

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MOLÉCULAS
DE dsRNA PRESENTES EN *Xanthophyllomyces dendrorhous***

Memoria de Título

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias

Mario Andrés Sanhueza Cubillos

2007

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino.

Co-Director de tesis: Dr. Victor Cifuentes Guzmán

UCH-FC
Biotecnología
8194
C-1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MOLÉCULAS DE
dsRNA PRESENTES EN *Xanthophyllomyces
dendrorhous*”**

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

MARIO ANDRES SANHUEZA CUBILLOS

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Director Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Rosalba Lagos Mónaco
Presidente Comisión

Dr. Francisco Chavez Espinosa
Corrector



Santiago de Chile, Noviembre de 2007



*We'll ride the spiral to the end and may just go where no one's been
M.J.K..*



A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Presentarse ante una situación así conlleva una serie de sentimientos que, pese a ser altamente disímiles, están asociados a una gran cantidad de recuerdos, momentos compartidos y superados, y por sobretodo, la calidad de las personas que me han permitido llegar a vivirlos. De esta forma, se hace necesario agradecerles y permitirles compartir este logro.

La figura del tutor es vital en este aspecto, tanto por su participación en cada mínimo detalle del trabajo realizado como por sobre todo, el ímpetu de inculcar cada aspecto necesario para la formación de un científico. Por ello, el agradecimiento a Marcelo es tácito por haber cumplido con esta idea de la mejor manera. De la misma forma, agradezco al Dr. Cifuentes, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por sobretodo, realizar todo lo posible para ayudarme a cumplir mis logros, tanto a nivel científico como personal. Este mismo grupo de trabajo ha compartido tantos momentos que se hace imposible enumerarlos, sin embargo el deseo de éxito conjunto es algo que queda reflejado en este trabajo. Por esto quería agradecer a todo el laboratorio de Genética y por sobretodo a Mauricio y Salvador, por su constante apoyo.

Tratar de hablar del apoyo en mi vida queda reducido a Tranquilidad y Comprensión. Esto último ha sido obtenido de una inmejorable manera por el grupo de amigos que me acompaña en cada momento, decisión, alegría y pesar. En forma conjunta sabemos que cada una de estas palabras depende de ellos, y que cada logro obtenido es un aporte mas al trabajo constante realizado por todos nosotros. Gracias al mítico y cada vez más influyente grupo Mokupas, que seguirá creciendo en cada momento y a todos mis amigos presentes desde el día en que entre a la Facultad. Gracias a todos.

Finalmente la tranquilidad es el sentimiento que de mejor forma agrupa el bienestar íntegro. Ella solo es alcanzada en presencia de mi familia, la cual forma cada detalle de mi existencia; apoyo, compañía y por sobre todo, sueños que han sido vividos y aquellos que se formarán día tras día. La importancia de su presencia es infinita y solo puede ser recompensada con mis ganas de forjar cada aspecto de mi vida exclusivamente por su bienestar. Esto es nuestro.

Agradecimientos a los proyectos FONDECYT N°1040450 y FONDECYT N° 11060157 por el financiamiento necesario para este trabajo.



INDICE



Índice General.....	iv
Índices de Figuras.....	v
Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. Elementos Genéticos extracromosómicos en levaduras.....	1
1.2. Sistema <i>Killer</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2.1 <i>Componentes del Sistema</i>	2
1.2.2 <i>Replicación Viral</i>	5
1.2.3 <i>Producción y acción de la Toxina</i>	7
1.3. Aplicaciones del Sistema <i>Killer</i>	7
1.4. Clonamiento de virus dsRNA.....	7
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	11
2. Materiales & Métodos.....	12
2.1. Materiales.....	12
2.2. Métodos.....	14
3. Resultados.....	27
4. Discusión.....	54
5. Conclusiones.....	59
6. Bibliografía.....	60



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo replicativo del sistema <i>killer</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figura 2. Corrimiento del marco de lectura en la traducción del L-dsRNA en <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura 3. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales de diversas cepas de <i>X. dendrorhous</i>	28
Figura 4. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con DNasa A.....	29
Figura 5. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con RNasa H.....	31
Figura 6. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con Nucleasa S1.....	32
Figura 7. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con RNasa A.....	33
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	35
Figura 9. Electroforesis de las moléculas dsRNA-S de la cepa UCD 67-385.....	36
Figura 10. Electroforesis de las muestras de dsRNA extraídas por distintos métodos..	42
Figura 11. Relación entre el tiempo de agitación y la cantidad de dsRNA purificado de la cepa UCD 67-385.....	40
Figura 12. Hibridación de las sondas de la cepa UCD 65-385 de <i>X. dendrorhous</i> con el RNA de otras cepas.....	42
Figura 13. Técnica de la amplificación por partidores únicos (SPAT).....	44
Figura 14. Controles en los pasos de la técnica SPAT.....	45
Figura 15. Hibridación del Clon pBS-385M con el dsRNA total de la cepa UCD 67-385.....	47
Figura 16. Electroforesis con los productos de RT-PCR a partir de la molécula 385M-dsRNA.....	49
Figura 17. Secuencia de un clon obtenido por el método aleatorio.....	51
Figura 18. Análisis mediante RT-PCR del clon 385L-R1.....	52

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
CML	Corrimiento del marco de lectura
DEPC	dietil pirocarbonato
dsDNA	DNA de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGE	Elemento genético extracromosómico
kb	kilobases
LB	medio de cultivo Luria Bertani
MM _v	medio mínimo Vogel
MWCO	rango de corte de peso molecular
ORF	marco abierto de lectura
pb	pares de bases
RT-PCR	reacción de transcripción reversa acoplada a PCR
SDS	dodecil sulfato de sodio
SPAT	técnica de amplificación por partidor único
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 rico para <i>X. dendrorhous</i>

RESUMEN

En una amplia gama de microorganismos se ha descrito la existencia de elementos genéticos extracromosómicos del tipo RNA de doble hebra encapsidados en partículas tipo virus. Se ha asociado la presencia de estos elementos con ciertas características del huésped como virulencia o patogenicidad. El sistema *killer* de *S. cerevisiae*, del cual se conoce mayormente su funcionamiento y estructura, 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.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura de importancia biotecnológica y algunas cepas portan moléculas de RNA de doble hebra, pero en ninguna de ellas se ha podido asociar a algún fenotipo. En este trabajo se muestra la caracterización de elementos genéticos extracromosómicos presentes en diversas cepas de *X. dendrorhous* a nivel químico y genético, buscando establecer una relación entre estas moléculas y las cepas que las posean.

Para determinar el tipo de elemento presente en las cepas estudiadas se realizaron una serie de ensayos enzimáticos, que mostraron la presencia de moléculas de RNA de doble hebra en 2 grupos de cepas: las 2 cepas analizadas de origen japonés presentaron 4 moléculas, de tamaños estimados de 4,8, 3,4, 0,8 y 0,6 kb; y las 3 cepas de origen ruso, que presentaron solo una molécula de RNA de doble hebra de tamaño 4,8 kb. De esta forma se relacionó el número de moléculas presentes con el origen geográfico de las cepas estudiadas.

La extracción y purificación de las moléculas de RNA de doble hebra fue optimizada en diversos parámetros para obtener un protocolo específico para *X. dendrorhous*. Así se definió como el mejor método de extracción el tratamiento con microesferas de vidrio y fenol ácido, con un periodo óptimo de ruptura de la pared celular de 40 minutos.

Se buscó relacionar estructuralmente las moléculas presentes en las cepas de *X. dendrorhous* mediante experimentos de hibridación y se observó una similitud entre las moléculas de 3,4 kb (M-dsRNA), pertenecientes a las 2 cepas japonesas. Sin embargo, no se encontró similitud entre las moléculas de 4,8 kb (L-dsRNA) de 2 cepas con origen distinto. Esto sugiere la existencia de sistemas virales diferentes de acuerdo al origen geográfico de cada cepa.

Para caracterizar genéticamente las moléculas anteriormente aisladas, se trató de clonaras mediante diferentes métodos establecidos para otros microorganismos. Los diversos intentos para clonar la molécula completa fueron infructuosos debido a dificultades como la alta cantidad de pasos involucrados en los protocolos, la incapacidad de verificar el proceso de clonamiento o la naturaleza misma de las moléculas estudiadas, las cuales podrían presentar diversas modificaciones o estructuras secundarias que dificulten aún más el proceso. Sólo mediante transcripción reversa con hexanucleótidos de secuencia aleatoria se obtuvieron una serie de clones, los cuales entregan una secuencia suficiente para sintetizar cDNA a partir de oligonucleótidos de secuencia específica.

ABSTRACT

A variety of extrachromosomal genetic elements have been described in a wide range of microorganisms as double stranded RNA encapsided in virus like particles. These elements have been associated with host features such as virulence or pathogenicity. *S. cerevisiae* killer system, which is mostly known in functioning and structure, is composed by 2 viruses with double stranded RNA genomes that encode various toxins and structural proteins of these viruses. The toxins, grouped in 3 main classes, kill sensitive cells through various mechanisms.

Xanthophyllomyces dendrorhous is a biotechnological important yeast, where double stranded RNA molecules have been found in some strains, but in none of them have been defined any associated phenotype. In this work we presented the chemical and genetic characterization of extrachromosomal genetic elements present in various strains of this yeast, looking forward to set a relation between these molecules and the carrier strains.

To determine the kind of elements that were present in the studied strains, enzymatic assays were performed. These assays showed the presence of double stranded RNA in 2 strains classes: both of the 2 japanese strains showed 4 molecules with size 4.8, 3.4, 0.8, 0.6 kb; and the 3 russian strains presented only a double stranded RNA molecule with 4.8 kb of size. According to this, we could establish a relation between the number of molecules and the geographic origin of the studied strains.

The double stranded RNA extraction and purification was optimized in several parameters in order to define a specific protocol for *X. dendrorhous*. The best extraction was done with glass beads and acidic phenol, with an optimal cell wall break time of 40 minutes.

We tried to relate structurally the molecules in these strains using hybridizations. A similarity was observed between the 3.4 kb molecules (M-dsRNA) that belong to the 2 japanese strains. However, this similarity was not found in the 4.8 kb molecule (L-dsRNA) from 2 different origin strains. This suggests the existence of diverse viral systems according to geographic origin of each strain.

To characterize genetically the previously isolated molecules, we tried to clone them by different methods described for other microorganisms. The several attempts to clone the complete molecule failed because some difficulties such us the high number of steps in these protocols, the impossibility of check the cloning process and the same nature of these molecules, which could have modifications or secondary structures that could make even harder the process. Only using random primers for the reverse transcription, some clones were constructed and they give a enough sequence for the cDNA synthesis using primers with specific sequence.

1. INTRODUCCIÓN

1. Elementos genéticos extracromosómicos en levaduras.

Estudios en diversos microorganismos han mostrado la existencia de Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGE) que confieren nuevas propiedades al microorganismo que las porta, tales como resistencias, factores de virulencia y diversos mecanismos de toxicidad. Principalmente se presentan en forma de moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) encapsadas en partículas tipo virus (VLPs) o plasmidios de DNA de doble hebra (dsDNA). La presencia de EGEs que codifican para la producción de toxinas es conocida en diversos géneros de levadura tales como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces* (Schmitt y Breinig, 2002). En otros géneros como *Xanthophyllomyces*, se describió la presencia de EGEs (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer, 1996) aunque aún se desconoce su función o relación con algún fenotipo en el hospedero.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete aislada desde exudados de los árboles de regiones frías, principalmente de Japón y Rusia. Posee una gran importancia biotecnológica debido a la producción de carotenoides de alto valor comercial como la astaxantina, un pigmento ampliamente utilizado en la acuicultura y la industria de salmónes (Kuscera y cols, 2000). En las moléculas de dsRNA presentes en diversas cepas de *X. dendrorhous* (Pfeiffer y cols, 1996) se ha observado un polimorfismo en cuanto a tamaño (0,7 – 6,9 kb) y número (0 – 4). En estos trabajos se asoció la presencia de estas moléculas con la existencia de VLPs, los cuales se presentan de manera estable a nivel celular al igual que cada una de las moléculas descritas en estas cepas. Sin embargo se ha visto una divergencia en los resultados que

intentan relacionar estas partículas con algún fenotipo reconocible o que tratan de relacionar la presencia de estos elementos con algún sistema viral de otra levadura.

En otros géneros de levadura, se ha caracterizado la relación entre EGEs y producción de toxinas (Schmitt y Breinig, 2006). Por ejemplo, en la levadura *Kluyveromyces lactis* se ha descrito un sistema de EGEs compuesto por 2 plasmidios de dsDNA lineales de 8874 y 13447 pb de tamaño, y que contienen 4 ORFs involucrados en la producción de una toxina, la inmunidad de la misma y la producción de una DNA polimerasa capaz de replicar estos plasmidios en el citoplasma del huésped. La toxina producida está compuesta por 3 subunidades, que poseen modificaciones post-traduccionales y producen el arresto en la fase G1 del ciclo celular de las levaduras sensibles (Magliani y cols, 1997).

2. Sistema *killer* en *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 Componentes del Sistema

El sistema mejor caracterizado es el sistema *killer* presente en *S. cerevisiae*, donde se presentan según la cepa, diversos virus dsRNA capaces de producir toxinas y matar a células de la misma especie o relacionadas. Se ha definido que dos virus de dsRNA son necesarios para el funcionamiento de este sistema: un virus con un genoma de 4,6 kb denominado SCV-L que codifica para una RNA Polimerasa dependiente de RNA (Gag-Pol) y para la proteína de la cápside del virus (Gag); y otro virus dsRNA con genoma de menor tamaño (~1.6 kb, SCV-M), que codifica para la toxina en forma de pre-protóxina y para la inmunidad a la misma. Estos viriones se mantienen a nivel citoplasmático produciendo sus proteínas y ensamblando nuevas partículas. La permanencia del virus SCV-M es dependiente de la presencia del virus SCV-L y la expresión de los genes codificados en su genoma, por lo que se ha denominado como virus "Satélite". La

carencia del virus SCV-L lleva a una pérdida progresiva del virus SCV-M. En cambio, el virus SCV-L o virus "Helper", puede permanecer autónomamente pero, es incapaz de producir alguna toxina o efecto apreciable en alguna célula blanco (Wickner, 1996).

