



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y MAPEO
CROMOSÓMICO DE LAS DOS FORMAS
DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA
TIPO CuZn (Cu,ZnSOD) DE LA LEVADURA
MARINA *Debaryomyces hansenii***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

presenta

Delia Irene Rojas Posadas

La Paz, B.C.S., Abril del 2003.

RESUMEN

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que comunmente se encuentra en los organismos aeróbicos, y juega una papel central en el metabolismo de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno. La levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa C11 presenta tres isoformas de la enzima cobre-zinc SOD (dos homodímeros y un heterodímero). En un estudio previo, Hernández-Saavedra clonó la secuencia codificante de una de las dos formas básicas de la Cu,ZnSOD (SODC), denominada *dh sod1*. En el presente trabajo se clono y secuencio la *dh sod2* de la levadura marina *D. hansenii*. Se realizó un screening en una librería genómica para buscar la región promotora y se mapearon ambas formas *dh sod1* y *dh sod2* utilizando ADN intacto para separar los cromosomas mediante electroforesis de campo pulsante. El uso de primers degenerados, diseñados a partir de péptidos internos obtenidos mediante digestión con tripsina de la proteína purificada, permitió obtener fragmentos de ~420 pares de bases (pb) después de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El análisis de la secuencia mostró un 97% de homología con la SODC de *S. cerevisiae* y sólo un 69% de homología con la *dh sod1* de *D. hansenii*. Un resultado similar fue obtenido al construir un árbol de homología con secuencias de levaduras marinas y terrestres reportadas en el Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Se obtuvieron dos grandes grupos, uno que incluye levaduras terrestres y otro que incluye levaduras marinas. Sin embargo en el árbol de homología, la *dh sod2* se incluyo en el grupo de las levaduras terrestres. Del screening de la librería genómica se obtuvieron varias clonas positivas, dos de las cuales fueron secuenciadas (una de 656 pb y otra de 660 pb), una de ellas con homología a secuencias del cromosoma VII de *S. cerevisiae*, sin embargo, no fue posible obtener la secuencia correspondiente a la *dh sod* del promotor. Se logró separar el ADN intacto de *D. hansenii* mediante electroforesis de campo pulsante, obteniendo un patrón difuso de pequeños cromosomas. Sin embargo, cuando se uso con la *dh sod2* marcada con digoxigenina en la hibridación, se logró obtener una banda bien definida. Esto, aunado a los reportes de expresión diferencial de ambas formas (Dh SODC1 y Dh SODC2) bajo condiciones de estrés dado por compuestos clorados o metales sugieren el probable origen génico (no formas alélicas). La presencia y función de ambos genes en la levadura marina *D. hansenii* son probablemente el resultado de la adaptación a ambientes marinos y terrestres.

Palabras clave: SOD, *Debaryomyces hansenii*, Cu,ZnSOD

ABSTRACT

Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that is common in aerobic organisms and plays a central role in the metabolic control of free radicals and reactive oxygen species. The marine yeast *Debaryomyces hansenii* strain C 11 presents three forms of the copper-zinc SOD enzyme (two homodimers and one heterodimer). In previous work, Hernández-Saavedra cloned one of the encoding sequences of one of the two basic forms of Cu,ZnSOD (SODC), designated *dh sod1*. In this study, the *dh sod2* was cloned and sequenced, a screening of a genomic library was done looking for the promoter sequence and mapping both forms (*dh sod1* and *dh sod2*) on intact DNA separated by pulsed field gel electrophoresis. The use of degenerate oligonucleotides, designed from internal peptides obtained by trypsin digestion of the pure protein, yielded a 420 bp fragment after amplification by the polymerase chain reaction. The sequence analysis showed 97% homology of the *dh sod2* of *D. Hansen* with SODC of *Saccharomyces cerevisiae*, while only a 69% homology was found with the *dh sod1*. A similar result was obtained when a homology tree was constructed, considering the corresponding sequences of marine and terrestrial sequences reported in the National Center of Biotechnology Information. Two main groups were obtained; one included terrestrial yeast, while the other included marine yeast. However, on the homology tree, the *dh sod2* was included in the group of terrestrial yeast. From the screening of the genomic library, several positive clones were obtained, two of which were sequenced (656 and 660 bp), resulting in one with the homology to fragments of chromosome VII of *S. cerevisiae*. However, it was not possible to find the sequence corresponding to the *dh sod* promoter. Intact DNA of *D. hansenii* was separated by pulsed field gel electrophoresis, resulting in a diffused pattern of small chromosomes. However, when a probe of digoxigenine-labeled *dh sod2* was used for hybridization, a single well-defined band was obtained. This, together with reports of differential expression of both forms of the enzyme (Dh SODC1 and Dh SODC2) under metal- or chloride-based substances, supports the genomic origin of both sequences (not allelic forms). The presence and function of both genes in the marine yeast probably are the result of the marine and terrestrial environmental adaptations of *D. hansenii*.

Key words: SOD, *Debaryomyces hansenii*, Cu,ZnSOD

Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra

Dedicatoria

A mi madre, a pesar del tiempo no dejo de extrañarte.

A mi padre que siempre me ha impulsado para seguir por el camino de la superación.

A mis hermanos Paty, Luis y Luisa por todo el apoyo otorgado aún estando lejos de casa.

A Alex por ser esa pequeña estrellita que ilumina nuestras vidas.

A Norma y Arturo por su amistad y todo el apoyo incondicional, mas allá de trabajo.

A mi gran amor, Nachito, por estar siempre conmigo y compartir juntos esta gran meta.

Agradecimientos

A la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra por creer en mi y depositar toda su confianza en que saldría este trabajo.

A mi comité revisor Dr. Felipe Ascencio Valle y Dr. Murugan Gopal.

Al CIBNOR por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado mediante la beca No. 158427.

A Posgrado por el apoyo económico otorgado para continuar el trabajo.

A Edgar Yuen, Manuel Melero, Horacio, Tony, Betty, Letty y Osvelia por todo su apoyo.

A dos grandes amigos que nunca me han dejado caer y siempre están allí cuando mas he necesitado de alguien, Norma y Arturo.

A Bárbara, que me involucro en el fascinante mundo de la microbiología y compartió conmigo toda su experiencia, gracias amiguita.

A mis compañeros y amigos del L4: Barbara, Letty, Tomas, Jesús, Roger, Lili, Raúl, Patsy, Sujey, Erika, Arturo, Murugan, Reyna (hermana) y Nacho, por todos los buenos momentos que hemos pasado.

A todos mis compañeros y amigos de Patología Marina, en especial a Carlos, Pedro, Angel, Claus, Flor (hermana) y Valeri (amibita) por su amistad y apoyo durante los momentos mas difíciles.

A ti AMOR, no existen palabras para expresar todo mi agradecimiento.

A Dios por permitirme seguir disfrutando de la gente que mas quiero.

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	vii
Glosario	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las levaduras	1
1.2 Importancia de las levaduras en biotecnología	3
1.3 Metabolismo del oxígeno	4
1.4 Superóxido dismutasa (SOD)	6
1.4.1 Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc (Cu,ZnSOD)	7
1.5 Tecnología del ADN recombinante	10
1.5.1 Librerías genómicas	11
1.6 Cariotipos	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1 SOD en levaduras marinas	16
2.2 Cu,ZnSOD en levaduras marinas	17
2.3 Regulación de la expresión de la Cu,ZnSOD en levaduras	21

3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Clonación de la secuencia codificante <i>dh sod2</i>	26
5.2 Preparación de células competentes por el método de CaCl ₂	30
5.3 Transformación de células. Método de shock térmico	31
5.4 Extracción y purificación de ADN plasmídico. Método de lisis alcalina	32
5.5 Secuenciación	33
5.6 Marcado de sondas	34
5.6.1 Estimación de la sensibilidad y nivel de reconocimiento de las sondas marcadas	34
5.7 Hibridación	35
5.7.1 Pre-hibridación	35
5.7.2 Hibridación	36
5.7.3 Detección inmunológica	36
5.8 Titulación de la librería genómica	37
5.8.1 Transferencia a membranas de nitrocelulosa	38
5.9 Re-infección	38
5.9.1 Excisión <i>in vivo</i> utilizando el sistema EXASSIST/XLOR	39

5.10 Mapeo de genes	40
5.10.1 Preparación de protoplastos	40
5.10.2 Preparación de plugs	41
5.10.3 Lisis de células <i>in situ</i>	41
5.10.4 Electroforésis	42
6. RESULTADOS	43
6.1 Amplificación y clonación de la secuencia codificante <i>dh sod2</i>	43
6.2 Marcado de sonda	48
6.3 Sensibilidad y nivel de reconocimiento de la sonda marcada	48
6.4 Sub-titulación de la librería genómica de <i>D. hansenii</i>	49
6.5 Cariotipos	51
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA	69
10. APÉNDICE	79
10.1 APÉNDICE I. MEDIOS DE CULTIVO	79
10.2 APÉNDICE II. SOLUCIONES STOCK	81
10.3 APÉNDICE III. SECUENCIAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático que representa la estructura dimérica de la Cu,ZnSOD	8
Figura 2. Modelo hipotético de la conformación del sitio activo en una subunidad de la enzima Cu,ZnSOD en <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 3. Vector de clonación pBluscript SK (+)	13
Figura 4. Perfil electroforético de actividad SOD en gel de poliacrilamida	17
Figura 5. Perfil electroforético de actividad SOD en gel nativo de poliacrilamida: fracciones obtenidas mediante cromatografía en filtración en gel	18
Figura 6. Secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de las Cu,ZnSOD de <i>D. hansenii</i>	27
Figura 7. Vector de clonación pCR2.1	30
Figura 8. Diluciones seriales para el marcado de las sondas <i>dh sod1</i> y <i>dh sod2</i>	35
Figura 9. Fragmento amplificado utilizando los juegos de primers 4F-UD42 y UD39-UD42	43
Figura 10. ADN plasmídico recombinante obtenido por el método de lisis alcalina	44

Figura 11. Secuencia de nucleótidos de la <i>dh sod2</i> de <i>D. hansenii</i> y secuencia deducida de aminoácidos.	44
Figura 12. Representación gráfica de las relaciones de homología (%) de las secuencias de aminoácidos de las Cu,ZnSOD de levaduras marinas del género <i>Debaryomyces</i> y otros organismo fungi (<i>S. cerevisiae</i> y <i>Sz. pombe</i>) reportadas en los bancos de datos	46
Figura 13. Secuencia parcial de nucleótidos (420 pb) de la región codificante del gen <i>dh sod2</i> de <i>D. hansenii</i> y su correspondiente secuencia teórica de aminoácidos	47
Figura 14. Productos de PCR normales y marcados con digoxigenina	48
Figura 15. Membrana de nitrocelulosa con diluciones seriales para el marcado de las sondas <i>dh sod1</i> y <i>dh sod2</i> marcados con digoxigenina	48
Figura 16. Placas líticas positivas obtenidas del screening de la librería genómica de <i>D. hansenii</i>	50
Figura 17. Patrón electroforetico de <i>S. cerevisiae</i> y <i>D. hansenii</i> obtenido mediante electroforésis de campo pulsante	52
Figura 18. Mapeo cromosómico A patrón electroforetico de ADN intacto obtenido mediante PFGE y B membrana de nitrocelulosa en la que se observa la señal obtenida de la hibridación con la sonda <i>dh sod2</i> marcada con digoxigenina	54

Figura 19. Patrón electroforético de actividad de la enzima SOD de diversas fuentes 62

Figura 20. Perfiles de actividad Cu,ZnSOD de *D. hansenii* crecida bajo condiciones normales, de estrés dado por metales y NaOCl 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Hábitats naturales de las levaduras	2
Tabla II. Características de los dos tipos de Cu,ZnSOD en <i>D. hansenii</i>	18
Tabla III. Secuencias de aminoácidos de péptidos internos obtenidos mediante digestión con tripsina de las dos formas de Cu,ZnSOD de <i>D. hansenii</i>	26
Tabla IV. Secuencias de primers utilizados para la clonación de la <i>dh sod2</i> y la <i>dh sod1</i> , utilizada como control	27
Tabla V. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia <i>dh sod2</i>	28

GLOSARIO

Anticuerpo: Proteína (inmunoglobulina) producida por linfocitos T que reconoce un antígeno específico y desencadena la respuesta inmune.

Cariotipo: Complemento cromosómico de una célula. Se realiza con cromosomas metafásicos, los que se ordenan en parejas de cromosomas homólogos de acuerdo básicamente a sus longitudes y posición del centrómero.

Clonación: aislamiento y multiplicación de un gen determinado.

Competente: Se dice de la célula capaz de tomar DNA exógeno y, por tanto, de ser transformada.

Hibridación *in situ*: Localización de un gen mediante adición de sondas marcadas específicas y detección del marcado sobre el cromosoma tras la hibridación.

Kilobase (kb): Unidad de longitud de ácidos nucleicos correspondiente a 1000 nucleotidos. Se abrevia como kb para ácidos nucleicos de hebra simple y kbp (kilo pares de bases) para ácidos nucleicos de doble hebra.

Ligasa: Enzima que puede volver a unir un enlace fosfodiéster roto de un ácido nucleico.

Levadura: Hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación y/o fisión. En este grupo de también se observa reproducción sexual y formación de esporas asexuales.

Levadura halotolerante: Levaduras capaces de proliferar a bajas actividades de agua por tolerar altas concentraciones de sales.

Plásmido: Molécula de ADN extracromosómico que se replica autónomamente.

Promotor: Región reguladora situada a corta distancia del extremo 5' de un gen y que actúa como sitio de unión de la polimerasa de ARN.

Radical libre: Átomos o moléculas cuya última capa electrónica no se encuentra apareada en su totalidad.

Secuencia Río Abajo (Down stream): Secuencias nucleotídicas de un gen localizadas en la región que se transcribe. Se numeran a partir del nucleótido de inicio de la transcripción como +1, +2, y así sucesivamente.

Secuencia Río Arriba (Up stream): Secuencias nucleotídicas de un gen localizadas anteriormente a la región que se transcribe. Se numeran desde el nucleótido de inicio de la transcripción como -1, -2, y así sucesivamente. Ejemplo: nucleótidos del promotor.

Sonda: Molécula utilizada para identificar a otra molécula. Por ejemplo, para identificar un gen se utiliza como sonda el ARN mensajero correspondiente ó el ADN complementario. En ambos casos la sonda debe estar marcada (ej. radioisótopo), la identificación ocurre por complementariedad de bases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS LEVADURAS

Los hábitats de los microorganismos son extremadamente diversos. Cualquier hábitat que sea adecuado para el crecimiento de organismos superiores, también lo es para el crecimiento de microorganismos. No obstante, hay muchos hábitats donde no se encuentran organismos superiores debido a las extremas condiciones físicas o químicas, sin embargo, en ellos pueden existir microorganismos que incluso crecen mejor allí (Leveau *et al.*, 2000). Dentro de la diversidad de microorganismos se pueden mencionar a las levaduras. A la fecha, se han descrito alrededor de 700 especies de levaduras, sin embargo, estas representan sólo una fracción de la biodiversidad de las levaduras en el planeta. Para los ascomicetos, en general, el número descrito de géneros y especies se ha calculado en 62,000 y 669,000 respectivamente (Hawkswort y Mouchacca, 1994). Las levaduras son un grupo de microorganismos eucariontes filogenéticamente diverso que pertenecen al Reino Fungi (Kurtzman y Phaff, 1987), que en un estadio de su ciclo vital aparecen como células simples y se pueden reproducir por fisión o gemación, o una combinación de ambas (Kreger-van Rij, 1987).

Las levaduras tienen una amplia distribución, ya que han sido aisladas de diversos tipos de sustratos correspondientes a un variado tipo de hábitats (Tabla I), dentro de los que se incluyen los ambientes marinos (levaduras marinas).

Las levaduras marinas son descritas como aquellas levaduras que pueden encontrarse, y que completan sus ciclos de vida, en hábitats marinos. Dentro de este grupo se incluyen a todas las levaduras y organismos levaduriformes que son capaces de construir y perpetuar poblaciones en el medio marino o aquellas en las que su reproducción y crecimiento ocurren preferentemente en el mar (2.4 - 4.0% de cloruro de sodio, principalmente) (Hernández-Saavedra, 1990).

Tabla I. Hábitats naturales de las levaduras (Tomado de Walker, 1998).

