC ACGAACAGTG TGTTGAACTA TATTTATACA ACGAAATTAG CAGCAGAAGA AAAGCGTCCG

      G D S L H N G D D V L I G V R S M A L P Q R C M Q N A I K Y N V R M
2801 GGTGATAGCT TGCACAACGG AGACGATGTC TTAATAGGAG TGAGGTCAAT GGCTCTGCCG CAGAGGTGTA TGCAAAAACGC CATTAAATAT AACGTGCGAA

      Q S S K C A V G A I A E F L R I D H K Q G G N G Q Y L S R A V A T
2901 TGCAAAGCAG CAAATGCGCC GTGGGTGCAA TTGCAGAATT CCTGCGGATA GACCACAAAC AGGGAGGCAA CGGCCAGTAC CTATCCAGAG CAGTGGCCAC

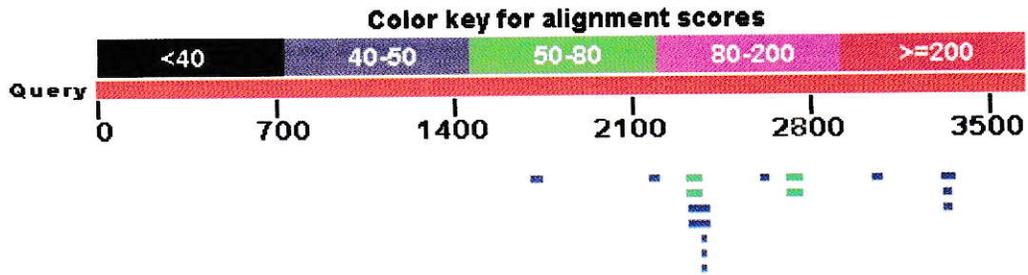
      M V H S R I E S R V S T D I R D L V Q S M E N R F A D A K G R G M
3001 AATGGTACAT TCGAGAATTG AAAGTAGAGT CTCGACTGAC ATAAGAGACT TAGTACAATC AATGGAAAAC AGATTGCTG ACGCAAAAAGG CAGAGGGATG

      A N D I I S G L R E Q Y Y M R Q S V L
3101 GCGAATGACA TCATATCCGG ATTGCGGGAA CAGTACTACA TGAGGCAGAG TGTGCTGTGA CACCGACGTA GAGGACATAT ACTTGATAAA GAATGCGCAC
3201 AGAGTTGTAG GAGGAATAAG CGAAGAAAAA GACTCGAAAA TGGGTGTTTT GATAACATCC CAACTTAGAG CGCAGAAGAA ACGTGGCAAT ACCGTACTTG
3301 CCGGGAGTAA ATGAATATGC AAACGAAATA CACAAAGCAT TAAAAATAAA TGTGTCAATT AAGACTATAT GTGACAGATT ATACGACGCT ACATACGAAG
3401 CTGTCTCAAT CAAAGATCGC AAGATGAAAA TCTTTCGGGA AAACAGAGAT CAGTGGTTCG TTAACGTACG CAGAATATAC AAAGCACATA AGGGTAGTCA
3501 ATTGTACAG AATTACGGTA AAGCAGCCTT AGTAGGATTC GCATTGGAAG TGTTGGGCAG AGAAATGCCT GATGCAACCA TAACAACAAT ACTGAATACT
3601 TCACAAAAGG CACTAGACCT AATTAAGTAC

```

Figura 10. Secuencia del alineamiento de los clones de la molécula L-385. En azul se muestra la secuencia aminoacídica del ORF propuesto.

A

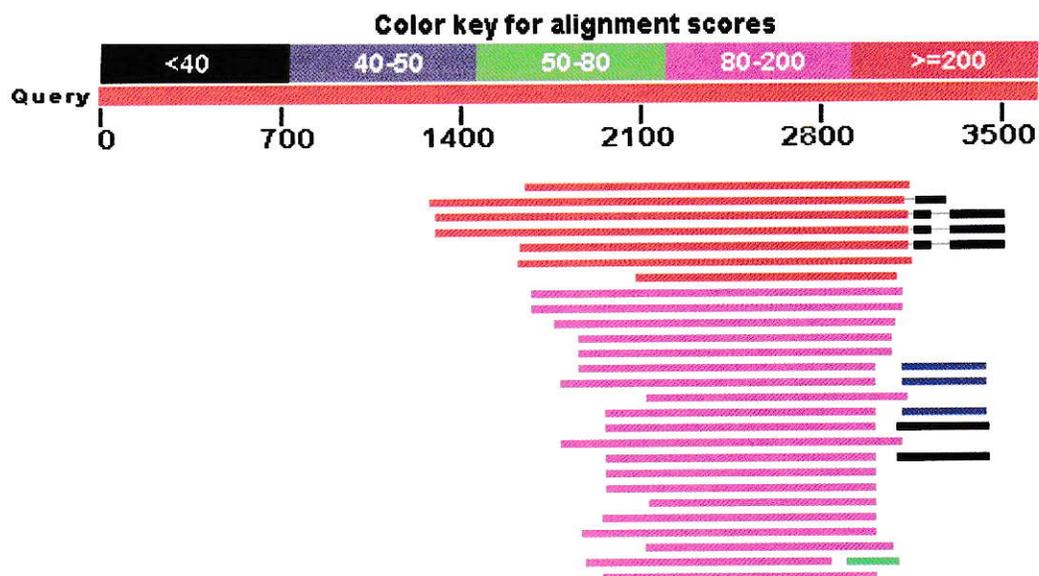


B

Acceso IMDB	Gen	Huésped	Puntaje	E Value
M28353.1	virus L-A Segmentos de genes de la proteína de la cápside y RNA polimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68.0	3e-07
J04692.1	virus L-A Genes de la proteína de la cápside, proteína de unión a ssRNA y RNA polimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68.0	3e-07
EU082131.1	virus F Genoma completo	<i>Black raspberry</i>	66.2	1e-06
EU495331.1	virus F Gen de la RDRP	<i>Ribes</i>	51.8	0.022
XM 457518.1	Proteína hipotética mRNA parcial	<i>Debaryomyces hansenii</i>	48.2	0.27
CR382134.1	Cromosoma B	<i>Debaryomyces hansenii</i>	48.2	0.27

Figura 11. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de L-385 con la base de datos (*blastn*). A. Esquema con las zonas de alineamiento obtenido, indicándose en distintos colores los puntajes obtenidos. B. Principales identidades obtenidas mediante este alineamiento

A



B

Acceso IMDB	Proteína	Huésped	Puntaje	E Value
ref YP_001497151.1	RDRP	<i>Black raspberry</i>	350	1e-94
gb AAA50321.1	RNA polimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	325	2e-90
ref NP_620493.1	Proteína de unión a ssRNA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	325	9e-90
ref NP_620495.1	RNA polimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	322	6e-89
ref NP_042581.1	RNA polimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	317	3e-84
emb CAJ29959.1	RDRP	<i>Amasya cherry disease-associated</i>	163	8e-38
emb CAJ57274.1	RDRP propuesta	<i>Cherry chlorotic rusty spot</i>	159	2e-36
emb CAJ29958.1	RDRP propuesta	<i>Amasya cherry disease-associated</i>	145	3e-32
ref NP_620730.2	RDRP	<i>Trichomonas vaginalis</i>	110	1e-21
ref NP_041191.1	RDRP	<i>Leishmania</i>	89.7	1e-15
ref NP_619670.2	RDRP	<i>Helminthosporium victoriae</i>	88.2	4e-15

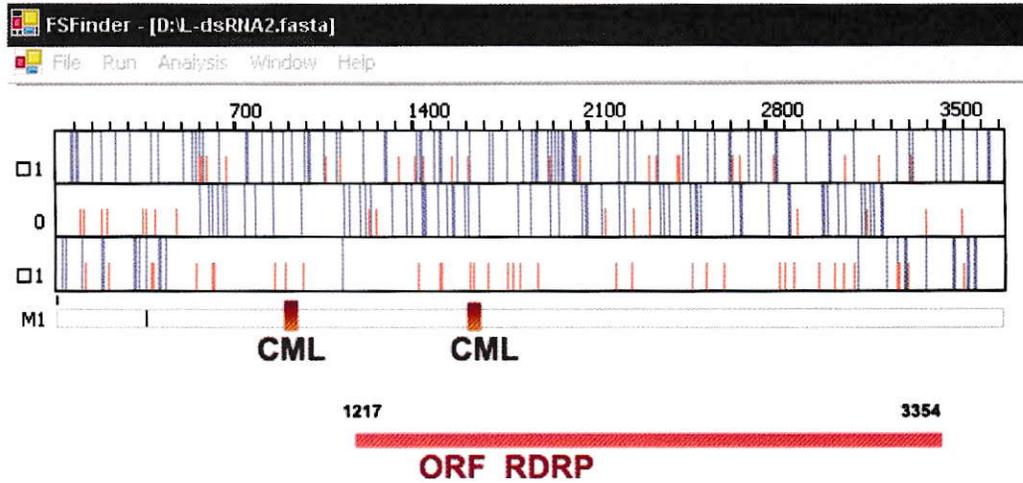
Figura 12. Alineamiento de la secuencia traducida de L-385 con la base de datos de nucleótidos traducida. A. Esquema con las identidades, indicándose en distintos colores los puntajes obtenidos B. Principales identidades obtenidas mediante este alineamiento.

