CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

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.

T E S I S

Que para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Norma Yolanda Hernández-Saavedra

La Paz, B.C.S. Noviembre 1997

Agradecimientos.

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), México y en el Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire (IGBMC), de Strasbourg, Francia. El autor ha recibido apoyo de CONACyT a través de la beca No. 87142.

Quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Lennart Adler (Universidad de Gotenburgo, Suecia), Dr. Joe M. McCord (Universidad de Colorado, E.U.), Dr. Jorge Herrera (Universidad Michoacana, México), Dr. Martín Lotz (Universidad de California San Diego, E.U.) por la estimulante e instructiva discusión del trabajo y su valiosa crítica, pero muy especialmente al Dr. Jean Marc Egly (IGBMC, Francia) por su amabilidad durante mi estancia en Estrasburgo y al Dr. José Luis Ochoa por el apoyo académico, como tutor y como jefe, así como por la confianza que siempre ha depositado en mi.

Quiero agradecer también muy especialmente al Dr. Thomas Schulte (q.e.p.d.) por habernos abierto los ojos ante una prometedora e interesante línea de trabajo, así como por el apoyo financiero que nos brindo, a través de Nevada Biotech, en los inicios de este proyecto.

A todos mis colegas de la Unidad de Patología Marina, pero especialmente a cM.C. Martín Ramírez, Arturo Sierra y Ariel Cruz por su apoyo técnico.

Al cDr. Jean Christophe Marinoni y al Dr. Vincent Moncollin por revelarme algunos tips técnicos que me facilitaron el desarrollo de una parte de este trabajo.

Al cDr. Eduardo Ruiz, por su ayuda en la versión bilingüe de esta tesis.

A Jae, Claudia y Vinecnt (del laboratorio 4028) por brindarme su amistad y hacer mas llevadera mi estancia en Estrasburgo a pesar de las inclemencias del clima.

Quiero dedicar esta tesis a:

Mis padres, por el ejemplo de fortaleza y
superación que siempre ha estado presente.

Mi esposo Arturo.

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.

por

Norma Yolanda Hernández-Saavedra

Laboratorios de Levaduras Marinas y Biología Molecular. Unidad de Patología Marina. División de Biología Experimental. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Apdo. Postal 128, La Paz, Baja California Sur, 23000, México.

Esta tesis se basa principalmente en los siguientes manuscritos:

I. Ochoa J.L., Ramírez-Orozco. M., Hernández-Saavedra, N.Y., Hernández-Saavedra, D., y Sánchez-Paz, A. 1995. Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* as an alternative source of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD). *J. Mar. Biotechnol.*, 2:224-227.

II Ramírez-Orozco. M., Hernández-Saavedra, N.Y., Asencio-Valle, F., Acosta-González, B. y Ochoa, J.L. 1997. Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. Manuscrito sometido para su publicación al *J. Mar. Biotechnol.*

III Ramírez-Orozco, M., Hernández-Saavedra, N.Y. y Ochoa J.L. 1997. Chemical sterilization using chlorine dioxide in the biomass production of *Debaryomyces hansenii* and its effect on Cu,Zn SOD activity. Manuscrito en preparación.

IV Hernández-Saavedra N. Y. y Ochoa, O. J.L. Isolation and characterization of a copper-zinc superoxide dismutase of the marine yeast *Debaryomyces hansenii.* Manuscrito sometido para su publicación a la revista *YEAST.*

V Hernández-Saavedra N. Y., Egly, J.M. y Ochoa, O. J.L. 1997. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a copper-zinc superoxide dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii.* Manuscrito sometido para su publicación a la revista *YEAST.*

Los manuscritos serán referidos por sus números romanos respectivos.

Contenido.

		Página.
	Resumen	vii
	Lista de tablas.	viii
	Lista de figuras.	viii
1.	**Radicales libres en bioquímica y medicina.**	1
	Qué es un radical?	1
	Radicales como subproductos del metabolismo.	1
	Generación de aniones superóxido.	2
	El papel de los metales.	2
2.	**Estrés oxidativo.**	3
	Defensas antioxidantes.	3
	Bioquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS).	4
	Superóxido dismutasas.	5
3.	**Superóxido dismutasa tipo cobre-zinc.**	7
	Distribución.	7
	Banco de datos.	7
	Características de la Cu,Zn SOD.	8
	Secuencia de aminoácidos.	9
4.	**Importancia médica.**	11
	Estudios de correlación.	11
	Enfermedades genéticas relacionadas a la SOD.	11
	Deficiencia de Cu,Zn SOD.	12
	Otras enfermedades relacionadas con la producción de superóxido y Cu,Zn SOD.	13
5.	**Cu,Zn SOD en levaduras y hongos.**	14
	Función-regulación.	14
6.	***Debaryomyces hansenii*: una levadura halotolerante.**	15
	Colección de levaduras marinas del CIBNOR.	15
	Halotolerancia de *Deb. hansenii*.	16
	Extracción de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*.	16
	Purificación de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*.	18

Influencia del ClO_2 en el gen *dh sod-1*. 23
Caracterización de la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*. 24
Uso clínico de la SOD de *Deb. hansenii*. 24

7. Clonación de una Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*. 28

Expresión de una secuencia *dh sod-1*. 28
Importancia evolutiva. 31

8. Conclusiones. 33

9. Referencias. 35

Resumen.

La superóxido dismutasa tipo cobre-zinc (SOD-1), es una enzima ubicua que se encuentra en todos los organismos eucariontes, y tiene varios efectos importantes en los organismos aerobios. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en varias especies de organismos tanto eucariontes como no-eucariontes. Sin embargo, de hongos y levaduras únicamente la SOD-1 de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido estudiada extensivamente, a pesar de que en los bancos de datos se encuentran registradas las secuencias del gen *sod-1* de *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus japonicus*.

En el laboratorio, hemos aislado la forma citosólica de la Cu,Zn SOD de *Debaryomyces hansenii*, observándose una masa molecular de 15.6 kDa para cada subunidad. La preparación de la enzima mostró ser heterogénea mediante cromatografía IMAC, electroforésis nativa e isoelectroenfoque (con dos intervalos de pI: 5.14 a 4.0 y 1.8 a 1.6), sugiriendo la existencia de dos formas de Cu,Zn SOD en *Deb. hansenii*. Otras observaciones que apoyan lo anterior, son las diferencias encontradas tanto en composición de aminoácidos como actividad específica de dos fracciones derivadas de la cromatografía IMAC (fracciones 32 y 37). Las diferencias principales radican en el numero de residuos de histidinas y tirosinas: la forma uno (IMAC 32, ~17 300 U/mg de proteína) contiene 6 residuos de histidina, mientras la forma dos (IMAC 37, ~8 000 U/mg de proteína) solo presenta 3 residuos de histidina. En el caso de los residuos de tirosina, la forma uno contiene dos, mientras que la forma dos el número se incrementa a 5. Estos resultados sugieren que los tres nuevos residuos de tirosina de la forma dos podrían estar jugando el papel de las histidinas faltantes en el sitio activo. Mediante diferencias de expresión de las proteínas, observadas bajo condiciones de estrés provocadas por la concentración de ClO_2, sugerimos la presencia de dos genes.

La preparación de la enzima mostró gran estabilidad entre pH 6 y 7, sobreviviendo periodos de ebullición de 10 minutos sin perder más del 60% de la actividad. Mediante análisis con anticuerpos de conejo (Western blot), observamos que las enzimas son fuertemente reconocidas por su suero homólogo, mientras que con sueros generados contra Cu,Zn SOD de *Sacch. cerevisiae* y de *Bos taurus* (bovino) solo se observan reacciones de reconocimiento débiles. Cuando se inmunizaron ratones con fragmentos de geles de acrilamida que contenían la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*, se observaron fuertes efectos en la salud de los animales; principalmente, una pérdida del ~25% de peso comparado con los controles. Mediante el análisis de secuencia de un péptido de la enzima de *Deb. hansenii* obtenido por digestión con tripsina, se encontró un 85% de identidad con el péptido homólogo de *Sacch. cerevisiae*, así como por el análisis de la composición de aminoácidos de ambas proteínas.
Nuestros resultados sugieren una alta eficiencia en la transformación de radicales superóxido en la forma uno de la enzima (superior en un 300% respecto a las enzimas comerciales). Considerando las propiedades antes mencionadas, podemos concluir que la preparación de Cu,Zn SOD citosólica de *Deb. hansenii* puede considerarse como una alternativa interesante como fuente de esta enzima para aplicaciones biotecnológicas.