Existen al menos 3 tipos distintos de toxinas en este sistema, denominados K1, K2 y K28; cada uno de ellos codificado por su genoma dsRNA satélite respectivo (M1, M2 y M28). Además, cada uno de estos sistemas posee su propia inmunidad, cuyos mecanismos de acción aún se desconocen. En términos de estructura, los genes que codifican estas toxinas tienen una alta variabilidad, tanto entre los tres tipos de toxinas de *S. cerevisiae* como en los codificantes para las toxinas en otras especies.

2.2 Replicación Viral

Los viriones son partículas icosaédricas de un diámetro de 39 nm, que en el caso de ScV-L, cuenta con una copia del genoma L-dsRNA encapsidado en 60 dímeros de la proteína Gag y una copia de la polimerasa Gag-Pol. Para el virión ScV-M, se encapsidan hasta 2 moléculas del genoma M-dsRNA. El ciclo de replicación viral se inicia con la transcripción y posterior expulsión de la molécula (+) ssRNA por parte del virión. En el citoplasma del huésped, ésta molécula es traducida para producir las proteínas virales, y por otra parte sirve como genoma iniciador de una nueva partícula viral. Una vez encapsidada, esta última es replicada por la proteína Gag-Pol, formando un nuevo virión (Fig. 1).

La proporción de la cantidad de proteínas virales presentes en el citoplasma celular traducidas desde el genoma L-dsRNA, es regulada mediante un evento de corrimiento de marco de lectura (CML). El segundo ORF de esta molécula presenta una sobreposición de 130 nucleótidos con el primero, y sólo es traducido si el ribosoma

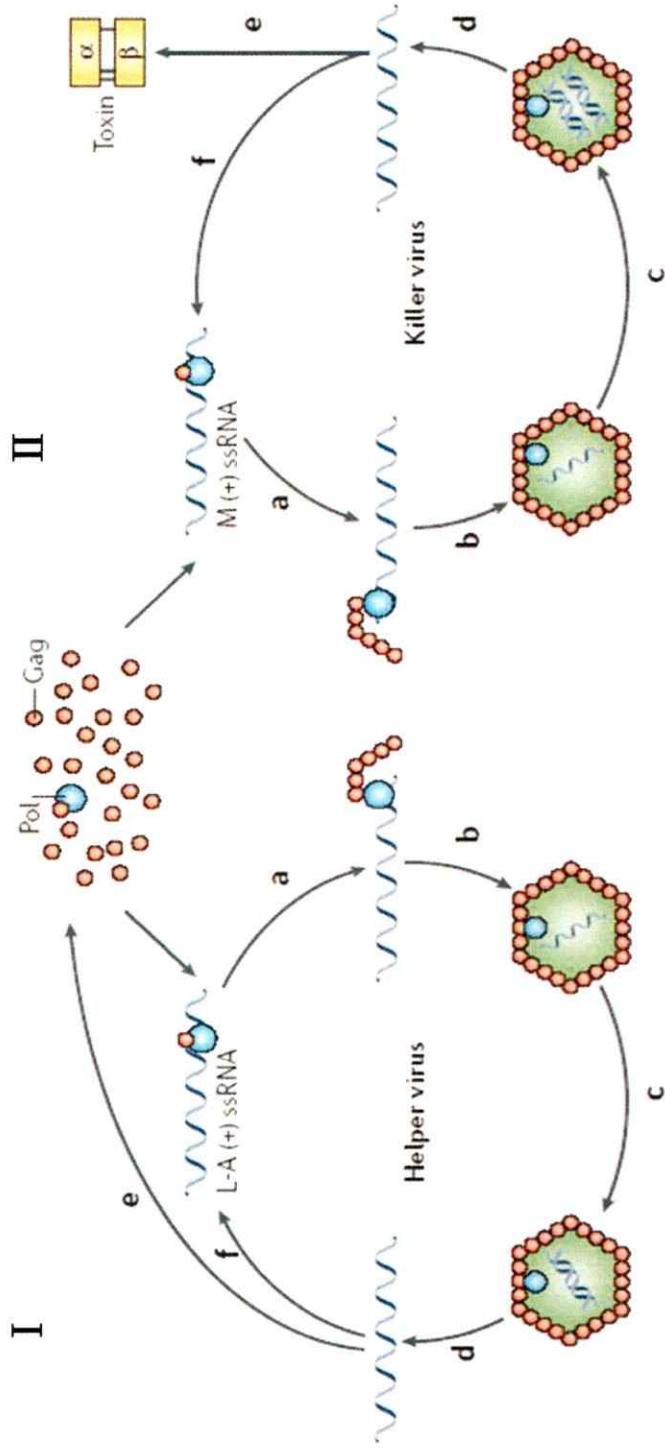


Figura 1. Ciclo replicativo del sistema *killer* en *Saccharomyces cerevisiae*. I: Ciclo del virus SCV-L, o virus Helper, donde la expulsión de la molécula (+)ssRNA de la partícula viral (d) lleva a la traducción de las proteínas Gag y Gag-Pol (e), y a la encapsidación de una nueva molécula (f, a, b). Una vez encapsidado, el genoma viral es replicado por la RNA polimerasa Gag-Pol. II. Ciclo del virus SCV-M o virus *killer*, el cual utiliza el mismo método para traducir la preprotoxina (e). En este caso, el virus es capaz de encapsidar hasta 2 moléculas de dsRNA (c). (Schmitt y Breinig, 2006).

cambia el marco de lectura tras verse dificultado de avanzar debido a la formación de una estructura secundaria (horquilla o pseudoknots) en el (+) ssRNA utilizado como mensajero. De esta forma el segundo ORF, codificante para la RNA polimerasa Pol, se traduce como una proteína de fusión Gag-Pol (Fig. 2). Con este mecanismo de control, la concentración de la proteína Gag es aproximadamente 50 veces mayor a la Gag-Pol, relación necesaria para la correcta encapsidación de los viriones (Dinman y Wickner, 1992). Un exceso de molécula Gag lleva a formación de VLP vacíos, y una carencia de la misma lleva a un mayor ensamble de VLP (proceso iniciado por la proteína de fusión Gag-Pol) y un déficit de las proteínas estructurales de la cápside para esta formación. Diversos métodos de regulación del CML logran cambiar las concentraciones e incluso eliminar moléculas de dsRNA permanentemente de la célula huésped, formando así nuevas cepas con diferencias fenotípicas respecto a las que si poseen las moléculas (Carroll y Wickner, 1995; Dinman y cols, 1997).

2.3 Producción y acción de la Toxina

Pese a que las toxinas conocidas de *S. cerevisiae* difieren tanto en composición aminoacídica como en forma de acción, ellas comparten en gran parte su síntesis y procesamiento. En el citoplasma, el ssRNA codificante de la toxina es traducido para formar la preprotoxina (pptox), la cual es sujeta a una serie de modificaciones antes de la exportación de la toxina madura. Los mecanismos de acción incluyen la formación de canales de iones en la membrana citoplasmática (toxinas K1 y K2) o el arresto del ciclo celular del huésped (K28) (Schmitt y Breinig, 2006).

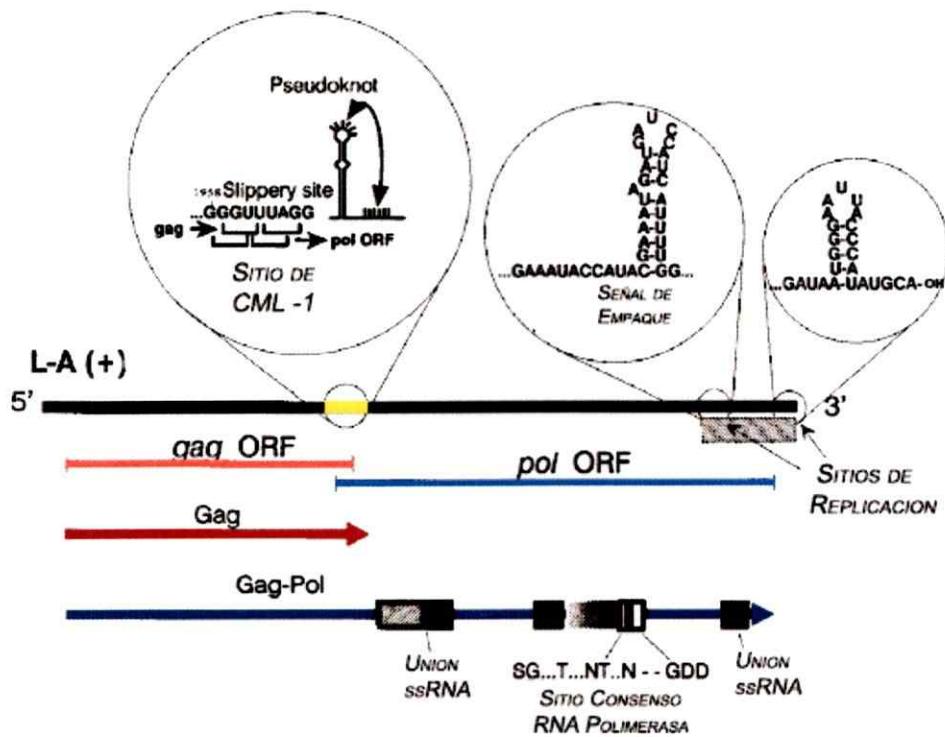


Figura 2. Corrimiento del marco de lectura en la traducción del L-dsRNA en *S. cerevisiae*. En amarillo se muestra la región de solapamiento de 130 pb, que permite el evento de CML. En rojo se presenta el ORF codificante para la proteína de la cápside, Gag; y en azul, el ORF codificante del segmento Pol de la proteína de fusión Gag-Pol (Adaptado de Wickner, 1996).

3. Aplicaciones del Sistema *Killer*.

El sistema *killer* y la presencia de las moléculas de dsRNA pueden representar una ventaja evolutiva para el microorganismo portador, tanto a nivel de competencia por un sustrato limitante frente a una cepa sensible o incluso, en la misma colonización de un nicho ecológico. Esto explica la presencia de estos virus en un amplio rango de levaduras. Así mismo, el estudio de este sistema ha permitido ampliar conocimientos relativos a la estructura celular e interacciones de las levaduras, procesamiento y modificaciones de diversas proteínas (Magliani y cols, 1997).

En términos aplicados, el sistema *killer* se ha utilizado industrialmente en diversos ámbitos. En la industria vitivinícola, la producción de toxinas por parte de las cepas fermentadoras evita su pérdida y la competencia con otras especies. La producción de péptidos antifúngicos se ha utilizado como control biológico en diversos procesos, evitando la aparición de organismos no deseados. Por otra parte, el mayor conocimiento molecular de los EGEs permitió su expresión en plantas transgénicas, lo cual les confirió nuevas resistencias a diversos patógenos ambientales. De la misma manera, se ha estudiado el sistema de cepas patógenas al humano tales como *Candida* o *Sporothrix* para contrarrestar su efecto y evitar la acción de las toxinas de estos sistemas. Finalmente, la producción de toxinas constituye un modelo de secreción heteróloga de proteínas y una forma de estudio de las modificaciones post traduccionales de las preproteínas.

4. Clonamiento de virus dsRNA.

El conocimiento en profundidad del sistema en *S. cerevisiae* se ha visto beneficiado en gran medida por el clonamiento de las moléculas de dsRNA existentes, lo que permite identificarlos a nivel de secuencia y expresarlos *in vitro*. Desde este punto de vista, el

clonamiento resulta fundamental como primer paso en el estudio de algún nuevo sistema de EGE en levaduras. Los métodos de clonamiento en dsRNA se han desarrollado esencialmente en rotavirus humanos, y se basan en gran parte en el método de la amplificación por partidador único, planteado por Lambden (1992), el cual propone el ligamiento de un partidador de DNA a los extremos de la molécula de dsRNA en estudio, proporcionando una secuencia conocida para realizar la reacción de RT-PCR. Sucesivas mejoras al método inicial consiguieron disminuir sus dificultades, dadas principalmente por la cantidad de muestra inicial y la especificidad del protocolo mismo, lo que producía un método altamente ineficiente (Vreede y cols, 1997; Potgiester y cols, 2002); sin embargo, estas mejoras no han llegado a optimizarlo mayormente, y sigue siendo técnicamente complicado, sobre todo para moléculas de tamaño superior a las 2 kb (Attoui y cols, 2000; Ambrose y Clewley, 2006).

Otra metodología utilizada es la síntesis de cDNA desde partidadores de secuencias aleatorias. Se han descrito sólo un par de trabajos aplicando este método con dsRNA (Coutts y Livieratos, 2003; Tzanetakis y cols, 2004). La base del método más reciente fue utilizar la actividad DNA-polimerasa dependiente de DNA de la transcriptasa reversa, lo que se ha podido aplicar en genomas de bajo tamaño, sin embargo no se han observado resultados en genomas de mayor tamaño.

Los métodos anteriormente nombrados consideran como paso crítico para la eficiencia del proceso, la cantidad e integridad de la muestra inicial de dsRNA. Respecto a este punto existen numerosas técnicas propuestas para la extracción del RNA viral, buscando optimizar la baja cantidad existente en las levaduras de estudio (Lopez de Heredia y Jansen, 2004; Castillo y Cifuentes, 1994). La alta diversidad de células y virus estudiados, lleva a una optimización específica para cada nuevo estudio.

La presencia de moléculas de dsRNA en *X. dendrorhous* no ha podido relacionarse con alguna función. En ninguno de los trabajos descritos se ha conocido la secuencia de estas moléculas, lo cual ha dificultado el avance del estudio en este ámbito. Finalmente no se ha determinado la relación existente entre la presencia de moléculas en cada una de las cepas y la posible agrupación existente entre los orígenes de éstas.

En la presente memoria se caracterizó diversas cepas de *X. dendrorhous* en relación a los EGEs que poseen y se analizó las moléculas de dsRNA presentes a nivel genético mediante el clonamiento de ellas y a nivel estructural mediante hibridación entre diversas moléculas.

HIPÓTESIS

Xanthophyllomyces dendrorhous posee al menos, un sistema viral compuesto por moléculas de dsRNA presentes extracromosómicamente, y el cual podría estar relacionado con el origen geográfico de cada cepa.