La secuencia del ORF predicho muestra una alta similitud con RNA polimerasas dependientes de RNA típicas de diversos sistemas virales de la misma familia *totiviridae*, con valores E cercanos a 1×10^{-100} y un puntaje de 350 puntos. Se presentan los 8 motivos conservados característicos de estas polimerasas (ver Fig. 14), las cuales coinciden con zonas de estabilización de la estructura terciaria, asociación a metales y principalmente el sitio activo, las cuales se mantienen en diversas RDRP ya caracterizadas (Ribas y Wickner, 1992; Routhier y Bruenn, 1998).

Para determinar si cercano al inicio de esta zona caracterizada se presenta una zona de corrimiento del marco de lectura (CML), se utilizó la aplicación bioinformática FSFinder 2 (Moon y col. 2007). Con esto se buscó definir una región regulatoria previa al posible ORF descrito y que podría relacionarlo con algún otro ORF ubicado hacia el 5', tal como se ha descrito en diversos genomas virales en levaduras.

La búsqueda muestra 2 sitios cercanos al inicio de la zona descrita (Fig. 13). Esta zona se caracteriza por una estructura de tallo precedida de un sitio corredizo (*slippery site*) en el cual el ribosoma cambia el marco abierto de lectura, determinando así si se realiza la traducción de un ORF posterior al sitio. Ambas secuencias propuestas por el programa calzan con la descripción teórica de este tipo de sitios, sin embargo presentan un *loop* de mayor longitud que los descritos, con una posible menor estabilidad al no encontrarse otras zonas de apareamiento. La definición de un posible ORF anterior al descrito, nos permitirá determinar el inicio exacto del ORF propuesto y con ello, establecer si esta zona se presenta a la distancia correcta como para realizar el corrimiento esperado.

A



B

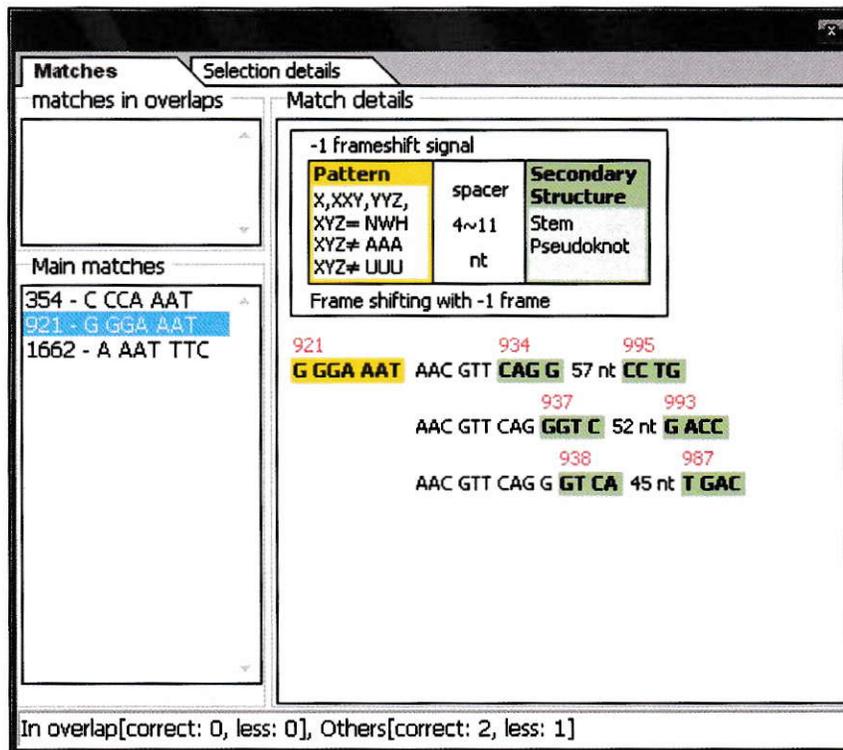


Figura 13. Sitios de corrimiento del marco de lectura en la molécula L-385. A. Posición de los 2 sitios de CML predichos, respecto al ORF RDRP. **B.** Estructura predicha n amarillo se presentan los sitios corredizos y en verde, las bases involucradas en la formación de la estructura secundaria.

Análisis filogenético

Una vez determinado el ORF de la molécula 385-L, la secuencia aminoacídica fue comparada con las secuencias de otros virus dsRNA de las familias *Totiviridae* y *Partitiviridae*, presentes en levaduras u hongos filamentosos que infectan árboles presentes en el ambiente de *X.dendrorhous* (Tabla 4). Al alinear las secuencias se observa un alto grado de identidad para la secuencia que codificaría para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RDRP). En este alineamiento (Fig. 14) se presentan zonas conservadas de hasta 20 residuos, indicando de esta forma, posibles motivos funcionales de esta proteína que son también encontrados en la secuencia del virus L-385 de *X. dendrorhous*, o virus XdV-L. Se encontraron grados de similitud de hasta un 70% en virus del género *totivirus*, y un menor grado de similitud en los otros géneros de la familia *totiviridae* (*giarniavirus* y *leishmaniavirus*). Las mayores similitudes se observaron en virus de esta familia, pese a la presencia de una alta identidad con el virus *Black Raspberry*, perteneciente a la familia *partiviridae*. Entre los motivos conservados, podemos ver la presencia de los motivos 5 y 6, los cuales se han descrito como los indispensables en RDRP (Ribas, 1992). En estos motivos se observa una identidad casi completa con la secuencia de la RDRP del virus ScV-LA de *S. cerevisiae* y con el virus del ya nombrado *Black Raspberry*.

Tras analizar los alineamientos se realizó un árbol filogenético basado en las secuencias de RDRP previamente obtenidas (Fig. 15). Este árbol indica la cercanía de la secuencia de XdV-L con las observadas en otros virus de la familia *totiviridae*, principalmente con los virus ScV-L-A, de *S. cerevisiae* y con otras proteínas homologas de levaduras. Esto nos indica la cercanía estructural de estos criptovirus. En forma más alejada se presentan los virus de los otros géneros de la familia *totiviridae*.