Habitats	Comentarios
Plantas	Las plantas son comúnmente nichos de levaduras, especialmente en la interfase entre los nutrientes solubles (azúcares) y en medios contaminados (ej. superficies de uvas). La dispersión de las levaduras en la filósfera es auxiliada por los insectos (ej. <i>Drosophila</i> spp) y algunas levaduras son patógenos de plantas (ejemplo: <i>Asbya</i> , <i>Nematospora</i> spp).
Animales	Varias levaduras no patógenas están asociadas con el tracto intestinal de los animales (ej. <i>Candida pintolopesi</i> , <i>Candida slooffii</i> , <i>Cyniclomyces guttulatus</i> y en piel <i>Pityrosporum</i> spp.). Numerosas levaduras están asociadas con insectos las que actúan como vectores importantes en su distribución natural.
Suelo	Para muchas levaduras, el suelo puede ser el único reservorio a largo plazo para su sobrevivencia, en donde crecen libremente.
Agua	Las levaduras se distribuyen extensamente en agua dulce y agua de mar (por ejemplo: <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> y <i>Debaryomyces</i> spp.), algunas levaduras existen a temperaturas de -3°C a 13°C, salinidades de 35% y profundidades de 4000 m, sin embargo, otras tienen una distribución restringida.
Atmósfera	Levaduras como <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Udeniomyces</i> y <i>Debaryomyces</i> spp. pueden ser dispersadas por el aire a partir de la capa vegetativa sobre la superficie de la tierra.
Hábitats extremos	Algunas levaduras halotolerantes por ejemplo: <i>Debaryomyces hansenii</i> pueden crecer en soluciones de diversa salinidad. La levadura osmofílica <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> crece en soluciones que van de 40% a 70% de azúcar; estas fueron encontradas durante una expedición a horizontes glaciares de 3250 años de edad.

Las levaduras marinas se encuentran como saprófitos en sedimentos marinos, hierbas marinas en estado de putrefacción, como parásitos de algas, mangles y animales (Jennings, 1983). Han sido aisladas de lagos salados que se encuentran tierra adentro, y muchas de ellas juegan un papel muy importante en los alimentos en salmuera (Onishi, 1963; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). Se ha observado que las poblaciones de levaduras son más abundantes en aguas costeras, encontrándose una gran variedad de especies que se incluyen en las tres divisiones de hongos superiores. En océano abierto, en donde los desechos orgánicos son menores, se han aislado en un menor número, disminuyendo también la variedad de especies encontradas (Fell, 1976).

1.2 IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN BIOTECNOLOGÍA

Actualmente, las levaduras son utilizadas en varios procesos industriales, como la producción de bebidas alcohólicas, biomasa (pan, alimentos) y varios productos metabólicos como enzimas, vitaminas, polisacáridos capsulares, carotenoides, alcoholes polihídricos, lípidos, glicolípidos, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono, y compuestos sintetizados por la introducción de ADN recombinante. Muchas especies de levaduras utilizadas en estos procesos han sido modificadas genéticamente para seleccionar las características deseadas y eliminar las no deseadas (Phaff, 1986).

La utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de proteínas heterólogas se ha incrementado en los últimos 10 años. El primer

sistema de expresión eucariótico fue desarrollado en ella, ya que al ser un organismo unicelular puede ser manipulado genéticamente utilizando la mayoría de las técnicas empleadas para *Escherichia coli*, y como organismo eucariótico es un huésped apropiado para la producción de proteínas eucarióticas auténticas. Por otro lado, el uso de levaduras es adecuado por su seguridad para la producción de productos farmacéuticos recombinantes por que a diferencia de *E. coli* no producen pirógenos o endotoxinas, y tienen un amplio historial con un grado de seguridad elevado cuando se emplean en la industria en procesos de fermentación a gran escala. El empleo de *S. cerevisiae* para la manipulación de ADN recombinante junto a su bien caracterizada fisiología, bioquímica y genética, han hecho de este organismo una piedra angular en la biotecnología contemporánea (Curran y Bugeja, 1997). En los años 80s se demostró que el uso de levaduras no convencionales como *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* como sistemas de expresión de proteínas de origen eucariota es eficiente, debido a que combinan características de ruta secretora de proteínas de eucariotas superiores y, al mismo tiempo, como organismos unicelulares son fáciles de manipular y cultivar en medios no complejos (Wolf, 1996).

1.3 METABOLISMO DEL OXÍGENO

El oxígeno es esencial para la vida en la tierra. En estado normal, el oxígeno (O₂) es poco reactivo. Sin embargo, durante el metabolismo normal y

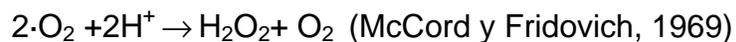
como consecuencia de perturbaciones ambientales y contaminantes (radiaciones, sequía, contaminantes del aire, humo de cigarrillo, estrés térmico, herbicidas etc.) el oxígeno da origen a varios intermediarios letales o altamente tóxicos. Los intermediarios tóxicos, referidos como radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) incluyen el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$) y el peroxinitrito (ONOO^-); todos los ROS son biológicamente importantes, debido a su citotoxicidad (Hernández-Saavedra *et al.*, 1998). El peróxido de hidrógeno es la forma de oxígeno menos reactiva; otros como el $\cdot\text{O}_2^-$ sólo pueden ser importantes en fotoreacciones (Davis, 1987).

La efectiva y rápida eliminación de los ROS es esencial para la función y sobrevivencia de los organismos. Para ello, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante. Tales estrategias incluyen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los mecanismos no enzimáticos consisten en el uso de antioxidantes de bajo peso molecular como: β -caroteno, ácido ascórbico y α -tocoferol (Warner, 1994; Goodsell, 1996). El primer mecanismo enzimático comprende la reparación de daños macromoleculares causados por ROS en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas a través de enzimas reparadoras de ADN, proteasas, lipasas, etc. (Medina, 1996). El segundo mecanismo enzimático consiste en la remoción, neutralización y/o depuración de los ROS mediante enzimas específicas. Como ejemplo de defensas enzimáticas metabolizantes se

pueden mencionar la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa que eliminan el H_2O_2 en cloroplastos y mitocondrias, la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POx) que remueven el H_2O_2 en las células, y la superóxido dismutasa (SOD) que elimina los radicales superóxido.

1.4 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Las células están equipadas con una familia de enzimas que depuran catalíticamente los radicales superóxido a través de la siguiente reacción:



La superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) es una metaloenzima ubicua que cataliza la dismutación del radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (McCord y Fridovich, 1969). A la fecha se han descrito cinco tipos diferentes de SODs. Estas puede ser agrupadas en tres familias principales: la MnSOD (SODM), la FeSOD (SODF), y formas combinadas de ambas (Fe,MnSOD) forman una familia (Fridovich, 1989); se encuentran generalmente en procariontes y organelos subcelulares. La segunda familia que consiste en SODs que tienen como grupo prostético al Ni (SODN) sólo se han encontrado en bacterias del género *Streptomyces*, por lo que no se sabe mucho acerca de su origen evolutivo (Youn *et al.*, 1996). La tercera familia esta

representada por las Cu,ZnSODs (SODC) que se encuentran generalmente en el citosol de células eucariontes (Amano *et al.*, 1990). Una forma extracelular de Cu,ZnSOD (SODE) ha sido caracterizada en fluidos corporales de mamíferos (Marklund, 1984). Se cree que ambos tipos de Cu,ZnSOD se desarrollaron a partir de un ancestro común, el cual es diferente al de la MnSOD y la FeSOD (Fridovich, 1989).

Como regla general se creía que la presencia de la SODC se restringía únicamente a organismos eucariontes, sin embargo, la primera excepción fué descubierta en la bacteria luminiscente *Photobacterium leiognathi* (Halliwell y Gutteridge, 1991), y posteriormente se ha encontrado en otras bacterias como *E. coli* (Benov y Fridovich, 1996) y formando parte del genoma de varias partículas virales (Goebel,1990).

1.4.1 Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc (Cu,ZnSOD)

La SODC es una proteína citosólica que consiste de dos subunidades idénticas no glicosiladas unidas no covalentemente (Hong *et al.*, 1992). Cada subunidad, de 152 aminoácidos, tiene una masa molecular de 16 kDa y une un átomo de cobre y uno de zinc (Tibell *et al.*, 1987; Halliwell y Guteridge, 1999). Se ha propuesto que la SODE es una glicoproteína tetramérica, con una secuencia señal de 18 aminoácidos (Hjalmarsson *et al.*, 1994).

A través de varios estudios se ha demostrado que solo el átomo de cobre sufre la óxido-reducción durante la dismutación del anión superóxido

(Malinowsky y Fridovich, 1979), mientras que el átomo de zinc contribuye al mantenimiento y configuración del sitio activo (Figura 1, Reinecke *et al.*, 1988).

La estructura tridimensional de las enzimas de bovino (Djinovic *et al.*, 1992a) y levadura (Frigerio *et al.*, 1989; Djinovic *et al.*, 1992b) se han elucidado mediante cristalografía de rayos X. Cada subunidad esta compuesta principalmente por 8 cadenas antiparalelas de estructuras de hoja plegada (β -sheet) que forman un cilindro aplanado, además de 3 lazos (loops) externos.

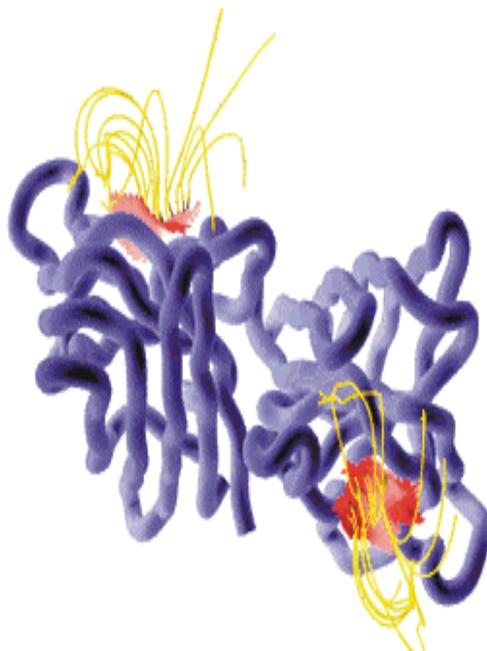


Figura 1. Modelo esquemático que representa la estructura dimérica de la Cu,ZnSOD. Las porciones rojas representan los átomos de zinc, mientras que las estructuras amarillas los átomos de cobre; ambos metales están ligados mediante los residuos de histidina propios de la proteína (Tomado de Reinecke *et al.*, 1988).

El ión cobre se mantiene en el sitio activo mediante la interacción con el nitrógeno en las estructuras anulares del imidazol de cuatro residuos de histidina (44, 46, 61 y 118 en la secuencia bovina). El ión zinc está unido a la proteína mediante interacciones con el imidazol de la histidina 61, interactuando también con las histidinas 69 y 78, y con el grupo carboxilo del aspartato 81 (Figura 2; Linder, 1993). La histidina 61, que interactúa con ambos metales, parece estar implicada en el aporte de protones necesarios para la reacción de dismutación. Gran parte de la superficie de cada subunidad proteica está cargada negativamente, por lo que rechaza los iones $\cdot\text{O}_2^-$, a excepción de las zonas cargadas positivamente, que lo conducen al sitio activo. Debido a lo anterior, cualquier ión $\cdot\text{O}_2^-$ que se aproxime a cualquier otra parte de una subunidad, parece ser “guiado” hacia el sitio activo.

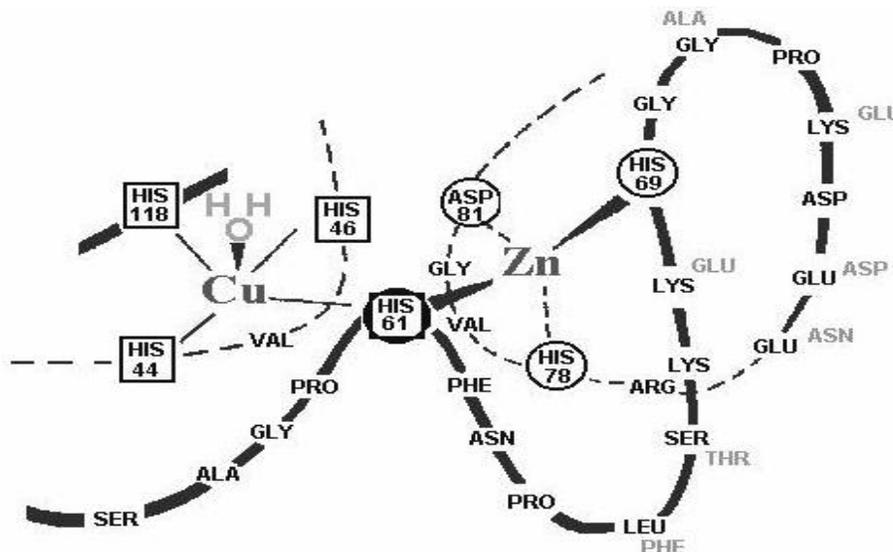


Figura 2. Modelo hipotético de la conformación del sitio activo en una subunidad de la enzima Cu,ZnSOD en *S. cerevisiae* (Linder, 1993). Nótese la participación de los residuos de His y Asp en el ligamiento de los metales y la molécula de agua asociada al ión cobre, que es donde se lleva a cabo la reacción de dismutación. Los residuos marcados en gris son las sustituciones de aminoácidos encontradas en la Cu,ZnSOD1 de *D. hansenii* (tomado de Hernández-Saavedra, 1997).

Las modificaciones químicas a las cadenas laterales cargadas positivamente, disminuyen en gran medida la actividad de la enzima. Aunque en la enzima, los dos sitios activos están separados el uno del otro, las subunidades por si mismas catalizan la dismutación del radical $\cdot\text{O}_2^-$, solo que de una forma más lenta (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.5 TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE

Durante los últimos 15 años se ha producido una revolución en la biología. Inicialmente, su desarrollo estuvo centrado en estudios a nivel molecular, pero ya son pocas las áreas de la biología aplicada y pura que permanecen intactas. La causa de toda esta agitación es la aparición de una serie de técnicas indistintamente referidas como ingeniería genética, clonación y tecnología del ADN recombinante o manipulación genética *in vitro* (Walker y Gingold, 1997).

Con el desarrollo de la ingeniería genética, se ha abierto un campo nuevo en el estudio del material genético de los seres vivos. Esto ha sido posible gracias a la clonación molecular, la cual ha permitido aislar en forma pura, reproducible e ilimitada fragmentos específicos de ADN de un organismo dado, al introducir estos en vectores o vehículos moleculares y propagarlos en un organismo alterno, por ejemplo, en *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989). Cualquier procedimiento de clonación de ADN requiere de cuatro partes esenciales: un

método para generar los fragmentos de ADN, las reacciones que van a ensamblar el ADN ajeno al vector, una manera de introducir el recombinante artificial en la célula huésped donde este se pueda replicar, y un método de selección o screening de las clonas de las células receptoras que adquirieron al recombinante.

1.5.1 Librerías genómicas

Una librería genómica consiste de una gran cantidad de clonas de ADN recombinante, cada una de las cuales contiene un fragmento diferente de ADN “foráneo”. Para aislar una clona que corresponde a un gen o a una secuencia de ARNm en especial (librerías de ADNc), se realiza el tamizado (screening) de dicha librería. En efecto, sólo unos cuantos de los millares de clonas contienen la secuencia nucleotídica deseada. Si el gen en cuestión confiere un fenotipo que pueda ser seleccionado en bacterias, la clona puede ser aislada en condiciones de cultivo selectivas. Sin embargo, la mayoría de los genes no codifican para una función selectiva, por lo cual las secuencias son identificadas por medio de su hibridación con sondas, o porque se expresan por medio de la síntesis de una proteína que puede ligarse a un anticuerpo (Ausubel *et al.*, 1997).

Un parámetro crítico para la realización del screening de una librería es la cantidad de clonas que deben ser examinadas para identificar la clona deseada, lo cual corresponde a la frecuencia de la clona deseada en la librería. La

titulación de la librería permite determinar el volumen necesario que ha de ser manejado para manipular el número crítico de clonas calculado.

El vector λ ZAP es un vector de inserción que puede ser empleado para realizar subclonaciones, cuenta con sitios múltiples de clonación dentro de secuencias plasmídicas que pueden ser seccionadas *in vivo* y transformadas en un vector plasmídico, pBluescript SK (M13-) (Figura 3). Se pueden insertar fragmentos hasta de 10 kb en sitios únicos para las enzimas *Xho* I, *Eco* RI, *Spe* I, *Xba* I, *Not* I o *Sac* I. Fragmentos cortados con *Mbo* I, *Bgl* II, *Bam* HI, *Hind* III y *Sau* 3AI pueden ser clonados después de haberse llenado los extremos. El sitio de policlonación está situado en la porción amino-terminal del gen *lacZ'*, resultando a menudo en un fenotipo Lac(-) en IPTG/X-gal. En ciertos casos, la posición relativa del inserto y de *lacZ* permite que una proteína de fusión sea expresada y detectada mediante el uso de anticuerpos (Short *et al.*, 1988).