Objetivos

Objetivo General

Identificar y caracterizar los Elementos Genéticos Extracromosómicos del tipo dsRNA presentes en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Objetivos específicos

- Determinar de la presencia de EGEs en diversas cepas de *X. dendrorhous* y determinación de su naturaleza química.
- Estudiar la relación existente entre EGEs aislados de distintas cepas mediante técnicas de hibridación.
- Optimización de los métodos de aislamiento de dsRNA y obtención de cDNA de diversas cepas de *X. dendrorhous*.
- Clonamiento y secuenciación de moléculas de dsRNA de cepas tipo de *X. dendrorhous*. Análisis bioinformático de estas secuencias

2. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

I.1. Células

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas fueron: UCD 67-383 (ATCC 24203), UCD 67-385 (ATCC 24230), VKM Y-2059 (ATCC 96814), VKM Y-2266, VKM-Y 2786 (CBS 7918). 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 *HindIII*, y el marcador 1 kb, adquirido a New England Biolabs. Los partidores utilizados en las reacciones de transcripción reversa, PCR y secuenciación, así como los oligonucleótidos adaptadores utilizados en las moléculas de dsRNA, son indicados en la Tabla 1.

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, RNAsin, transcriptasa reversa de M-MLV, Proteínasa K, DNA polimerasa I, DNA Polimerasa I fragmento Klenow, Taq DNA Polimerasa, y las endonucleasas de restricción *EcoRV*, *BamHI*, *NotI* y *XhoI* fueron adquiridas de las empresas Promega, New England BioLabs, Sigma y Gibco-BRL.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en cada uno de los pasos especificados.

<i>Partidor</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>	<i>Función</i>
PC1	PO ₄ GGATCCCGGAATTCGG(A) ₁₇ NH ₂	Adaptador dsRNA
PC2	CCGAATTCCTCGGGATCC	Amplificación cDNA
PC3	PO ₄ GGATCCCGGAATTCGG NH ₂	Adaptador M-dsRNA
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Específicos a pBS. Secuenciación y análisis por PCR
M13 rv	AACAGCTATGACCATG	
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	
T7	AATACGACTCACTATAG	
385M-SR	TAAGCGTAGCTCTCGTACAG	Formación de la sonda del clon pBS-385M
385M-SF	AGCTGTACCGCGACAAATG	
385L-R1F	GCCATACAGTTCTCCATAAG	Reacción de RT-PCR para analizar el clon 385LR-1
385L-R1R	TAAGCGTAGCTCTCGTACAG	

I.5. Reactivos Químicos

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos puntuales, 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 el marcaje de ácidos nucleicos se utilizó el Kit Random Primers DNA Labeling System, de Gibco-BRL.

II. Métodos

II.1. Condiciones de Cultivo.

Cultivos en medio completo.

X. dendrorhous. Se utilizó el medio YM que contiene 2% P/V de Glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.3% de extracto de malta y 0.5% de Peptona. En forma sólida se utilizó 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 les agregó 1.5% de Bacto-Agar. Para el reconocimiento de transformantes, al medio LB-agar, se le agregó 100 ug/ml de ampicilina y 75 ug/ml de X-Gal (Placas LB-amp-X Gal)

Cultivos en medio Mínimo.

Para medir el crecimiento de *X. dendrorhous* en distintas condiciones, se utilizó el medio MMv, el cual contiene 2% de glucosa suplementado con los requerimientos mínimos de crecimiento (Vogel, 1956).

Cultivos en Fermentador.

Para obtener un cultivo con una alta masa celular, se realizó una fermentación de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Para ello se creció en un fermentador New Brunswick Scientific de 15 l, con medio YM. 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

Purificación de Ácidos nucleicos totales de *X. dendrorhous*.

Los ácidos nucleicos se obtuvieron a partir de cultivos líquidos de 100 ml crecidos a 22°C hasta la fase exponencial tardía. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 8000 x g durante 7 min en una centrífuga Sorvall RC-5B. Las células se lavaron 2 veces con buffer TE (10 mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH 8.0) para luego resuspender en 3 ml de buffer TE y romper mediante microesferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y un volumen de fenol (pH 8.0):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex durante 3 min y se centrifugó a 10000 x 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). Los ácidos nucleicos se precipitaron con 3 volúmenes de etanol

absoluto a -20°C durante toda la noche, tras lo cual se centrifugó a 15000 x g durante 15 min y se resuspendió en buffer TE.

Purificación de dsRNA de *X. dendrorhous*.

Para obtener las moléculas de dsRNA se estandarizaron y compararon 4 métodos.

Método A: Microesferas de Vidrio.

Se crecieron cultivos de 200 ml a 22°C hasta la fase estacionaria. Las células se colectaron, se lavaron 2 veces con buffer TE y se resuspendieron en 3 ml de buffer TE. La ruptura se realizó con microesferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y un volumen de fenol a pH 4.0, y se agitó en vortex durante 30 min para luego centrifugar a 10000 x 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 cualquier residuo fenólico presente. 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 x g durante 20 min y se resuspendió en 500 µl de H₂O-DEPC.

Método B: Protoplastos.

Las células colectadas de un cultivo de 200 ml se lavaron y posteriormente se trataron con 200 µg de Proteinasa K durante 2 h a 37 °C, para romper la pared celular y formar protoplastos. Tras esto, se continuó con el protocolo anterior de ruptura física mediante microesferas de vidrio.

Método C: Ruptura Química

Cultivos de 200 ml crecidos a 22°C hasta la fase estacionaria se colectaron y lavaron 2 veces con 5 mM EDTA, pH 7.0. Las células se incubaron en buffer A (0.05 mM Tris-H₂SO₄ y 2.5% de β-mercaptoetanol) durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual

se precipitó y se resuspendió con el buffer B (0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 0.01M EDTA y 0.2% SDS) junto con un volumen de fenol pH 4.0. Posterior a la agitación vigorosa en vortex y centrifugación a 10000 x g durante 10 min, la fase acuosa se traspasó a un tubo limpio donde se realizó una extracción fenólica adicional y luego una extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). 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 x g durante 20 min y se resuspendió en 500 µl de H₂O-DEPC.

Método D: Mortero. Se crecieron cultivos de 200 ml a 22°C hasta la fase estacionaria. Las células fueron colectadas, se lavaron 2 veces con buffer TE y se resuspendieron en 3 ml de buffer TE. A continuación se congelaron con nitrógeno líquido y las células se lisaron con un mortero de teflón durante 10 min. Esta pasta se mantuvo a temperatura ambiente y se le agregó un volumen de fenol a pH 4.0 para luego agitar mediante vortex y centrifugar a 10000 x g durante 10 min. La fase acuosa se traspasó a un tubo limpio donde se realizó una extracción fenólica adicional y posteriormente otra extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para eliminar cualquier residuo fenólico presente. 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 x g durante 20 min y se resuspendió en 500 µl de H₂O-DEPC.

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.

Purificación de ácidos nucleicos desde geles de agarosa.

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 eppendorff al cual se le agregaron 500 μ l de 6M KI y se incubó durante 10 min a 55°C para disolver la agarosa. Se agregaron 10 μ l 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 x g por 1 min con lo cual se eliminó la agarosa disuelta. 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) y se resuspendió en 10 μ l de H₂O estéril (H₂O-DEPC para el caso de los dsRNA) y se incubó a 55°C por 10 min. El sobrenadante obtenido de una centrifugación final a 10000 x g por 2 min se transfirió a un tubo eppendorf limpio y el ácido nucleico se analizó y cuantificó en un gel de agarosa. Este método se utilizó tanto para purificar un fragmento de DNA de interés como para obtener moléculas individuales de dsRNA separadas del resto del RNA.

Electroforesis de ácidos nucleicos.

A las moléculas purificadas se les agregó el buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 15% ficoll, 30% glicerol), y se corrieron en geles de agarosa al 1% que contenían 0.5 μ g/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).

Concentración de muestras de dsRNA.

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

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.

Digestión con RNasa H.

Se ocupó 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.

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.

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 ocupó 1 U de enzima por µg de ácidos nucleicos.

Digestión con Endonucleasas de Restricción

Las enzimas *EcoRV*, *NotI*, *BamHI* y *XhoI* 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 μ l a 37°C durante 2 h.

II.6. Formación del plasmidio pBS-T

Se construyó un nuevo plasmidio, pBS-T, creado a partir del vector pBS para facilitar el clonamiento. El vector pBS se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* para formar un corte con extremos romo, tras lo cual se incubó con 1U de Taq Polimerasa y los nucleótidos dTTP durante 20 min a 72°C, formando un extremo 3' con un nucleótido extra de timina y permitiendo el fácil alineamiento de los productos de PCR formados con la Taq DNA polimerasa, enzima que crea productos de amplificación con un nucleótido adenina extra al final de la molécula. La reacción formada se analizó en un gel de agarosa al 1% y se purificó el fragmento correspondiente a la molécula lineal mediante GeneClean. Este producto fue ligado utilizando la T4 DNA ligasa a 16°C por 16 horas, para luego verificar nuevamente el producto en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, se purificó el fragmento lineal, incapaz de recircularizar a causa del nucleótido extra agregado.

II.7. Hibridaciones

Preparación de las membranas

El RNA total de las cepas UCD 67-383, UCD 67-385 y VKM Y-2266 de *X. dendrorhous* (1-2 µg de RNA total) se desnaturalizó en presencia de DMSO 18% a 95°C durante 5 min antes de enfriar en hielo. Estas moléculas fueron separadas en un gel de agarosa al 1% y posteriormente fotografiadas. La transferencia de las moléculas se realizó a una membrana de nylon Biodyne B (Pall) con buffer de transferencia SSC 10X (1.5 M NaCl, 0.15 M citrato de sodio, pH 7.0) durante 16 h tras las cuales el RNA fue fijado a 80°C durante 15 min.

Preparación de las sondas

Sonda de RNA

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 desnaturizando estas moléculas durante 5 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. Una vez completada la reacción, las sondas se purificaron en columnas de Sephadex G-50.

Sonda de DNA

Se desnaturizaron 100 ng de DNA plasmidial a 94°C durante 5 min. A este tubo se le agregó el mix de reacción que incluía la enzima DNA Polimerasa I fragmento Klenow, hexanucleótidos de secuencia aleatoria y una mezcla de nucleótidos con P³²-dCTP. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 1 h, tras lo cual las sondas se purificaron mediante columnas de Sephadex G-50.

Hibridación

La membrana se incubó en un tubo de hibridación a 65°C por 5 min con 10 ml de buffer 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. Transcurrido este tiempo, 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.8. Clonamiento de moléculas de dsRNA

Método de la amplificación por partidor único (SPAT)

Preparación del producto inicial

A cada molécula de dsRNA se le ligó en el extremo 3'OH el oligonucleótido PC1 o el PC3 con la enzima T4 RNA ligasa durante 16 h a 16°C, tras lo cual se purificaron mediante GeneClean. El cDNA fue formado posterior a la denaturación de estas moléculas de dsRNA a 94°C durante 5 min y enfriado inmediatamente en hielo para evitar la renaturación.

Formación de la primera hebra de cDNA

Para la reacción de RT se utilizaron 200U de transcriptasa reversa de M-MuLV y partidores oligo dT o PC2, complementario a PC1. La molécula de ssRNA se hibridó con los partidores específicos a 37°C durante 5 min previo a la adición de la enzima. La polimerización se realizó en un volumen final de 20 µL los cuales incluían 2 µl de DMSO, 2µl de Buffer RT 10X, 10U de RNAsin y 1 µl de mezcla de dNTP (25mM de cada nucleótido). La polimerización se llevó a cabo a 42°C durante 90 min tras los cuales la enzima se denaturó a 80°C por 5 min.

Formación de la segunda hebra de cDNA

Formación por alineamiento de hebras complementarias

Las hebras de cDNA complementarias se hibridaron a 65°C durante 3 h, posterior a la desnaturalización a 80°C durante 5 min. Las moléculas de RNA restantes en la muestra se degradaron por tratamiento con 5µl de NaOH 1M durante la primera hora de incubación a 65°C. Seguido a esto, se neutralizó agregando 5µl de HCl 1M y de Tris-HCl pH 7.5. Para completar la molécula de dsDNA, los extremos fueron rellenados con DNA polimerasa I Fragmento Klenow (30 min a 37°C).

Formación por degradación enzimática

Una vez concluida la reacción de transcripción reversa, se agregó al tubo de reacción 4 U de RNasa H, y se incubó a 37°C durante 90 min, lo cual eliminó el RNA unido a las moléculas de cDNA recién formadas. De esta forma se utilizó la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA de la enzima transcriptasa reversa para producir la segunda hebra de DNA. Las moléculas de dsDNA se completaron con DNA polimerasa I fragmento Klenow por 30 min a 37°C.

Amplificación de los cDNA

El cDNA se amplificó por PCR con Taq DNA polimerasa y los partidores PC2 o el partidador oligo dT. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 2400 mediante el protocolo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, alineación de los partidores a 60°C por 30 s y elongación a 72 °C por 4 min, para finalmente elongar por 10 min a 72°C. Este producto se analizó en geles de agarosa al 1% y se purificaron mediante el Kit de Limpieza de Productos de PCR (Promega).

Método de Partidores Aleatorios

Formación de la primera hebra de cDNA

Se utilizaron 500 ng de dsRNA purificado como producto inicial. Estas moléculas se desnaturalizaron a 94°C durante 5 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.

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 mediante la actividad de la misma Transcriptasa

reversa (Tzanetakis et al, 2004) o rellenando con 1U de la DNA polimerasa I (Sambrook et al, 1989).

Purificación de los productos

Una vez obtenidas las moléculas de doble hebra de DNA, la mezcla de reacción se purificó utilizando el kit de limpieza de producto de PCR y se resuspendió en un volumen final de 10 μ l. Estos se ligaron posteriormente al vector de clonamiento para su transformación directa.

Clonamiento y secuenciación de los cDNA

El DNA obtenido por ambos métodos se ligó al vector pBS-T mediante la enzima T4 DNA ligasa durante 16 h a 16°C. Este ligado se dializó con membranas de nitrocelulosa (Milipore) y se transformó en la cepa electrocompetente de *E. coli* DH5 α .

II.9. Transformación mediante electroporación

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 x 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 x g por 10 min a 4°C cada vez. Las células se resuspendieron en 500 μ l de glicerol al 10 % estéril frío y se alicuotaron 40 μ l en tubos Eppendorf, para luego guardarlas a -80°C.