Tabla 4. Totivirus cuya secuencia genómica fue utilizada para comparar con la secuencia obtenida del genoma del virus XdV-L

Virus	Abreviatura	Género	Tamaño (pb)	ID Tax. NCBI	Tamaño RDRP (aa)
<i>Giardia canis virus</i>	Gc-V	Giardiavirus	6276	353633	1871
<i>Trichomonas vaginalis virus</i>	Tv-V	Giardiavirus no clasificados	4647	29256	1430
<i>Leishmania RNA virus 1 - 1</i>	L1-1V	Leishmaniavirus	5284	58103	874
<i>S cerevisiae L-A</i>	Sc-V L-A	Totivirus	4579	11008	731
<i>S cerevisiae L-BC</i>	Sc-V L-BC	Totivirus	4605	42478	863
<i>Helminthosporium victoriae virus 190S</i>	Hv-V 190S	Totivirus	5179	45237	835
<i>Zygosaccharomyces bailii virus Z</i>	Zb-V Z	Totivirus no clasificados	3147	114871	643
<i>Amasya cherry disease-associated</i>	ACDA-V	No clasificado	5047	284689	1294
<i>Black raspeberry virus F</i>	Br-V	No clasificado	5077	463392	814
<i>X. dendrorhous virus L</i>	XdV-L	No clasificado	3630	-	-

1001 1050 1100

ACDA-V (637) -----MDKVLQWPDITN FMS S L LAMAALPPELYV I ---MVEWNGWAKCDSMAEYILEAK NLT T K M K A L D N Q V T L G D F E L L I A P L F E W E V I N H R

BrV (158) ---RALLLVVDK L R E T S G V T E A I V S T F M A Y I M F A K P Q V A Y L L ---A T S A N I W R - A K D V N T L A E K L E I S T P L K S M H R H D V L ---D M T Q L F E L Q V L V N R

ScV L-A (85) ---Y Y L M C V V E L L A N L Q V D L E A A V A T I L A Y V L T L S E K F V P I F ---L D S R A I W V G E P G P D A L T A R L K A S S G Q I K S I H T A D Y E ---P L T E L F E L A V I M N R

XdV-L (174) -----A I Q A S R L P K D A E M F A T G M L W Y T S I S D Q M A E ---I R G A G I F K - C D S V R E Y V K E M Q L S V E A K S L Q N L V T D ---D L R T V F E L E V I V N R

ScV L-BC (229) -----Y E A L L A M L D R F N N I E S H V I F F T Y L R A L P D R E K E V F ---I S L V L M Y N ---G L G R E W L S E G V R A Q A O G T V K Y ---D M S K L F E L N V I E N G

GcV (1000) I Y A P I Q L Q D A I P V R R E D P V P G S I Y V F K F E S E P K A W E I R A L K S Y K V R F Q D L P S H I V I S E L K E R A A R S Y I G S R G Y V D T G F K G L D I Y I L I L S Q M E L P K Y I H E

ZbV (164) -----H F T R Y L D K N I T G P T F H K I M I N F D K V K D A K H Q N W W E Q Y D Y I I E A D ---Y S K F D S S V P A C V V R K A F Q I F K E L F I C F S I L P L F M I L I E N F

HvV 190S (163) ---Y G L A A L G S H L A Y V G M P N D R A C A T L L A Q T Y K A R F G S E G ---V A W A I A S V R ---Q P E N A K G L S N A L K A L G S N T S E ---P G A L F V E A N T I Q G R

L1-1V (198) ---V V Y C E F V R Y S A Y F A G L Y D Q V A I L Y A V A A H N V Q G F G A R F C V L W A L M C V R ---I A G F A D D I N I Y I K H R G M S G L L P ---Q L V E M K C I L G R

TvV (800) A R T L W N E T T S D K S A F K P G T Y N D V A G L M W Q Q C A L M W S L P K ---I I N K I I S G V C D A L T E K V S L T L L K R I S D W L K Q L G L A Y S P ---I F R L F I E L P T L I L G R

Consenso (1001) LA I E T A T L L Y A L L V I W AK L S V I K A L DL L F E L V L I N R

(1)

46

1101 1150 1200

ACDA-V (724) A V L K G I Y D K E L I E R D E K Q -----S I K L T A E E L E A E I D S V F Q D V S A V L D S R T E E G K S -----P L Y A T S D W Y V D V Q T T P A G S A F T

BrV (246) G I G K V D W N R K H Q K -----P D T V K V G F T D V Y C E A R R I F E L G V Q R F K -----Y P T M D E L K Y L K S R W E V P T G S V H S

ScV L-A (174) G V G H S W Q A K D H L N -----P D V A V I D Q A R L Y S C V R D M F E - G S K Q T Y K -----Y P F M T D D Y T A N R W E V P G S V H S

XdV-L (256) I D G V D W E K K E N Q S -----M N V T M I K D S D V F R S A C K I F E D A K G I C R R -----P K S F S W E S Y W A N R W Q S A A G S I H S

ScV L-BC (311) V D E E V W E K K R N S D -----I K T V N I S Y A K V L E H C R E L F I M A R A E K E -----P M R M K W Q E Y W R Q F A V I M P G S V H S