El gene *(dh sod-1)* que codifica para la enzima Cu,Zn SOD de la levadura marina *Deb. hansenii*, se clonó a partir de ARNm a través de la técnica de RT-PCR. Utilizando este procedimiento, se obtuvieron dos clones idénticos de 470 pares de bases. Mediante la secuencia de nucleótidos, se determinó que los clones contienen una región de 462 pares de bases que codifica para una proteína de 154 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 15.9 kDa. Se determinó que en el genoma de la levadura, la región codificante del gene *dh sod-1* no contiene intrones, ya que cuando se utilizó ADN genómico como templado en la amplificación por PCR, no se obtuvieron fragmento mayores a 470 pares de bases. La composición de aminoácidos deducida de la secuencia de *dh sod-1*, corresponde a aquella obtenida para la fracción IMAC 32, sugiriéndonos que el gene clonado corresponde a la forma uno de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* con las secuencias correspondientes de *Sacch. cerevisiae* y *N. crassa*, se observo ~ 70% de homología, así como homologías menores (entre 55 y 65%) con las enzimas correspondientes de otros organismos eucariontes. La mayoría de los residuos idénticos se encuentran en la posición correspondiente en SODs de otras especies, representando las regiones que están involucradas con la unión de metales y catálisis. Sin embargo, aunque los clones obtenidos (*dh sod-1*) contienen toda la información necesaria para producir una proteína funcional, no se detectaron productos recombinantes cuando se realizaron experimentos de expresión en un sistema bacteriano.

Lista de Tablas.

Tabla I. Ejemplos de radicales libres.
Tabla II. Producción endógena de ROS.
Tabla III. Principales enzimas antioxidantes.
Tabla IV. Superóxido dismutasas tipo Cobre-Zinc en organismos no eucariontes.
Tabla V. Secuencias de SOD Cobre-Zinc reportadas en el banco de datos Swiss Protein.
Tabla VI. Extracción de superóxido dismutasa de levaduras en una un solo paso.
Tabla VII. Contenido proteico y actividad SOD de varias preparaciones de levaduras.
Tabla VIII. Masas moleculares.
Tabla IX. Métodos IMAC.
Tabla X. Corrimientos IMAC.
Tabla XI. Composición de aminoácidos de las proteínas Cu,Zn SOD y enolasa.
Tabla XII. Actividad específica de preparaciones de SOD de diferentes lotes de biomasas.
Tabla XIII. Esquema de inmunización para experimentos en ratones.
Tabla XIV. Titulo de sueros en ratón.

Lista de Figuras.

Figura 1. Bioquímica de ROS.
Figura 2. Representación esquemática del sitio activo de Cu,Zn SOD de eritrocitos bovinos.
Figura 3. Hipótesis de la función ALS.
Figura 4. Electroforésis desnaturalizante de muestras derivadas de IMAC y GF.
Figura 5. Perfiles cromatográficos (IMAC y GF) de extractos Sf.
Figura 6. Electroforésis no-desnaturalizante de varias enzimas SOD.
Figura 7. Electroforésis no-desnaturalizante de Cu,Zn SOD obtenida de un lote de biomasa sujeto a estrés por ClO_2.
Figura 8. Efecto de la concentración de ClO_2 en la actividad de varias enzimas SOD.
Figura 9. Ratones inmunizados con Cu,Zn SOD y ENO obtenidas de *Deb. hansenii*.
Figura 10. Construcción pTrcHis/*dh sod-1*.
Figura 11. Expresión de la construcción pTrcHis/*dh sod-1* en *E. coli* TOP 10. Electroforésis desnaturalizante.
Figura 12. Electroforésis no-desnaturalizante de extractos *E. coli*.
Figura 13. Representación gráfica de las relaciones entre enzimas Cu,Zn SOD.

1. Radicales libres en bioquímica y medicina.

Los radicales libres y otras especies derivadas del oxígeno, son constantemente generadas *in vivo*, tanto por "accidentes químicos" como para propósitos metabólicos específicos. La reactividad de los diferentes radicales libres varía, pero algunos causan daños severos a moléculas biológicas, especialmente al ADN, lípidos y proteínas. Aunque existen sistemas de defensa antioxidante que depuran y minimizan la formación de especies derivadas de oxígeno, no son 100% efectivas. Por ello, en la célula existen sistemas de reparación que tratan las moléculas que han sido oxidativamente dañadas. El daño en ADN parece ocurrir por radicales hidroxilo en todas las células aeróbicas y puede contribuir significativamente al desarrollo del cáncer edad-dependiente (Medina, 1996).

Qué es un radical?

En la estructura de átomos y moléculas, los electrones usualmente se asocian en pares, moviéndose dentro de una región definida del espacio (*orbital*). Un electrón de cada par tiene un número de giro cuántico de +1/2 o -1/2. Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones no apareados (un electrón no apareado es aquel que se encuentra sólo en un orbital) capaz de existir independiente (de aquí el término *libre*). El radical libre más simple es el átomo de hidrógeno, con un solo protón y un electrón (Halliwell, 1995). Algunos ejemplos de radicales libres se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Ejemplos de radicales libres.

Nombre	Fórmula
Atomo de hidrógeno	$H^{\bullet}$
Hidroxilo	$OH^{\bullet}$
Oxidos de nitrógeno	$NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$
Peroxilo, alcoxilo	$RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$
Superóxido	$^{\bullet}O_2^-$
Tiol	$RS^{\bullet}$
Triclorometilo	$CCl_3^{\bullet}$

Radicales como subproductos del metabolismo.

Uno de los radicales más reactivos es el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). La exposición de organismos vivientes a radiación gamma (γ) causa fisión de los enlaces O-H en el agua (los organismos vivos contienen más de un 70% de agua), que resulta en radicales $H^{\bullet}$ y $OH^{\bullet}$. Los radicales hidroxilo reaccionan con casi todas las moléculas en las células; por ello, cuando es formado *in vivo*, daña cualquier cosa que se encuentre cerca (ya que en la célula no puede migrar distancias significativas). Se piensa que en organismos vivos, los efectos dañinos de la exposición excesiva a radiación–γ es iniciada por el ataque de radicales $OH^{\bullet}$ a proteínas, ADN y lípidos.

A pesar de que el radical $OH^{\bullet}$ es siempre dañino, otros radicales libres pueden ser útiles *in vivo*. Se sabe que los radicales libres son metabólicamente producidos en los organismos vivientes. Así, el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) es sintetizado por las células endoteliales, fagocitos y muchos otros tipos celulares a partir de L-arginina. El óxido nítrico ayuda a regular el tono vascular y parece estar involucrado en la exterminación de parásitos por los macrófagos. Los radicales superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), son producidos por células fagocíticas, ayudándoles a matar bacterias. Existen muchas de evidencias que sugieren que pequeñas cantidades de $^{\bullet}O_2^-$ extracelular pueden ser generadas (como señales moleculares intercelulares) por células endoteliales, linfocitos y fibroblastos (Linder, 1993). Además, parte del $^{\bullet}O_2^-$ es producido intracelularmente en mitocondrias y retículo endoplásmico: esto es una consecuencia inevitable de la "fuga" de electrones de sus vías correctas en la cadena de transferencia de electrones.

Gran parte del $^{\bullet}O_2^-$ generado *in vivo* es convertido en H_2O_2 (no radical), mediante una reacción de dismutación ($2^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). El peróxido de hidrógeno es semejante al agua en su estructura molecular, por lo que es muy difusible dentro, y entre las células. De igual forma que a partir de $^{\bullet}O_2^-$, el H_2O_2 puede producirse por la acción de ciertas oxidasas en las células, dentro de las que se incluyen las aminoácido-oxidasas y la xantina oxidasa (tabla II). Al igual que $^{\bullet}O_2^-$, el H_2O_2 también puede exhibir funciones metabólicas útiles. Por ejemplo, el H_2O_2 "ayuda" a la peroxidasa tiroidea a producir hormonas; de la misma forma el H_2O_2, por sí mismo o a través de sus derivados, puede desplazar la subunidad inhibidora del factor de transcripción NK-kB (Baeuerle y Baltimore, 1988). De esta forma, el H_2O_2 induce la expresión de genes del pro-virus HIV-1, la causa más común del Síndrome de Inmuno-deficiencia Adquirida (Halliwell *et al.*, 1992; Miesel *et al.*, 1995).

Generación de aniones superóxido.

La generación de radicales superóxido, de acuerdo a los mecanismos cuánticos que limitan la reducción del oxígeno bivalente, se favorece por la reducción del oxígeno monovalente. Varias enzimas evitan esta limitación y son capaces de reducir el oxígeno (sin intermediarios) a formas bivalentes o tetravalentes. De aquí que la mayor parte del oxígeno que consumimos es usado por enzimas oxidativas, como la citocromo oxidasa. De esta forma, la toxicidad en la célula se minimiza, evitando la formación de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. Existen, en las células aeróbicas, varios indicadores que muestran la importancia del estrés oxidativo: aproximadamente el 2 -l 3% del oxígeno que consume una célula, se divide en la formación de $^{\bullet}O_2^-$ y H_2O_2 (Sohal y Weindruch, 1996).

Papel de los metales.

Aunque en niveles bajos, los radicales libres son metabólicamente útiles, ya que ni el $^{\bullet}O_2^-$ ni el H_2O_2 son muy reactivos. Sin embargo, si estos compuestos se ponen en contacto con iones de fierro o cobre, puede formarse el nocivo $OH^{\bullet}$. Por ello, la presencia de tales iones en un sistema biológico puede causar que el $^{\bullet}O_2^-$ y el H_2O_2 se vuelvan dañinos. Ya que el $OH^{\bullet}$ no puede migrar distancias significativas, el daño ocurrirá en el sitio donde los iones de los metales estén presentes (Strain, 1994).