Electroporación

Cada tubo de células electrocompetentes se descongeló para agregarles entre 5 y 10 μ l de DNA a transformar. La mezcla se agregó a 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. Posterior a esto, se sembraron 100 µl de células en placas con medio LB-Amp-XGal y se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias. Los transformantes positivos se reconocieron por la incapacidad de degradar el sustrato X-Gal debido a la interrupción del gen *lacZ* del plasmidio pBS. Así, se aislaron las colonias de color blanco que poseían esta interrupción.

II.10. 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). Estas secuencias se analizaron mediante los programas CGC, Vector NTI Suite 9 y la herramienta de búsqueda de alineamientos BLAST.

3. RESULTADOS

1. Detección de los elementos genéticos extracromosómicos

Con el fin de determinar cuales cepas de *X. dendrorhous* contenían elementos genéticos extracromosómicos (EGEs), se aislaron los ácidos nucleicos totales de las cepas UCD 67-383, UCD 67-385, VKM Y-2059, VKM Y-2266 y VKM-Y 2786. Al analizar los resultados por electroforesis, se observaron diferencias en el número de EGEs presentes en cada una de las cepas (Fig. 3). En las 2 primeras cepas analizadas, se observó la banda de alto peso molecular correspondiente al DNA genómico y además 2 bandas de tamaño estimado en 4,6 (Large), 3,2 (Medium), y 2 bandas de menor concentración, con tamaños de 0,8 (Small 1) y 0,6 kb (Small 2). Para el caso de las 3 siguientes cepas (cepas VKM-Y) se observa aparte del DNA cromosómico, solamente 1 banda de 4,6 kb.

2. Análisis enzimático de los elementos genéticos extracromosómicos

Para determinar la naturaleza química de los EGEs presentes en *X. dendrorhous* y poder diferenciarlos entre DNA de doble (dsDNA) o simple hebra (ssDNA) o RNA de doble (dsRNA) o simple hebra (ssRNA), estas moléculas se sometieron a una serie de análisis enzimáticos. Se incubaron los ácidos nucleicos totales de las cepas UCD 67-383, UCD 67-385, VKM Y-2059, VKM Y-2266 y VKM-Y 2786 con 1U de DNAsa I. Se observó la degradación de la banda de alto peso molecular correspondiente al DNA genómico en cada una de las cepas, pero la resistencia a la acción de esta enzima por 4 moléculas en las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 (Fig. 4 carril 1 y 2) y de una molécula en las cepas VKM Y-2059, VKM Y-2266 y VKM-Y 2786 (Carriles 3, 4 y 5), lo cual nos sugiere que estos elementos no corresponden a moléculas de DNA.

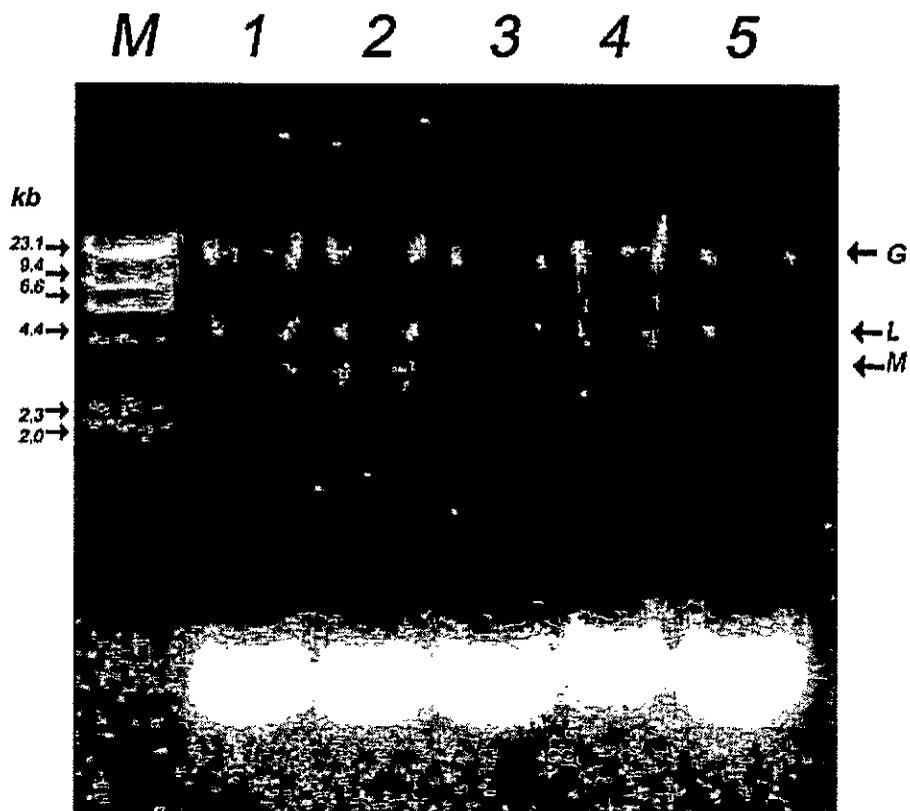


Figura 3. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales de diversas cepas de *X. dendrorhous*. Carril 1: UCD 67-383; carril 2: UCD 67-385; carril 3: VKM-Y 2059; carril 4: VKM-Y 2266; carril 5: VKM-Y 2786. G indica el DNA genómico; L, la molécula L-dsRNA y M, la molécula M-dsRNA. El primer carril M corresponde al marcador de peso molecular λ /*Hind*III.

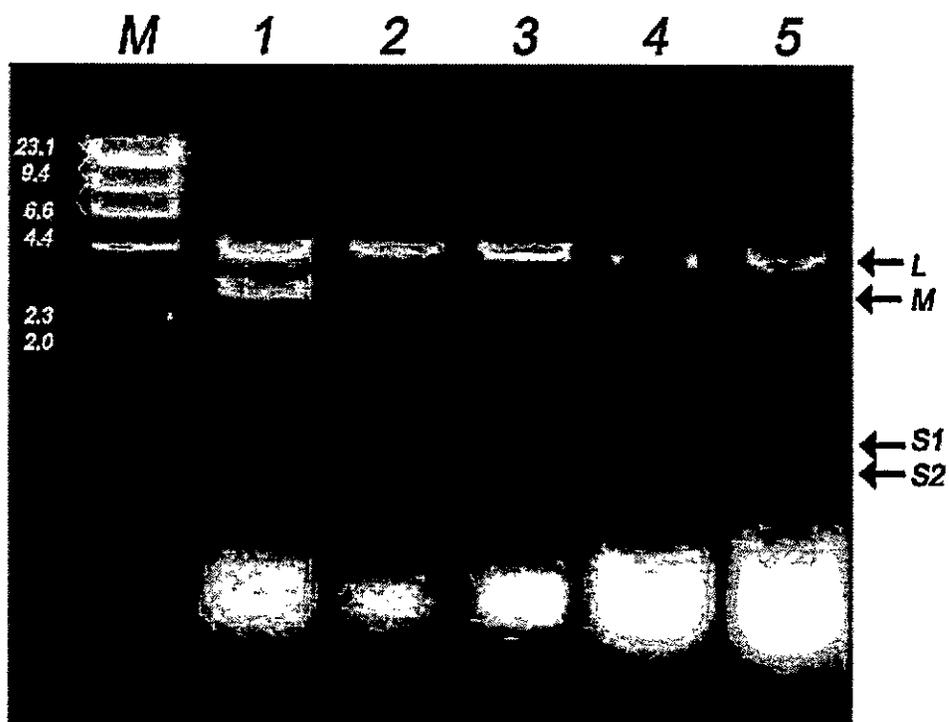


Figura 4. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con DNasa A.

Se muestra el patrón de digestión de las cepas UCD 67-385 (Carril 1), UCD 67-383 (Carril 2), VKMY-2059 (Carril 3), VKMY-2266 (Carril 4) y VKMY-2786 (Carril 5). Carril M corresponde al marcador de peso molecular λ Hind III. Las flechas de la derecha muestran la ubicación de las moléculas L-dsRNA (L), M-dsRNA (M), S1-dsRNA (S1) y S2-dsRNA (S2).

Para observar si éstas corresponden a moléculas de RNA o híbridos DNA-RNA, se trataron con la enzima RNasa H (Fig. 5). En este caso, todas las moléculas son resistentes a la acción de esta enzima, lo cual nos indicó que no hay presentes híbridos DNA-RNA en los EGE de *X. dendrorhous*. Finalmente, para determinar si las moléculas extracromosómicas corresponden a ssRNA o dsRNA, se realizaron 2 ensayos: la incubación de las moléculas con la enzima Nucleasa S1 no produce cambios en el patrón observado anteriormente, exceptuando una degradación de las moléculas de bajo peso molecular al final de cada carril, correspondientes a mRNA degradados o tRNA (Fig. 6). Paralelamente, la incubación con la enzima RNasa A presenta un cambio en el patrón según la fuerza iónica. La degradación de los 4 EGEs de las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 y del único EGE de las cepas VKM Y-2059, VKM Y-2266 y VKM-Y 2786 se observó solo bajo la acción de la RNasa A en un medio con baja fuerza iónica (Fig. 7A). A una alta fuerza iónica se mantienen los EGEs (Fig. 7B).

Estos resultados señalan que los 4 EGEs presentes en las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 y el EGE presente en las cepas VKM Y-2059, VKM Y-2266 y VKM-Y 2786 corresponden a RNA de doble hebra y no presentan regiones híbridas de DNA-RNA ni tampoco zonas con RNA de hebra simple.

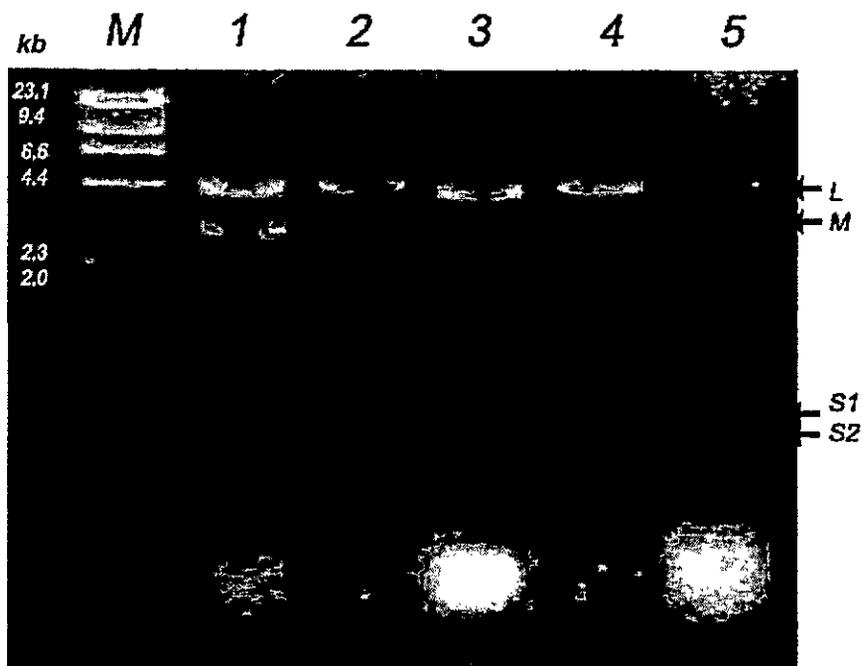


Figura 5. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con RNasa H.

Se muestra el patrón de digestión de las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas. Se utilizó las mismas abreviaturas de la figura 4.

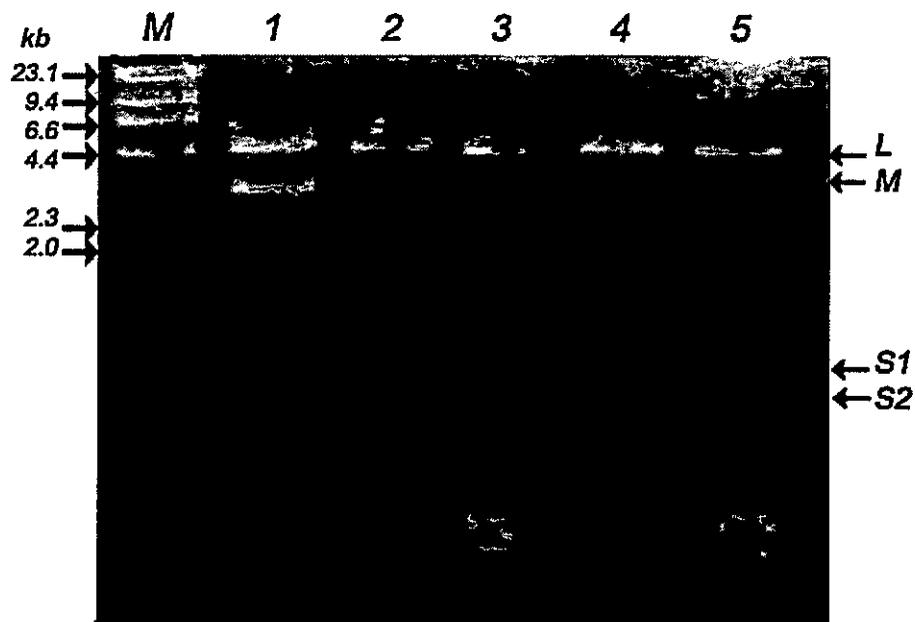


Figura 6. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con Nucleasa S1.

Se muestra el patrón de digestión de las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas. Se utilizó las mismas abreviaturas de la figura 4.