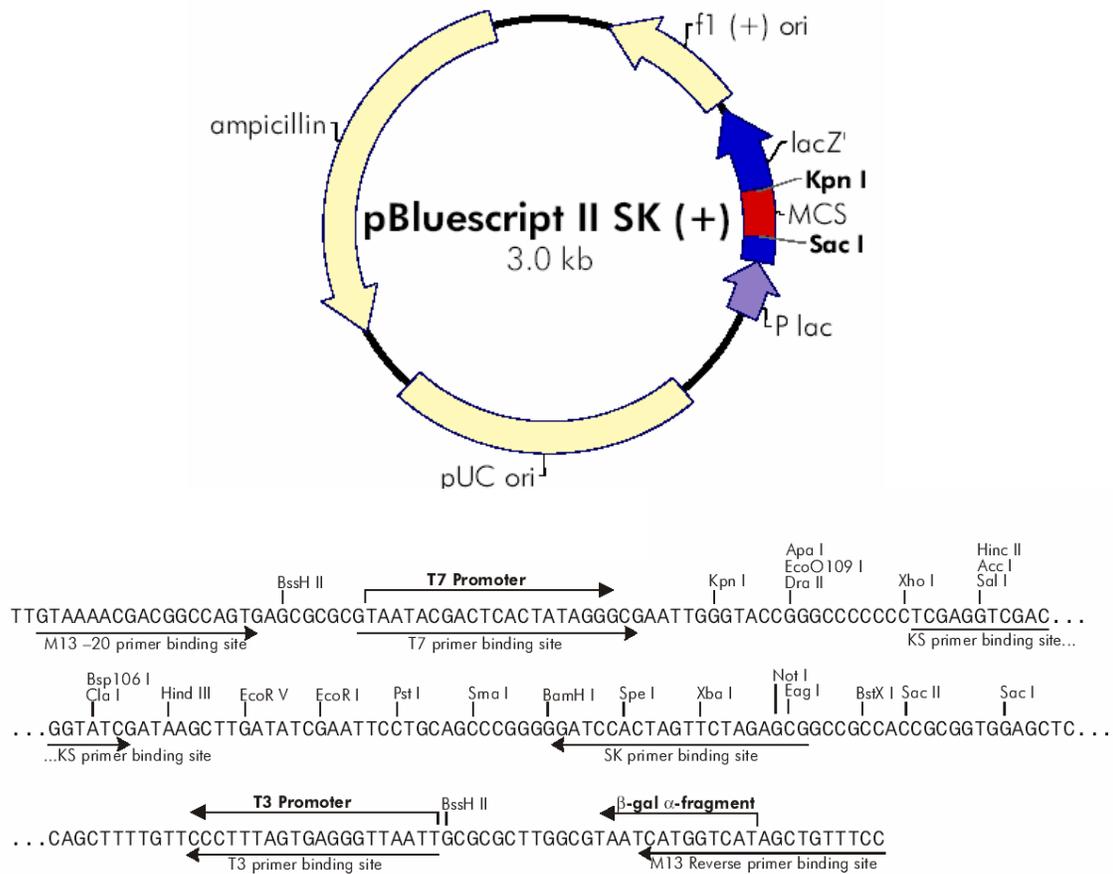


Figura 3. Vector de clonación pBluescript SK (+). (Stratagene®)

1.6 CARIOTIPOS

La electrofóresis es una técnica que permite separar ácidos nucleicos y proteínas de acuerdo a su tamaño y/o carga cuando se depositan en geles sometidos a un campo eléctrico intenso. Una técnica aplicable a organismos con cromosomas pequeños consiste en su separación mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE, del inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis). La PFGE es un tipo especializado de electroforesis que permite la separación de

moléculas de ADN muy largas. Se basa en la utilización de varios campos eléctricos oscilantes que están orientados en varias direcciones. Esto permite que las moléculas de ADN de gran tamaño migren a posiciones diferentes del gel según su tamaño. El cromosoma de interés puede identificarse utilizando una sonda específica de dicho cromosoma (Griffiths *et al.*, 2000). La visualización de los cromosomas de una especie, que a menudo se hace por electroforesis de campo pulsante, recibe el nombre de *cariotipo*.

La técnica de PFGE ha sido utilizada en pruebas de diagnóstico clínico para la identificación de levaduras patógenas del género *Candida* aisladas de pruebas clínicas en humanos (Monod *et al.*, 1990). Otros estudios muestran que esta técnica se ha utilizado para el análisis de diferenciación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter calcoaceticus* en pacientes con infecciones urinarias y ventilación mecánica, respectivamente (Vázquez *et al.*, 1991). La PFGE también puede ser utilizada en sistemas microbianos ya que provee información acerca del genoma. Esta técnica permite demostrar si el genoma se distribuye entre uno o varios cromosomas, así como el tamaño de los mismos (Maule, 1998). También se ha utilizado para la identificación de subespecies y cepas de levaduras con interés enológico. Estudios realizados en mosto muestran que el cariotipo permite distinguir entre diferentes especies del género *Saccharomyces* y otros géneros. El número de cromosomas encontrados en las poblaciones naturales de *S. cerevisiae* del mosto es sorprendentemente

elevado, lo que sugiere que sólo cepas muy próximas presentan el mismo cariotipo. Hay que decir que no es un fenómeno universal: las cepas de levadura “flor”, utilizadas para elaborar el vino de jerez, presentan cariotipos muy constantes. Si el estudio se limita a la levadura de la fermentación del mosto, este método (PFGE) permite reconocer el grado de parentesco entre cepas procedentes de diferentes instalaciones, independientemente de su morfología o de su comportamiento metabólico (Carro *et al.*, 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 SOD EN LEVADURAS MARINAS.

El estudio de *Debaryomyces hansenii* como fuente potencial para la obtención de la enzima SODC, surge de la observación de que esta enzima es producida por la levadura marina en cantidades superiores a las reportadas para otras levaduras. De acuerdo a trabajos previos, los niveles de SOD obtenidos a partir de levaduras convencionales como *S. cerevisiae* y *Candida polymorpha* son 16 veces menores que los niveles normales obtenidos de la levadura marina *D. hansenii* (cepa C11, Colección de Levaduras Marinas del CIBNOR). *D. hansenii* fué aislada de la Costa Pacífico de Baja California Sur a 50 m de profundidad (Hernández-Saavedra, 1990). Dadas sus particulares cualidades de halotolerancia, ya que puede desarrollarse a salinidades desde cero a 18% y su alta tasa específica de crecimiento (Hernández-Saavedra, 1992), además de su resistencia a altas concentraciones de dióxido de cloro y sus bajos requerimientos nutricionales (Ramírez-Orozco, 1998), esta cepa ha sido ampliamente estudiada para conocer la composición de su pared celular (Hernández-Saavedra, 1991), sus mecanismos de halotolerancia (Hernández-Saavedra, 1992, Hernández-Saavedra *et al.*, 1995) y para producir biomasa celular de alta calidad para la obtención de Cu,ZnSOD en un sistema de producción a escala intermedia en un medio que se prepara a base de agua de mar y es esterilizado químicamente (Ochoa *et al.*, 1995; Hernández-Saavedra, 1997; Ramírez-Orozco, 1998; Ramírez-Orozco *et al.*, 1998; Ramírez-Orozco *et al.*, 2001).

2.2 Cu,ZnSOD EN LEVADURAS MARINAS

Debido a las características particulares de la cepa y por su inusual producción de SODC, en 1997 se purificó y caracterizó la Cu,ZnSOD de *D. hansenii*, encontrándose que bajo condiciones normales de cultivo y en fase estacionaria temprana de crecimiento existen tres isoformas de la enzima (dos homodímeros y un heterodímero) (Figura 4) que han sido caracterizadas físicoquímica e inmunológicamente (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999).

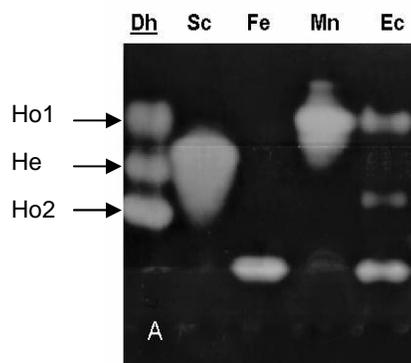


Figura 4. Perfil electroforético de actividad SOD en gel de poliacrilamida. Dh, SODC de *D. hansenii*; SC, SODC de *S. cerevisiae*; Fe, SODF de *E. coli*; Mn, SODM de *E. coli* y EC, extracto crudo de *E. coli*. Ho, homodímeros 1 y 2; He, heterodímero. Técnica de tinción: NBT. (Tomado de Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999)

Mediante técnicas de cromatografía líquida (Ornelas, 2002) se han logrado separar las tres isoformas (Figura 5); las dos principales formas de la enzima (homodímeros) mostraron diferencias significativas mediante análisis electroforéticos, actividad específica y composición de aminoácidos (Tabla II), resaltando que una de ellas (Dh SODC2), presenta una actividad específica comparable con las de preparaciones comerciales (~5,000 - 8,000 U/mg de proteína) mientras que la otra (Dh SODC1) es 300% más activa (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999)

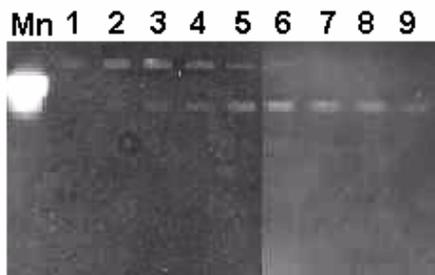


Figura 5. Perfil electroforético de actividad SOD en gel de poliacrilamida. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en filtración en gel. Líneas 1 y 2, Dh SODC1; líneas 3-6 Dh SODC1 y Dh SODC2; líneas 7-9 Dh SODC2. Técnica de tinción NBT. (Tomado de Ornelas, 2002).

Tabla II. Características de los dos tipos de Cu,ZnSOD en *D. hansenii*

Parámetro	Características
Actividad específica	
Cu,ZnSOD1	~17,000 U/mg de proteína
Cu,ZnSOD2	~8,000 U/mg de proteína
Principales diferencias en composición de aa	
Cu,ZnSOD1	6 His, 2 Tyr, 9 Leu, 13 Thr
Cu,ZnSOD2	3 His, 5 Tyr, 14 Leu, 7 Thr
Secuencia de aa de péptidos internos	
Cu,ZnSOD1	
aminoácidos 1-29	VQAVALRGDSKVSQVNVFEQSSSEDTT,
aminoácidos 116-128	TVVIHAGTDDLK
Cu,ZnSOD2	
aminoácidos 1-29	VKAVALRGDSNVSGVVRFEQTHESEPTK,
aminoácidos 116-128	TVVHAGTDDYK

La secuencia codificante del gen *dh sod1* fue clonada a partir de ARNm a través de la técnica de RT-PCR, usando primers degenerados diseñados a partir de las secuencias amino- y carboxilo-terminal de la SODC de *S. cerevisiae* (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra *et al.*, 1998). Mediante este procedimiento se obtuvieron dos clonas idénticas de 470 pb que codifican para una proteína de 153 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 15.9 kDa. La secuencia de aminoácidos deducida mostró un 70% de homología con la SODC de organismos como *S. cerevisiae* y *Neurospora crassa*, así como homologías menores (entre 55 y 65%) con las enzimas correspondientes de otros organismos eucariontes (Hernández-Saavedra *et al.*, 1998). Mediante la traducción de la secuencia de nucleótidos y su análisis, se concluyó que la secuencia clonada, *dh sod1*, corresponde a la forma superactiva de la enzima; la identificación se realizó mediante el análisis de la composición de aminoácidos (Hernández-Saavedra, 1997).

La presencia de tres bandas de actividad puede interpretarse como el resultado de la expresión de un gen con dos alelos o de dos genes. Dado que la presencia de dos isoformas de la SODC no es común en organismos eucariotas, pues solo se ha reportado en humanos (Edwards *et al.*, 1978) y en el parásito *Schistosoma mansoni* (Simurda *et al.*, 1988), y que una de las formas existentes en la levadura marina presenta características de actividad inusuales, Hernández-Saavedra y Romero-Geraldo (2001) clonaron las secuencias

codificantes de la SODC de varias especies marinas del genero *Debaryomyces*, tratando de explicar si las particularidades de las enzimas encontradas en *D. hansenii* C11 son propiedades intrínsecas de la cepa o son compartidas por otras especies marinas del genero. Estos autores reportaron pequeñas variaciones en las secuencias obtenidas, y mediante análisis de homología se encontraron niveles de identidad del 99% entre dos cepas de *D. hansenii* (C11 y C61) y del 85% entre otras especies pertenecientes al género (*D. vanriijiae* var *vanriijiae* y *D. vanriijiae* var *yarrowii*), formando un grupo compacto. El siguiente nivel de identidad (70%) se encontró con otros organismos fungi (*Candida albicans*, *N. crassa* y *S. cerevisiae*) que a su vez formaron un grupo compacto. En un trabajo reciente Hernández-Saavedra (2003) utilizando organismos tanto de origen marino como terrestre, pertenecientes a diferentes phylum: *Debaryomyces*, *Candida* y *Saccharomyces* (Ascomycota) y *Rhodotorula* y *Udeniomyces* (Basidiomycota), se encontró que todas las especies de origen marino (independientemente de su ubicación taxonómica) se asociaron en un solo grupo, independiente de aquellas especies de origen terrestre. La explicación a estos resultados considera el origen de aislamiento de las levaduras, y establece que la construcción de relojes moleculares a partir de la SODC no es aplicable aun dentro de linajes (como lo podrían representar las levaduras) ya que aparentemente en este tipo de organismos el ambiente ejerce una presión de selección en este gen en particular.

2.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA Cu,ZnSOD EN LEVADURAS

Aunque se conoce que en ausencia de un "estrés" oxidativo agudo la expresión del gen que codifica para la Cu,ZnSOD es constitutiva y directamente proporcional al número de copias existentes en un organismo (Medina, 1996), se ha comprobado que la sobre-expresión del gen se puede inducir en presencia de varios estímulos, como el paraquat (Warner, 1994), los metales divalentes (Galiazzo *et al.*, 1991; Gralla *et al.*, 1991; Ramírez-Serrano, 2003), el ditranol y la nitrofurantoina (Michels y Remacle, 1988; Michels *et al.*, 1994; Ramírez-Serrano, 2003), el oxígeno molecular (Greco *et al.*, 1990; Galiazzo *et al.*, 1988; Ramírez-Orozco *et al.*, 1998) y compuestos de cloro (Hernández-Saavedra, 1997; Ramírez-Orozco *et al.*, 2001; Ramírez-Serrano, 2003), observando en algunos casos la represión de la expresión del gen que codifica la MnSOD (Warner, 1994).

En general, se ha establecido que la expresión de las enzimas SODs depende de muchos factores. Se ha observado que un incremento en la actividad de la Cu,ZnSOD mejora la resistencia de las células hacia los efectos dañinos del ión superóxido y a las altas concentraciones de metales divalentes tales como el Cu^{+2} y el Zn^{+2} . Se ha reportado que el Cu^{+2} puede modular la expresión de la proteína a nivel transcripcional via *Ace1p*, que es un factor de transcripción que inicialmente se había descrito que unía el cobre y activaba el promotor CUP1 que codifica la cobretioneina (sistema de metalotioneinas

denominado CUP en levaduras y MT en eucariotas superiores). Las metalotioneínas son unas proteínas que secuestran, y por lo tanto, detoxifican a las células de iones cobre. En *S. cerevisiae* se han encontrado tres genes (CUP1, CRS4 y CRS5 -copper resistant suppressors-) que participan en la homeostasis celular del cobre. Al caracterizar estos genes, se encontró que el CRS4 corresponde (100% identidad) al gen SODC. El papel de la SODC en la homeostasis de cobre aparentemente no está relacionado con su capacidad para atrapar iones superóxido, ya que la enzima tiene un efecto protector contra el cobre aún en condiciones anaeróbicas, y las diferencias en la eficiencia de activación de la transcripción del gen SODC y el sistema CUP radica en que en el primero existe un solo sitio de unión en el promotor para el *Ace1p*, mientras que en el segundo se han observado dos o más (Birmingham-Mc Donogh *et al.*, 1988; Carri *et al.*, 1991). Estos datos más la inducción de ARNm de *sc sod* en presencia de AgNO_3 , sugieren un segundo papel para la SODC en levaduras; aparentemente la Cu,ZnSOD de *S. cerevisiae* puede funcionar también como quelador de metales (Ciriolo *et al.*, 1994).

Existen reportes que establecen, en términos generales, que la SODC de *D. hansenii* se comporta como indican los reportes para *S. cerevisiae* (expresión constitutiva e inducible en presencia de excesos de cobre). Sin embargo, en la levadura marina existe una expresión diferencial de las dos formas de SODC dependiendo del estímulo inductor. En 1997, Hernández-Saavedra reportó que

bajo condiciones normales de crecimiento (y en cultivos tratados con sales de cobre) en la fase estacionaria temprana se expresan en igual proporción las tres isoformas de la enzima en la levadura marina (Figura 4), mientras que en presencia de dióxido de cloro solo una de las formas está presente. Recientemente, Ramírez-Serrano (2003) realizando experimentos de inducción con diversas sales metálicas y sustancias pro-oxidantes, encontró expresión diferencial particularmente en el caso de la adición de sales de plata e hipoclorito de sodio. En sus estudios observó que las dos formas de la enzima no obedecen de igual manera a los estímulos mencionados. *S. cerevisiae* pierde la actividad de la SODC en presencia de plata por sustitución de los iones de cobre (Ciriolo *et al.*, 1994), en contraste, en *D. hansenii* solo una de las formas (Dh SODC1) se comporta de esta manera. La actividad de la Dh SODC2 permanece intacta, sugiriendo que su papel es básicamente antioxidante, dejando la doble función (antioxidante y secuestradora de iones metálicos) a la Dh SODC1 (Ramírez-Serrano, 2003). En el caso de células tratadas con sustancias cloradas (dióxido de cloro e hipoclorito de sodio) se encontró que la forma superactiva (Dh SODC1) es la que permanece, exhibiendo actividades de hasta 27,000 U/mg de proteína, lo que representa un 100% de incremento en actividad en comparación con la misma enzima (10,000 a 17,000 U/mg) obtenida bajo condiciones normales de cultivo (Hernández-Saavedra, 1997; Ramírez-Serrano, 2003). Finalmente, en estudios en los que se correlaciona la síntesis de la proteína a través de la cinética de crecimiento, Ramírez-Serrano (2003)

encontró que las dos formas de las SODC en *D. hansenii* se presentan en forma de homodímeros en la fase exponencial de crecimiento, apareciendo el heterodímero únicamente bajo condiciones de estrés por sales de cobre y como se había observado anteriormente (Hernández-Saavedra, 1997) en la fase estacionaria temprana de crecimiento.