GcV (1100) L E V L L R G K V C E V S L Y K K E Q V F I I L L T V F S E L T A I V R H R G N K S T G S M G R M C T L L S D F E T L L G K V S Y K N R S I I E E Q V V P W L T S D P I P R T P D F Y S T Y F K M A V

ZbV (252) L N S K V L S D G R L L Q K F G -----G V P S G S G F T S I I G S I C N Y I M I D T C F M K M G -----L D K N R S A I V Y G D D C L I G I K K P L H

HvV 190S (246) Y D R T E L M H V E S C S P -----A A I A D Q V I P Y I D E L G A C I D F I L D T E L G Q D T -----I E L P D E D E W W T S R W L C V N G S Q N A

L1-1V (282) G V N E I V E T A R R L D -----V G S L S M Q R L D E N E L R A A V R L I Y S E E L R R P -----V T Y P L I C D E W S S R W L M A A N G S H S R

TvV (894) G A I P G A A L D M K H L T Y N -----P I M T V D V P K T Q L H D L Y R I L S -----R N Y N N -----T K I S S F E H H L E E L L S R S C - S Y

Consenso (1101) V D W E E K R I V I T V I L L G K T W D D Y W R W G S V H S

(1)

(2)

1201 1250 1300

ACDA-V (801) V N K D M M E A R N M L K A N G V Q N L T K T Q V M A Q M R D N L P L S A V I G C E M I L A Q M W L E W S K L -----R A L F A A S M E H W M P S A F S L

BrV (314) C Y E G D Q E Y L A K D Y R -----H R S K F V T L N R L S C D Q I R E M F N R K E I Q A W A V Y E W A K Q -----R A I Y G V D L T S V I T N Y A M

ScV L-A (241) C Y E E D N D Y Y P G Q Y -----T R N K F T V N K M P K H K S R M I A S P E V R A W T S T Y E W G K Q -----R A I Y G T L R S T L I T N A M

XdV-L (324) C Y P R D M E Y V I R D Q Q S -----L K N K F T I S M P K C T V D F S D R E Q V Q G W S T Y E W G K Q -----R A I Y G T L T S Y V L S N F A F

ScV L-BC (379) Q H P V E Q V I R V L P R E -----I R S K K G V A S V M P Y K E Q K F T S R R E I H A Y T T Y E W G K V -----R A I Y G C D F S S H T M A D F G I

GcV (1200) F M H S T F V P V T L R S A P L T F Y E Y C A R S E L W G T T G S G I G Y G K R S F N K S I Y G A Y P T E E I Y R X A L Y G D N P P L K P L E K P E L T K V R A V I S A S F Q S Y I L L M S Y L E

ZbV (322) K H E D S A F K I R K L M L K F M Q L L F D I T D P K D T K L V C E K V S V I I E Y D E D T I N G T S L L P S K I -----T R I E K E P D T F L L N S S S H R W W

HvV 190S (317) L S K A L G I K N K S G Q R -----Y R R M A A E E V N N N P V P A W N G H T S V S P S V L E N G S D -----R A I F A C D T R S Y F A F T Y W L

L1-1V (351) A L E H A H P E L A T R K E G -----Q A Y R K A V M E Q W Q H N P M D R W D G T V Y V T P A L E H G R T -----R L L L A C U T L S Y M W F E Y A L

TvV (961) Y P D E Q I D Q L P P Q P -----T R K E F I D I V T I D I K Q C K Q V F I R Q R L E H G R E -----R F L Y N C U T I S Y V Y F D V L

Consenso (1201) D I I M I Y M P V A W T S K E W G K R A I Y G DL SYVIS FAL

(2)

(3)

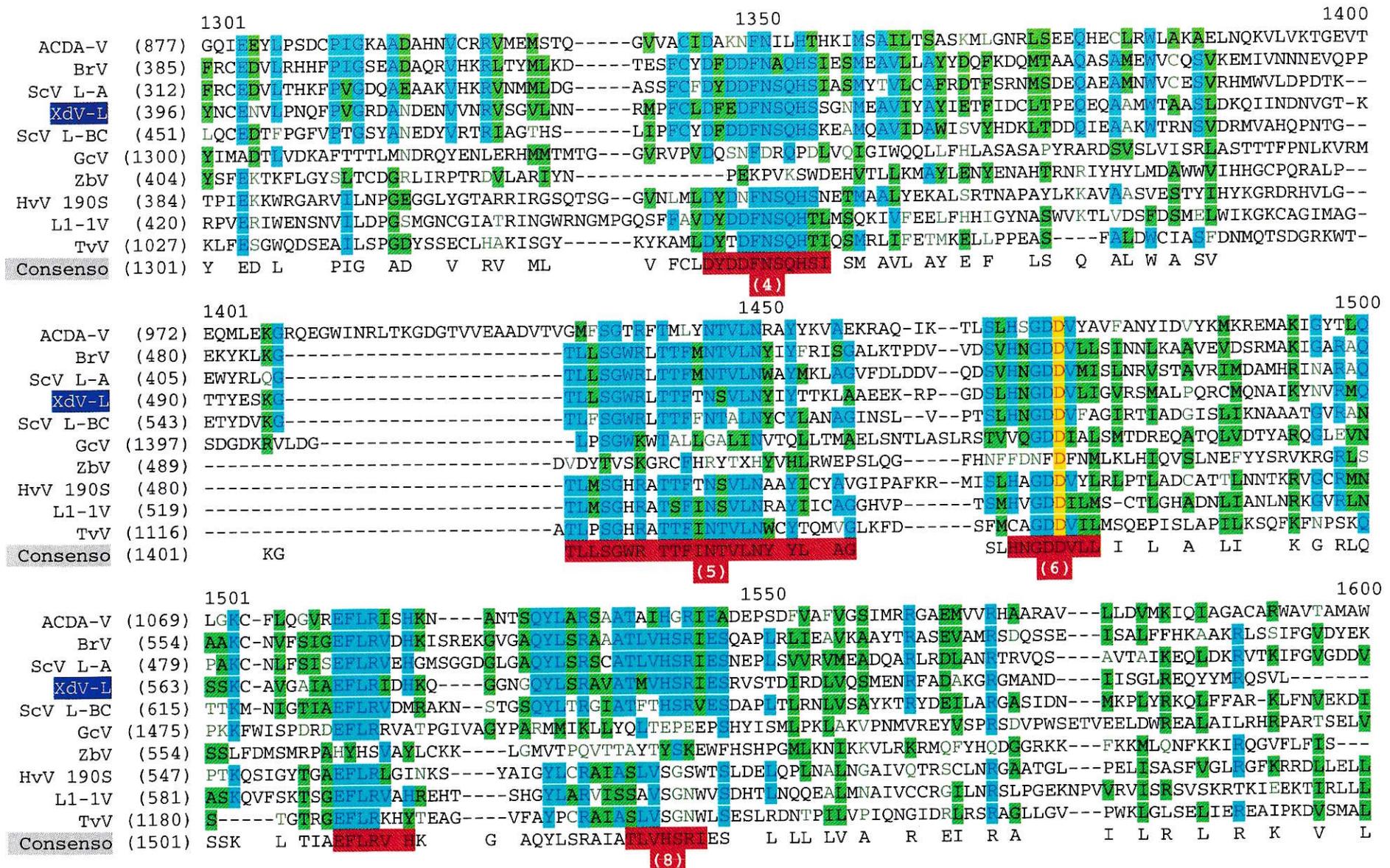


Fig 14. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de RDRP de diversos virus de levaduras. En rojo, se resaltan los 8 motivos conservados definidos en los RDRP virales. En azul se resalta la secuencia de la proteína Pol predicha para el virus XdV-L y en gris se resalta la secuencia consenso de las proteínas utilizadas. La secuencia se resalta en amarillo para aminoácidos idénticos, en celeste, aminoácidos con cambios conservados y en verde, aminoácidos similares.

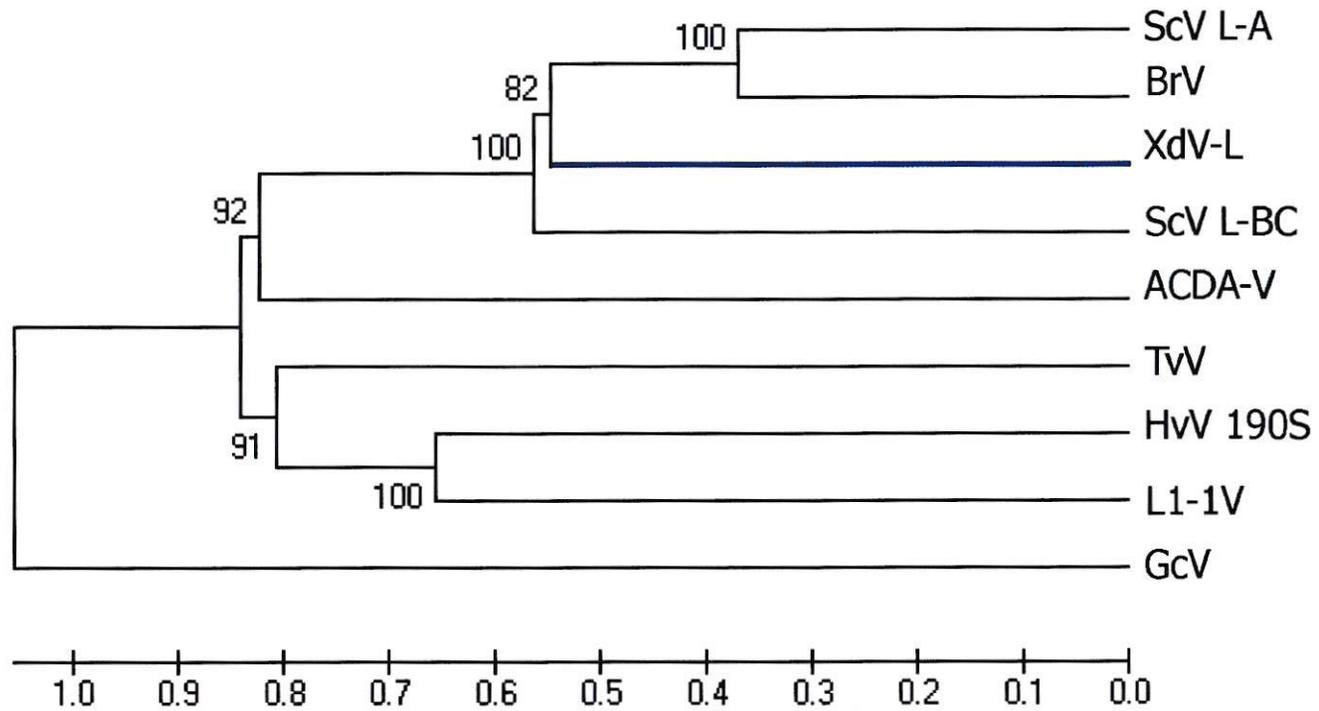


Figura 15. Dendrograma del alineamiento de las secuencias de RDRP de distintos sistemas virales presentes en levaduras. Filogenia realizada con el programa MEGA 4.0, utilizando el algoritmo UPGMA. La escala inferior refleja las distancias relativas entre las secuencias aminoacídicas. Los valores de las raíces (*Bootstraps*) están basadas en 1000 replicaciones.