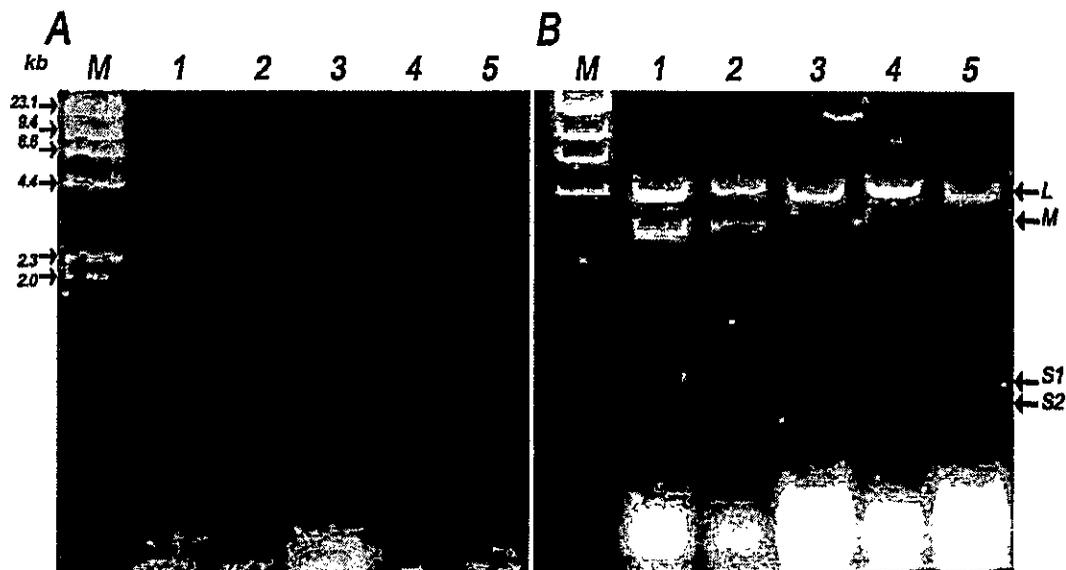


Figura 7. Electroforesis de los ácidos nucleicos totales digeridos con RNasa A.

A: Digestión con RNasa a baja fuerza iónica (0.01x SSC). B: Digestión con RNasa en alta fuerza iónica (2xSSC). Se utilizó las mismas abreviaturas de la figura 4.

Para obtener un valor más preciso respecto del tamaño de las bandas de mayor tamaño, las moléculas L-dsRNA y M-dsRNA de la cepa UCS 67-385, y L-dsRNA de la cepa VKM-Y 2786 se purificaron individualmente y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Fig. 8). A esta concentración las moléculas de DNA y RNA poseen una movilidad electroforética equivalente (Gast y Sanger, 1994). De esta forma se determinó un tamaño de 4,8 kb para la molécula L-dsRNA y de 3,4 kb para la molécula M-dsRNA, mediante comparación con los estándares de peso molecular de dsDNA. Estos valores levemente mayores a los tamaños estimados inicialmente en geles de agarosa al 1%.

Finalmente, para analizar más profundamente las moléculas de menor tamaño (S_1 y S_2) y descartar que correspondiesen a las moléculas de rRNA que suelen migrar a esa altura (0,8 y 0,6 kb), la muestra total de los ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-385 se analizó en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificaron exclusivamente estas moléculas, a las cuales se les sometió a tratamiento con nucleasa S1 (Fig. 9). Estas pruebas indicaron que las moléculas son resistentes a la acción de esta enzima, lo cual demuestra que corresponden a dsRNA tal como las 2 moléculas de mayor tamaño.

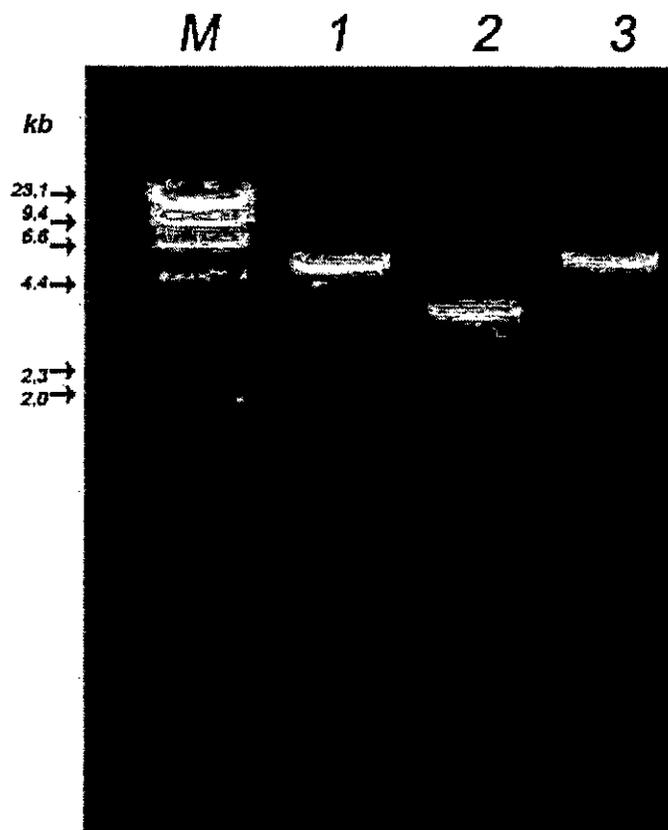


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran las moléculas L-dsRNA (1) y M-dsRNA (2) de la cepa UCD 67-385 y la molécula L-dsRNA de la cepa VKM-Y 2786 (3). M muestra el marcador de peso molecular λ / *Hind*III.

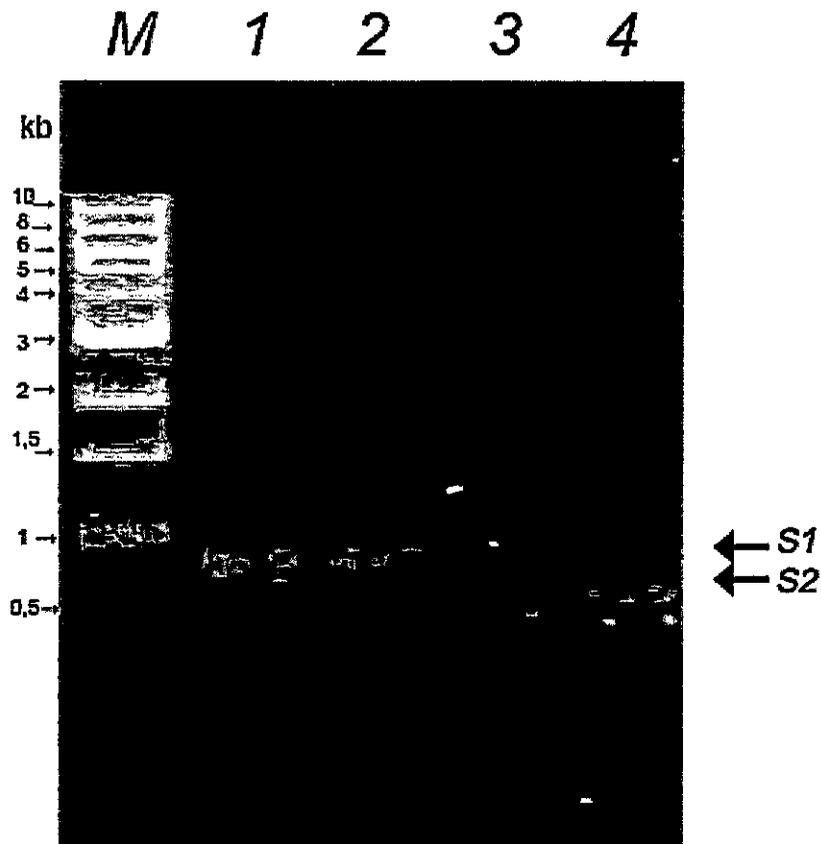


Figura 9. Electroforesis de las moléculas dsRNA-S de la cepa UCD 67-385. Las moléculas dsRNA-S1 (Carriles 1 y 2) y dsRNA-S2 (Carriles 3 y 4) fueron tratadas con Nucleasa S1 (Carriles 1 y 3). Los controles sin enzima (Carriles 2 y 4) presentan la misma concentración. El Carril M corresponde al marcador de peso molecular 1kb.

3. Optimización de los métodos de extracción

3.1 Análisis de la extracción de RNA por distintas metodologías.

Con la finalidad de estandarizar un método para la extracción de las moléculas de dsRNA desde células de *X. dendrorhous* se crecieron cultivos de la cepa UCD 67-385 y se extrajeron las moléculas de dsRNA mediante 4 métodos: microesferas de vidrio, formación de protoplastos, ruptura física de la pared por medio de mortero, y ruptura química utilizando β -mercaptoetanol y SDS. Las moléculas obtenidas de cada extracción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se observó diferencias en términos de la concentración en cada una de ellas (Fig. 10). Las microesferas de vidrio se utilizaron como método de ruptura tanto en células intactas como en protoplastos. En estas 2 extracciones no se aprecia mayor diferencia en concentración e integridad de los dsRNA, siendo ambos métodos más eficientes que los otros. Al considerar que la única diferencia entre ambos métodos es la incubación con Proteinasa K, el tiempo y los pasos extras involucrados, podemos decir que en nuestras condiciones, este paso no significa un aporte en el aumento de la concentración de las moléculas de dsRNA. La extracción utilizando mortero exhibe un bajo rendimiento explicado posiblemente por la ruptura de la pared de solo un porcentaje menor del total de las células colectadas. La utilización de una solución de β -mercaptoetanol, seguida de SDS y fenol logró la ruptura de la pared celular sin la utilización de las perlas de vidrio, pero con una eficiencia mucho menor. Además es posible apreciar la aparición de moléculas de mayor tamaño, correspondientes a DNA genómico causado posiblemente por un aumento del pH de la reacción al utilizar soluciones con componentes básicos.

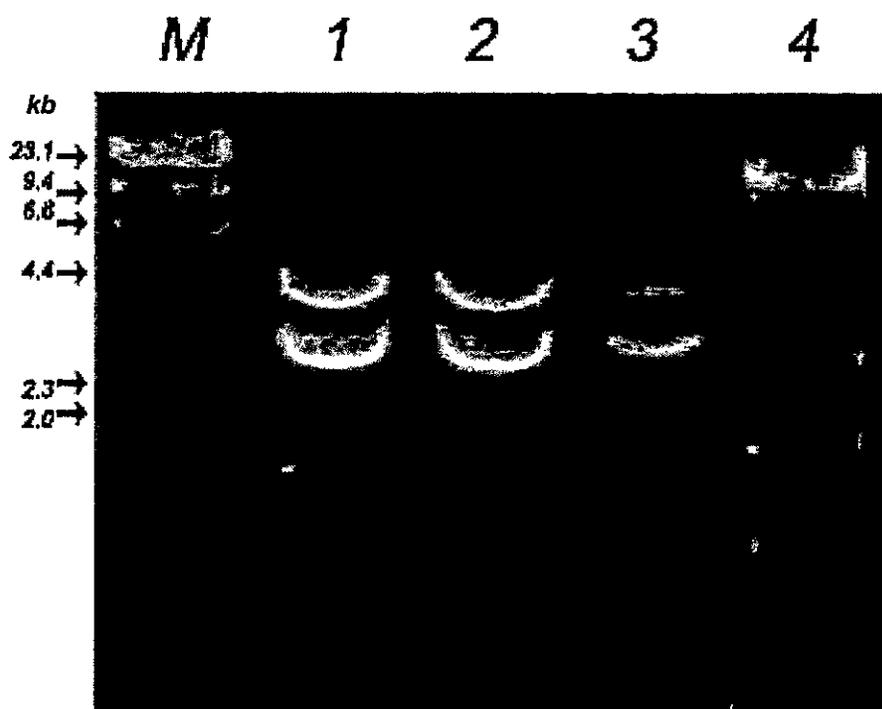


Figura 10. Electroforesis de las muestras de dsRNA extraídas por los distintos métodos. Se muestran las purificaciones de dsRNA mediante las técnicas de microesferas de vidrio (1), protoplastos (2), mortero (3) y ruptura química (4). M indica el marcador de peso molecular λ /*Hind*III.

3.2 Optimización del tiempo de ruptura celular.

Los métodos de extracción estudiados se realizaron originalmente en *S. cerevisiae*, organismo con una pared celular de menor dureza que la presente en *X. dendrorhous*. Por este motivo, es probable observar una mayor dificultad al aplicar los métodos anteriormente nombrados y una diferencia en los parámetros utilizados en la ruptura de la pared. Para determinar el tiempo óptimo de ruptura celular por medio de microesferas de vidrio, se realizaron extracciones de RNA con diferentes tiempos, tomando como referencia el protocolo que utiliza 2 minutos de ruptura para *X.dendrorhous* (Castillo y Cifuentes, 1994). A partir de un cultivo de la cepa UCD 67-385 se separaron 6 alícuotas las cuales se procesaron independientemente variando el tiempo de agitación con las microesferas de vidrio. Se realizaron extracciones con 0, 3, 10, 20, 40 y 60 min de agitación, manteniéndose a -20°C una vez terminada la ruptura, para luego tratarlas de manera uniforme para el resto del protocolo. La Figura 11A muestra un aumento progresivo de la concentración de las moléculas de dsRNA a partir de los 3 min de agitación. Sin embargo en los 2 últimos tiempos se observó además una mayor concentración de ácidos nucleicos de bajo peso molecular, lo que podría indicar la presencia de moléculas de mayor tamaño degradadas o, una mayor cantidad de otras moléculas de RNA, principalmente tRNA. La concentración de la molécula L-dsRNA obtenida para cada punto fue cuantificada y se graficó en función al tiempo de agitación. (Fig. 11B). Se observó que se alcanza una mayor eficiencia en la extracción aproximadamente a los 40 minutos de agitación con las microesferas de vidrio, considerando que el aumento de concentración visto en el último punto no es de gran magnitud para el tiempo extra empleado.