3. HIPÓTESIS

En *D. hansenii* existen tres isoformas de la Cu,ZnSOD (producto de dos secuencias codificantes) que presentan regulación diferencial, por lo tanto se sugiere que estas proteínas están codificadas por genes diferentes (que no forman parte de un sistema alélico).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Clonar y secuenciar la Cu,ZnSOD2 en la levadura marina *D. hansenii*, y mapear ambas formas (*dh sod1* y *dh sod2*) en cromosomas.

4.2 Objetivos particulares

- Clonar la secuencia codificante de la Dh SODC2 mediante PCR utilizando primers degenerados, diseñados a partir de secuencias de aminoácidos obtenidos de la enzima purificada.
- Realizar un screening de la librería genómica de *D. hansenii* cepa C11, utilizando como sondas las secuencias codificantes *dh sod1* y *dh sod2* para obtener clonas que contengan información “río arriba” y “río abajo” de la secuencia codificante (porciones del promotor y de terminación).
- Mapear las secuencias codificantes *dh sod1* y *dh sod2* en cromosomas separados mediante electroforesis de campo pulsante (CHEF).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE *dh sod2*

Para la realización de este experimento se utilizaron iniciadores (primers u oligos) que fueron diseñados a partir de las secuencias de péptidos internos (Tabla III) obtenidas de la Cu,ZnSOD2 de *D. hansenii* purificada. En negritas subrayadas se indica la secuencia de aminoácidos considerada para el diseño de los primers. En la figura 6 se muestra el alineamiento de los péptidos internos de la Dh Cu,ZnSOD2 sobre la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de la *dh sod1* (AF016383, Hernández-Saavedra *et al.*, 1998).

Tabla III. Secuencia de aminoácidos de péptidos internos obtenidos mediante digestión con tripsina de las dos formas de Cu,ZnSOD de *D. hansenii* (Hernández-Saavedra, 1997).

CuZnSOD	Secuencia de aminoácidos de péptidos internos
Cu,ZnSOD1	VQAVAVLRGDSKVS GVVNFE QSS ESDPTT (1-29) SILGRT VVIHAGTDDLK (111-128)
Cu,ZnSOD2	VKAVAVLRGDSNVSGVVRFE QTHESE PTK, (1-29) SILAL TVVVHAGTDDYK (111-128)

En la tabla IV se muestra la secuencias de los primers utilizados para la clonación de la *dh sod2* mediante amplificación por PCR (4F y 42UD), así como los controles positivos (39UD y 42UD) que amplifican la *dh sod1* (Hernández-Saavedra, 1998).

Tabla IV. Secuencias de primers utilizados para la clonación de la *dh sod2* y la *dh sod1*, utilizada como control.

Oligonucleótidos	Secuencia	
4F	5' CAR-ACI-CAY-GAR-TCY-GAR-CC 3'	Forward
39 UD	5' ATG GTI CA (AG) GCI GTI GCI GTI TT 3'	Forward
42 UD	5' ITT IGT IAG ICC IAT IAC ICC ACA 3'	Reverse

```

GAATTCGGCTTATGGTGCAGGCGGTGGCGGTGTTAAGAGGTGATTCTAAGGTTAGCGGTG
1          M V Q A V A V L R G D S K V S G      61
          V K A V A V L R G D S N V S G
TCGTTAACTTCGAACAATCGTCAGAGTCTGACCCAATACTACTATTACATGGGAGATTTCTG
20 V V N F E Q S S E S D P T T I T W E I S    121
   V V R F E Q T H E S E P T K
GTAATGATGCTAATGCTTTAAGAGGTTCCACGTCCACACATTTGGTGATAACACCAACG
40 G N D A N A L R G F H V H T F G D N T N    181
   GTTGTACTTCTGCTGGACCTCACTTCAACCCGTTACAAAAGGAACATGGTGCTCCAGAAG
60 G C T S A G P H F N P F T K E H G A P E    241
   ACGATAACAGACATGTCGGTGATTTAGGTAACGTTACAACCTGATACTTCTGGTGTTGCTA
80 D D N R H V G D L G N V T T D T S G V A    301
   AGGGTTCTAAACAAGACTTATTCGTCAAGTTAATCGGTCAAAAATCCATTTTAGGTAGAA
100 K G S K Q D L F V K L I G Q N S I L G R    361
   CTGTTGTTATTACGCGCGGTACCGACGATTTAGGTAAGGGTGGTAATGCTGAATCTAAGA
120 T V V I H A G T D D L G K G G N A E S K    421
   T V V V H A G T D D Y G K
AGACCGGTAACGCTGGTGCTAGACTAGCCTGTGGCGTCATCGGCCTCACCAACTAAAGCC
140 K T G N A G A R L A C G V I G L T N *    481

```

Figura 6. Secuencia de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de las Cu,ZnSOD de *D. hansenii*. La secuencia de nucleótidos (AF016383) y su traducción (O42724) corresponden a la region codificante del gen *dh sod1*. En itálicas se muestran las secuencias de aminoácidos (P82902) de los peptidos internos obtenidos mediante digestión con tripsina de la Cu,ZnSOD2 de *D. hansenii*, que están alineadas en su localización correspondiente de acuerdo al análisis de homología. En negritas están indicados los cambios de aminoácidos en la Cu,ZnSOD2 (Tomado de Hernández y Rojas, 2003).

La estrategia de clonación consistió en el uso de ADN genómico como templado (purificado mediante un gradiente de sacarosa) para amplificar fragmentos específicos. Para la amplificación de la *dh sod2* se usaron los primers 4F y 42UD mientras que como control positivo se utilizaron los primers 39UD y 42UD que amplifican la *dh sod1*. La mezcla de reacción contenía 100 ng de ADN , 10 pM de cada oligo, 5 μ L de buffer PCR 10X, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua mili-Q esteril para tener un volumen final de 50 μ L. Finalmente se adicionaron 30 μ L de aceite mineral; las mezclas de reacción fueron amplificadas en un termociclador Techne-Cyclogene[®], con el programa citado en la Tabla V.

Tabla V. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia *dh sod2*.

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
95° C	5'	1
94° C	2'	
35° C	2'	5
72° C	3'	
94° C	1'	
40° C	2'	25
72° C	3'	
72° C	10'	1

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% y TBE (0.089 M tris base, 0.88 M ác. bórico, 0.5 M EDTA pH 8.0) preteñidos con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989), tomando 10 μL de cada reacción mezclándolos con 2 μL de buffer de carga LB (50% glicerol, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25% de azul de bromofenol). La electroforesis se desarrolló a 70V durante 60 minutos. Los resultados fueron documentados mediante el uso de un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc[®]). Con el producto amplificado, se procedió a realizar la clonación, que consistió en tomar 5 μL de producto de PCR, 1 μL (25 ng/ μL) de vector pCR 2.1 (mostrado en la Figura 7), 4 μL de buffer de ligación, 1 μL de T4 Ligasa (Invitrogen[®]) y 9 μL de agua destilada estéril. La reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

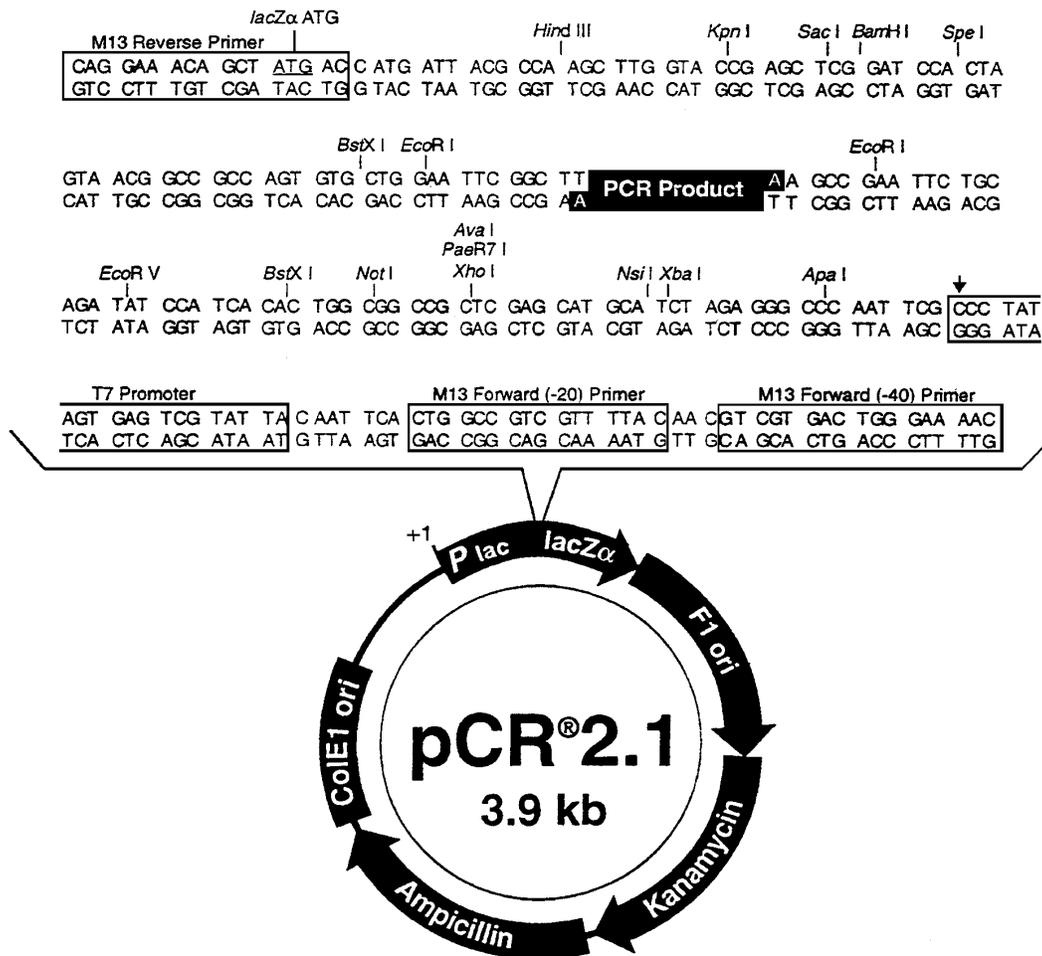


Figura 7. Vector de clonación pCR2.1. El producto de PCR insertado es flanqueado a cada lado por un sitio *EcoR I* (Original TA Cloning Kit, Invitrogen).

5.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR EL MÉTODO DE CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989)

Se inocularon 100 μ L bacterias (*E. coli* cepa INV α F') en 50 mL de medio LB (Apéndice 1). Se incubaron a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 20 horas. Con estas células (500 μ L) se inocularon 50 mL de LB. El cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 3 hrs.

Posteriormente las células se trasladaron a tubos estériles (Nalgene) previamente enfriados, estos se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos. Se cosecharon las células por centrifugación a 1,431xg, durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón (pellet) celular fue resuspendido en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M frío. Las células se cosecharon por centrifugación a 1,431xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el pellet celular fue resuspendido en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M frío. Nuevamente las células se mantuvieron en hielo, por un periodo no mayor a una hora.

5.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS. MÉTODO DE SHOCK TÉRMICO (Sambrook *et al.*, 1989).

A 100 µL de células competentes, se les agregó 5 µL de ligación y 2 µL de β-mercaptoetanol 0.5 M, se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se realizó un shock térmico a 42°C durante 30 segundos en un termoblock TropiCooler (Boekel®). Posteriormente los tubos se incubaron en hielo durante 2 minutos. Enseguida se adicionaron 250 µL de medio SOC (Apéndice 1) y se incubaron a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm, por una hora. Posteriormente la incubación los tubos se regresaron al hielo y las células finalmente se sembraron (200 µL de la transformación) en placas LB-ampicilina (50 mg/mL), que se incubaron a 37°C durante 18 horas.

5.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO. MÉTODO DE LÍISIS ALCALINA (Birboin y Doly, 1989).

Las colonias que crecieron en las placas LB-ampicilina se picaron con un palillo estéril y se inocularon 3 mL de medio LB con ampicilina (minipreps). Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 18 horas. Posteriormente, las células (1.5 mL) se recuperaron por centrifugación a 17,530xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 50 µL de solución I fría (0.5 M glucosa, 0.25 M tris HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0), agitándose en un vórtex e incubándose en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron 150 µL de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) mezclándose por inversión, incubando 5 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo. Se adicionaron 200 µL de solución III fría (3 M acetato de sodio, pH 5.2), se mezcló por inversión y los tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 17,530xg por 20 minutos a 4°C. Los 400 µL recuperados del sobrenadante fueron transferidos a tubos Eppendorf estériles. Se realizó una extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron a 17,530xg por 2 minutos a 4°C. La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN plasmídico se llevo a cabo adicionando dos volúmenes de etanol absoluto frío. Los tubos se incubaron a -20°C durante 2 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 17,530xg durante 20 minutos a 4°C; los pellets resultantes se lavaron con etanol al 70% preenfriado a -20°C,

se centrifugo nuevamente a 17530xg durante 10 minutos a 4°C. Los pellets se dejaron secar al aire, resuspendiéndose finalmente en 40 µL de buffer TE pH 7.5 (0.1 M Tris pH 7.6, 0.001 M EDTA pH 7.5) adicionándole 1 µL de ARNasa (1 µg/µL). Los tubos se incubaron en una estufa (VWR Scientific®) a 37°C por 1 hora. Se realizó una extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Posteriormente el ADN plasmídico se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman DU-6®) a 260 y 280nm de absorbancia. El ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% en TBE preteñidos con bromuro de etidio. Los resultados fueron documentados como se menciono anteriormente.

5.5 SECUENCIACIÓN

La secuencia de nucleótidos fue obtenida mediante secuenciación automática en un equipo ABI PRISM (Perkin Elmer®) en el laboratorio de Biología Molecular del CIBNOR, usando los primers M13 (forward y reverse) cuyas secuencias se encuentran en el vector. El análisis de secuencias se realizó mediante el uso del software DNAMAN y se confrontó mediante análisis Blast con las bases de datos mundiales (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

5.6 MARCADO DE SONDAS

Se utilizaron como sondas para el screening de la librería genómica de *D. hansenii*, las secuencias codificantes *dh sod1* (Hernández-Saavedra, 1997) y *dh sod2* (del presente trabajo); estas se marcaron con digoxigenina utilizando el Kit PCR DIG Probe Síntesis Kit (Boehringer Mannheim®).

Los 2 productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de TBE/agarosa al 1%, preteñido con bromuro de etidio. De cada reacción se tomaron 3 µL y se mezclaron con 1 µL de LB buffer de carga; la electroforesis se corrió en las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados fueron documentados como se menciona anteriormente. Finalmente, ambas sondas se purificaron mediante el uso del Rapid PCR Purification System (Life Technologies®).

5.6.1 Estimación de la sensibilidad y nivel de reconocimiento de las sondas marcadas

Para estimar la sensibilidad de las sondas *dh sod1* y *dh sod2* se realizaron diluciones en serie 1:10 – 1:10 000; las diluciones se desnaturalizaron durante 10 minutos a 95 °C y se enfriaron en hielo. De cada dilución se tomaron 2 µL y se colocaron en una membrana de nitrocelulosa, en la primer hilera se colocaron las diluciones de la sonda *dh sod2* marcada, en la segunda hilera el amplificado sin marcar 4F-42UD (*dh sod2*) y en una tercer hilera el amplificado sin marcar 39UD-42UD (*dh sod1*) (Figura 8). Se hizo una segunda

membrana con la sonda *dh sod1* en la primer hilera se colocaron las diluciones con la sonda marcada, en la segunda hilera el amplificado sin marcar 39UD-42UD y en una tercer hilera el amplificado sin marcar 4F-42UD. Finalmente los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana con luz ultravioleta en un HibryLinker HL 2000[®] (UVP).

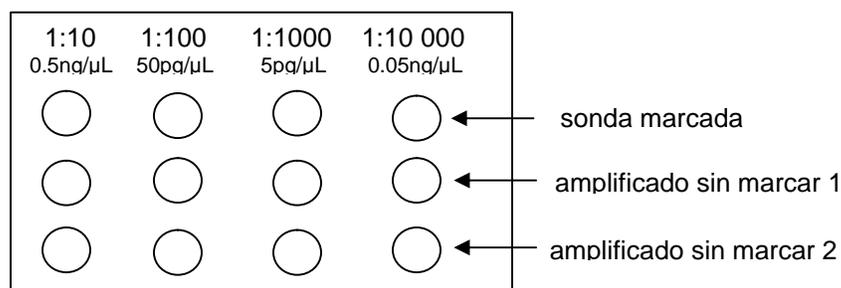


Figura 8. Diluciones seriales para el marcado de las sondas *dh sod1* y *dh sod2* marcadas.