Análisis bioinformático de la secuencia de la molécula M₁-385.

La secuencia de parte de la molécula M₁-385 fue obtenida tras la secuenciación de 3 clones obtenidos mediante oligonucleótidos de secuencia aleatoria. El alineamiento obtenido tiene un tamaño de 1330 pb y posee identidad con la molécula L-385. Al ser una molécula de menor tamaño que L-385 (Fig. 16), la búsqueda de homologías tanto nucleotídicas como aminoácidas no reflejaron resultados, pero si nos permite reafirmar la identidad presentada entre estas 2 moléculas, lo cual constituye un sistema novedoso respecto a lo observado en otros sistemas virales de levaduras.

Para complementar los resultados de hibridación, se buscaron identidades utilizando secuencias ahora conocidas. Para esto, se diseñaron partidores específicos a la secuencia de XdV-L, los cuales se utilizaron para realizar una reacción de RT-PCR con las distintas moléculas de dsRNA como molde de la reacción. El análisis de esta reacción (Fig. 17) nos confirma los resultados obtenidos con la hibridación, al presentarse una similitud de secuencia entre las moléculas de origen japonés pero no con las cepas de origen ruso. Esto nos sugiere que las moléculas de dsRNA, pese a tener tamaños similares, no poseen una secuencia idéntica entre ellas, sugiriendo de esta forma una especificidad de acuerdo al lugar de aislamiento. Por otra parte, se vuelve a observar una similitud entre las moléculas L-dsRNA y M₁-dsRNA, tanto en la cepa UCD 67-385 como en la CBS 5908. Estos resultados nos indican la presencia de 2 moléculas distintas encontradas en el mismo huésped, pero que poseen similitud nucleotídica, avalando la idea de la existencia de 2 distintos sistemas virales en el mismo huésped.

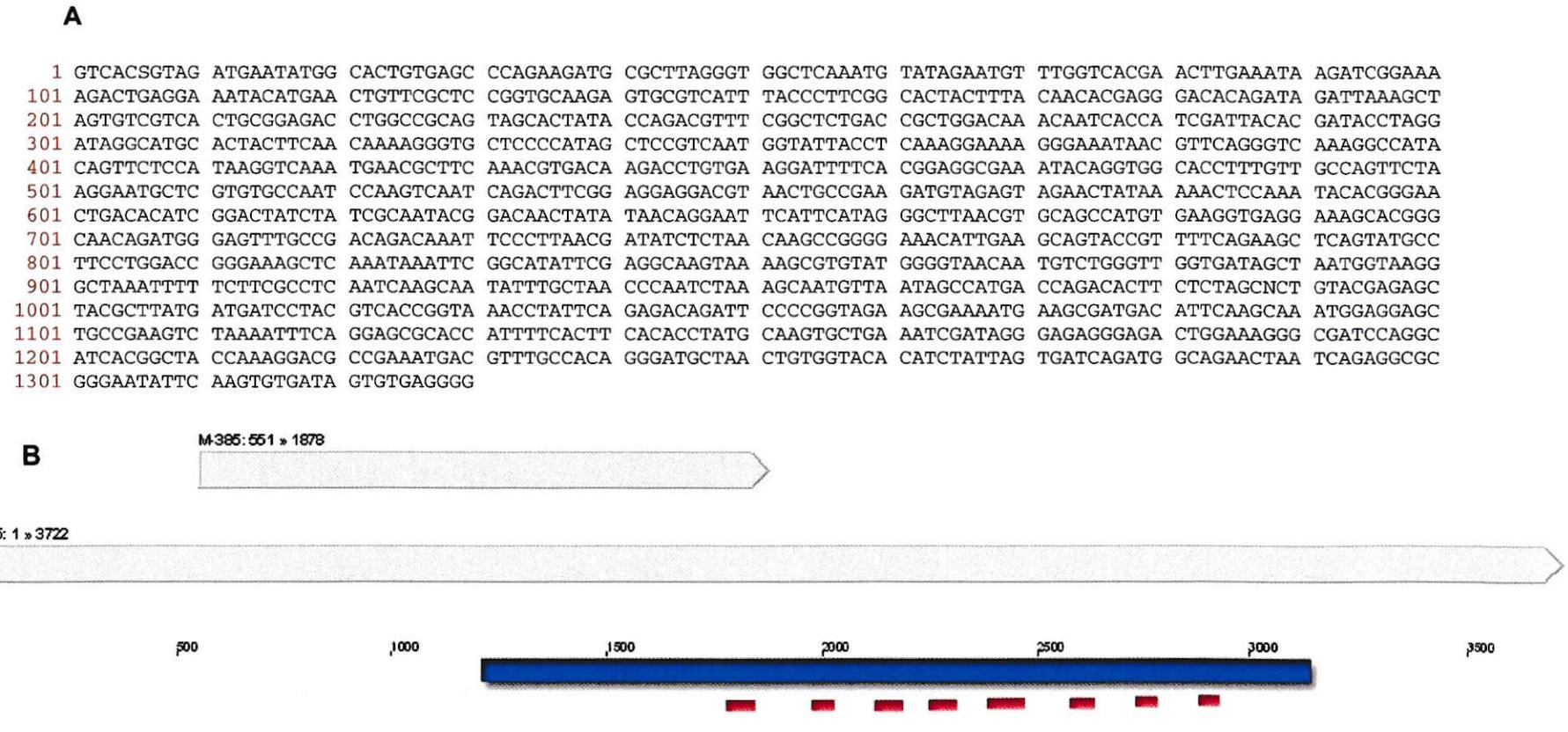


Figura 16. Alineamiento de las secuencias de las moléculas L-385 y M₁-385. A. Secuencia de parte de la molécula M-385 mediante la secuenciación de clones obtenidos por oligonucleotidos de secuencia aleatoria. B. Posición relativa de la secuencia de la molécula M-385 respecto a las de L-385. En azul se resalta el segmento homólogo a secuencias de RDRP publicadas y en rojo, las regiones conservadas en distintas RDRP, las cuales se ubican fuera de la zona abarcada por la secuencia de M₁-385

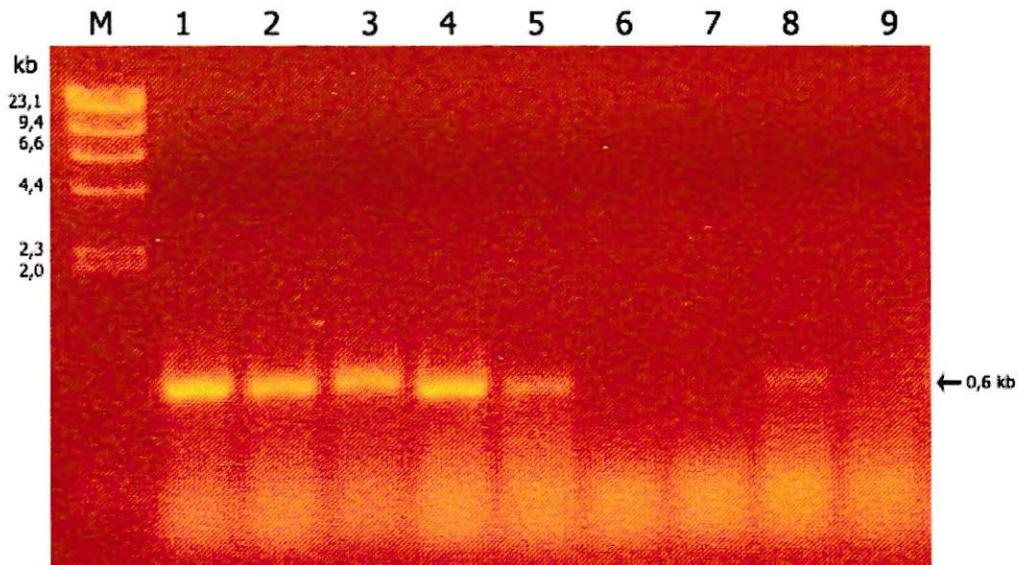


Figura 17. Reacción de RT-PCR utilizando partidores específicos a la secuencia de L-385. Se utilizó como molde de la reacción: 1, 385-L; 2, 385-M; 3, 383-L; 4, 383-M; 5, 1149-L; 6, 2059-L; 7, 2786-L; 8, 653.3-M; 9, ScV-L. M, marcador de peso molecular *NHindIII*. La flecha indica el tamaño esperado de la reacción.

4. DISCUSION

Polimorfismo de dsRNA en *X. dendrorhous*.

Las cepas de *X. dendrorhous* analizadas en este estudio abarcan el espectro total de orígenes geográficos descritos en la literatura para esta levadura, incluyendo cepas aisladas desde Japón, Rusia, Finlandia, Alaska y Argentina. De esta forma podemos definir de mejor manera una relación entre el origen geográfico y las moléculas presentes, comparándolo con lo anteriormente descrito (Sanhueza, 2007; Fell y Blatt, 1998). Podemos concluir la idea de que para cada origen se encuentra una combinación distinta de moléculas, patrón que es compartido por las cepas de ese origen. Para el caso de ambas cepas de origen sudamericano, se presenta una molécula de igual tamaño (L-dsRNA, ~4,8 kb) a la observada en las cepas del hemisferio norte, pero adicionalmente se encontró una molécula exclusiva de estas 2 cepas (M₂-dsRNA, ~1,6 kb). Este hecho apoya la relación geográfica de las moléculas de dsRNA encontradas en cada cepa y reafirma el aislamiento genético de las cepas patagónicas, planteado anteriormente en base a otros análisis filogenéticos (Libkind, 2007).

El único caso que escapa al agrupamiento geográfico planteado es la ausencia de moléculas de dsRNA en la cepa de origen japonés UCD 67-210, la cual ha sido catalogada de forma diferencial respecto a las otras cepas de ese origen, tanto por características fisiológicas como genéticas propias, al ser estudiada utilizando marcadores genéticos tales como MSP-PCR, ITS e IGS (Fell y Blatt, 1998; Libkind, 2007). Esta cepa ha sido rotulada como la cepa tipo de *Phaffia rhodozyma*, fase asexual de la misma levadura nombrada posteriormente como *X. dendrorhous*. La ausencia de moléculas de dsRNA y la consiguiente divergencia del agrupamiento geográfico planteado en este trabajo, corroboran esos datos previamente planteados y