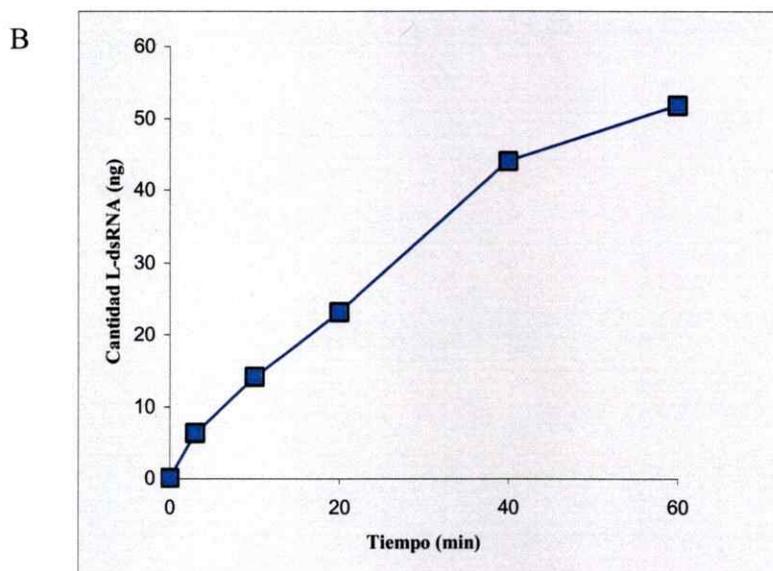
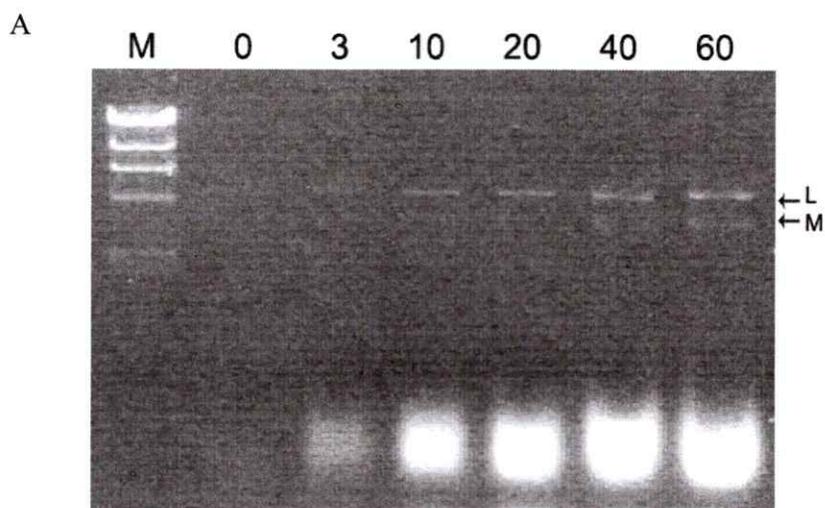


Figura 11. Relación entre el tiempo de agitación y la cantidad de dsRNA purificado de la cepa UCD 67-385. A) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de dsRNA purificadas con tiempos de ruptura variables mediante microesferas de vidrio. Se midieron las extracciones con los tiempos indicados en la parte superior. El DNA del fago λ digerido con *Hind*III (M) se utilizó como estándar de peso molecular. B) Relación entre el tiempo de ruptura utilizado y la concentración de la molécula L-dsRNA, cuantificado en comparación al estándar de peso molecular (M) mediante el software ImageJ.

4. Determinación del polimorfismo viral mediante hibridaciones.

Para relacionar estructuralmente los genomas de los virus presentes en las diversas cepas de *X. dendrorhous*, se realizaron una serie de hibridaciones. Con estos experimentos se buscó establecer semejanzas estructurales entre los dsRNA de una misma cepa, entre cepas de origen geográfico común y finalmente relacionar dsRNA presentes en cepas de origen geográfico distinto. A partir del RNA total de la cepa UCD 67-385 (Fig. 12), se purificaron las moléculas L-dsRNA y M-dsRNA para producir sondas radioactivas que se utilizaron para hibridar con los ácidos nucleicos totales de las cepas UCD 67-385, UCD 67-383 y VKMY-2786 (Fig 12B). La hibridación con el RNA de la cepa UCD 67-385 se utilizó como control positivo para validar así la utilidad del método planteado. La hibridación con los ácidos nucleicos totales de la cepa UCD 67-383 buscó establecer alguna relación estructural entre los dsRNA presentes en cepas provenientes del mismo origen geográfico. Finalmente con la hibridación entre las cepas UCD 67-385 y VKMY-2786 se intentó relacionar las cepas con un origen geográfico distinto.

La sonda de la molécula M-dsRNA presenta una señal de hibridación con la muestra que proviene de la misma cepa a la altura de la molécula M-dsRNA (Fig. 12B-2) lo cual avala la técnica utilizada. Se presenta una hibridación no específica entre las 3 y 1 kb, explicado principalmente por una posible degradación de M-dsRNA en el momento de la preparación del filtro, uniéndose así la sonda con fragmentos que incluyen solo una parte de la molécula M-dsRNA.

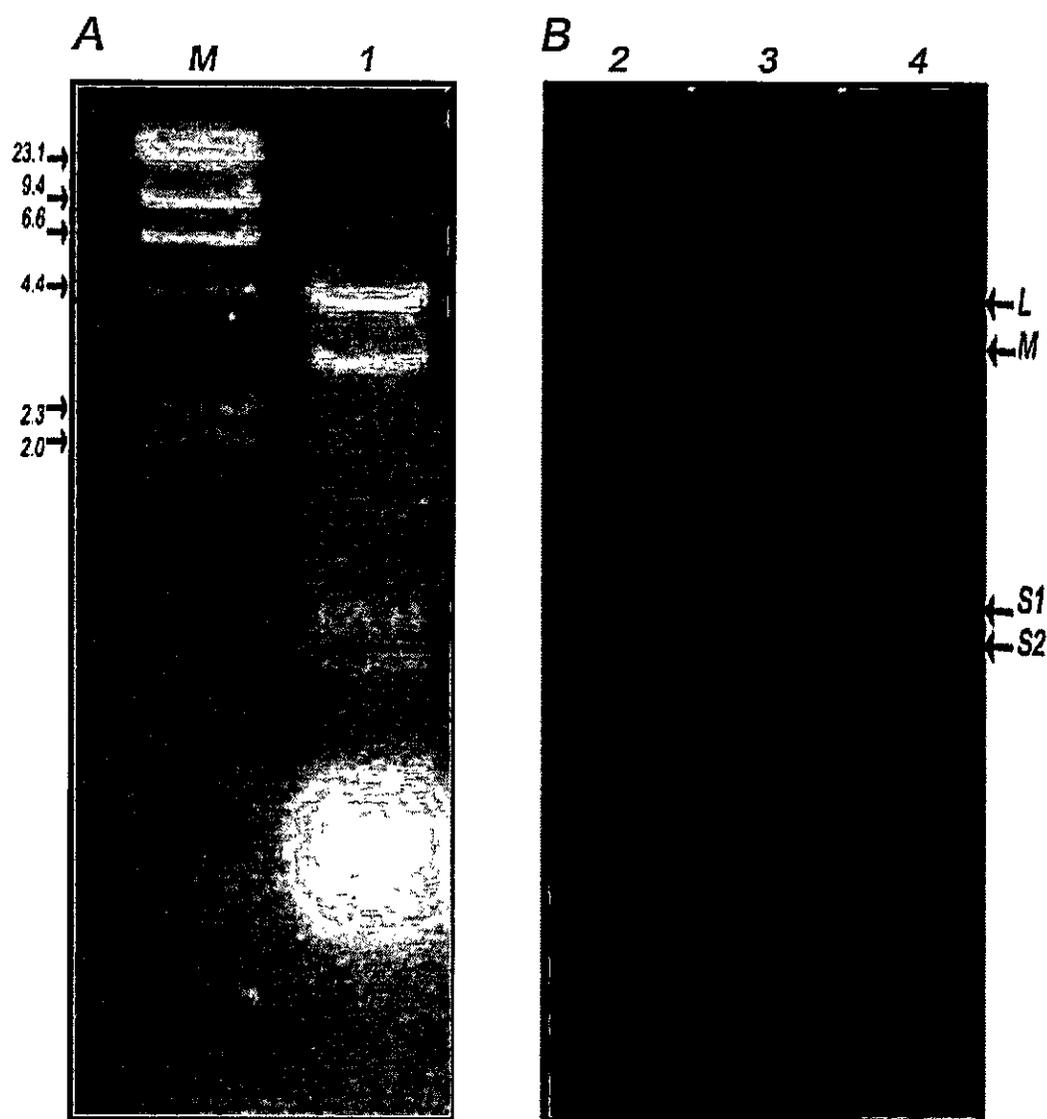


Figura 12. Hibridación de las sondas de la cepa UCD 65-385 de *X. dendrorhous* con el RNA de otras cepas. A) Electroforesis en gel de agarosa utilizado como referencia. M: DNA de λ Hind III utilizado como estándar molecular. Carril 1: RNA total de la cepa UCD 67-385. B) Autorradiografía de la hibridación de la sonda M-dsRNA de UCD 67-385 con el RNA total de la misma cepa (2), con el RNA de la cepa UCD 67-383 (3) y de la sonda L-dsRNA de UCD 67-385 con el RNA total de la cepa VKMY-2786 (4).

La hibridación entre la sonda de la molécula M-dsRNA de la cepa UCD 67-385 con el RNA de la cepa UCD 67-383 (ambas de origen japonés) muestra una señal a la altura de M-dsRNA, lo cual indica que estas 2 cepas presentarían estructuras virales similares, al menos para una parte de las partículas presentes en estas cepas (Fig. 12B-3). Tal como en el caso anterior, no se observó identidad entre las moléculas M-dsRNA de UCD 67-385 y L-dsRNA de UCD 67-383, indicando la existencia de 2 virus estructuralmente distintos.

Finalmente, la hibridación entre la sonda L-dsRNA de la cepa de origen japonés UCD 67-385 y el RNA de la cepa de origen ruso VKMY-2786 (Fig. 12B-4), no presenta ninguna señal a la altura de los 4,8 kb. Por lo tanto, la molécula L-dsRNA, única con un tamaño similar entre los 2 grupos de cepas, no tendría similitud estructural en estas cepas.

5. Clonamiento de las moléculas de dsRNA

5.1 Amplificación con el partidador único

Para lograr identificar a nivel de secuencia los genomas virales presentes en *X. dendrorhous* se planteó clonar estas moléculas en vectores para su posterior secuenciación. Considerando la inexistencia de alguna región de secuencia conocida para estos genomas, y la imposibilidad de tratar estas moléculas con algún sistema de clonamiento de RNA de hebra simple, los intentos se basaron en el método de la amplificación por un partidador único (Fig. 13). El método incluye una serie de pasos que fueron secuencialmente analizados para confirmar la concentración e integridad del dsRNA utilizado (Fig. 14).

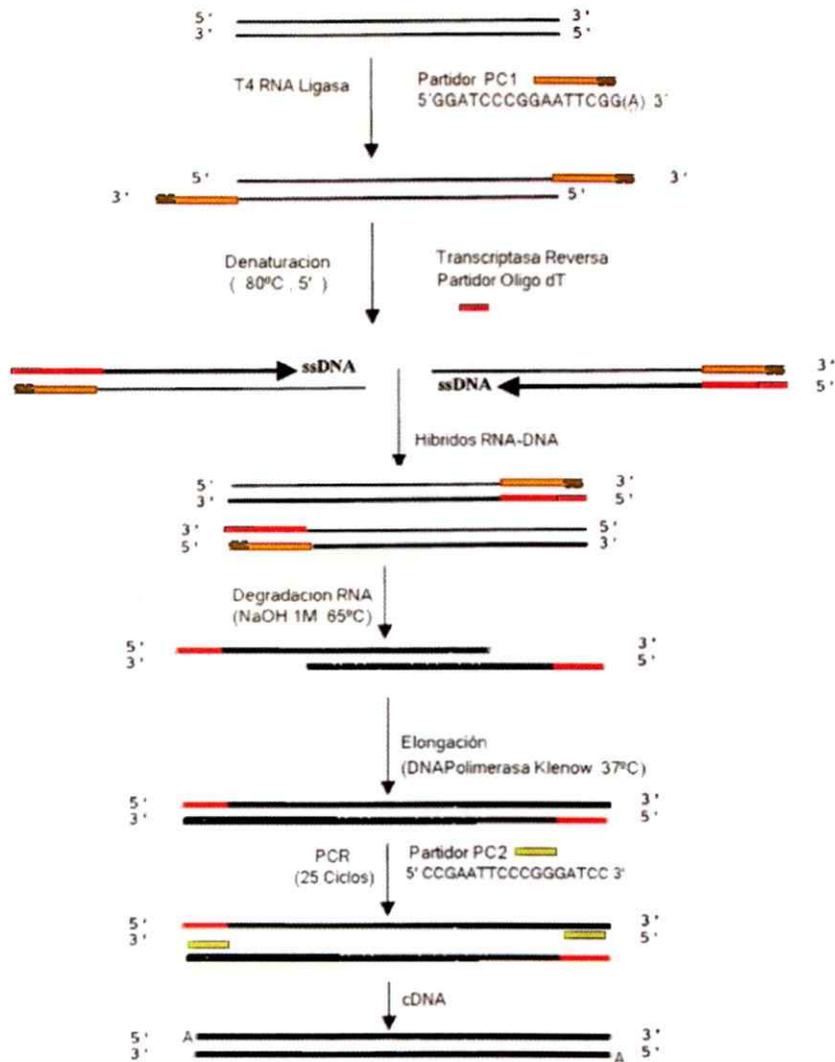


Figura 13. Técnica de la amplificación por partidores únicos (SPAT)

A la molécula inicial de dsRNA se le agrega un adaptador, y luego es desnaturada térmicamente, previo a la formación de la primera hebra de cDNA. Tras la degradación del RNA y el alineamiento de las hebras complementarias, las moléculas de dsDNA son reparadas por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa o la Taq Polimerasa. La amplificación de este producto mediante un partidor específico al adaptador, produce un alto número de copias del molde original, el cual puede ser posteriormente clonado y secuenciado (Adaptado de Lambden, 1991).

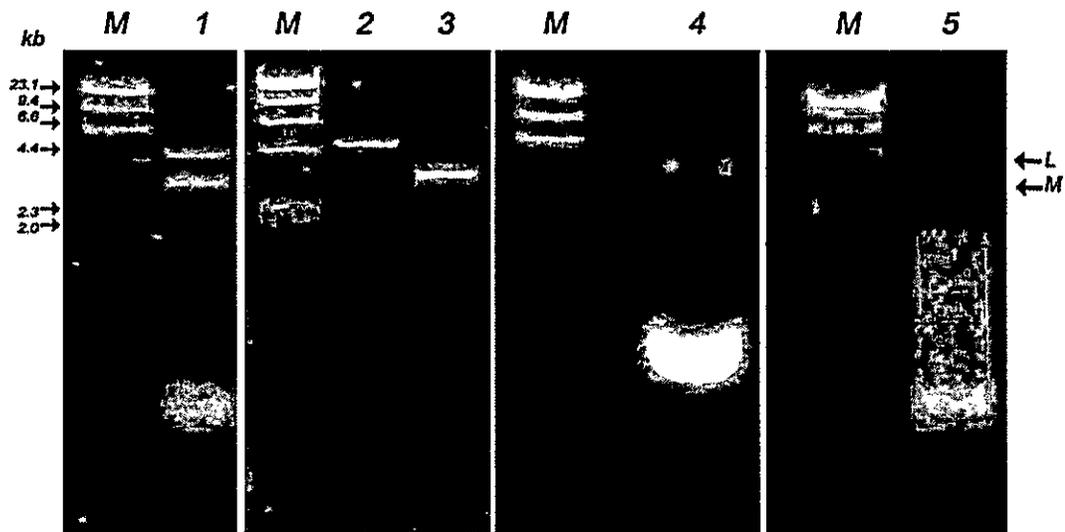


Figura 14. Controles en los pasos de la técnica SPAT. (1). Extracción de dsRNA total de la cepa UCD 67-385, desde donde se obtienen las moléculas individuales de L-RNA (2) y M-dsRNA (3). A éstas se les agrega el adaptador PC1 y son re-purificadas por GeneClean. (4). Tras la reacción de RT-PCR, se verifica (5) si hay aparición de una banda a la altura del producto utilizado inicialmente, indicado por las flechas de la derecha, L y M.