5.7 HIBRIDACION

5.7.1 Pre-hibridación

Las membranas se colocaron en botellas de hibridación adicionando 1 ml de solución de prehibridación (5X SSC, 1% reactivo de bloqueo -ROCHE-, 0.1% sarcosil, 0.1% NaCl, 0.02% SDS) por cada 10 cm² de membrana, la prehibridación se llevó a cabo en un HibryLinker HL 2000[®] (UVP) a 60°C durante tres horas.

5.7.2 Hibridación

La sonda marcada con digoxigenina se desnaturalizó 10 minutos en agua hirviendo, inmediatamente después se enfrió en un baño con hielo y se agregó en solución de pre-hibridación nueva. La hibridación se llevó a cabo a 60°C durante 16 horas. Transcurrida la hibridación se recuperó la solución y la membrana se lavó dos veces; cada lavado se realizó durante 5 minutos en 5 mL de solución de lavado (2X SSC, 0.1% SDS) a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados más (0.1X SSC, 0.1% SDS) por 15 minutos a temperatura ambiente.

5.7.3 Detección Inmunológica

La membrana fue bloqueada con 5 mL de solución de bloqueo (1% reactivo de bloqueo y se agregó el anticuerpo anti-Dig conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim®) diluyéndolo 1:1000 para obtener una concentración de 150 mU/mL, se incubó durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente, se retiró la solución y se lavó la membrana un par de veces, cada lavado (de 15 minutos) se hizo con 5 mL de solución de lavado (0.1 M ác. maleico, 0.15 M NaCl pH 7.5/0.3% Tween 20). Una vez realizados los lavados, la membrana se equilibró en buffer de detección (0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 mM NaCl, 0.5 M MgCl₂) durante dos minutos. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se agregó la solución de detección

con el sustrato cromogénico el cual contenía: 45 μ L de nitroazul de tetrazolium (NBT 75mg/mL) y 35 μ L de 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato p-toluidina (BCIP 50mg/mL) en 10 mL de buffer. La membrana se incubó en obscuridad a temperatura ambiente hasta el desarrollo del color. Una vez que se observó la marca deseada, la membrana se lavó con agua destilada para detener la reacción. Finalmente, la membrana se secó entre dos hojas de papel 3M y se documentó mediante el uso de un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc[®]).

5.8 TITULACIÓN DE LA LIBRERÍA GENÓMICA

La librería en la cual se realizó el screening en el presente trabajo fue construida con fragmentos de ADN genómico de 2-4 kb (generados mediante digestión parcial con *Sau* 3AI) ligados en el sitio *Bam* HI del vector λ ZAP, usando como hospedero la cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF' (Hernández-Saavedra, 1997). Se tomaron 5 μ L de la librería y se llevaron a 500 μ L con buffer SM estéril (0.09 M NaCl₂, 0.016 M MgSO₄, 1 M tris-HCL pH 7.5, 2% de gelatina). Se tomaron 100 μ L de la dilución y se mezclaron con 900 μ L de células XL1 Blue MRF' en fase exponencial crecidas en medio NYZM (SIGMA) con 0.2% maltosa y sulfato de magnesio 0.1 M para expresar los receptores de superficie (Apéndice 1). Las células, junto con el fago, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se pasaron a una incubadora a 37°C durante 30 minutos. A cada tubo se le agregaron 4 mL de

TOP agarosa equilibrada a 50°C; la mezcla de células-agarosa se vació a modo de overlay sobre placas de medio NYZM de 100 x 15 mm y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se contó el número de placas líticas presentes en cada caja.

5.8.1 Transferencia a membranas de Nitrocelulosa

Para llevar acabo la transferencia del ADN de las placas líticas a membranas de nitrocelulosa, las cajas petri se enfriaron a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, en cada caja petri se colocó una membrana de nitrocelulosa (evitando la formación de burbujas) durante 3 minutos, para posteriormente retirarla y colocarla en una solución desnaturalizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) durante 5 minutos. Enseguida, la membrana se colocó en solución neutralizante (0.5 M Tris, 1.5 M NaCl) durante 3 minutos. Las membranas se dejaron secar al aire durante una hora, y el ADN se fijó a las membranas mediante irradiación UV. La manipulación posterior de las membranas (pre-hibridación, hibridación y detección inmunológica) se realizó de acuerdo a lo mencionado en los puntos 5.6.1 a 5.6.3.

5.9 RE-INFECCIÓN

Los clones positivos se seleccionaron recuperando las placas líticas de las cajas petri originales (utilizando una jeringa de insulina como nucleador a la cual previamente se le cortó la parte superior) y se incubaron en solución SM

estéril para la liberación de los fagos. Se tomaron 100 μ L de la suspensión de partículas virales y se infectó la cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF'. Posteriormente, se realizó el tamizado como se describió anteriormente. Este procedimiento se realizó 2 veces hasta obtener placas líticas aisladas.

5.9.1 Excision *in vivo* utilizando el sistema EXASSIST/XLOR

En 50 mL de medio LB se inocularon por separado las cepas de *E. coli* XL1-Blue MRF' y XLOR, incubándose a 30°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante toda la noche. Estas células (500 μ L) se inocularon 50 mL de medio LB, y el cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 3 horas hasta alcanzar la tasa máxima de crecimiento exponencial ($OD_{600}=0.5$). Posteriormente las células de *E. coli* XL1-Blue MRF' se transfirieron a tubos estériles (Nalgene) de 50 mL. Las células se cosecharon por centrifugación a 4,000xg durante 20 minutos a 27°C. El sobrenadante se decantó y el pellet resultante se resuspendió en 0.1 mM $MgSO_4$ hasta tener una $OD=1.0$.

En tubos estériles de 14 mL se mezclaron 200 μ L de células (XL1-Blue-MRF $OD=1.0$), 250 μ L del stock del fago (1×10^5 partículas virales) y 1 μ L del fago ayudador ExAssist (1×10^6 pfu/mL). La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, posteriormente se adicionaron 3 mL de medio LB y se incubó durante toda la noche con agitación orbital constante a 225 rpm y 37°C. Transcurrida la incubación los tubos se calentaron a 70°C durante 15 minutos, posteriormente

se centrifugaron a 4,000xg durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó en tubos estériles, este stock contiene plasmido pBK-CMV que está contenido en el genoma del fago λ ZAP, en el que fue construida la librería (Hernández-Saavedra, 1997).

En tubos de 1.5 mL se adicionaron 200 μ L de un cultivo fresco de *E. coli* XLOR ($OD_{600}=1.0$) y 100 μ L del stock del fago. Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 minutos, posteriormente se adicionaron 300 μ L de LB y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Finalmente se plaquearon 200 μ L de la transformación en placas LB-kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El tamaño de los insertos se determinó mediante análisis de restricción con la enzima *Eco RI*. La secuenciación de los insertos se llevó a cabo mediante secuenciación automática en el laboratorio de Biología Molecular del CIBNOR, usando el primer T7 cuya secuencia se encuentra en el vector. Los análisis de las secuencias se realizaron mediante el uso del software DNAMAN y se confrontaron mediante análisis Blast con las bases de datos mundiales.

5.10 MAPEO DE GENES

5.10.1 Preparación de Protoplastos (Sambrook *et al.*, 1989)

En 50 mL de medio YPD (Apéndice 1), fue inoculada la levadura *D. hansenii*, de igual manera se preparó un cultivo con la levadura *S. cerevisiae* (utilizada como control), ambos cultivos se mantuvieron en agitación orbital constante a 100 rpm y 30°C hasta obtener una densidad celular de 2×10^8 cel/mL

(aprox. 48 horas). Se cosecharon las células por centrifugación a 4,000xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el pellet celular se lavó con 10 mL de EDTA 0.05 M pH 8.0 y se centrifugó a 8,050xg durante 10 minutos a 4°C. Finalmente el pellet celular se resuspendió en 1 mL de EDTA 0.05 M pH 8.0; se realizó una dilución 1:50 para obtener 1×10^9 cel/ μ L.

5.10.2 Preparación de cilindros “Plugs” (células embebidas en agarosa)

De la dilución se tomaron 250 μ L (25×10^{10} células) y se adicionaron 400 μ L de la solución (EDTA 0.125 M pH 8.0, 2% de agarosa de bajo punto de fusión LMP, BIORAD®) en tubos eppendorf de 2 mL. Finalmente los tubos se incubaron en hielo hasta que los plugs gelificaron completamente.

5.10.3 Lisis de células *in situ*

Los plugs se incubaron a 65°C durante 8 horas con 10 mL de buffer NDS (0.1 M tris, 0.5 M EDTA, 1% sarcosil pH 9.5) y 10 μ L de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (75mg/mL, SIGMA®). Posteriormente el NDS se decantó y los plugs se incubaron en 10 mL de NDSU (0.1 M tris, 0.5 M EDTA, 1% sarcosil, 4 M urea pH 9.5) durante 72 horas a 50°C (haciendo 6 recambios de 10 mL cada uno). El NDSU se decantó y se agregaron 10 mL de NDS y 10 μ L de enzimas líticas de *T. harzianum* incubando durante 8 horas a 65°C. Finalmente el NDS se desechó y los plugs se guardaron a 4°C en 35 vol de NDS.

5.10.4 Electroforésis

Los plugs obtenidos fueron seccionados en fragmentos de aproximadamente 3 mm que se colocaron en un gel de agarosa CHEF (SIGMA[®]) al 1% en TBE 0.5 X. La electroforésis se llevo a cabo en un sistema CHEF DR II (BIORAD[®]) bajo las siguientes condiciones: 12-14°C, 6V/cm, tiempos de pulso de 90-120 segundos, con un coeficiente de electrodo constante de 120° durante 24 hr. El gel se tiño con una solución de bromuro de etidio (1µg/mL) durante 30 minutos en agitación constante y posteriormente se lavo durante 10 minutos con agua destilada. Los resultados fueron documentados mediante el uso de un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc[®]).

6. RESULTADOS

6.1 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE *dh sod2*

La segunda forma de la SODC de *D. hansenii* (*dh sod2*) se clonó, utilizando primers degenerados (Tabla III). Después de realizar el PCR se obtuvo un producto de ~420pb (Figura 9, carril 1). Los carriles 2 y 3 muestran los controles positivos usando los primers 39UD-42UD específicos para la *dh sod1*.

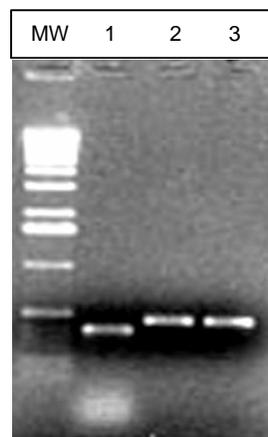


Figura 9. Productos de PCR utilizando los primers 4F-UD42 (carril 1) y UD39-UD42 (carriles 2 y 3).

El producto de amplificación, se clonó en el vector pCR 2.1 para su posterior manipulación en forma de plásmido (Figura 10). La secuencia de nucleótidos obtenida mediante secuenciación automática (Figura 11) fue confrontada con los bancos de datos mundiales utilizando el programa Blast, identificándose como una Cu,ZnSOD citosólica. La secuencia de nucleótidos de

la *dh sod2* fue ingresada al banco de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) quedando registrada con la clave de acceso AY116213 (Hernández-Saavedra y Rojas, 2003).

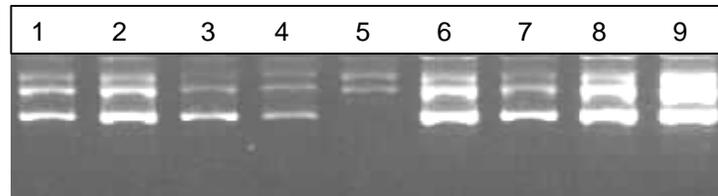


Figura 10. ADN plasmídico recombinante obtenido por el método de lisis alcalina.

```

1  GAATTCGGCTCAGACGCACGAGTCCGAGCCAACCACTGTCTCTAGCGAGATCGCTGGTAA
1      Q T H E S E P T T V S S E I A G N
61  CAGTCCTAACGCAGAACGTGGGTTCACATTCATGAGTTTGGAGATGCCACCAATGGTTG
18   S P N A E R G F H I H E F G D A T N G C
121 TGTCTCTGCTGGTCCTCACTTCAATCCTTTCAAGAAGACACATGGTGCTCCTCAACTGACGA
38   V S A G P H F N P F K K T H G A P T D E
181 AGTCAGACATGTCCGTGACATGGGTAACGTAAAGACGGACGAAAATGGTGTGGCCAAGGG
58   V R H V G D M G N V K T D E N G V A K G
241 CTCCTTCAAGGACTCTTTGATCAAGCTTATCGGTCCTACCTCCGTTGTAGGCAGAAGCGT
78   S F K D S L I K L I G P T S V V G R S V
301 CGTTATCCACGCCGGCCAAGATGACTTAGGTAAGGGTGACACTGAAGAATCTTTGAAGAC
98   V I H A G Q D D L G K G D T E E S L K T
361 TGGTAATGCCGGTCCAAGACCAGCCTGTGGCGTCATCGGCCTCACCAACAAGCCGAATTC
118  G N A G P R P A C G V I G L T N

```

Figura 11. Secuencia de nucleótidos de la *dh sod2* de *D. hansenii* y secuencia deducida de aminoácidos

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la traducción de la secuencia de nucleótidos (Figura 11) presentó un 97% de homología con la SODC de *S. cerevisiae* (Swiss Prot P00445), mientras que comparada con la secuencia *dh sod1* de *D. hansenii* cepa C11 la homología encontrada fue del 69% (Swiss Prot 042724).

El análisis de homología mostró la misma tendencia al compararse con otras especies de levaduras marinas del mismo género y otras relacionadas, segregándose en dos grupos principales: marinas y terrestres, siendo en este último donde se agrupó la *dh sod2*. La homología con otras especies del mismo género y otras relacionadas se muestra en la Figura 12 (*D. hansenii* cepa C61, Gen Bank AAK82335; *D. vanriijiae* var. *yarrowi* cepa A7, Gen Bank AAK82336; *D. vanriijiae* var. *vanriijiae* cepa 020, Gen Bank AAL24455 y *Schizosaccharomyces pombe*, Swiss Prot P28758).

La construcción completa de la secuencia de aminoácidos se realizó usando los 20 residuos del extremo N-terminal (Figura 13) obtenidos de la secuenciación de péptidos internos (Tabla II). La figura 13 muestra (como resultado de la traducción) que la proteína hipotética contiene la información necesaria para producir una proteína funcional. Los residuos relacionados con la unión a metales H46, H48, H63 y H120 para la unión al cobre y H63, H71, H80 y D83 para la unión al zinc, así como las C57 y C146 que estabilizan la estructura terciaria, y el R143 que guía al ión superóxido al sitio activo para la

reacción de dismutación (Parker *et al.*, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1999), se encuentran en las posiciones correspondientes (por análisis de homología).