2. Estrés oxidativo.

El oxígeno es esencial para la vida en la tierra. En su estado normal, el oxígeno (O_2) es relativamente poco reactivo, sin embargo, a lo largo del metabolismo normal, y como consecuencia de perturbaciones ambientales y contaminantes (como radiaciones, sequías, contaminantes del aire, estrés térmico, herbicidas, fumar cigarros, etc.), el oxígeno da origen a diversos intermediarios letales o altamente tóxicos (Tabla II). Estos intermediarios, que son las especies biológicas de oxígeno citotóxicas más importantes, reciben el nombre genérico de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species o ROS) y radicales libres (Strain *et al.*, 1991).

Tabla II. Producción endógena de ROS

Enzima o sistema	ROS producida.
Fosforilación oxidativa en mitocondria	$^{\bullet}O_2^-$
Superóxido dismutasa	H_2O_2
Monoanino oxidasa (cerebro)	H_2O_2
Xantina oxidasa	$^{\bullet}O_2^-$
NADPH oxidasa en neutrofilos	$^{\bullet}O_2^-$
Reacción Fenton (en superficie de proteínas)	$OH^{\bullet}$
Oxido nítrico sintetasa	$NO^{\bullet}$

El término ROS incluye al radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), al oxido nítrico ($^{\bullet}NO$) y el peroxinitrito (ONOO-) (Warner, 1995). Algunas de las consecuencias del daño oxidativo incluyen la peroxidación de lípidos de membranas, perdida de función en organelos, mutación, inactivación enzimática, reducción en la eficiencia metabólica y una reducida fijación de carbono, lo que conlleva una capacidad fotosintética deteriorada en las plantas. De permitir que este daño continúe, y/o permanezca sin reparación, la integridad y función celular podrían comprometerse rápidamente. La eliminación rápida y efectiva de estas especies de oxígeno es esencial para la sobrevivencia y correcta función de todos los organismos vivientes. Para prevenir este daño, las células y los organismos utilizan tres estrategias de defensa: en una se utilizan antioxidantes de bajo peso molecular (mecanismo no-enzimático), mientras que las otras dos utilizan varias enzimas, metabolizando ROS (mecanismos enzimáticos), o reparando los daños macromoleculares causados por ROS en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (enzimas reparadoras de ADN, proteasas, lipasas, etc.) (Medina, 1996).

Defensas antioxidantes.

Dos tipos de defensas antioxidantes han evolucionado, a la par con los organismos, como mecanismos de auto-protección. Los mecanismos no-enzimáticos incluyen β-caroteno, ácido ascórbico, α-tocoferol, flavonoides, hidroxiquinonas y glutatión (Meyers, 1995; Warner, 1995; Goodsell, 1996), estos compuestos pueden neutralizar directamente las ROS. Por otro lado, las

defensas enzimáticas incluyen enzimas que son capaces de remover, neutralizar o depurar los radicales libres e intermediarios de oxígeno. Sin tales defensas, las plantas no podrían convertir eficientemente la energía solar en energía química y la vida en la Tierra no podría existir tal y como la conocemos. Como ejemplos de defensas enzimáticas, podremos mencionar la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa, que eliminan el peróxido de hidrógeno en cloroplastos y mitocondrias; la catalasa (CAT) y peroxidasa (Px), que remueven el peróxido de hidrógeno de las células; y la superóxido dismutasa (SOD), que depura los radicales superóxido (Tabla III). Se ha propuesto que las enzimas SOD son la barrera más importante para la eliminación de los radicales superóxido. El radical superóxido es el primero en formarse y es responsable de la formación de otros radicales libres más peligrosos. La CAT y la SOD son las enzimas más eficientes que al combinarse pueden convertir los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Scandalios, 1995).

Tabla III. Principales enzimas antioxidantes.

Enzima	Número E.C.	Abreviación	Reacción
Catalasa	1.11.1.6	CAT	$CAT + 2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutatión peroxidasa	1.11.1.9	GPx	$GPx + 2GSH + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Peroxidasa	1.11.1.7	Px	$Px + SH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + S$
Superóxido dismutasa	1.15.1.1	SOD	$SOD + 2^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$

Bioquímica de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se considera que la SOD juega un papel central en el metabolismo de ROS como se muestra en la Figura 1. Está claro que la SOD es un arma de dos filos, ya que convierte el ion superóxido, una especie con un baja actividad que no difunde fácilmente, en peróxido de hidrógeno, que libremente pasa a través de las membranas celulares. El ion superóxido, sin embargo, en sí mismo no es inocuo; interactúa con/e inactiva a la CAT y a la GPx. Del mismo modo, actúa recíprocamente con el óxido nítrico para formar peroxinitrito, que modifica las cadenas laterales de cisteína y tirosina y es muy neurotóxico (Warner, 1995). Así pues, la SOD puede proteger a las neuronas limitando la formación no-enzimática de peroxinitrito a partir de superóxido y óxido nítrico. En la presencia de metales como el Fe^{+2}, el peróxido de hidrógeno puede ser convertido no-enzimáticamente en radical hidroxilo, que es extremadamente reactivo.

Yim *et al.*, (1990) ha reportado que la Cu,Zn SOD también puede catalizar la producción de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno. Así, el producto de la reacción de SOD es potencialmente mucho más dañino que el propio anión superóxido. Una suposición frecuente es que cualquier incremento significativo en la actividad de SOD debe estar acompañada de un aumento comparable en la actividad de CAT y/o GPx para prevenir la excesiva acumulación de peróxido de hidrógeno. Ceballos-Picot *et al.*, (1992) discutieron esta posibilidad, generando la hipótesis de que un exceso de Cu,Zn SOD induce un desbalance en la regulación de la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Esto puede resultar en daño peroxidativo cerebral y,

posiblemente, contribuir con el envejecimiento acelerado y neuropatología relacionadas con la edad. Los radicales libres y sus derivados han sido implicados como agentes causales en numerosas enfermedades humanas, incluyendo el proceso de envejecimiento, el cáncer, el enfisema y desórdenes inmunológicos. De esta forma, la eliminación rápida y efectiva de ROS es esencial para el correcto funcionamiento y sobrevivencia de todos los organismos vivientes.

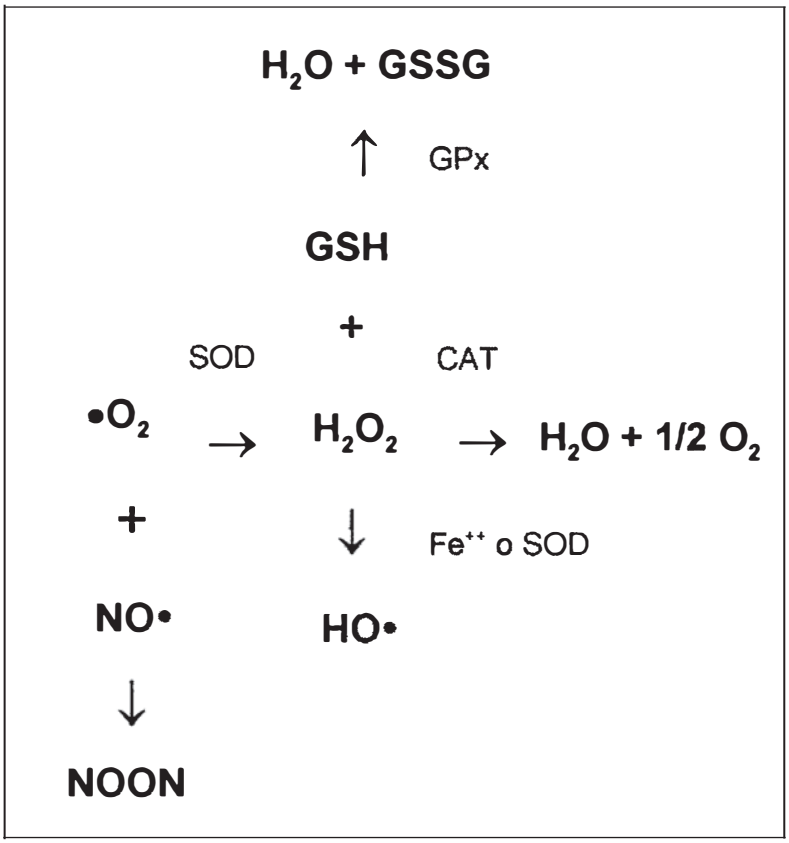

Figura 1. Bioquímica de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Superóxido dismutasas.

Las células están equipadas con una familia de enzimas que depuran catalíticamente los radicales superóxido a través de la reacción: $2^{\bullet}O^{-}_{2} + 2H^{+} \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$. Debido a esto, ayudan a proteger a las células de $^{\bullet}O^{-}_{2}$ (McCord y Fridovich, 1969). Aparentemente, existen tres tipos de enzimas SOD, dependiendo de su grupo prostético. La enzima Cu,Zn SOD se encuentra localizada en el citoplasma de plantas y otros eucariontes (Amano *et al., 1990*), mientras que una forma extracelular ha sido caracterizada solo de fluidos corporales de mamíferos (Marklund, 1980). La Mn SOD se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citoplasma de bacterias, mientras que la Fe SOD solamente se ha detectado en el espacio periplásmico de procariotes (Hong *et al.*, 1992). Una cuarta enzima SOD, que contiene como grupo prostético Ni, ha sido recientemente descrita (Ni SOD; en este caso, la enzima se encontró en el citoplasma de tres especies del genero *Streptomyces* (Youn *et al.*, 1996 a y b). Existe una gran similitud en la

secuencia de aminoácidos de la Fe- y la Mn-SOD (Matsumoto *et al., 1991*), sin embargo, al compararlas las secuencias con la de la Cu,Zn SOD no se encontró homología; por lo tanto, se cree que esta última evolucionó independientemente a las otras SODs (Steiman y Hill, 1973; Fridovich, 1989).