Partiendo como producto inicial desde las moléculas L-dsRNA, M-dsRNA o la mezcla de ambas provenientes de la cepa UCD 67-385, se realizaron numerosos intentos para llegar a un resultado positivo en el punto de verificación posterior a la reacción de PCR, donde se esperaba encontrar una molécula de dsDNA de tamaño equivalente al del molde inicial. Considerando ésto, se modificaron numerosas variables como la concentración inicial de dsRNA, tiempos y temperaturas para las reacciones de ligado, transcripción reversa, degradación de RNA y alineamiento; modalidades en la formación de la segunda hebra de cDNA, y finalmente, el tiempo, la temperatura y los partidores utilizados en la reacción de amplificación.

Mediante el uso de la DNA Polimerasa I fragmento Klenow para formar la segunda hebra de cDNA y posterior amplificación con los partidores PC2 específicos al adaptador, se logró obtener un posible clon de la molécula M-dsRNA de la cepa UCD 67-385. El plasmidio con el inserto (pBS-385M) fue analizado, confirmando la presencia en el sitio de clonamiento de un inserto de aproximadamente 5,8 kb. Este mayor tamaño al de la molécula de dsRNA inicial, se explicó inicialmente por la movilidad diferencial que poseen las moléculas de DNA y RNA. La secuencia completa del inserto de 5941 pb, presentó identidad de un 99% con los 2 ORF codificantes del Transposon Tn1000 (Gamma Delta) de *Escherichia coli*. La hibridación entre una sonda de 1,5 kb de tamaño amplificada con partidores específicos del inserto (385M-SF y 385M-SR), con los ácidos nucleicos totales de la cepa UCD 67-385 (Fig. 15), muestran que no hay identidad entre la molécula M-dsRNA y el fragmento clonado en el vector pBS, así como tampoco se presenta homología con el DNA genómico de la cepa ni con algún otro EGE de la misma. Según esto, el clon posiblemente presentaría algún inserto obtenido por contaminación en las células DH5 α transformadas, la contaminación en las células DH5 α transformadas, el plasmidio utilizado o en alguno de los múltiples

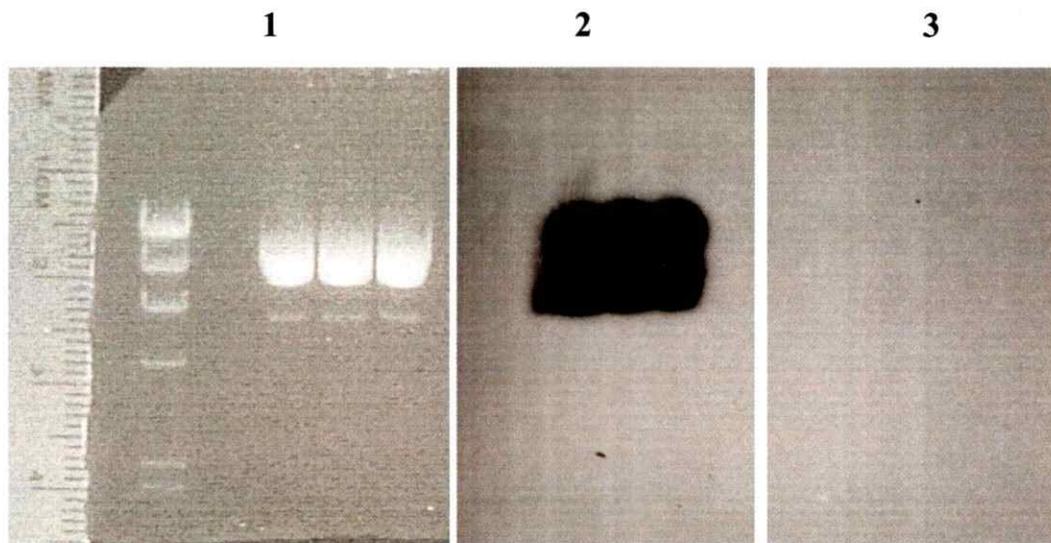


Figura 15. Hibridación del Clon pBS-385M con el dsRNA total de la cepa UCD 67-385. 1: Electroforesis con el DNA plasmidial del clon pBS-385M por triplicado. 2: Southern Blot de la Sonda específica del clon pBS-385M con el DNA plasmidial del mismo clon, utilizado como control positivo. 3: Northern Blot de la sonda específica al clon pBS-385M con el dsRNA total de la cepa UCD 67-385.

pasos de purificación en el procedimiento. Por lo anterior no se continuó analizando esta molécula y se trabajó en otros aspectos de la técnica utilizada.

La técnica de SPAT utiliza la adición de una cola poli A al adaptador inicial, con lo cual se puede realizar la reacción de formación de la primera hebra de cDNA mediante partidores oligo dT. Otro de los intentos de clonamiento realizados con la molécula M-dsRNA, fue incompleto al no lograrse una banda de tamaño mayor a los 3 kb posterior a la amplificación por PCR. Pese a esto se observó una región cercana a los 1,5 kb (Fig. 16) correspondiente a moléculas de cDNA de doble hebra, de acuerdo al control realizado sin la enzima Taq Polimerasa, la cual solo puede amplificar moléculas de DNA. Este patrón se observó sólo al realizar la reacción de transcripción reversa con Oligo dT y no con el partidior PC2, específico al adaptador. Este resultado podría ser explicable si el genoma viral M-dsRNA tuviera una región interna rica en A (o la complementaria, rica en U), la cual pudiese hibridar con el partidior oligo dT y producirse así moléculas de menor tamaño desde esta zona interna hasta el final de la molécula; o simplemente verse favorecido el alineamiento de éstas por sobre el alineamiento de las moléculas de mayor tamaño y posiblemente de menor número. Para analizar esta posibilidad, se clonó directamente el subconjunto de los productos obtenidos de tamaño cercano a los 1,5 kb, luego de purificarlos mediante el kit de limpieza de productos de PCR. Así se obtuvieron 2 clones de tamaño cercano a 1,5 kb los cuales fueron secuenciados con los partidiores específicos del vector.

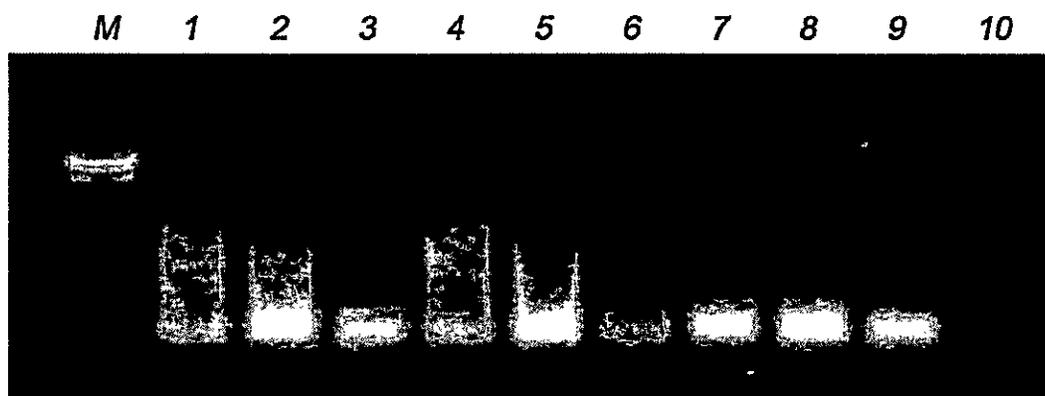


Figura 16. Electroforesis de los productos de RT-PCR a partir de la molécula 385M-dsRNA. Se muestran las combinaciones de los partidores utilizados tanto en el RT como en la amplificación. La reacción de transcripción reversa se realizó con oligodT en los carriles 1 al 6, y con el partidor PC2 desde el 7 al 9. La amplificación por PCR se realizó con el partidor PC2 en los carriles 1 al 3 y 6 al 9, y con oligodT en los carriles 4 al 6. Los carriles 1, 4 y 7 representan 3 μ l de reacción de RT utilizada para la amplificación; carriles 2, 5 y 8 muestran la reacción con 6 μ l y los carriles 3, 6 y 9 un control de reacción de PCR sin Taq Polimerasa. Como control extra se presenta en el Carril 10, 6 μ l de reacción de transcripción reversa sin amplificar. M representa el DNA del fago λ digerido con *HindIII*.

Estas secuencias presentaban repeticiones de nucleótidos adenina o timina en el extremo 5' y 3' del inserto, que llegaban a alcanzar incluso las 100 repeticiones. Esto imposibilitaba la secuenciación interna del inserto debido a la dificultad operacional de la secuenciación encontrada con los fragmentos de este tipo. Sin embargo estas secuencias podrían ser un punto a considerar en relación a la presencia de las repeticiones de adeninas en la molécula M-dsRNA de la cepa UCD 67-385.

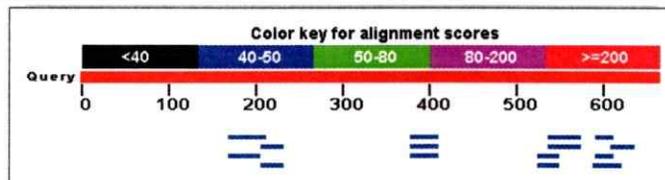
5.2 Método *Aleatorio*.

Al verse imposibilitado el clonamiento mediante la técnica de SPAT, se utilizó el método de transcripción reversa por medio de hexanucleótidos de secuencia aleatoria. De esta forma se buscaba realizar una genoteca con insertos de bajo tamaño (alrededor de 600 pb, Tzanetakis y cols, 2004) a partir de los cuales se obtendría la secuencia completa de las moléculas. Mediante los métodos de Tzanetakis y Sambrook, se logró obtener una serie de clones de tamaño inserto promedio de 700 pb, algunos de los cuales fueron secuenciados con los partidores específicos del vector (Fig. 17). Así se lograron algunas secuencias, las cuales no presentan identidad con algo anteriormente descrito presente en las bases de datos.

Para confirmar que este clon provenga de la molécula de dsRNA, se realizó una reacción de RT-PCR con la molécula L-dsRNA como molde y con los partidores 385L-R1F y 385L-R1R, diseñados a partir de la secuencia del clon 385L-R1 (Fig. 18). El producto de PCR obtenido demuestra que la secuencia obtenida en estos clones, corresponde a la molécula L-dsRNA, lo que avala su uso para el diseño de nuevos partidores, y la posterior obtención de nuevos clones de la molécula sin la utilización de partidores aleatorios.

A	Secuencia
385L-R1	<p>AAGGAAAAGGGAAATAACGTTTCAGGGTCAAAGGCCATACAGTTCTCCATAAGGTCAAATGAACGCTTC AAACGTGACAAGACCTGTGAAGGATTTTCACGGAGGCGAAATACAGGTGGCACCTTTGTTGCCAGTTCT AAGGAATGCTCGTGTGCCAATCCAAGTCAATCAGACTTCGGAGGAGGACGTAAGTCCCGAAGATGTAG AGTAGAACTATAAAAACCTCAAATACAGGGAAGTACACATCGGACTATCTATCGCAATACGGACAAC ATATAACAGGAATTCATTCATAGGGCTTAACGTGCAGCCATGTGAAGGTGAGGAAAGCACGGGCAACA GATGGGAGTTTGCCGACAGACAAATCCCTTAACGATATCTCTAACAAGCCGGGAAACATTGAAGCAG TACCGTTTTTCAGAAGCTCAGTATGCCTTCCTGGACCGGAAAGCTCAAATAAATTCGGCATATTCGAGG CAAGTAAAAGCGTGTATGGGGTAAACAATGTCTGGGTTGGTATAGCTAATGGTAAGGCTAAATTTTCTT CGCTCAATCAAGCAATATTTGCTAACCCAATCTAAAGCAATGTTAATAGCCATGACCAGACACTTCTCT AGCCTGTACGAGAGCTACGCTTATGATGATCCTACGTCAC</p>

B



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	E value	Max ident
XM_001487201.1	Pichia guilliermondii ATCC 6260 hypothetical protein (PGUG_00628) mRNA, complete cds	42.8	1.8	81%
AC117825.9	Mus musculus chromosome 18, clone RP24-8034, complete sequence	42.8	1.8	84%
AC119259.15	Mus musculus chromosome 18, clone RP24-285N19, complete sequence	42.8	1.8	84%
AE013599.4	Drosophila melanogaster chromosome 2R, complete sequence	41.0	6.4	87%
AC104514.2	Drosophila melanogaster clone BACR22L21, complete sequence	41.0	6.4	87%
CR450820.5	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-209J18 in linkage group 12, complete sequence	41.0	6.4	96%
AC012195.9	Homo sapiens chromosome 15, clone RP11-44F11, complete sequence	41.0	6.4	92%
AL359259.18	Human DNA sequence from clone RP11-182B22 on chromosome 1. Contains the 3' end of the MTR gene for	41.0	6.4	83%
AC156639.2	Mus musculus BAC clone RP23-301M11 from chromosome 9, complete sequence	41.0	6.4	100%
AC154701.2	Mus musculus BAC clone RP24-344N20 from chromosome 14, complete sequence	41.0	6.4	92%
AC151977.4	Mus musculus BAC clone RP24-534C19 from chromosome 9, complete sequence	41.0	6.4	100%
AL929104.3	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-61O11 in linkage group 14. Contains the 5' part of a novel gene	41.0	6.4	87%
AC011114.5	Homo sapiens, clone PP11-115A23, complete sequence	41.0	6.4	92%
AC005298.1	Drosophila melanogaster DNA sequence (P1s DS04841 (D188) and DS08189 (D218)), complete sequence	41.0	6.4	87%
AL929346.5	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-38P12, complete sequence	41.0	6.4	96%

Figura 17. Secuencia de un clon obtenido por el método aleatorio. A) Secuencia del clon representativo 385L-R1, obtenido desde la molécula L-dsRNA de la cepa UCD 67-385. El tamaño total del inserto es de 662 pb. B) Resultado del alineamiento de la secuencia del clon 385L-R1 con los genomas depositados en la base de datos mediante la herramienta BLAST. Se muestran los bajos niveles de identidad con algunos genomas publicados y los puntajes obtenidos para dichos alineamientos.