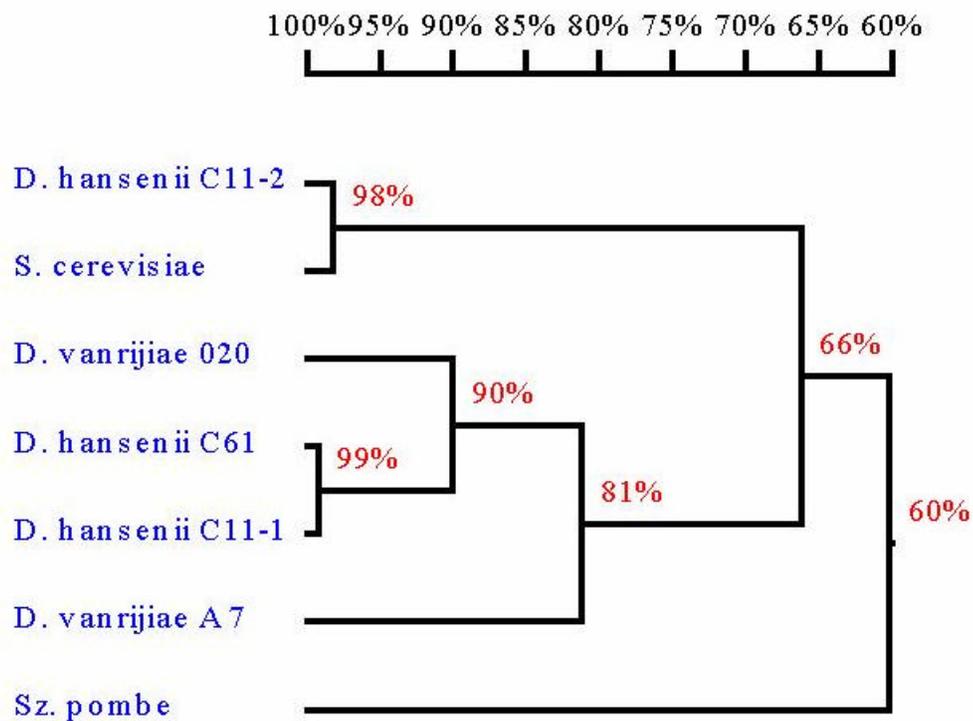


Figura 12. Representación gráfica de las relaciones de homología (%) de las secuencias de aminoácidos de las Cu,ZnSOD de levaduras marinas del género *Debaryomyces* y otros organismos fungi (*S. cerevisiae* y *Sz. pombe*) reportadas en los bancos de datos. El árbol de homología fue construido mediante una matriz de distancia, usando el método de ligamiento UPGMA. El número en las ramas es el porcentaje de homología entre las secuencias consideradas.

```

1           V K A V A V L R G D S N V S G V V
•  GAATTGGGCTCAGACGCACGAGTCCGAGCCAACCACTGTCTCTAGCGAGATCGCTGGTAA
18  R F E Q T H E S E P T T V S S E I A G N
61  CAGTCCTAACGCAGAACGTGGGTTCCACATTCATGAGTTTGGAGATGCCACCAATGGTTG
38  S P N A E R G F H I H E F G D A T N G C
121 TGTCTCTGCTGGTCCTCACTTCAATCCTTTCAAGAAGACACATGGTGCTCCAACCTGACGA
58  V S A G P H F N P F K K T H G A P T D E
181 AGTCAGACATGTCGGTGACATGGGTAACGTAAAGACGGACGAAAATGGTGTGGCCAAGGG
78  V R H V G D M G N V K T D E N G V A K G
241 CTCCTTCAAGGACTCTTTGATCAAGCTTATCGGTCCTACCTCCGTTGTAGGCAGAAAGCGT
98  S F K D S L I K L I G P T S V V G R S V
301 CGTTATCCACGCCGGCCAAGATGACTTAGGTAAGGGTGACACTGAAGAATCTTTGAAGAC
118 V I H A G Q D D L G K G D T E E S L K T
361 TGGTAATGCCGGTCCAAGACCAGCCTGTGGCGTCATCGGCCTCACCAACAAGCCGAATTC
138 G N A G P R P A C G V I G L T N

```

Figura 13. Secuencia parcial de nucleótidos (420 pb) de la región codificante del gen *dh sod2* de *D. hansenii* y su correspondiente secuencia teórica de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos fue construida al adicionar a la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína purificada (subrayado). Las itálicas muestran los 6 residuos de aminoácidos usados para el diseño del oligo 4F. Las negritas señalan los aminoácidos involucrados en el mantenimiento de la estructura y función de la proteína. En los extremos de la secuencia e nucleótidos 5' y 3' se indica en itálicas el sitio *EcoRI* que liga el inserto al vector de clonación usado (pCR 2.1).

6.2 MARCADO DE SONDAS

Se llevo a cabo el marcado de las sondas *dh sod1* y *dh sod2* utilizando el PCR DIG Probe Sintesis Kit[®]. En la figura 14, los carriles 1 y 3 corresponden al producto de PCR (sin marca) usando la mezcla de oligos 4F-UD42 y UD39-UD42 respectivamente, mientras que en los carriles 2 y 4 se observa el producto marcado usando la mezcla de oligos 4F-UD42 y UD39-UD42. Debido a la múltiple incorporación de Dig-dUTP durante el proceso de PCR el peso molecular del producto amplificado se incrementa significativamente comparado con el producto no marcado.



Figura 14. Productos de PCR normales (carriles 1 y 3) y marcados (carriles 2 y 4) con digoxigenina.

6.3 SENSIBILIDAD Y NIVEL DE RECONOCIMIENTO A TEMPLADOS ESPECÍFICOS DE LA Sonda MARCADA

En la figura 15 se muestra el resultado de la estimación de la sensibilidad del marcado de la sonda utilizando el PCR DIG Probe Sintesis Kit[®]. Como se puede observar, en la dilución 1:10 (0.5ng/μL) la intensidad de la marca es mayor, mientras que en el resto de las diluciones la intensidad de la marca se ve disminuida y en algunas tiende a desaparecer (Figura 15, línea 1), por tal razón se optó por trabajar con la primer dilución ya que contiene la cantidad necesaria de sonda para realizar el screening de la sub-librería genómica. Por otra parte cabe mencionar que la sonda marcada para la *dh sod2* reconoce ambas formas (Figura 15 B líneas 2 y 3), sin embargo, la intensidad de la marca en la *dh sod1* se ve disminuida (Figura 15 A líneas 2 y 3).

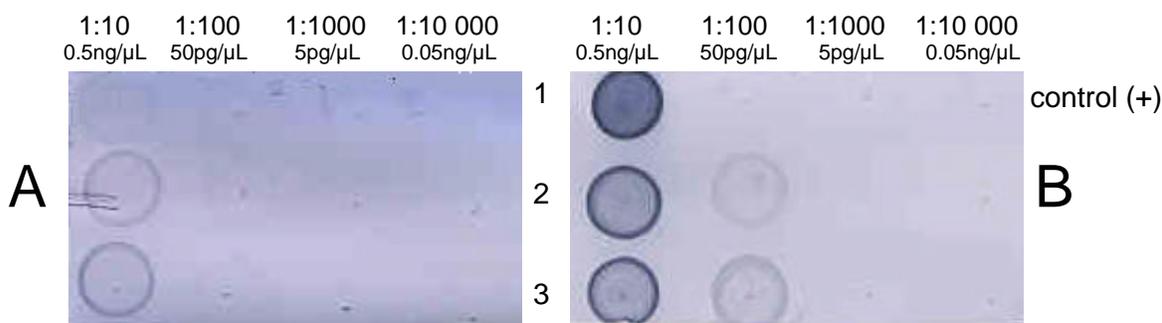


Figura 15. Membrana de nitrocelulosa con diluciones seriales de las sondas marcadas (A) *dh sod1* y (B) *dh sod2* marcadas con digoxigenina.

6.4 SUB-TITULACIÓN DE LA LIBRERÍA GENÓMICA DE *D. hansennii*

Mediante la titulación de la librería genómica de *D. hansennii* se encontró un título de 2.3×10^3 UFP/ μ l, por lo que considerando el tamaño del genoma de otras levaduras como referencia (*Sz. pombe*, 20, 000 kb), el número mínimo de recombinantes analizado fue de 5.5×10^4 que representa ~3.6 veces el genoma completo de *D. hansneii*. Los cálculos se realizaron utilizando la fórmula:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1 - 1/n)$$

En donde **N** es el número de recombinantes independientes a analizar, **P** es la probabilidad de incluir cualquier secuencia (0.95) y **n** es el tamaño del genoma en relación a los fragmentos simples aislados ($20,000 \text{ kb} / 4 \text{ kb} = 5 \times 10^3$), entonces:

$$N = \ln(1 - 0.95) / \ln(1 - 1/5 \times 10^3)$$

$$\mathbf{N = 14.97 \times 10^3 \text{ recombinantes}}$$

En el primer tamizado de la librería se colocaron 1,833 UFP por cada placa petri de 10 mm, encontrándose un promedio de 20 placas líticas positivas por membrana. Con las placas líticas positivas se realizaron re-infecciones para obtener placas líticas aisladas, encontrándose verificadas alrededor de 70 clonas positivas (sólo se tomaron las eran completamente redondas) (Figura 16).

Con las placas líticas positivas se realizó el experimento de exsición *in vivo* para obtener el plásmido recombinante (pBK-CMV + inserto) sin el resto del genoma del fago λ . El tamaño de los insertos se estimó mediante linearización del plásmido por digestión con la enzima *EcoRI*, obteniéndose que el tamaño promedio de los insertos fué de 1,000 pb.

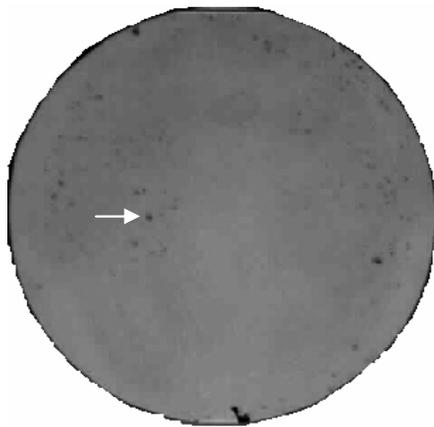


Figura 16. Placas líticas positivas obtenidas del screening de la librería genómica de *D. hansenii*.

Los plasmidos recombinantes seleccionados se purificaron para secuenciarse planteandose para esto último dos estrategias: 1) utilizando los primers del plásmido (T3 y T7) y 2) oligos internos diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida por secuenciación que corresponde al péptido **QTHESE** (en formato reverse). La primera estrategia fue utilizada obteniéndose dos secuencias de 656 y 660 bases (Apéndice 2), correspondiendo una al vector y otra con homología a secuencias del cromosoma VII de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en las secuencias obtenidas no se pudieron reconocer los sitios consenso del promotor de las *sod1*, como lo son

la caja TATA y la secuencia de unión al factor de transcripción *Acep1* 5' TTTGCTG 3'.

6.5 CARIOTIPOS

En la figura 17 se observa el patrón obtenido mediante electroforesis de campo pulsante en el sistema CHEFF DR II, el carril 1 corresponde al patrón electroforético comercial de *S. cerevisiae* (BIORAD), los carriles 2-6 muestran el patrón obtenido de células cultivadas de *S. cerevisiae* usadas como control, mientras que los carriles 7-11 corresponden a *D. hansenii*; el carril 12 muestra al marcador de peso molecular Pulsed Marker 225-2,200 kb (SIGMA). De acuerdo a estos resultados, se puede decir que los cromosomas presentes en *D. hansenii* son pequeños ya que se observó bandeo en las muestras por debajo de las 750 kb (Figura 16, carriles 7-11), por lo que se ajustó la concentración del gel, las condiciones de pulso y el tiempo de corrimiento para retener estas moléculas pequeñas. Al realizar las modificaciones en el programa de separación mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE) se logró obtener una zona no definida de cromosomas pequeños que bandean alrededor de 450 y 610 kb (Figura 18 A), uno de los cuales hibridó la sonda *dh sod2* marcada con digoxigenina (Figura 18 B).

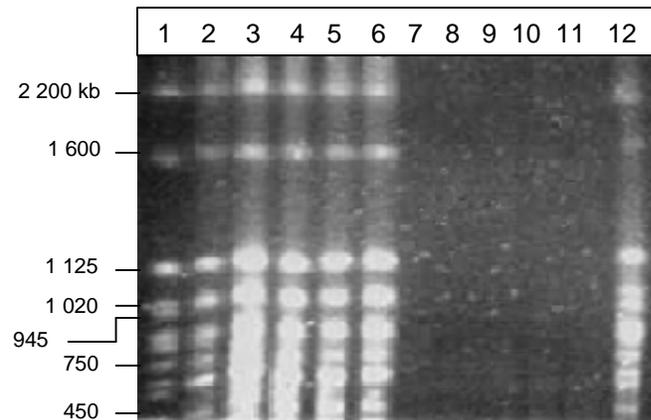


Figura 17. Patrón electroforético de *S. cerevisiae* (carriles 2-6) y *D. hansenii* (carriles 7-11) obtenido mediante electroforésis de campo pulsante en el sistema CHEFF DR II.

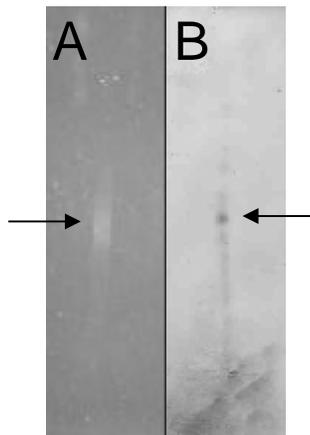


Figura 18. Mapeo cromosómico. (A) Patrón electroforético de ADN intacto obtenido mediante PFGE (B). Membrana de nitrocelulosa en la que se observa la señal obtenida mediante la hibridación con la sonda marcada con digoxigenina.

7. DISCUSIÓN

El metabolismo y las propiedades genéticas de los microorganismos, particularmente el de las bacterias, son semejantes a los de las plantas y animales. Por tanto los conocimientos adquiridos con ellas son directamente aplicables a las formas de vida superior, por ende los microorganismos son especialmente apropiados para la investigación experimental (Ingraham, 1998).

Una de las nuevas áreas, más excitantes, de la microbiología es la biotecnología. En sentido amplio, la biotecnología contempla el uso de microorganismos en procesos industriales a gran escala, pero hoy en día se entiende por biotecnología la aplicación de procedimientos genéticos para crear nuevos microorganismos capaces de sintetizar productos específicos. La biotecnología depende en gran medida de la ingeniería genética, una disciplina que se centra en la manipulación de genes y sus productos, resultando incluso posible la creación de genes completos. Una vez que el gen se ha seleccionado o creado, puede insertarse en un microorganismo donde se reproducirá y fabricará el producto génico deseado (Madigan, 1999). El aislamiento de un gen permite la determinación de su secuencia nucleotídica. A partir de esta información pueden establecerse los rasgos característicos de un gen: por ejemplo el número de intrones y su posición. La comparación entre las secuencias de ADN (o genes) de diferentes especies puede proporcionar información sobre su evolución. Mediante la conversión de la secuencia de nucleótidos en secuencias de aminoácidos dictada por el código genético

puede determinarse directamente la estructura del producto protéico de un gen y, a partir de estos datos, se puede inferir su función (Griffths *et al.*, 200).

Con este tipo de técnicas ha sido posible clonar segmentos o aún genes completos que permiten no únicamente la producción de moléculas recombinantes, sino lo que es más importante, la creación de herramientas moleculares que son pieza clave para el estudio de fenómenos (o procesos) implicados en el metabolismo normal de una célula, o aquellas respuestas específicas a condiciones ambientales cambiantes.

Mucho se ha comentado acerca de la verdadera existencia de levaduras marinas, aunque solo se han reportado dos especies marinas obligadas *Metschnikowia zobellii* y *M. krissii* (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979; Hernández-Saavedra, 1990), el término se acepta en general para levaduras halotolerantes que son capaces de construir poblaciones en ambientes marinos. De hecho, como resultado del estudio de muchos organismos de origen marino (desde bacterias y microalgas unicelulares hasta procordados y vertebrados) se ha planteado la hipótesis de que presencia de la enzima Cu,ZnSOD (SODC) en organismos aerobios es el resultado del paso del medio marino al terrestre, ya que en organismos estrictamente marinos (que teóricamente nunca han abandonado el medio marino en su historia evolutiva) solo están presentes las formas Fe,SOD y/o Mn,SOD (Brouwer y Brouwer, 1998). Bajo este marco, se puede considerar que las levaduras marinas salieron del medio marino, invadiendo el medio terrestre y posteriormente regresaron al mar. Aunque se

habían reportado especies de levaduras del género *Rhodotorula* en las que no se observaba actividad SODC (Moore *et al.*, 1989), recientemente se estableció que la ausencia de la enzima en especies de este género se debe a que el gen que codifica la enzima contiene mutaciones puntuales que generan codones de parada prematura, y más aún, la información parcial legible de estos genes no se transcribe (Hernández-Saavedra, 2003). Antes del trabajo mencionado, la creencia generalizada era que las levaduras pigmentadas no contenían SODC, sin embargo, Hernández-Saavedra (2003) estableció que la presencia de la enzima está en función del tipo y cantidad de pigmentos en las células, pues levaduras pigmentadas como *Udeniomyces puniceus* presentan ambos, enzima y pigmentos, aunque éstos últimos en menor proporción que en *Rhodotorula*. De esta forma, la cantidad y tipo de pigmentos presentes en *Rhodotorula* complementaron funcionalmente el gen mutado, permitiéndole sobrevivir como especie, sin la síntesis de SODC. En estudios recientes que incluyen secuencias de la SODC de levaduras tanto de origen marino como terrestre, se ha encontrado una asociación de especies marinas independientemente de su ubicación taxonómica. Los resultados apuntan a una selección dada por el ambiente marino (Hernández-Saavedra y Romero-Geraldo, 2001; Hernández-Saavedra, 2003) que aún en este momento no puede atribuirse a un factor en particular. El hecho de que *D. hansenii* cepa C11 presente dos formas funcionales de la SODC, y que la regulación de ambas formas sea diferencial (Hernández-Saavedra 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999; Ramírez-

Serrano, 2003), hace que el planteamiento del origen génico o alélico de estas formas así como su función sean importantes, no solo por curiosidad científica, sino por las implicaciones adaptativas que pueden resumir éstos hechos. Como primer paso para resolver éstas interrogantes está la clonación de la secuencia codificante de la segunda forma de la SODC en *D. hansenii* C11 (*dh sod2*) reportada en el presente trabajo. La clonación de la *dh sod2* se realizó utilizando oligonucleotídeos específicos para la Dh SODC2 diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de péptidos internos obtenidos mediante digestión con tripsina de la SOD purificada. Fue obtenido un producto de ~420 pb (*dh sod2*) y, mediante análisis de secuencia, se encontró que presenta una homología del 97% con la secuencia correspondiente *sc sod1* de *S. cerevisiae* (P00445) y sólo un 69% de homología con la *dh sod1* de *D. hansenii* (O42724). El árbol de homología construido con secuencias *sod1* de otras levaduras (marinas y terrestres) mostró la misma tendencia reportada previamente (Hernández-Saavedra, 2003): la formación de dos grupos principales, uno constituido por levaduras de origen marino y otro en el que se incluyen las levaduras terrestres. Sin embargo, en este árbol (Figura 12), la *dh sod2* que codifica la segunda forma de Dh SODC en *D. hansenii* se asoció con aquellas secuencias de origen terrestre. En el análisis de homología *Sz. pombe* formó un grupo aislado de los demás, lo que es congruente con los reportes que establecen, mediante el reciente desarrollo de estudios taxonómicos y evolutivos, que esta levadura pertenece a la Clase Archiascomycetes, Orden

Schizosaccharomycetales, Familia Schizosaccharomycetaceae (Kurtzman, 1999). Por otro lado, los géneros *Saccharomyces* y *Debaryomyces* se clasifican dentro de la Clase Hemiascomycetes, Orden Saccharomycetales, lo cual se refleja en el grado de homología con las especies de éstos géneros (66%). El grado de homología entre las cepas de *D. hansenii* es muy alto (99%), mientras que con otras especies marinas del género van desde el 81% hasta el 90% (*D. vanriijiae* var *yarrowii* A7 y *D. vanriijiae* var *varijiae* 020, respectivamente). Por otra parte, *D. hansenii* C11 (Dh SODC2) y *S. cerevisiae* se ligan formando un grupo independiente (terrestre) con un 98% de homología, el cual se une al grupo de *Debaryomyces* en un 66%. La unión de las ramas marina y terrestre con *Sz. pombe* ocurre a un nivel de homología del 60%, sin embargo, la asociación de los grupos que se observó en este análisis es diferente a lo propuesto por la taxonomía tradicional (Kreger-van Rij, 1987).