3. Cobre-Zinc superóxido dismutasa.

Distribución.

La cobre-zinc superóxido dismutasa fue caracterizada por primera vez en 1969 (McCord y Fridovich, 1969), aunque la comunidad científica sabía de su existencia desde 30 años antes (Mann y Keilin, 1939). La Cu,Zn SOD se encuentra en virtualmente todas las células eucarióticas como levaduras, plantas y animales, pero esta generalmente ausente en organismos no-eucarióticos, tales como virus y procariotes (bacterias y algas azul-verde). La primera excepción a esta regla fue descubierta en la bacteria luminiscente *Photobacterium leiognathi*. Este organismo presenta Cu,Zn SOD, y existe en relación simbiótica con el pez "caballito de mar", ocupando una glándula especial que le imparte al pez la característica luminiscente. A través de un análisis de comparación entre la composición de aminoácidos de la enzima bacteriana y la de organismos superiores, se encontró que la enzima bacteriana estaba estrechamente relacionada con la Cu,Zn SOD del pez (Puget y Michelson, 1974).

La primera interpretación, fue que la bacteria había adquirido el gen de su huésped mediante transferencia génica. Sin embargo, mediante estudios de secuenciación recientes, se ha demostrado que la enzima bacteriana no se semeja ni remotamente a la de organismos eucariontes. La misma conclusión surge del análisis de la secuencia de la Cu,Zn SOD presente en la bacteria de vida libre *Caulobacter crescentus*. Un mutante nula, para el gen de la Cu,Zn SOD, no presentó deficiencias fenotípicas bajo condiciones de crecimiento ordinario, ni mostró ser hipersensible al paraquat, pero sí al citrato (que es un buen quelante, capaz de extraer los cationes metálicos de los lipopolisacáridos de la superficie celular) (Steiman, 1993). Por otra parte, se observó que una mutante nula, para el gen que codifica para la Cu,Zn SOD, de *Brucella abortus* perdió gran parte de su capacidad para sobrevivir en ratón; por lo que se piensa que la enzima probablemente funcione también como factor de patogenicidad (Tatum *et al.*, 1992).

Recientemente se ha descubierto que la Cu,Zn SOD funciona como protección contra el daño oxidativo en cepas doble mutantes (*soda sodb*) de *E. coli* (Benov y Fridovich, 1996). Como se muestra en la Tabla IV, a la fecha existen en el Swiss Protein Data Bank solo 9 reportes de secuencias de Cu,Zn SOD en bacterias y 4 en virus (actualización del 30 de Mayo, 1997).

Banco de datos

A la fecha, 81 secuencias de Cu,Zn SOD se encuentran incluidas en el Swiss Protein Data Bank; de estas, 13 pertenecen a organismos no-eucarióticos, 8 son formas extracelulares, y las 60 restantes son formas citosólicas (Tabla V).

Tabla IV. Superóxido dismutasas tipo Cobre-Zinc en organismos no-eucariontes.

Organismos	No. SwissProt	Localización	Actividad	Referencia
Bacteria				
Photobacterium leiognathi	P00446	NR	NR	Puget y Michelson, 1974
Pseudomona diminuta	NR	NR	NR	Steiman, 1985
P. maltophila	NR	NR	NR	Steiman, 1985
Brucella aburtus	P15453	periplasmica	funcional	Beck *et al.*, 1990.
Caulobacter crescentus	P20379	periplasmica	NR	Steiman y Ely, 1990
Haemophilus sp.	NR	periplasmica	NR	Loynds *et al.*, 1992
H. pleuropneumoniae	P24702	periplasmica	funcional	Kroll *et al.*, 1995
H. influenzae	P25841	periplasmica	no funcional	Kroll *et al.*, 1991
H. parainfluenzae	P25842	periplasmica	funcional	Kroll *et al.*, 1991
Legionella pneumophila	P53637	periplasmica	NR	No publicado
Salmonella typhimurium	P53636	periplasmica	NR	Canvin *et al.*, 1996
Escherichia coli	P53635	periplasmica	funcional	Benov y Fridovich, 1994; Imlay y Imlay, 1996
Virus				
Vaccinia virus (Copenhagen)	P21132	desconocida	no funcional	Goebel *et al.*, 1990
Vaccinia virus (WR)	P26669	desconocida	no funcional	Smith *et al.*, 1991
Variola virus	P33805	desconocida	no funcional	Massung *et al.*, 1993
ACMNPV	P24705	desconocida	desconocida	Ayres *et al.*, 1994

Características de la Cu,Zn SOD.

Como resultado de estudios realizados en varias especies, se sabe que la Cu,Zn SOD es una proteína citosólica dimérica, que consiste de dos subunidades idénticas no glicosiladas, unidas no covalentemente (Hong *et al.*, 1992). Cada subunidad de 151 aminoácidos, tiene una masa molecular de 16 kDa, y une un átomo de cobre y uno de zinc (Marklund, 1984; Tibell *et al.*, 1987). Se propone que la forma extracelular es una glicoproteína tetramérica, con una secuencia de señal de 18 aminoácidos (Hjalmarsson *et al.*, 1994). A través de varios estudios, se ha demostrado que solo el átomo de cobre sufre la oxido-reducción durante la dismutación del anión superóxido (Malinowski y Fridovich, 1979), mientras que el átomo de zinc contribuye solamente en el mantenimiento de la configuración y estructura del sitio activo (Figura 2; Reinecke *et al.*, 1988).

Ciertamente, dada la recuperación de la actividad SOD por la adición de iones de cobre a la Cu,Zn SOD libre de metales (apoenzima), se ha sugerido el uso de la apoenzima como un método sencillo para la cuantificación de cantidades traza de cobre (Halliwell y Gutteridge, 1991). En general, iones de otros metales de transición, tales como Mn^{+2}, no puede reemplazar al cobre para formar una enzima funcional, pero iones de cobalto, mercurio o cadmio sí pueden reemplazar al Zn^{+2}, incrementando la estabilidad de la enzima. Si el Cu^{+2} es reemplazado por iones de cobalto (Co^{+2}), la enzima puede todavía catalizar la dismutación de $^{+}O^{-}_{2}$, aunque con una constante mucho

menor: 4.8 x $10^6 M^{-1}s^{-1}$ (la constante normal para Cu,Zn SOD de bovino a pH fisiológico es 1.6 x $10^9 M^{-1}s^{-1}$; Halliwell y Gutteridge, 1991).

Tabla V. Secuencias de SOD Cobre-Zinc reportadas en el banco de datos Swiss Prot.

Especie	Gen	Especie	Gen	Especie	Gen
Eucariontes					
Oryza sativa (rice)	SOD1	*D. madeirensis*	SOD	*Pinus sylvestris*	SODC
Oryza sativa	SOD2	*D. melanogaster*	SOD	*Prionace glauca*	SODC
Oryctolagus cuniculus	SOD1	*D. willistoni*	SOD	*Brugia pahangi*	EC-SOD
Zea mays (maize)	SOD2	*D. miranda*	SOD	*Dirofilaria immitis*	EC-SOD
Z. mays	SOD4	*D. tolteca*	SOD	*Haemonchus contortus*	EC-SOD
Z. mays	SOD5	*D. virilis*	SOD	*Homo sapiens*	EC-SOD
Bos taurus (bovine)	SOD1	*Ceratitis capitata*	SOD	*Onchocera volvulus*	EC-SOD
Caenorhabdis elegans	SOD1	*Schistosoma mansoni*	SOD	*Oryctolagus cuniculus*	EC-SOD
Caretta caretta	SOD1	*Chymomyza amoena*	SOD	*Rattus norvegicus*	EC-SOD
Cavia porcellus (guinea pig)	SOD1	*Lycopersicon esculentum*	SODC	*Schistosoma mansoni*	EC-SOD
Gallus gallus (chicken)	SOD1	*L. esculentum*	SODP	**No-eucariontes**	
Ovis aries	SOD1	*Spinacia oleracea*	SODC	Bacteria	
Equus caballus	SOD1	*Arabidopsis thaliana*	SODC	*Haemophilus influenzae*	SODC
Homo sapiens	SOD1	*Nicotiana plumbaginifolia*	SODC	*H. parainfluenzae*	SODC
Saccharomyces cerevisiae	SOD1	*Olea europea*	SODC	*H. pleuropneumoniae*	SODC
Mus musculus	SOD1	*Onchocera vvolvulus*	SODC	*Legionella pneumophila*	SODC
Neurospora crassa	SOD1	*Pisum sativum*	SODC	*Photobacterium leiognathi*	SODC
Ipomoea batatas	SOD15	*P. sativum*	SODP	*Brucella abortus*	SODC
Schizosaccharomyces pombe	SOD1	*Xiphias gladius*	SODC	*Salmonella thyphimurium*	SODC
Sus scrofa	SOD1	*Brassica oleracea* (cabbage)	SODC	*Caulobacter crescentus*	SODC
Rattus novergicus	SOD1	*Brugia pahangi*	SODC	*Escherichia coli*	SODC
Drosophila bussckii	SOD	*Xenopus laevis*	XSODA	Virus	
D. obscura	SOD	*X. laevis*	XSODB	ACMNPV	SOD
D. pseudoobscura Bogotana	SOD	*Rana catesbeiana*	Frag.	Variola virus	A45R
D. pseudoobscura	SOD	*Picea abies*	Frag.	Vaccinia virus (Copenhagen)	A45R
D. persimilis	SOD	*Horedum vulgare*	Frag.	Vaccinia virus (WR)	A45R

Secuencia de aminoácidos.