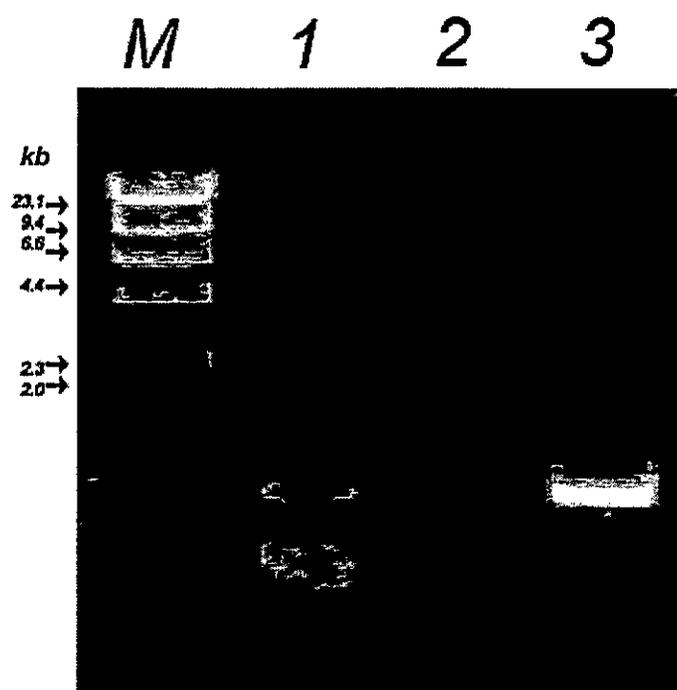


Figura 18. Análisis mediante RT-PCR del clon 385L-R1. Carril 1: RT-PCR de la molécula L-dsRNA de la cepa UCD 67-385, con los partidores específicos 385L-R1F y 385L-R1R. Carril 2: PCR con los mismos partidores y la molécula L-dsRNA como molde. Carril 3: PCR con los mismos partidores y el DNA plasmidial del clon 385L-R1 como molde.

Los insertos de los diversos clones obtenidos son por tamaño, insuficientes para completar aún la secuencia de las moléculas L-dsRNA y M-dsRNA de la cepa UCD 67-385, pero son suficientes para proporcionar una secuencia conocida y ser utilizados en futuros trabajos que busquen obtener la secuencia completa de estas moléculas.

4. DISCUSIÓN

1. Caracterización de los EGE de distintas cepas.

Las diversas cepas de *X. dendrorhous* estudiadas pueden ser agrupadas respecto a dos distintos lugares de aislamiento: las cepas de origen japonés, como las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385; y las cepas de origen ruso, tal como VKMY-2059, VKMY-2266 y VKMY-2786. En este trabajo se pudo detectar diferencias en la presencia de EGEs para cada uno de estos grupos; sin embargo, fue necesario realizar repetidas extracciones para confirmar este aspecto, y descartar si la ausencia de algún EGE se debía al tiempo de crecimiento del cultivo o a la calidad de la purificación.

Para el caso de las cepas japonesas, la concentración de las 2 moléculas de mayor tamaño, L-dsRNA y M-dsRNA, fue constantemente superior a la de las moléculas S₁-dsRNA y S₂-dsRNA, lo cual complicaba la detección de estas últimas cuando una extracción no tenía una alta eficiencia. Sin embargo, en ninguna etapa de la curva de crecimiento se pudo determinar algún punto donde las moléculas descritas no estuviesen presentes (El-Sherbeini y cols, 1984; Van Diepeningen y cols, 2006).

De esta forma, podemos relacionar el origen de las cepas estudiadas con el número de moléculas encontradas en cada una de ellas. Sin embargo es necesario un mayor número de cepas de los escasos lugares de origen (Kuscera y cols, 2000; Libkind y cols, 2007) para confirmar una relación entre número de EGEs y origen geográfico. Los sistemas descritos en *Saccharomyces cerevisiae* cuentan con 2 virus de tamaño aproximados de 4,2 y 1,8 kb (Schmitt y Breinig, 2006). Sólo el primero de estos, el genoma del virus SCV-L, posee un análogo en términos de tamaño en las cepas estudiadas de *X.*

dendrorhous. Existen cepas de *S. cerevisiae* que poseen sólo el virus SCV-L, lo cual sería un sistema similar al observado en las cepas rusas de este estudio. No obstante, pese a la existencia de motivos conservados, la variabilidad de estas moléculas es lo suficientemente alta como para impedir suponer algún sistema en común entre ambos géneros (Bruenn 1993; Thiele y cols, 1984).

2. Optimización de los métodos de extracción.

Los métodos analizados han sido descritos en diversos organismos, cada uno con finalidades específicas en términos de concentración o estabilidad de las moléculas (Lopez de Heredia y Cansen, 2004; Castillo y Cifuentes, 1994; Sambrook y cols, 1989). Para *X. dendrorhous* fue necesario optimizar el método debido a la dureza de su pared celular. Ésto, junto con la baja concentración de moléculas de dsRNA purificadas desde el interior de los VLPs, dificultaron el avance en los objetivos planteados.

Considerando lo anterior, el intento de romper enzimáticamente la pared de las células no reflejó un aumento significativo en la concentración de los dsRNA purificados, y pudo ser reemplazado con tiempos levemente mayores de ruptura con microesferas de vidrio. De la misma forma, los otros métodos de ruptura consideraban un mayor cuidado de las moléculas obtenidas a cambio de un descenso importante de la concentración. Para nuestro estudio no justificamos esta pérdida, debido a la estabilidad de las moléculas de dsRNA en comparación a las de mRNA o complejos proteína-RNA (Sambrook y cols, 1989; Lopez de Heredia y Cansen, 2004).

3. Hibridación de moléculas de dsRNA

Los resultados de las hibridaciones presentadas en este trabajo, dejan de manifiesto la variabilidad viral existente entre los 2 grupos de cepas de *X. dendrorhous*. La similitud a nivel de la molécula M-dsRNA en las cepas de origen japonés, junto con el patrón común observado en los análisis enzimáticos, nos permite suponer la existencia de un mismo sistema viral para estas 2 cepas y posiblemente para otras con un origen común. No obstante, nuestros datos no son suficientes para afirmar esto y son necesarias nuevas hibridaciones entre las otras moléculas, análisis fenotípicos e idealmente la secuencia de estas partículas para lograr afirmar la suposición antes planteada. De la misma forma, podemos plantear la existencia de 2 sistemas virales distintos para las cepas de origen diverso. La diferencia en el número de los EGEs de cada cepa y la diferencia estructural en la única molécula común nos hacen pensar en la existencia de mecanismos de acción viral diferentes.

4. Clonamiento de moléculas de dsRNA.

Los escasos métodos de clonamiento de dsRNA fueron la base para sucesivas modificaciones que buscaron llegar a este fin. Considerando lo anterior, el protocolo con el que se obtuvo el clon pBS-385M se ajustaba a lo publicado en estudios anteriores (Potgiester y cols, 2002) y, pese a que los análisis iniciales indicaban un resultado correcto, era necesario completar la secuenciación ya que se desconocía cualquier identidad con algo publicado anteriormente. Sólo al obtener la secuencia completa del inserto y el resultado negativo de la hibridación con la molécula M-dsRNA, se pudo cuestionar la procedencia del inserto.

Las dificultades que rodean a este protocolo están dadas mayoritariamente por el alto número de pasos involucrados y la imposibilidad de verificar la integridad de las moléculas tras el paso de denaturación del dsRNA (Attoui y cols, 2000; Tzanetakis y cols, 2005). La estabilidad del dsRNA se pierde alcanzado este punto, por lo que la probabilidad de que la escasa concentración del producto inicial sea aun menor tras la denaturación, dificulta más el éxito del protocolo. Diversos estudios lograron clonar moléculas de dsRNA (Russel y cols, 1997; Schmitt, 1995) pero no muchos que lo logren con moléculas de un tamaño superior a las 3 kb (Vreede y cols, 1997; Ambrose y Clewley, 2006). Por ésto, la formación de las hebras de cDNA aparece como el paso clave del proceso, debido a aspectos como la procesividad de la transcriptasa reversa, el escaso producto inicial utilizado, la proporción de hebras de cDNA exitosamente completadas y la manera en que se forma la segunda hebra, paso donde normalmente se beneficiará la formación de moléculas de menor tamaño (Attoui y cols, 2000; Tzanetakis y cols, 2005).

La posibilidad de encontrar zonas con regiones ricas en A o U en la molécula M-dsRNA puede ser avalado por la secuencia de la molécula M₂-dsRNA de *S. cerevisiae* (Hannig y Leibowitz, 1985), donde internamente se pueden encontrar segmentos poli-A en sectores no codificantes de este RNA. Sin embargo, esto no guarda relación con el resto de la secuencia viral, por lo que no sería valido pensar en una similitud estructural entre partícula y la molécula M-dsRNA de la cepa UCD 67-385; más aun considerando que hay mas de 1 kb de diferencia en tamaño entre ellas. Pese a esto, este dato podría ser de utilidad en el análisis de la molécula M-dsRNA de la cepa en estudio, ya sea para una posible purificación específica del RNA, o idear nuevos métodos de clonamiento a partir de esta región.

Pese a que los métodos se han descrito en otras moléculas de dsRNA (Ambrose y Clewley, 2006), no se descarta que los genomas virales presentes en *X. dendrorhous* posean algún tipo de modificación o estructura que impida alguno de los pasos planteados. Algún tipo de modificación podría bloquear el ligado del adaptador, o la misma estructura del dsRNA podría adquirir una conformación que impida, o al menos dificulte algún paso descrito. Sin embargo la naturaleza de estas partículas y el desconocimiento de la secuencia, son los puntos de mayor dificultad para el éxito del protocolo.

5. CONCLUSIONES

1. Se determinó la existencia de 2 sistemas virales distintos y específicos al lugar de origen de las cepas de *X.dendrorhous*. Las cepas de origen japonés poseen un sistema compuesto por 4 moléculas de dsRNA de tamaños 4,8, 3,4, 0,8 y 0,6 kb. Las cepas de origen ruso en cambio, poseen un sistema viral compuesto por sólo una molécula de dsRNA de 4,8 kb de tamaño.
2. Por medio de hibridaciones, se estableció que los genomas virales M-dsRNA de las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 presentan un grado de identidad, lo cual no fue observado entre las moléculas L-dsRNA de las cepas de distinto origen, UCD 67-385 y VKMY-2786.
3. Mediante los métodos descritos para el clonamiento de dsRNA, no se consiguió obtener clones que posean la secuencia de los genomas virales completos de la cepa UCD 67-385. El tamaño de las partículas y el alto número de pasos involucrados representan las mayores limitantes para el éxito del protocolo.
4. Se optimizó un método de extracción de dsRNA en *X. dendrorhous* mediante la ruptura física de la pared celular mediante perlas de vidrio y fenol ácido. El tiempo óptimo de ruptura fue 40 minutos, donde se presentaba una alta concentración de moléculas de dsRNA sin llegar a un nivel de degradación de las mismas.

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.

Bruenn, J. 1993. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 21, 5667-5669.

Carroll, K., Wickner, R. 1995. Translation and M1 Double-Stranded RNA Propagation: *MAK18 5 RPL41B* and Cycloheximide Curing. *J Bacteriol.* 177, 2887-2891.

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

Coutts, R., Livieratos, I. 2003. A rapid method for sequencing the 5'- and 3'-termini of double-stranded RNA viral templates using RLM-RACE. *J. Phytopathol.* 151, 525-527.

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

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

El-Sherbeini, M., Tipper, DJ., Mitchell, DJ., Bostian, KA. 1984. Virus-like particle capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids. *Mol Cell Biol.* 4, 2818-2827.

Gast, F., Sanger, H. 1994. Gel dependence of electrophoretic mobilities of double-stranded and viroid RNA and estimation of the contour length of a viroid by gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 15, 1493-1498.

Hannig, E., Leibowitz, M. 1985. Structure and expression of the M2 genomic segment of a type 2 killer virus yeast. *Nucleic Acids Res.* 13, 4379-4400.

Kuscera, J., Pfeiffer, I., Takeo, K. 2000. Biology of the red yeast *Xanthophylomyces 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.

Lopez de Heredia, M., Jansen, R., 2004. RNA integrity as a quality indicator during the first steps of RNP purifications: A comparison of yeast lysis methods. *BMC Biochem.* 5, 14.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast Killer Systems. *Clin Microbiol Rev.* 10, 369-400.

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.

Potgieter, A., Steele, A.D., Van Dijk, A., 2002. Cloning of complete genome sets of six dsRNA viruses using an improved cloning method for large dsRNA genes. *J Gen Virol.* 83, 2215-2223.

Rasband, W.S. Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006

Russell, P., Bennett, A., Love, Z., Baggott, D. 1997. Cloning, sequencing and expression of a full-length cDNA copy of the M1 double-stranded RNA virus from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13, 829-836.

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

Schmitt, M. 1995. Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K₂₈ killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet.* 246, 236-246.

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

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

Thiele, D., Hannig, E., Leibowitz, M. 1984. Multiple L double-stranded RNA species of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for separated encapsidation. *Mol. Cell. Biol.* 4, 92-100

Tzanetakis, I., Keller, K., Martin, R. 2004. The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *J Virol Methods.* 124, 73-77.

Van Diepeningen, A., Debets, A., Hoekstra, R. 2006. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* population. *Fungal. Genet. Biol.* 43, 446-552.

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