entregan un nuevo punto de vista a la discusión acerca del origen de esta cepa y su posible separación del resto de cepas de *X. dendrorhous*.

Este último aspecto está ligado al ambiente natural en el que se desenvuelve cada cepa, determinando características similares a las observadas en cepas con un origen geográfico común, entre las que se podrían encontrar la presencia de moléculas de dsRNA. De la misma forma, no se descarta la hipótesis que menciona a las levaduras como simples vectores para que estos virus logren infectar vegetales mayores (McCabe y col., 1999). La presencia de enfermedades agrícolas causadas por virus de dsRNA implica la infección por hongos que no son afectados por la presencia de estas moléculas, si no que por el contrario, representa una ventaja comparativa frente a otros organismos presentes en ese nicho. Este flujo puede ser comparado tanto por la presencia de las moléculas de dsRNA como también por el uso de marcadores genéticos que caractericen los agrupamientos observados.

Relación entre los dsRNA presentes en distintas cepas de *X. dendrorhous*.

En anteriores trabajos se mostró la relación existente entre cepas de origen japonés y ruso, mediante hibridaciones (Sanhueza, 2007) y análisis genéticos (Libkind, 2007). La similitud en la secuencia de las moléculas de dsRNA se observó solo en cepas del mismo origen geográfico, dándonos un indicio del comportamiento general en diversas cepas. En este trabajo logramos confirmar esta hipótesis, ampliando el espectro de cepas en estudio, con lo cual se abarcó el total de orígenes geográficos. Se definió de esta forma que la secuencia de las moléculas de dsRNA está relacionado al origen geográfico de cada cepa y no es una propiedad común a todas las cepas de esta especie.

Por otra parte, se logró demostrar que en los casos de cepas que presentan un mayor número de moléculas de dsRNA, se presentó una similitud estructural entre moléculas de distinto tamaño. Estos resultados, obtenidos mediante hibridaciones y transcripción reversa con partidores definidos, nos dan un nuevo apoyo a lo observado

a nivel de secuencia en relación a la posible convivencia de más de un sistema viral en estas cepas, donde al menos una de las moléculas de mayor tamaño (L o M-dsRNA) sea necesaria para determinar la presencia de las proteínas virales.

Pese a que podemos mostrar que las cepas japonesas comparten moléculas similares, con la metodología utilizada no podemos aseverar la completa diferencia entre las moléculas de distinto origen. Ambos métodos se basan en la identidad a nivel de secuencia, por lo cual los resultados pueden verse afectados con cambios nucleotídicos entre las distintas moléculas de dsRNA. Por lo tanto, un resultado negativo en estas hibridaciones no necesariamente nos descarta algún grado de identidad de los productos génicos, si no que al menos es un parámetro a considerar en términos de diferenciación de las moléculas presentes en cada origen geográfico. Este hecho puede ser corroborado al no observarse hibridación entre las moléculas XdV-L y ScV-L, moléculas que en forma paralela se observó que codifican para proteínas de una alta similitud estructural. De esta forma, podemos señalar que las cepas japonesas comparten la secuencia de la molécula L-385 y probablemente codifiquen para algún tipo de RDRP. Sin embargo no podemos descartar que las moléculas L-dsRNA de las cepas de otro origen geográfico codifiquen asimismo alguna proteína que posea una similitud a nivel de estructura con la encontrada en la molécula L-385, manteniendo la función principal de ésta (Bamford, 2005). La secuenciación del total de moléculas involucradas podrá definir el total grado de identidad entre estas moléculas y la relación según el origen geográfico de ellas.