Las secuencias completas de aminoácidos de la Cu,Zn SOD de varias plantas y animales se han estudiado y muestran grandes similitudes. 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 cristalografia de rayos X. Cada subunidad está compuesta, principalmente, por ocho cadenas anti-paralelas de estructuras de "β–sheet" que forman un cilindro aplanado,

además de tres lazos externos. El ion cobre se mantiene en el sitio activo mediante la interacción con el nitrógeno en las estructuras anulares del imidazol de cuatro residuos de histidina (números 44, 46, 61 y 118 en la secuencia bovina). El ion zinc está unido al cobre mediante interacciones con el imidazol de la histidina 61, interactuando también con las histidinas 69 y 78 y 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 los protones necesarios para la reacción de dismutación.

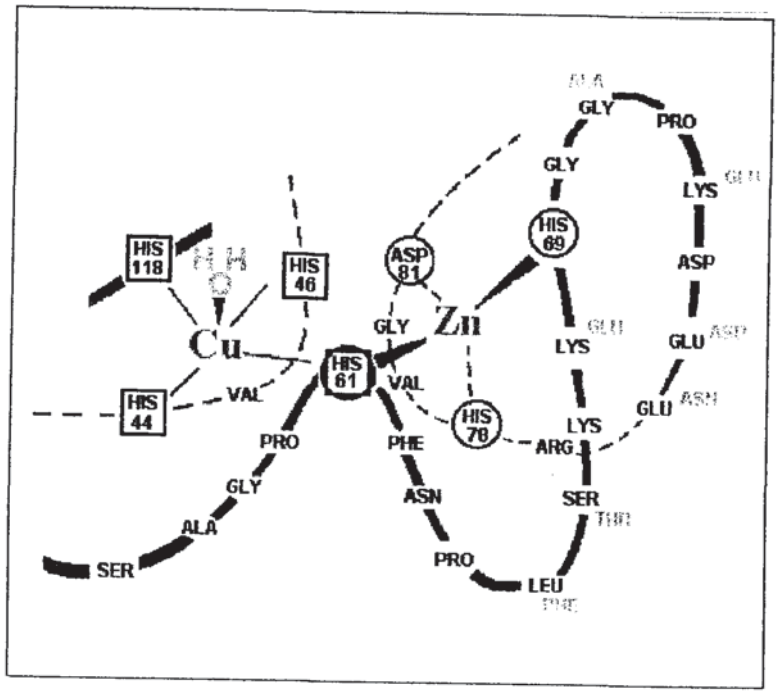

Figura 2. Representación esquemática del sitio activo de la Cu,Zn SOD de eritrocito bovino, mostrando las interacciones metal-ligando y puentes de histidina entre Cu y Zn. Los residuos externos grises son substituciones de aminoácidos encontradas en el gene de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* clonado por Hernández-Saavedra *et al.*, (V). Modificado de Linder, 1993.

Gran parte de la superficie de cada subunidad proteica está cargada negativamente, por lo que rechaza los iones $^{\bullet}O^{-}_{2}$, a excepción de las zonas positivamente cargadas, que lo conducen al sitio activo. Dado lo anterior, cualquier ion $^{\bullet}O^{-}_{2}$ que se aproxime a cualquier otra parte de una subunidad, parece ser "guiado" hacia el sitio activo. Las modificaciones químicas a las cadenas de aminoácidos laterales, positivamente cargadas, disminuyen en gran medida la actividad de la enzima. Aunque, en las enzima, los dos sitios activos están separados uno de otro, las subunidades por sí mismas catalizan la dismutación del $^{\bullet}O^{-}_{2}$, solo que de una forma más lenta (Halliwell y Gutteridge, 1991).

4. Importancia médica.

Los radicales libres y sus derivados, están implicados como agentes causales de varias enfermedades humanas, incluyendo el proceso de envejecimiento, algunas formas de cáncer, enfisema, y recientemente, enfermedades neurodegenerativas como Esclerosis Amiotrófica Lateral (ALS en sus siglas en inglés) y como parte de la patología del Síndrome de Down (DS). Debido a la importancia de Cu,Zn SOD como mecanismo de defensa contra los radicales libres, en la medicina se ha usado como tratamiento para varios desordenes patológicos de diversos órganos, como el hígado (Nikishimi *et al.*, 1975), la piel (Chedekel *et al.*, 1987), los ojos (Bhuyan y Bhuyan, 1987; Bunce, 1994) y el cerebro (Coyle y Puttfarcken, 1993; Rosen *et al.*, 1993; Rothstein *et al.*, 1994). Las enzimas SOD cobre-zinc, también se han utilizado para controlar los efectos colaterales de la radioterapia (Petkau *et al.*, 1975; Nelson *et al.*, 1992, 1993) y quimioterapia (Peskin *et al.*, 1997), así como en enfermedades inflamatorias (Oyanagui, 1976), reumatismo (Puig-Parellada y Planas, 1978), enfermedades autoinmunes (Bruroni *et al.*, 1975) y arteriosclerosis (Frazer y Brady, 1978).

Estudios correlativos.

Se ha establecido la existencia de una relación entre la producción de radicales libres y el proceso de envejecimiento (Medina, 1996). Una de las teorías más aceptadas para explicar las causas de envejecimiento considera que el proceso de senescencia está directamente relacionado con una pérdida de capacidad funcional, debido a la acumulación de daños oxidativos moleculares (Fleming, 1995; Medina, 1996). El daño es manifiesto como una peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados de membrana, modificaciones en el ADN (incluyendo alteraciones de bases, ruptura de cadenas sencillas, intercambio entre cromátides hermanas y fusión proteína-ADN) y carboxilación y pérdida de sulfhidrilos en proteínas (que se traducen en inactivación o lísis). La etiología del envejecimiento, relacionada con un incremento en el estrés oxidativo, puede estar ligada a tres factores: 1) Un incremento en la generación de ROS, 2) Una disminución o mal funcionamiento de las defensas antioxidantes, y/o 3) Una disminución de la eficiencia de reparación del daño molecular. Al estudiar la relación entre la función de la SOD y el envejecimiento, se han observado tanto modificaciones tisulares (Gurney *et al.*, 1994), como la extensión del tiempo de vida de la mosca *Drosophila melanogaster*, debido a la sobre-expresión de las enzimas CAT y Cu,Zn SOD (Orr y Sohal, 1994).

Enfermedades genéticas relacionadas a la SOD.

Hoy día, la expresión alterada de la Cu,Zn SOD se ha asociado a dos enfermedades genéticas. La primera, es el síndrome de Down (DS), donde una copia extra del cromosoma 21 (o parte de él) se encuentra presente en el individuo. En humanos, la Cu,Zn SOD se localiza en el cromosoma 21 (Tan *et al.*, 1973), y el nivel de esta enzima se encuentra elevado en un 50% en células de individuos con DS. Aunque el gen de la Cu,Zn SOD parece residir fuera de la región del cromosoma 21 responsable de las características fenotípicas predominantes del DS (Korenberg *et al.*, 1990), la sobre-expresión de la misma, deteriora el transporte de

neurotransmisores en células PC12 de rata cultivadas, y a su vez altera las uniones neuromusculares (Avraham *et al.*, 1988).

La otra enfermedad que recientemente se ha asociado con la expresión alterada del gen de la Cu,Zn SOD, es la esclerosis amiotrófica lateral familiar (ALS); un desorden degenerativo autosómico dominante edad-dependiente, de las neuronas motoras en la corteza, tallo cerebral y médula espinal. Rosen *et al.*, (1993) mapeo este desorden de la Cu,Zn SOD en el cromosoma 21, y demostró que está relacionado con mutaciones puntuales en este gen. En los individuos afectados, la actividad de la Cu,Zn SOD en eritrocitos es menor al 50% de los niveles normales. Mediante el estudio de las secuencia de nucleótidos de este gen, se han encontrado, en las regiones de la proteína que controlan las estructuras terciaria y cuaternaria de la enzima, 12 mutaciones puntuales diferentes.

La importancia de la reducida actividad Cu,Zn SOD en individuos que padecen ALS, parece radicar en la acumulación de iones superóxido en las neuronas motoras (Figura 3). El anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito (Figura 1), que conduce a la nitración, catalizada por la SOD, de los residuos de tirosina y sulfhidrilos en las proteínas (Beckman *et al.*, 1993; Ischiropoulos *et al.*, 1992).