La secuencia de nucleótidos clonada (*dh sod2*) codifica para un fragmento de 133 aminoácidos que corresponden (por homología) a los aminoácidos 21 a 153 de la Dh SODC1. La secuencia de aminoácidos completa se construyó adicionando a la secuencia traducida de aminoácidos, los primeros 20 residuos de la secuencia obtenida mediante secuenciación directa de la proteína purificada, cuyo total consiste de 153 aminoácidos que contienen los 6 residuos de histidina involucrados en la conformación del sitio activo (H46, H48, H63, H71, H80, H120y D83) y aquellos relacionados con el mantenimiento de la

estructura terciaria y la conducción de los iones superóxido al sitio activo (C57, C146 y R143).

Cabe mencionar que para la clonación confirmación de la forma *dh sod1* (Hernández-Saavedra *et al.*, 1998) así como para la clonación de la forma *dh sod2* (en el presente trabajo) el ADN usado como templado fue el mismo, obtenido mediante digestión con *Sau3AI* en fragmentos de 2 a 4 kb y purificado en gradiente de sacarosa, lo que asegura que la presencia de ambas formas así como las particularidades de cada una de las secuencias se deben a las características intrínsecas de la información que forma parte del genoma de la levadura.

Si bien, se realizó el tamizado de la librería genómica de *D. hansenii* para conocer las regiones regulatorias de las secuencias *dh sod1* y *dh sod2*, a través de la secuenciación de los extremos 5' de las clonas positivas, se obtuvo 1 secuencia que presentó homología parcial con el cromosoma VII de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la secuencia consenso 5'-TTTTGCTG-3', que corresponde al sitio de unión del factor de transcripción *Acep1* no pudo ser ubicada, así como ningún otro elemento de regulación como la caja TATA. Esto indica que mediante la secuenciación no se consiguió llegar al sitio promotor del gen, ya que aunque las clonas fueron seleccionadas por hibridación con sondas marcadas y confirmadas mediante PCR, el ADN genómico fue cortado y ligado aleatoriamente al vector, por lo que no existe un parámetro que determine la distancia (en nucleótidos) del sitio de ligación al vector y la región del promotor

que se está buscando. El paso siguiente es aplicar la técnica de “caminar sobre la secuencia” al diseñar nuevos primers basados en las secuencias obtenidas para avanzar hacia arriba o hacia abajo de los fragmentos clonados. De hecho, se realizó un experimento de este tipo en el que se diseñó un primer reverso basado en la secuencia de aminoácidos QTHESE, con el que teóricamente se podría conocer la la secuencia 5' de la secuencia codificante así como parte de la región del promotor, sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios. No obstante, esta estrategia será retomada en estudios futuros.

Aunque se observó un 98% de homología entre las secuencias que codifican las SODC de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* (*dh sod2* y *sc sod1*, respectivamente), el patrón electroforético de cromosomas indica que los genomas son muy distintos. El hecho de encontrar 11 bandas (correspondientes a cromosomas) en electroforesis CHEF de *S. cerevisiae* y solo un patrón no definido de bajo peso molecular en *D. hansenii*, nos da una idea de las diferencias genómicas entre ambos géneros. Las diferencias en los resultados no son causa de deficiencias en la aplicación de la técnica para la preparación de ADN intacto, pues se considero durante todo el procedimiento a *S. cerevisiae* como control. Las preparaciones de *S. cerevisiae* mostraron un patrón de bandeo similar al de un marcador comercial (*S. cerevisiae* CHEF Molecular

Marker, BIORAD), con un desarrollo durante la electroforésis igual al reportado por el proveedor bajo las mismas condiciones de separación. Sin embargo, los patrones obtenidos para *D. hansenii* distaron mucho de ser satisfactorios, no lográndose determinar el número de bandas presentes en este tipo de preparaciones para la especie. No obstante, al realizar un experimento de hibridación con las sondas *dh sod1* y *dh sod2* marcadas con digoxigenina, se observó un banda de hibridación bien definida con el ADN intacto de *D. hansenii* separado mediante CHEF (Figura 18), excluyendo de esta forma la posibilidad de que el patrón del material separado estuviese degradado. Si bien se ha reportado que los cariotipos convencionales de levaduras (microscopía óptica) son particularmente difíciles de obtener debido a que los cromosomas metafásicos nunca están bien condensados sino mas bien laxos, el cariotipo obtenido por electroforésis en campo pulsante ha sido una excelente alternativa de solución. Sin embargo, aparentemente en levaduras de origen marino, particularmente en *D. hansenii* esto no es totalmente aplicable; las particularidades de la composición de la pared celular de levaduras marinas (Hernández-Saavedra, 1992) pueden estar contribuyendo al bajo rendimiento de extracción de ADN, por lo que a partir del mismo número de células, la cantidad de ADN intacto extraído en las especies marinas es de por lo menos 1/10 comparado con *S. cerevisiae* (Figura 17, líneas 2-6 y 7-11). Aunque el intervalo de tamaños de cromosomas de *S. cerevisiae* y de *D. hansenii* es muy diferente, el problema básico en el cariotipo mediante electroforésis de campo pulsante de

levaduras marinas es la concentración de ADN. No obstante que se tuvieron resultados satisfactorios, pues solo se encontró hibridación con una banda de ADN en el material extraído de *D. hansenii* lo que indica la posibilidad de que ambos genes se encuentran en el mismo cromosoma, se requiere de trabajo adicional para mejorar en lo posible la imagen obtenida en el gel (con relación en la concentración y resolución de la separación), y tener de esta forma resultados 100% concluyentes.

Entender el papel que juegan las dos formas de la enzima Cu,ZnSOD en *D. hansenii* ha llevado a determinar su expresión bajo diferentes condiciones de estrés. Si bien, se conoce que en ausencia de estrés oxidativo la expresión del gen que codifica para la SODC es constitutiva (Medina, 1996), se ha visto que la expresión de este gen puede inducirse en presencia de varios estímulos, como por ejemplo: el paraquat (Warner, 1995), el oxígeno molecular (Ramírez-Orozco *et al.*, 1998); metales divalentes (Galiazzo *et al.*, 1991; Gralla *et al.*, 1991; Ramírez-Serrano, 2003) y el dióxido de cloro (Hernández-Saavedra, 1997). Al adicionar el CuSO₄ a un cultivo de *D. hansenii* en fase estacionaria temprana se observaron pequeños cambios en la intensidad de las bandas al ser comparada con un cultivo en condiciones normales (Figura 19A), sin verse afectado el patrón de actividad (2 homodímeros, 1 heterodímero). Sin embargo, la adición de compuestos de cloro (dióxido de cloro o hipoclorito de sodio) tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento, se tradujo en fuertes

cambios en el patrón de actividad (Figura 19B): el heterodímero y uno de los homodímeros desaparecieron (Hernández-Saavedra 1997; Ramírez-Serrano, 2003) sugiriendo la no traducción de la proteína, pues en experimentos complementarios *in vitro*, se comprobó que los compuestos de cloro no tienen efecto en la actividad de la enzima a las concentraciones de cultivo, y mas altas (Hernández-Saavedra, 1997; Ramírez-Orozco *et al.*, 2001; Ramírez-Serrano, 2003).

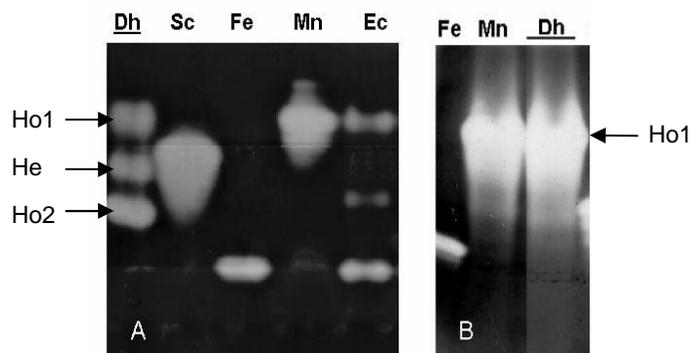


Figura 19. Patrón electroforético de actividad de la enzima SOD de diversas fuentes. A. Bajo condiciones normales de crecimiento. Homodímeros (Ho1 y Ho2) y heterodímero (He). B. Bajo condiciones de estrés por ClO₂. Dh, SODC de *D. hansenii*, Sc; SODC de *S. cerevisiae*; Fe, SODF de *E. coli*; Mn, SODM de *E. coli*; Ec, homogenizado total de *E. coli* TOP10. Técnica de tinción NBT. (Tomado se Hernández-Saavedra 1997).

La presencia de tres isoformas de la SODC en la levadura marina *D. hansenii* es el resultado de dos secuencias que las codifican, las cuales no corresponden a formas alélicas debido a la inducción diferencial observada bajo diferentes estímulos (Figuras 19 y 20) lo que sugiere la existencia de regiones de regulación diferentes. Se ha observado que la adición de metales afecta la

expresión de la enzima, especialmente por metales con valencia 2, que pueden interactuar con el factor de transcripción *Acep1* que es una proteína de 225 aminoácidos con una región altamente básica en el extremo N-terminal (100 aminoácidos) que rodea el dominio de unión al ADN y se activa por iones Cu^{+2} y Ag^{+1} . El dominio de unión al ADN sufre un cambio conformacional, dependiente del metal, que dirige el plegamiento de este dominio para unirse a la secuencia consenso 5'-TTTGCTG-3' presente en el promotor de la *sc sod1* en *S. cerevisiae*. La secuencia *dh sod1* que codifica la Dh SODC1 en *D. hansenii* corresponde a la forma superactiva (Hernández-Saavedra *et al.*, 1998), la cual bajo condiciones de estrés promovidas por ClO_2 incrementa su actividad de 17,000 U/mg (bajo condiciones normales de crecimiento) a 27,000 U/mg (Hernández-Saavedra, 1997; Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999). La segunda forma, Dh SODC2, cuya secuencia se reporta en el presente trabajo (*dh sod2*) presenta una actividad específica convencional (~6,000 U/mg) si se compara con proteínas que son normalmente utilizadas como control (5,000 a 6,000 U/mg).

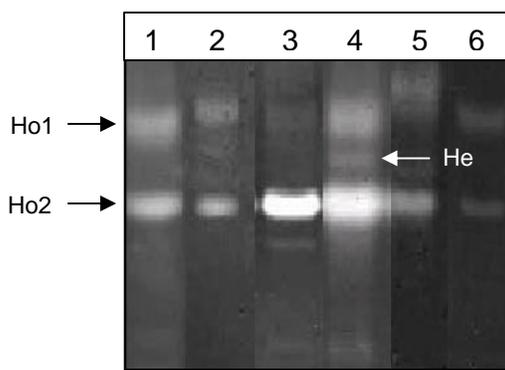


Figura 20. Perfiles de actividad Cu,ZnSOD de *D. hansenii* crecida bajo condiciones normales, de estrés dado por metales y NaOCl. Carril 1, condiciones normales de cultivo, carril 2, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$; carril 3, AgNO_3 ; carril 4, CuSO_4 ; carril 5, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y carril 6, NaOCl (Tomado de Ramírez-Serrano, 2003).

Al parecer el papel fisiológico de la Dh SOD1 bajo condiciones de estrés oxidativo dado por la presencia de sustancias cloradas es 100% antioxidante, pues se sobre-expresa y aparentemente es más activa, sin embargo, bajo condiciones de estrés dadas por la presencia de metales divalentes su función antioxidante pasa a un segundo término, evidenciándose como su función principal la incorporación de metales para evitar el envenenamiento de la células (función quelante). Por otro lado, la Dh SODC2 bajo condiciones de estrés dadas por la presencia de sustancias cloradas no se expresa, mientras que en presencia de metales divalentes no pierde su actividad, lo que sugiere que su principal función es 100% antioxidante.

8. CONCLUSIONES

- A través de la técnica de PCR y usando primers degenerados diseñados a partir de secuencias de aminoácidos de la proteína purificada, fue posible clonar un fragmento de 420 pb de la secuencia que codifica la Dh SOD2 de la levadura marina *D. hansenii*.
- En la levadura marina *D. hansenii* existen dos secuencias que codifican las SODC 1 y 2 observadas en geles de actividad (Ho1 y Ho2).
- La secuencia clonada (parcial) codifica para una proteína de 133 aminoácidos, que por análisis de homología fue identificada como SODC. La secuencia de aminoácidos deducida contiene toda la información necesaria para producir una proteína funcional.
- El árbol de homología resultó en el agrupamiento de la secuencia *dh sod2* con aquella de *S. cerevisiae*, independientemente de las relaciones taxonómicas y de origen de aislamiento de otras especies consideradas en el análisis, resultando en la formación de grupos o clusters que incluyen a las especies marinas (*dh sod1*) o terrestres (*dh sod2*).

- Aunque se obtuvieron clonas positivas en el tamizado de la librería genómica, mediante la secuenciación automática no fue posible encontrar las secuencias que correspondieran al promotor de los genes, ya que no se encontraron los elementos regulatorios básicos como la caja TATA y la secuencia consenso 5' TTTGCTG 3', así como tampoco el codón de inicio de la traducción (ATG), ni los nucleótidos que codifican los primeros aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal de la proteína. No obstante, se sugiere continuar con el análisis de las clonas positivas, considerando como estrategia el diseño de primers específicos a partir de las secuencias obtenidas.
- La técnica de electroforesis de campo pulsante (PFGE) es un método que permite la separación de moléculas de gran tamaño. Con este método se logró obtener un patrón no definido de cromosomas pequeños, uno de los cuales hibridó con la sonda *dh sod2* marcada con digoxigenina, por lo que este patrón obtenido en la electroforésis no es el resultado de ADN degradado.
- La baja eficiencia en la obtención de ADN intacto se debe probablemente a la pobre degradación de la particular pared celular de levaduras marinas con las enzimas utilizadas, ya que las preparaciones de ADN intacto realizadas a

partir de levaduras convencionales como *S. cerevisiae* resultaron en preparaciones comparables a las que están disponibles de forma comercial.

- El análisis de hibridación del ADN intacto de *D. hansenii* con la sonda *dh sod-2*, sugiere que ambas secuencias codificantes (*dh sod1* y *dh sod2*) se encuentran localizadas en un mismo cromosoma, ya que la sonda utilizada reconoce ambas secuencias y sólo se observó una banda de hibridación. Aunque aun cabe la posibilidad de que la banda electroforética revelada esté constituida de dos o mas moléculas del mismo tamaño.
- Las diferencias en la secuencias de aminoácidos de las secuencias codificantes de la SODC1 y SODC2 de *D. hansenii* (este trabajo) ponen de manifiesto su probable origen génico, lo que confirma los resultados reportados mediante experimentos de expresión diferencial de ambos genes bajo condiciones de estrés dados por compuestos clorados y metales.
- La presencia y función de estos dos genes en la levadura son probablemente el resultado de la adaptación de este microorganismo a ambientes marinos y terrestres durante su evolución, lo que explica en cierta medida el papel que juegan ambas formas de la enzima (*dh sod1* y *dh sod2*) en la levadura marina *D. hansenii*.

10. BIBLIOGRAFÍA

Amano, A. Shizukuishi, S. Tamagawa, H. Iwakura, K. Tsunasawa, S. and Tsunemitsu, A. 1990. Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.*, 172: 1457-1463.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1997. Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition. John Wiley and Sons, Inc., 847pp.

Benov, L. and Fridovich, I. 1996. Functional significance of the Cu-Zn SOD in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327: 249-253.