Determinación de la presencia de dsRNA en distintos estados celulares de *X. dendrorhous*.

En *S. cerevisiae*, el estudio de sus sistemas virales ha llegado a definir completamente el comportamiento de las moléculas de dsRNA, determinando incluso diferencias en la interacción de las proteínas sintetizadas y su relación con el huésped (Schmitt y Breinig, 2006; Wickner, 1996). De esta forma se determinó que gran parte de la expresión e interacción de estos genomas depende principalmente de genes ribosómicos de la célula, los cuales alteran la estabilidad de los mRNA virales y sus productos presentes en el citoplasma del huésped (Ohtake y Wickner, 1995). Desde este punto de vista, no encontramos alteraciones en las concentraciones de las moléculas de dsRNA al cambiar la fuente de carbono o diversos estados metabólicos del huésped. Sin embargo, si logramos definir una variación en la relación de las concentraciones entre las moléculas de dsRNA de la cepa UCD 67-385. En ese caso, observamos que pese a que siempre se presentaron 4 moléculas, la relación de concentración entre las 2 de mayor tamaño varió durante la curva de crecimiento, observándose un aumento en la concentración de la molécula M-385 frente a la concentración de L-385.

Este dato, junto con la identidad de secuencia posteriormente determinada, apoyan la idea de la presencia de 2 sistemas virales distintos que podrían presentar una función similar y posiblemente sean estas moléculas de mayor tamaño las necesarias para la propagación de las moléculas de menor tamaño S₁-dsRNA y S₂-dsRNA. Solo conociendo la secuencia de estas últimas, podremos definir si el aumento de la concentración de M-dsRNA se relaciona con algún efecto fenotípico claro y confirmar la diferenciación del sistema observado en *X. dendrorhous* con el descrito en *S. cerevisiae*, donde si se observa una dependencia de la molécula M-dsRNA de la L-dsRNA.

Clonamiento moléculas de dsRNA

El clonamiento de genomas virales de dsRNA ha representado un constante desafío en diversas áreas de estudio. El planteamiento de nuevos métodos ha llevado a un avance en ese sentido, sin embargo factores como el desconocimiento de secuencias, la baja concentración de moléculas y el alto número de pasos involucrados hacen que este procedimiento siga teniendo una baja eficiencia (Attoui y col., 2000; Ambrose y Clewley, 2006). Numerosos métodos fueron probados y adaptados para lograr el clonamiento de las moléculas completas de dsRNA de la cepa UCD 67-385 (Lambden y col., 1992; Vreede y col., 1998; Maan y col., 2007), sin embargo ellos fueron infructuosos. Es por esto que se planteó la obtención de varios clones de un menor tamaño, formando una genoteca que nos entregó finalmente el resultado deseado. La secuenciación de los clones iniciales abarcó solo una zona de la información total de estas moléculas. Diversas complicaciones estructurales, tales como zonas de alto nivel de GC o estructuras secundarias altamente estables podrían explicar una difícil desnaturación de las hebras, paso clave para el inicio del proceso. Por otra parte, estructuras definidas en los extremos, ya sean estructuras secundarias o incluso proteínas asociadas, dificultaría la obtención de clones de la extensión total de la molécula.

Una vez confirmada la obtención de clones de estas moléculas, el clonamiento del resto de cada una de las moléculas fue posible mediante el uso de partidores de secuencia conocida, método que nos permitió el avance por estas moléculas con una mayor eficiencia al eliminar el factor de aleatoriedad y permitiéndonos localizar claramente la posición de los nuevos clones en comparación a los ya alineados.

Con estas secuencias obtenidas se definió una similitud entre la molécula L-385 y las descritas para diversos sistemas virales como el de *S. cerevisiae* u otros totivirus presentes en levaduras, encontrándose una identidad con los ORF codificantes para las RDRP virales. El avance en el conocimiento de la secuencia de M-385 nos mostró una identidad con la molécula de mayor tamaño L-dsRNA, resultado

que pese a diferir con los modelos estudiados, nos entrega un avance en el conocimiento del sistema en *X. dendrorhous*. Esto constituye un apoyo a la hipótesis de la presencia de 2 sistemas en paralelo, donde la molécula M-385 podría cumplir las mismas funciones de la molécula L-385, pese a ser una molécula de menor tamaño. Por otra parte, las escasas secuencias obtenidas para las moléculas S-dsRNA no presentan algún tipo de identidad con las 2 mayores ni con algo descrito en las bases de datos públicas, conformando un componente distinto al ya descrito que podría ser dependientes de cada una de las 2 moléculas de mayor tamaño. Una vez conocidas las secuencias en su integridad, se definirá el conocimiento del sistema de forma global y se podrá determinar la relación entre estos tipos de moléculas y si corresponden a uno o más sistemas virales.

Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

El proceso de clonado y secuenciación de la molécula L-385 nos llevó a conocer cerca del 90% de su información, con lo cual logramos identificar completamente un ORF presente. La identidad de esta secuencia con las diversas RNA polimerasas publicadas nos indica por primera vez en el estudio de esta levadura una relación entre las moléculas de dsRNA y un componente de un sistema viral. Anteriores trabajos habían sugerido la presencia de partículas tipo virus (Pfeiffer y col., 1996) o de un fenotipo micocida o *killer* (Castillo y Cifuentes, 1994), sin embargo no se había determinado cual era la información contenida en las moléculas de dsRNA presentes en la levadura.

Este estudio también muestra, a diferencia de la mayoría de los sistemas anteriormente descritos, la presencia de una segunda molécula que compartiría al menos en parte, la secuencia de la molécula L-385. La permanencia de 2 virus con la misma función ha sido descrita en pocos casos como el de *U. maydis*. Sin embargo resulta destacable en *X. dendrorhous* la diferencia de tamaño presentada entre ambas moléculas, lo cual nos permitiría predecir que las moléculas de menor tamaño S1 y

S2-dsRNA podrían presentarse relacionadas con el fenotipo *killer* descrito para esta cepa anteriormente (Castillo y Cifuentes, 1994).

Tanto la comparación con otras secuencias de virus de levaduras anteriormente publicadas, como el análisis filogenético de las mismas, nos indican que el virus XdV-L podría pertenecer a la familia *Totiviridae*. No obstante, este resultado está basado solamente en identidades de las proteínas compartidas, sin conocer aún la morfología exacta de estos virus, la existencia de alguna proteína de la cápside e incluso el rol de las otras moléculas de dsRNA presentes en la cepa UCD 67-385.

A diferencia de los sistemas pertenecientes a dicha familia, en el caso de la secuencia de la molécula L-385 no identificamos la presencia de un ORF relacionado con alguna proteína estructural de la cápside del virus. Pese a que en los sistemas estudiados, la mayor identidad se encuentra en la secuencia codificante de las RDRP, la similitud entre los ORF gag de los diversos virus de levaduras es suficientemente alta como para haber sido detectada mediante comparación informática de las secuencias obtenidas. Considerando que la secuencia de XdV-L se presenta incompleta hacia su extremo 5' (extremo donde se debería localizar algún ORF que codifique para una proteína estructural), podemos suponer que al completar la secuencia de este extremo se logrará identificar un ORF de esas características. Con esta información podremos completar el grado de similitud de las RDRP y definir este sistema viral como parte de la familia *totiviridae*.