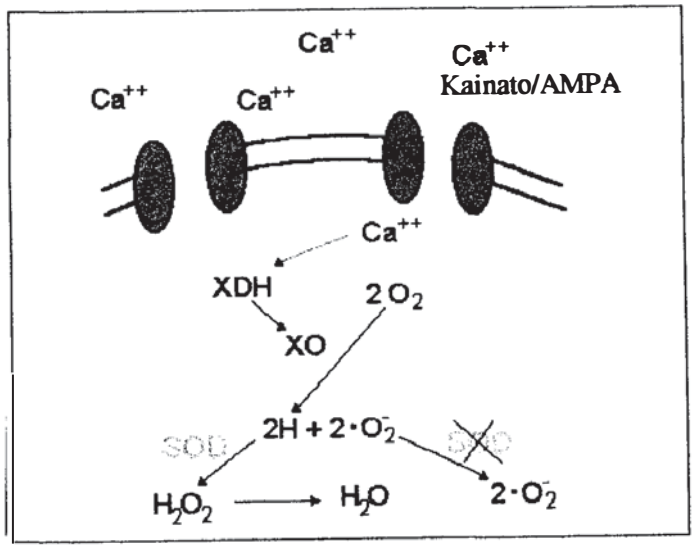

Figura 3. Hipótesis de acuerdo a la cual la activación fisiológica de los receptores kainato/AMPA en neuronas motoras genera un bajo nivel de $^{\bullet}O^{-}_{2}$, los aniones superóxido se acumulan y, como resultado se da la muerte neuronal.

Deficiencia de Cu,Zn SOD.

A partir de estudios realizados en cuatro especies de invertebrados (*N. crassa*, *Sacch. cerevisiae*, *E. coli* y *Drosophila sp.*), se ha demostrado que un organismo mutante, deficiente en Cu,Zn SOD, es sensible al anión superóxido (Warner, 1995). Es claro que la SOD juega un papel primordial en el organismo para sobrevivir al estrés oxidativo. De interés particular es la deficiencia de Cu,Zn SOD en humanos. Existen tres posibilidades para explicar la pérdida de actividad SOD: 1) Mutaciones en la región codificante del gene (como en ALS); 2) Mutaciones en el gen que se traduce en un nivel de expresión alterado, y 3) pérdida total, o parcial, de un cromosoma 21 (Warner, 1995).

En la monosomía del cromosoma 21, el nivel de Cu,Zn SOD es 50% menor que en un caso normal; esta situación es devastadora en los primeros años de vida (Ackerman *et al.*, 1988). En la monosomía parcial del cromosoma 21 (donde la parte perdida del cromosoma corresponde al gen para la Cu,Zn SOD) se ha observado, en un niño de 2 años de edad, desarrollo anormal (anormalidades óseas, palpitaciones cardiacas, dismorfia, etc.) y sensibilidad a la hiperoxia (Ackerman *et al.*, 1988).

Otras enfermedades relacionadas con la producción de superóxido y Cu,Zn SOD.

Como se ha discutido antes, ya se ha establecido que las células y tejidos se encuentran normalmente sujetos a una constante amenaza por daño oxidativo. Cuando el daño se debe a un inadecuado consumo dietario de antioxidantes, o a niveles inadecuados de enzimas antioxidantes, pueden ocurrir niveles patológicos de daño oxidativo (Strain, 1994). Las enfermedades mejor documentadas son las cataratas (Taylor, 1992) y las enfermedades cardiovasculares (Ames *et al.*, 1993; Jialal y Grundy, 1992); en varias revisiones se ha resumido la relación existente entre el daño oxidativo y la enfermedad. Recientemente, se ha considerado el estatus actual de la terapia antioxidante para proteger a las células contra tales enfermedades y otros estados patológicos (Rice-Evans y Diplock, 1993).

Prácticamente, nada se sabe acerca de como se regula la expresión de genes de SOD en células de mamíferos, esto contrasta con nuestro conocimiento de dichos procesos en levaduras, específicamente en *Sacch. cerevisiae*.

5. Cu,Zn SOD en levaduras y hongos.

El gen que codifica la SOD-1 ha sido clonado en varias especies de eucariontes mayores. Sin embargo, el gen *sod-1* de hongos y levaduras no se ha estudiado extensivamente. A la fecha, solo cuatro secuencias de nucleótidos están reportadas en el EMBL-Gene Bank Data Libraries. Estas secuencias corresponden a: *Saccharomyces cerevisiae* (J03279), *Schizosaccharomyces pombe* (X66722), *Neurospora crassa* (M58687), y *Aspergillus japonicus* (L32834).

La levadura *Sacch. cerevisiae* tiene dos proteínas SOD. La SOD-1 (Cu,Zn SOD) es citosólica, mientras que la SOD-2 (Mn SOD), que es sintetizada como una pre-proteína, se encuentra en la mitocondria. La estructura tridimensional y los mecanismos de acción de estas enzimas están bien caracterizadas (Djinovic *et al.*, 1992b), sin embargo, sus propiedades biológicas aun son tema de discusión.

Función-regulación

La expresión de las SODs en levaduras depende de varios factores. Se ha observado que un incremento en la actividad de SOD-1, mejora la resistencia de la célula al anión $\bullet O^-_2$ y a concentraciones elevadas de iones bivalentes como el Cu^{+2} y el Zn^{+2}. Una efecto similar se ha observado cuando las levaduras se cultivan con N-alcanos como única fuente de carbono, ya que la asimilación de alcanos (en levaduras) está sujeto a una oxidación inicial a través de la hidroxilación del citocromo P450 (Kujumdzieva-Savova *et al.*, 1991). La capacidad de las levaduras de crecer en fuentes de carbono no-fermentativas (como el metanol o el glicerol), está asociada a la inducción de varias enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa, y la alcohol oxidasa (Paganelli *et al.*, 1988).

En *Sacch. cerevisiae*, las SOD-1 y SOD-2 tienen comportamientos diferentes en respuesta a la exposición a cobre (Greco *et al.*, 1990). Se ha reportado que la actividad Cu,Zn SOD se incrementa de acuerdo a con la concentración de cobre en el medio, mientras que la Mn SOD no. De igual forma, se ha observado, bajo condiciones anaeróbicas, un incremento en la actividad SOD cobre-dependiente (Galiazzo *et al.*, 1991). La presencia del cobre en el sitio catalítico de la Cu,Zn SOD sugiere que la disponibilidad del cobre puede limitar la actividad de la enzima, ejerciendo, de esta forma, una regulación a un nivel post-transcripcional. Más aún, el cobre puede modular la Cu,Zn SOD de levadura a nivel transcripcional vía ACE1 (Carri *et al.*, 1991), que es un factor de transcripción que en momento de interacción (unión) con el Cu(I), activa el promotor de CUP1, el gen que codifica la cobre-tioneina (Thiele, 1988; Furst y Hamer, 1989). En el promotor de la Cu,Zn SOD se ha localizado un sitio de unión ACE1 (Carri *et al.*, 1991); del mismo modo, se ha demostrado *in vitro* su habilidad de unir ACE1 (Gralla *et al.*, 1991). Estos datos, junto con la inducción de ARNm de la Cu,Zn SOD en presencia de $AgNO_3$, sugieren un segunda función de la SOD-1 en levaduras: aparentemente la Cu,Zn SOD de *Sacch. cerevisiae* funciona como un quelante de metales (Ciriolo *et al.*, 1994).

6. *Debaryomyces hansenii*: una levadura halotolerante.

Debaryomyces hansenii (en su estado imperfecto *Candida famata*; sin. *Torulopsis candida*, *T. famata*, *T. minor* y *C. flareri*) es un organismo eucarionte perteneciente al reino Fungi dentro de la división Eumycota, subdivisión Ascomycotina. Esta especie está incluida en la subclase Hemiascomycetes, clase Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae. *Deb. hansenii* es una levadura marina, que ha servido como el principal modelo biológico para estudios de halotolerancia en organismos marinos. Esta especie es altamente halotolerante. Puede crecer en un medio con 0 a 24% (0 a 4.13 M) de cloruro de sodio (Adler, 1986; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995a). Cuando es cultivada en altas concentraciones de sal, este organismo excreta sodio e incorpora selectivamente iones potasio (Hobot y Jennings, 1981). Para balancear el potencial osmótico en presencia de altas concentraciones de sales, *Deb. hansenii* produce y acumula intracelularmente alcoholes polyhídricos (Adler y Gustaffson, 1980; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995a).

En lo que respecta a estudios de biología molecular en esta especie, solo se han realizado esporádicamente. Se ha aislado una secuencia de replicación autónoma (ARS) (Nadathur y Banaszak, 1992; NCBI S65728), así como las secuencia de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (NCBI D55727) y, un fragmento del gen de una transcriptasa reversa (NCBI Y11869). Como herramientas taxonómicas, se han realizado amplificaciones y secuenciación de fragmentos de ARN ribosomal (rRNA) (Fell *et al.*, 1992; Kurtzman, 1994; NCBI U45808, D25211, D25192, C25173, D21851, L20828, L10683, L19666, L20222, L10742, L11098, X62649, L22159, L10649, X58053). En lo que respecta a proteínas, solo la secuencia que corresponde al citocromo c (P00043) esta incluida en el Swiss Protein Data Bank.