Bermingham-Mc Donogh, M., Gralla, E. B. and Valentine, J. S. 1988. The copper zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 4789-4793.

Birboin, H. C. and Doly, J. 1989. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 513-1515.

Brouwer, M. and Brouwer, T. H. 1998. Biochemical different mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 351: 257-264.

Carri, M. T., Galliazo, F., Ciriolo, M. R. and Rotilio, G. 1991. Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper by the ACE1 factor. *Febs. Lett.*, 2278: 263-266.

Carro D. y Benjamí Piña. 2001. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. *ACE Revista de Enología*. No. 9. En línea: http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm

Ciriolo, M. R., Civitereale, P., Carrie, M. T., De Martino, A., Galliazo, F. and Rotilio, G. 1994. Purification and characterization of Ag,Zn superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silver. *J. Biochem.*, 264: 25783-25787.

Curran, B. P. G y Bugeja, V. C. 1997. Levadura: clonación y biotecnología. En: J. M. Walker y E. B. Gingold (eds) *Biología molecular y biotecnología*. Segunda Edición. Editorial Acribia, Zaragoza. 475pp.

Davis, K. J. A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 262: 9895-9901.

Djinovic, A., Coda, A., Antolini, L., Pelosi, G., Desideri, A., Falconi, M., Rotilio, G. and Bolognesi, M. 1992a. Crystal structure solution and refinement of the semisynthetic cobalt-substituted bovine erythrocyte superoxide dismutase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 226: 227-238.

Djinovic, A., Gatti, G., Coda, A., Antolini, L., Pelosi, G., Desideri, A., Falconi, M., Marmochi, F., Rotilio, G. and Bolognesi, M., 1992b. Crystal structure of yeast Cu,Zn superoxide dismutase. Crystallographic refinement at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 225: 791-809.

Edwards, Y. H., Hopkinson, D. A. and Harris, H. 1978. Dissociation of 'hybrid' isozymes on electroforesis. *Nature.*, 271: 84-87.

Fell, J. K. 1976 Recent advances in aquatic mycology. (E.B.G.) Eds. Jhon and Wiley, New York. p93-124. En J. M. Ramírez Orozco. Evaluación del rendimiento celular y actividad de superóxido dismutasa en *Debaryomyces hansenii*. Tesis de Maestría, CICIMAR. 81pp.

Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.*, 224: 7761-7764.

Frigerio, F., Falconi, M., Gatti, G., Bolognesi, M., Desideri, A., Marmocchi, F. and Rotilio, G. 1989. Crystallographic characterization and three-dimensional model of yeast Cu,Zn superoxide dismutase, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 160: 677-681.

Galiazzo, F., Ciriolo, M. R., Carri, M. T., Civitareale, P. Marmocchi, L. and Rotilio, G. 1991. Activation and induction by copper of Cu,Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 196: 545-549.

Goebel, S. J., Jhonson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. and Paoletti, E. 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology.*, 179: 247-266.

Goodsell, D. S. 1996. Our molecular nature: the body's motors, machines and messages. Spring-Verlag, New York. 183pp.

Gralla, E. B., Thiele, D. J. Silar Ph., and Valentine J. S. 1991. ACE1, a cooper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 8558-8562.

Greco, M. A., Hrab, D. I., Magner, W. and Valentine, J. S. 1990. Cu,Zn superoxide dismutase and copper-deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 172: 317-325.

Griffths, A. J., Gelbart, W. M., Miller, J. H. y Lewontin R. C. 2000. Genética Moderna. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 676 pp.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford Press, Oxford, 936pp.

Hawksworth, D.L., and Mouchacca, J. 1994. Ascomycete systematic in the nineties. En M. Walker (ed) Yeast Physiology and Biotechnology. Ed. Wiley. England, 350pp.

Hernández-Saavedra, D. 1991. Composición química de la pared celular de distintos géneros de levaduras marinas. Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato. 96pp.

Hernández-Saavedra, N. Y. 1990. Levaduras marinas aisladas de la costa occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. UNAM Iztacala. 107pp.

Hernández-Saavedra, N. Y. 1992. Efecto de la salinidad en la composición y concentración de osmoreguladores en levaduras marinas. Tesis de Maestría. CICIMAR. 106pp.

Hernández-Saavedra, N. Y. 1997. Caracterización de la enzima superóxido dismutasa tipo cobre zinc de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* y clonación de la secuencia que la codifica a partir de ADNc. Tesis de Doctorado, CIBNOR. 75pp.

Hernández-Saavedra, N. Y., Egly J. M. and Ochoa J.L. 1998. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Copper-Zinc superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.*, 14: 573-581.

Hernández-Saavedra, N. Y., Ochoa J.L. and Vázquez-Duhalt, R. 1995. Osmotic adjustment in marine yeast. *J. Plankton Res.*, 17: 59-69.

Hernández-Saavedra, N. Y. and Ochoa J.L. 1999. Copper-Zinc superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.*, 15: 657-668.

Hernández-Saavedra, N. Y. and Rojas, D. I. 2003. Presence of two active forms of cytosolic copper zinc superoxide dismutase enzyme in the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. Submitted to *Yeast*.

Hernández-Saavedra, N. Y. and Romero-Geraldo, R. 2001. Cloning and sequencing the genomic encoding region of copper-zinc superoxide dismutase enzyme from several marine strains of the genus *Debaryomyces* (Lodder & Kreger-van Rij). *Yeast.*, 18: 1227-1238.

Hernández-Saavedra, N. Y. 2003. Cu,Zn superoxide dismutase in *Rhodotorula* and *Udeniomyces* spp. isolated from sea water: cloning and sequencing the encoding region. *Yeast*, 20: In Press.

Hjalmarsson, K., Marklund, S., Engström, A. and Edlund, T. 1987. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 6340-6344.

Hong, Z., Lo Verde, P., Thakur, A., Hammarskjöld, M. L. and Rekosh, D. 1992. *Schistosoma mansoni*: cloning of a complementary DNA encoding a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and high-yield expression of the enzymatic active gene product in *Escherichia coli*. *Exp. Parasitol*, 75: 308-332.

Ingraham J. L., e Ingraham C. A. 1998. Introducción a la Microbiología. Ed. Reverté, S. A., España. 328pp.

Jennings, D. H. 1983. Some aspects of physiology and biochemistry of marine fungi. *Biol. Rev.* 58:423-459.

Kohlmeyer J. and Kohlmeyer E. 1979. Marine Ecology: The higher fungi. Academic Press, New York, 690pp.

Kreger-van Rij. 1987. Classification of Yeast. In Anthony H. Rose, J. S. The Yeast. Vol. 1. Second Edition Academic Press, New York. 407pp. .

Kurtzman, C. P. and Phaff, H. J. 1987. Molecular Taxonomy of Yeast. In: The Yeast. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 63-94.

Kurtzman, C. P. 1999. Classification of Yeast. En: C. P. Kurtzman, J. W. Fell (eds) The Yeast: a taxonomic study. Elsevier Science, Amsterdam.

Leveau J.Y. and Bouix M. 2000. Microbiología Industrial. Ed. Acribia. España. 475pp.

Linder, M. C. 1993. Copper within vertebrate cells. En: M. C. Linder, Ch. A. Goode (eds), Biochemistry of copper. Plenum Press, New York, pp. 163-239.

Madigan, M. J., Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. Brock. Biología de los Microorganismos, Octava Edición, Prentice Hall, Madrid, 1064pp.

Malinovsky and Fridovich. 1979. Subunit association and side-chain reactivity of bovine erythrocyte superoxide dismutase in denaturing solvents. *Biochem.*, 18: 5055-5060

Marklund, S. L., 1984. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem. J.*, 222: 649-655.

Maule, J. 1998. Pulsed field gel electrophoresis. *Mol. Biotechnol.*, 9: 107-125.

Medina, J. J. 1996. The clock of ages. Cambridge University Press. Cambridge. 332pp.

Meyers, R. A. 1995. Molecular biology and biotechnology. VCH Publishers Inc., New York.

McCord J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 224: 6049-6055.

Michiels, C. and Remacle, J. 1988. Quantitative study of natural antioxidant systems for cellular nitrofurantoin toxicity. *Bioch. Bioph. Ac.*, 967: 341-374.

Michels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. 1994. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 235-248.

Monod, M., Porchet, S., Baudraz, F. and Frenk, E. 1990. The Identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J. Med. Microbiol.* 32: 123-129.

Moore, M. M., Breedveld, M. W. and Autor, A. P. 1989. The role of carotenoids in preventive oxidative damage in the pigmented yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 270: 419-431.

Ochoa J. L., Ramírez-Orozco M., Hernández-Saavedra, N. Y., Hernández-Saavedra D. and Sánchez-Paz A. 1995. Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* as an alternative source of Cu/Zn superoxide dismutase SOD. *J. Mar. Biotechnol.*, 3: 224-227.

Onishi, H. 1963. Studies on osmophilic yeasts XV. The effects of high concentrations of sodium chloride on polyalcohol production. *Agricult. Biol. Chem.*, 27: 543-547.

Ornelas Glarza, T. L. 2002. Efecto en la expresión de la Cu-Zn superóxido dismutasa de la adición de metales divalentes en cultivos de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*. Memoria de Residencia Profesional, Instituto Tecnológico de La Paz-SEP. 62pp

Phaff, H. J. 1986. Ecology of yeast with actual and potential value in biotechnology. *Microb. Ecol.*, 12: 31-42.

Phaff, H. J. and Miller, M. W. 1980. The Life of Yeast. 2nd end, Harvard University Press, Cambridge (Mass.) and London.

Parker, M. W., Bossa, F., Barra, D., Bannister, W. H. and Bannister, J. V. 1986. Structural and evolutionary relationships between the eukaryotic superoxide dismutase. En: G. Rotilio (ed) Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 237-245.

Ramírez Orozco, J. M. 1998. Evaluación del rendimiento celular y actividad de superóxido dismutasa en *Debaryomyces hansenii*. Tesis de Maestría, CICIMAR. 81 pp.

Ramírez-Orozco, M, Hernández-Saavedra, N. Y., Ascencio-Valle, F, Acosta-González, B. and Ochoa, J. L. 1998. Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. *J. Marine. Biotechnol.*, 6: 225-229.

Ramírez-Orozco, M, Hernández-Saavedra, N. Y. and Ochoa, J. L. 2001. *Debaryomyces hansenii* development in a nonsterile sea water-ClO₂ peptone containing culture medium. *Can. J. Microbiol.*, 47: 676-679.

Ramírez-Serrano, R. 2003. Efecto de estímulos oxidativos y metales en los niveles de expresión de Cu,Zn SOD de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*. Tesis de Mestría. CIBNOR. 78 pp.

Reineckek, K., Wolf, B., Michelson, A. M., Puget, K., Steffens, G. J. and Flohé, L. 1988. The amino-acid sequence of rabbit Cu-Zn superoxide dismutase. *Biol. Chem. Hoop- Seyler.*, 369: 715-725.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol.1,

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., Huse, W. D. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucl. Acid. Res.*, 16: 7583-600

Simurda, M.S., Rekosh, D.M. and LoVerde, P.T. 1988. *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of and mRNA and a gene encoding superoxide dismutase Cu/Zn. *Exp. Parasitol.*, 67: 73-84.

Tibell, L., Hjalmarsson, K., Edlund, T., Skogman, G., Engström, A. and Marklund, S.L. 1992. Expression of human extracellular superoxide dismutase in Chinese hamster ovary cells and characterization of the product. *Pro. Nat. Acad. Sci.*, 84: 6634-6638.

Vázquez, J. M., Beckley, A., Sobel, J. D. and Zervous M. J. 1991. Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 962-967.

Walker, J. M. y Gingold, E. B. 1997. Biología molecular y biotecnología. Segunda Edición. Editorial Acribia, Zaragoza. 475pp.

Walker, M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. Ed. Wiley. England. 450pp.

Warner, H. R. 1994. Superoxide dismutase aging and degenerative disease. *Free Rad. Biol. Meth.*, 17: 249-258.

Wolf, K. 1996. Nonconventional yeasts in biotechnology. A handbook. Springer-Verlag, Berlin. 617pp.

Youn, H. D., Kim, E. Roe, J. H. Hab, Y. C. and Kang, S. O. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J.*, 318: 889-896.

APÉNDICE I.

MEDIOS DE CULTIVO

LB

Triptona	8 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1 lt

Disolver los componentes, ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Para placas, adicionar 15 g de agar por litro de medio.

LB ampicilina adicionar 50 mg/mL

LB kanamicina adicionar 50 µg/mL

SOB

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
KCl 250 mM	10 mL
H ₂ O	1 lt

Mezclar en 900 mL de agua. Ajustar el pH a 7.0, llevar a un volumen de 990 mL.

Esterilizar por en autoclave y enfriar a temperatura ambiente, finalmente agregar 10 mL de una solución estéril de KCl 250 mM.

SOC

Adicionar al medio SOB 20 mL de una solución estéril de glucosa 1 M por litro de medio.

NYZM

NYZM	22 g
Maltosa	0.2%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
H ₂ O	1 lt

Disolver los componentes, ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 M. Para placas, adicionar 15 g de agar por litro de agua.

TOP AGAROSA

Agarosa	0.7%
---------	------

Diluir la agarosa en medio NYZM. Esterilizar en autoclave.

YPD

Glucosa	2%
Peptona	2%
Extracto de levadura	1%
H ₂ O	1 lt

Disolver los componentes y aforar a 1 lt. Para placas, adicionar 15 g de agar por litro de medio.

APÉNDICE II

SOLUCIONES STOCK

20X SSC

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
H ₂ O	1 lt

Disolver el NaCl y el citrato de sodio en 800 mL de agua, ajustar el pH a 7.0 con una solución 10 N de NaOH. Ajustar el volumen a 1 lt. Esterilizar por autoclave.

Buffer de ácido maleico

Ácido maleico	100 mM
NaCl	50 mM

Disolver los reactivos, ajustar el pH a 7.5 a con NaOH sólido. Esterilizar por autoclave.

Solución de Bloqueo

Disolver el reactivo de bloqueo en buffer de ácido maleico a una concentración final de 10% (p/v) en una plancha con calor y agitación continua o en microondas. Esterilizar por autoclave.

APÉNDICE III

SECUENCIAS

Clona 1376

```

1      CGANTNGGTC CTTCTGGTTC CCCCCGGGT GGAAAATCGA TGGGCCCGCG
51     GCCGCTCTAG AAGTACTCTC GAGANGCTTT TTGAATTCTT TGGATCCAAA
101    TTGGGTTTTGT TGCATTAATC GAGAATTTTG TCAAAAAAAG GGTGAAATTC
151    GACACTAAAT ATGACATTAA TTTTACGAGA CTATTCTGCT CCAGCTTTCG
201    CCGGAGATTT ACCTGGTACT TCGGCTACAT ACACCCTTTA CCGAAAGCTT
251    TTCCGTTCTA AGACCTACCG ACAAAGAATA CGTGAAGATG TGCAAAGTGG
301    TCTTATTATC ACAATGCATT TTTTGCAAAA ATAAAGAGAA TTATGTGGGG
351    CAATCCCCGT AAGCCGAGCA TGTTGTATTT CGGGTCAATT AATGGGAGTA
401    ATGATGCATG AGGGTAGGCA CGGATTAATC AAAAATGCAT ATCGGATCGA
451    GCTCCCTATT AAAAAAGATA TGAAAGCACT CGGATATCAG TCGACCAGCT
501    TCAGACTTTA AATAAGTCCG ATTAGCCTCA CTTTTNTGGG AAAAATTTAA
551    TNTACCGTTA AGGTTNTAAC TCCAGTAAGA AAGATAGCAA AAGGCTNTAA
601    GTAAATCAGG TTGATTGCCT TANTGGCTCG GTGTGGAAGT GCNAGGNCTG
651    GCCCCNNTTC

```

Clona 1378

```

1      TTCANTCGCC TTCNTGTCCC NCCCGGGTGG AAAATCGTGG GCCCGCGGCC
51     GCTCTAGAAG TACTCTCGAG AAGCTTTTTG AATTCTTTGG ATCCACTAGT
101    GTCGACCTGC AGGCGCGCGA GCTCCAGCTT TTGTTCCCTT TAGTGAGGGT
151    TAATTTTCGAG CTTGGCGTAA TCAAGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
201    TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAATATA CGAGCCGGAA GTATAAAGTG
251    TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACAGTA ATTGCGGCTA
301    GCGGATCTGA CGGTTCACTA AACCAGCTCT GCTTATATAG ACCTCCCACC
351    GTACACGCCT ACCGCCCAT TCGGTCAATG GGGCGGAGTT GTTACGACAT
401    TTTTGGAAAG TCCCGTTGAT TTTTGNTGCC CAAAACAAAC TCCATTGACG
451    TCCAATGGGG GGTGGAGACT TNGGAAATCC CCGTGAANTC AAACCGCTTT
501    CCCC GCCCA TGTTGTNCT GCCAAACCGC TNACCTGGGT AATACCGNTG
551    ACTAANCCNT AGAATNTCNG CCAAGTAGGA AAATCCCATN ANGGCATGTC
601    CTGGGCATAN TCCCGNNGN CCNTTACCT ATTNCTCAA AANGGGGCGT
651    ANTTGC

```