El análisis de las zonas cercanas al inicio del ORF identificado, nos permitió predecir estructuras secundarias que podrían cumplir con lo necesario para realizar un cambio del marco de lectura asociado al ribosoma, evento característico de estas moléculas. Sin embargo, considerando la distancia de estas estructuras secundarias con el propuesto sitio corredizo, la posible inestabilidad del *loop* formado y además la inexistencia de un primer ORF que sea participe del cambio, no permite definir una estructura en la molécula XdV-L, que esté involucrada con ese cambio de marco de lectura.

El análisis de zonas conservadas nos muestra la completa mantención de secuencias específicas y reconocibles dentro del ORF de la proteína Pol. En la secuencia obtenida, se encuentran identificadas zonas de unión a magnesio o a rNTP y zonas conservadas que poseen una estructura primaria y secundaria estable, las cuales se proponen como imprescindibles para la actividad de estas RNA polimerasas (Ribas, 1992; Routhier y Bruenn, 1998). La misma conservación se observa en zonas de propagación viral, donde la estructura secundaria definida promueve la interacción con los ssRNA nacientes para la formación de una nueva partícula viral. Esta zona incluye un motivo GDD altamente conservado, que podemos detectar en XdV-L en la posición 550 de la secuencia aminoacídica predicha. Estos patrones anteriormente descritos son específicos para todas las RDRP (Bruenn, 1993), lo cual nos lleva a afirmar la relación de la molécula XdV-L con alguna RDRP presente en el citoplasma de *X. dendrorhous*.

5. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *X. dendrorhous* poseen un patrón de moléculas de dsRNA que está relacionado con el origen geográfico, encontrándose 4 moléculas de dsRNA (cepas de origen japonés), 2 (argentino), 1 (ruso y de Alaska) o ninguna molécula (cepa finlandesa)
2. Algunas de las moléculas de dsRNA provenientes de cepas de distinto origen geográfico, presentan algún grado de identidad a nivel nucleotídico.
3. A diferencia de lo descrito en *S. cerevisiae*, se encontró la coexistencia de virus homólogos en el mismo huésped. Además, estos virus serían independientes, basado en el aumento de la molécula M-dsRNA en relación a L-dsRNA.
4. La secuencia traducida del genoma del virus XdL-V, posee una zona de alta identidad con RNA polimerasas presentes en otros sistemas virales de levaduras. La comparación de la secuencia de esta zona con la de otros sistemas, reveló que XdL-V pertenecería al genero *Totivirus*, el cual incluye al sistema viral de *S. cerevisiae*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ambrose, H., Clewley, J. 2006. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol.* 16:365-383.
- Attoui, H., Billoir, F., Cantaloube, J.F., Biagini, P., De Micco, P., De Lamballerie, X. 2000. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *J Virol Methods.* 89:147-158.
- Bamford DH, Grimes JM, Stuart DI. 2005. What does structure tell us about virus evolution?. *Curr Opin Struct Biol.* 15:655-663.
- Breinig, F., Sendzik, T., Einfeld, K., y Schmitt, M. J. 2006. Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3810-3815.
- Bruenn, J. 1993. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double stranded RNA viruses. *Nucleic acids research.* 21:5667-5669.
- Castillo, A., Cifuentes, V. 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet.* 26:364-368.
- Diamond, M. E., Dowhanick, J. J., Nemeroff, M. E., Pietras, D. F., Tu, C. L., y Bruenn, J. A. 1989. Overlapping genes in a yeast double-stranded RNA virus. *J Virol.* 63:3983-3990.
- Dihanich M, van Tuinen E, Lambris JD, Marshallsay B. 1989. Accumulation of viruslike particles in a yeast mutant lacking a mitochondrial pore protein. *Mol Cell Biol.* 9:1100-1108.
- Dinman, J. D., Wickner, R. B. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol.* 66:3669-3676.
- Dinman, J. D. 1995. Ribosomal frameshifting in yeast viruses. *Yeast.* 11:1115-1127.

Fell, J.W, Blatt, G.M. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 23:677-81.

Ghabrial, S.A. 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes.* 16:119-131.

Kuscera, J., Pfeiffer, I., Takeo, K. 2000. Biology of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mycoscience.* 41:195-199.

Lambden, P.R., Cooke, S.J., Caul, E.O., Clarke, I.N. 1992. Cloning of non cultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol.* 66:1817-1822.

Libkind, D., Ruffini, A., Broock, M., Alves, L., Sampaio, J.P. 2007. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomyceteous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ Microbiol.* 73:1120-1125.

Maan S, Rao S, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, Mertens PP. 2007. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J Virol Methods.* 143:132-139.

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

Makower, M., Bevan, E.A. 1963. The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proc of the 11th intl congress genetics.* 1:202.

McCabe, P. M., Pfeiffer, P., y Van Alfen, N. K. 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.* 7:377-381.

Moon S, Byun Y, Han K. 2007. FSDB: a frameshift signal database. *Comput Biol Chem.* 31:298-302.

Myers, C., Griffiths, A., Krause, S., Martin, R. 1988. Double stranded RNA in natural isolates of *Neurospora*. *Curr Genet.* 13:495-501.

- Ohtake, Y., Wickner, R. B. 1995. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol Cell Biol.* 15:2772-2781.
- Oliver, S., McCready, S.J, Holm, C., Sutherland, P.A., McLaughlin, C. S., Cox, B. S. 1977. Biochemical and physiological studies of the yeast virus-like particle. *J Bacteriol.* 130:1303-1309.
- Pfeiffer, I., Kuscera, J., Varga, J., Parduez, A., Ferenczy, L. 1996. Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet.* 30:294-297.
- Rasband, W.S. 1997-2006. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Ribas, J. C., y Wickner, R. B. 1992. RNA-dependent RNA polymerase consensus sequence of the L-A double-stranded RNA virus: definition of essential domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:2185-2189.
- Ribas, J. C., y Wickner, R. B. 1998. The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 273:9306-9311.
- Riffer, F., Eisfeld, K., Breinig, F., y Schmitt, M. J. 2002. Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 148:1317-1328.
- Routhier, E., y Bruenn, J. A. 1998. Functions of conserved motifs in the RNA-dependent RNA polymerase of a yeast double-stranded RNA virus. *J Virol.* 72:4427-4429.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanhueza, M. 2007. Caracterización genética de moléculas de dsRNA presentes en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Memoria de título de Ingeniería en biotecnología molecular, Facultad de ciencias, Universidad de Chile.

Schmitt, M. J., y Tipper, D. J. 1995. Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*. 213:341-351.

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

Schmitt, M. J., y Breinig, F. 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*. 4:212-221.

Tooley, P., Hewings, A., Falkestein, K. 1989. Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestant*. *Phytopatology*. 79:470-474.

Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol Genet Bull*. 13:641-651.

Vreede, F.T., Cloete, M., Napier, G.B., Van Dijk, A.A., Viljoen, G.J. 1998. Sequence-independent amplification of large dsRNA virus genome segments by poly(dA)-oligonucleotide ligation. *J Virol. Methods* 72:243-247.

Wickner, R. B., y Leibowitz, M. J. 1979. Mak mutants of yeast: mapping and characterization. *J Bacteriol*. 140:154-160.

Wickner, R. B. 1986. Double-stranded RNA replication in yeast: the killer system. *Annu Rev Biochem*. 55:373-395.

Wickner, R. B., Icho, T., Fujimura, T., y Widner, W. R. 1991. Expression of yeast L-A double-stranded RNA virus proteins produces derepressed replication: a ski-phenocopy. *J Virol*. 65:155-161.

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

Widner, W. R., y Wickner, R. B. 1993. Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Mol Cell Biol*. 13:4331-4341.