Colección de levaduras marinas del CIBNOR.

Deb. hansenii cepa C11 fue aislada de la costa Pacifico de Baja California Sur, a 50m de profundidad (Hernández-Saavedra, 1990), y pertenece a la colección de levaduras marinas del CIBNOR. En la actualidad, la colección está conformada por 78 cepas, agrupadas en nueve géneros (*Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Leucosporidium*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*), aisladas de diferentes ambientes marinos (Hernández y Ochoa, 1992; Hernández-Saavedra, 1990; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995a).

Con el fin de entender que factores afectan la distribución de estos organismos en ambientes marinos, se han realizado varios estudios. Por ejemplo, se encontró que para el género *Sporobolomyces*, que fue encontrado lejos de la línea costera a 50 y 100 m de profundidad, los factores que afectan principalmente su distribución son los niveles de oxígeno disuelto y la salinidad (Hernández-Saavedra *et al.*, 1992). Para el género *Candida*, que fue aislado principalmente de las áreas costeras entre 0.3 y 50 m de profundidad, se encontró que los factores principales que influencian su distribución la temperatura del agua y el oxígeno disuelto (Hernández-Saavedra *et al.*, 1995b). Sin embargo, en uno u otro caso, la cantidad de y tipo de nutrientes también pueden influir sobre las poblaciones de levaduras y su distribución.

A lo largo del proceso de caracterización morfológica y fisicoquímica, para la taxonomía de levaduras marinas, observamos que *Deb. hansenii* cepa C11 tenía características especiales de crecimiento (tolerancia térmica y salina) y metabolismo con diferentes fuentes de carbono (Hernández-Saavedra, 1990; Hernández-Saavedra, *et al.*, 1995a). Estos estudios también demostraron algunas características ventajosas en la producción de la enzima Cu,Zn SOD, por lo que fue seleccionada para estudios posteriores.

Halotolerancia de Deb. hansenii.

Deb. hansenii cepa C11 puede crecer a concentraciones cloruro de sodio de hasta un 18%. A esta concentración, encontramos que el mecanismo de esta especie para balancear la osmolaridad interna, respecto al medio ambiente extracelular, es la acumulación intracelular de glicerol y aminoácidos (80% y 20% respectivamente); adicionalmente se observó una reducción del 56% en el volumen celular (Hernández-Saavedra, 1992; Hernández-Saavedra *et al.*, 1995a). La velocidad específica de crecimiento (μ) no se modificó a 30°C entre cero y 10% de NaCl. En contraste, el organismo mostró una alta sensibilidad a la sal a 20 y 25°C (Hernández-Saavedra *et al.*, 1995a).

Extracción de Cu,Zn SOD de Deb. hansenii.

Al mismo tiempo que los estudios de producción y optimización de biomasa celular (II, III), se desarrolló un proceso de producción a escala intermedia (I). Para el aislamiento y la purificación de la Cu,Zn SOD no se utilizaron inductores durante la fermentación, a pesar de que se registró un incremento del 400% en la actividad de la enzima después de la aplicación de pulsos de oxígeno o $CuSO_4$ (II), o al utilizar glicerol como fuente de carbono (Ramírez-Orozco, 1997). Para la obtención de la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii,* se probaron varios métodos de extracción.

Para liberar la enzima, en un intento inicial se provocó la permeabilización de las células mediante el uso de solventes orgánicos como éter (Patente USA 4 390 628, Johansen, 1983), en otro, se utilizó una mezcla de metanol-cloroformo (2:1) acompañado de agitación vigorosa con vortex (Hernández-Saavedra, 1992). Mediante estas metodologías se obtuvieron preparaciones enzimáticas con una sola banda de proteína (Cu,Zn SOD), bajos rendimientos y pobre actividad específica (Tabla VI).

Debido a estos resultados, se introdujo un método alternativo que involucra el rompimiento celular mediante el uso de microesferas de vidrio (I). Con ésto, fue posible estandarizar la obtención de un homogenado celular con rendimientos y actividad Cu,Zn SOD adecuados (Tabla VII).

Tabla VI. Extracción de SOD de levadura marina en un solo paso.

Metodo	Proteína (mg/ml)	Unidades/ml	Unidades/mg	Unidades/g peso seco
Eter	20,00	1090,00	55,00	1525,00
Dietileter	5.7	287,00	51,00	800,00
Cloroformo:metanol	2.2	200,00	71,00	798,00

Tabla VII. Contenido proteico y actividad SOD de varias preparaciones de levadura.

	Proteína (mg/ml)		Actividad específica (U/mg)	
Conjunto de biomasa	So	Sf	So	Sf
3,00	5.12	0.18	27,00	1,193.55
7,00	4.34	0.46	35,00	1,579.61
8,00	4.18	0.42	24,00	1,131.88
10,00	4.58	0.42	32,00	1,664.81
11,00	4.73	0.33	30,00	1,067.99
promedio	4.71	0.36	29.6	1,515.99

Los extractos Sf consisten de dos principales bandas de proteína (Figura 4 A y B, flechas) que mediante secuenciación peptídica (después de digestión con tripsina) fueron identificadas como enolasa y Cu,Zn SOD. El porcentaje de similitud más alto del péptido Cu,Zn SOD (VSGVVNFEQSSESDPT), se encontró con la región homóloga de la secuencia de la Cu,Zn SOD de *Sacch. cerevisiae* P00445 (81%), mientras que para los péptidos de enolasa (VDEFLLSLDGTPNK, NQIGT, TESIQAA y KIEESLGDAIYAGK) se encontraron similitudes del 79%, 100%, 71% y 53% respectivamente, con los péptidos homólogos de la ENO1 de *Sacch. cerevisiae* (P00924). La masa molecular de ambas proteínas se determinó mediante SDS-PAGE al 12% (IV), resultando valores de 30.91 kDa para la enolasa y 15.6 kDa para la Cu,Zn SOD (Tabla VIII).

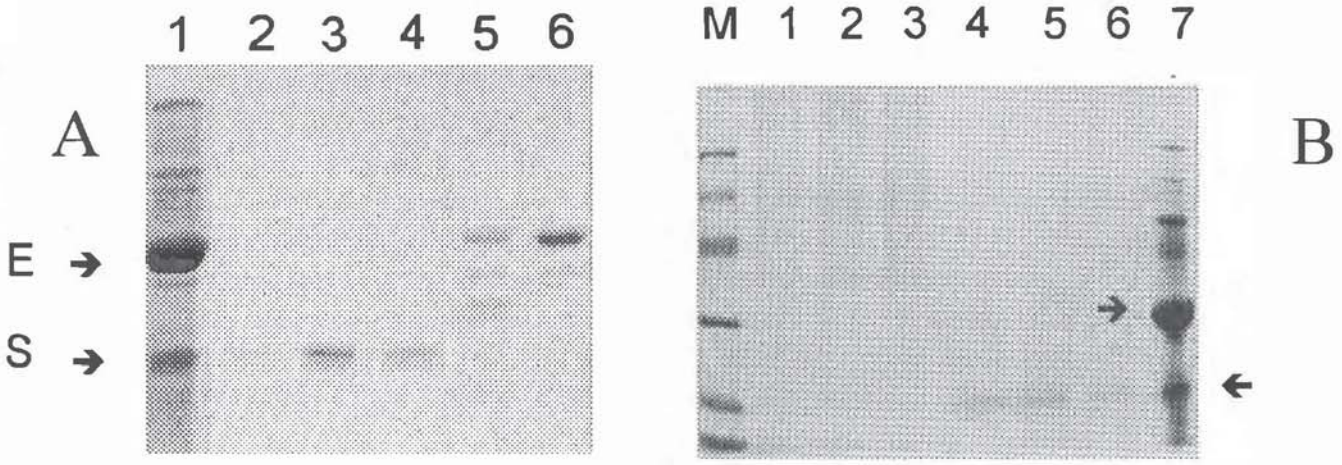

Figura 4. 12% SDS-PAGE. Gel A, cromatografía IMAC. Línea 1, extracto Sf; línea 2, fracción IMAC 10 (pico A); línea 3, fracción IMAC 32 (pico B); línea 4, fracción IMAC 37 (pico B); líneas 5 y 6, pico C. Gel B, Filtración en gel. Línea 1, fracción 27; línea 2, fracción 28; línea 3, fracción 30; línea 4, fracción 47; línea 5, fracción 50; línea 6, fracción 55; y línea 7, extracto Sf. M, marcador de masa molecular. Las flechas denotan las principales bandas proteicas de extractos Sf. E, enolasa y S, Cu,Zn SOD. Técnica de tinción: Azul de Coomassie B.

Tabla VIII. Masas moleculares

Enzima	Origen	Masa molecular (kDa)
Enolasa	*Deb. hansenii* (Sf)	30.91 + 1.29
Cu,Zn SOD	*Deb. hansenii* (Sf)	15.6 + 1.72
Cu,Zn SOD	*Sacch. cerevisiae* (CARLBIOTECH)	20.05
Cu,Zn SOD	*Bos taurus* -higado- (DDI Farmaceuticos)	16.33
Cu,Zn SOD	*B. taurus* (Sigma)	15.96
Fe SOD	*Escherichia coli* (Sigma)	24.07
Mn SOD	*E. coli* (Sigma)	26.38

Purificación de Cu,Zn SOD de Deb. hansenii.

Para su caracterización fisicoquímica, fue necesario purificar la mezcla de proteínas Sf. Con este objeto se utilizaron dos métodos: a) filtración en gel y b) cromatografía IMAC.

Para la filtración en gel, se utilizó una columna Sephadex G-200 (25 mm x 500 mm) conectada a un sistema de Cromatografía Líquida de Baja Presión (BioRad). La columna se equilibró con un tampón TRIS 10 mM/ NaCl 0.15 M/ $CuCl_2$ 30 μM a pH 7, para posteriormente ser calibrada utilizando como marcadores moleculares: β-amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12.4 kDa) (Pharmacia). Las muestras Sf se dializaron contra el tampón de equilibrio y posteriormente se inyectaron en la columna 500 μl de la muestra (0.4 mg). La elución de las proteínas se llevó a cabo con tampón TRIS 10 mM/ NaCl 0.15 M/ $CuCl_2$ 30 μM a pH 7, a una velocidad de 0.3 ml/min a 4°C. Se colectaron fracciones cada 3 min. Para la detección de la enzima Cu,Zn SOD en las fracciones se transfirieron 25 μl de cada fracción a placas de ELISA de 96 pozos para analizarse mediante una modificación del método de Beauchamp y Fridovich (1971) desarrollado en nuestro laboratorio (IV). En la Figura 5a, las muestras marcadas con triángulos corresponden a las fracciones con actividad de SOD. Como se muestra en la Figura 5a, la actividad enzimática esta esparcida en varias fracciones (de la fracción 45 a la fracción 75).

Para la cromatografía IMAC, se empleó una columna de Superosa HR (100 mm x 20 mm, Pharmacia LKB) activada con $CuSO_4$ 0.2 M, conectada a un FPLC (Pharmacia). Para la preparación de la muestra y condiciones de corrimiento de la columna se usó el método descrito por Hernández-Saavedra y Ochoa (IV). Con esta metodología (Tabla IX), fue posible el obtener preparaciones de la enzima Cu,Zn SOD altamente puras, así como de enolasa (Figura 4A). La enolasa representa aproximadamente el 70% de la proteína total en las muestras Sf. A la fecha, se han realizado un total de 25 corrimientos IMAC, utilizando extractos (Sf) derivados de varios lotes biomasa de *Debaryomyces hansenii* con los resultados mostrados en la Tabla X.

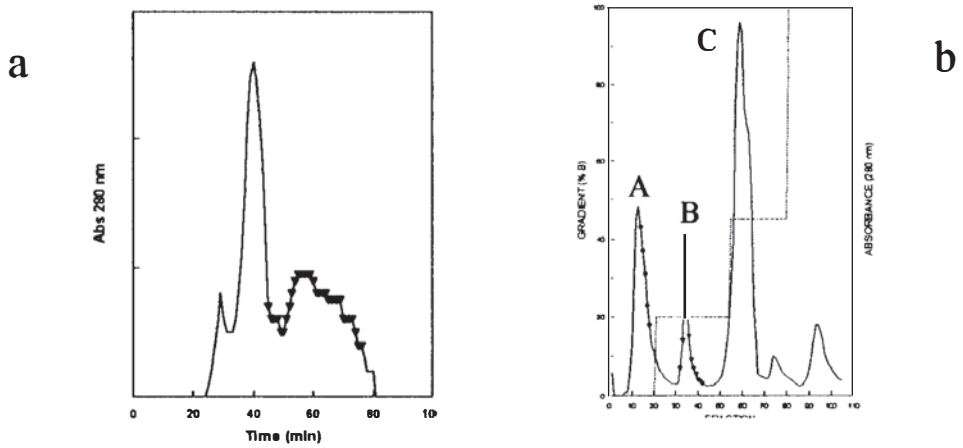

Figura 5. Perfiles cromatográficos de extractos Sf. Panel a, filtración en gel en Sephadex G-200. Panel b, cromatografía IMAC en Superosa HR. La línea contínua en el panel b representa el perfil de elución de proteínas registradas a una absorbancia de 280 nm; la línea punteada representa el porcentage de tampón B. Las marcas representan fracciones que mostraron actividad SOD.

Tabla IX. Metodos IMAC.

Procedimiento 1			Procedimiento 2		
Paso	Tiempo (min)	Tampón B %	Paso	Tiempo (min)	Tampón B %
1	20	0	1	20	0
2	30	20	2	35	20
3	20	45	3	25	45
4	20	60	4	25	100
5	10	80			
6	30	100			

Tabla X. Corrimientos IMAC.

		Fracciones				
IMAC	Lote	10-15	33-36	37-43	69-71	72-75
5 - 8	11	nd	0.062 mg/mL **4 473** U/mg	0.019 mg/mL **14 895** U/mg	0.036 mg/mL 324 U/mg	0.022 mg/mL 723 U/mg
9 - 10	10	nd	0.03 mg/mL **4 864** U/mg	0.030 mg/mL **4 864** U/mg	nd	nd
11 - 12	10	nd	0.029 mg/mL **15 684** U/mg	0.017 mg/mL **15 260** U/mg	nd	nd
13	10	nd	0.033 mg/mL **8 300** U/mg	0.014 mg/mL **3 530** U/mg	nd	nd
14	10	0.027 mg/mL **4 660** U/mg	0.024 mg/mL **20 890** U/mg	0.015 mg/mL **10 510** U/mg	nd	nd
15	9	nd	0.029 mg/mL **24 250** U/mg	0.013 mg/mL **15 420** U/mg	0.069 mg/mL	0.016 mg/mL
16	9	nd	0.047 mg/mL **14 100** U/mg	0.013 mg/mL **19 160** U/mg	nd	nd
17 - 18	8	nd	0.039 mg/mL **11 720** U/mg	0.011 mg/mL **13 510** U/mg	0.062 mg/mL	0.017 mg/mL
19 - 20	8	nd	0.035 mg/mL **11 690** U/mg	0.017 mg/mL **6 850** U/mg	0.052 mg/mL	0.023 mg/mL
21 - 22	8	nd	0.029 mg/mL **12 790** U/mg	0.011 mg/mL **3 540** U/mg	0.043 mg/mL	0.019 mg/mL
23	8	nd	0.062 mg/mL **9 840** U/mg	0.018 mg/mL **10 010** U/mg	0.080 mg/mL	0.018 mg/mL
24	7	nd	0.022 mg/mL **12 940** U/mg	0.015 mg/mL **6 740** U/mg	0.064 mg/mL	0.017 mg/mL
25	7	nd	0.019 mg/mL **8 150** U/mg	0.011 mg/mL **5 430** U/mg	0.053 mg/mL	0.018 mg/mL
26	7	nd	0.018 mg/mL **10 760** U/mg	0.011 mg/mL **4 060** U/mg	0.066 mg/mL	0.018 mg/mL
27 - 30	7	nd	0.017 mg/mL **8 330** U/mg	0.004 mg/mL **7 840** U/mg	0.071 mg/mL	0.017 mg/mL

Nota: El contenido proteico se determinó por el método de Lowry y la actividad SOD por el método de NBT. nd, no determinado.

La Tabla XI incluye la composición de aminoácidos de las enzimas Cu,Zn SOD y ENO-1 inferidas de las secuencias de los respectivos genes clonados, tal y como están reportados en el Swiss Protein Data Bank, para *Saccharomyces cerevisiae* (P000445 y P000924). Las diferencias entre la composición de aminoácidos obtenida de la traducción de *dh sod-1* (V) y del análisis de la proteína fracción IMAC 32 (SOD 32) son mínimas; el caso de la fracción IMAC 37 (SOD 37) es una excepción. Las principales diferencias, radican en el número de residuos de histidina. Es bien conocido el papel de los residuos de histidina en la unión de los metales y la catálisis de las enzimas Cu,Zn SOD (Parker *et al.*, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1991). Teóricamente, las histidinas **47**, **49**, **64** y **121** funcionan como sitios de unión al Cu^{+2}, y las His 64, **72** y **81** funcionan como sitios de unión para el Zn^{+2} según la secuencia del gen *dh sod-1* (V). Extrañamente, en el caso de la muestra IMAC 37, el número reportado de residuos de histidina es 3. Por tal motivo, la pregunta que surge es: ¿qué otros aminoácidos pueden funcionar como sitios de unión del Cu^{+2} y el Zn^{+2}?

Se sabe que el papel de los residuos de histidina en la unión de los metal es una función de su anillo de imidazol (Halliwell y Gutteridge, 1991). Si consideramos la estructura de otros aminoácidos que contienen un anillo de imidazol, las posibilidades se reducen a fenilalanina, triptofano y tirosina. Analizando la Tabla XI, el número de residuos de fenilalanina no muestra cambios, pero los residuos de tirosina se incrementan en 3. Quizás, esas 3 nuevas tirosinas jueguen el papel de histidinas. Para confirmar esta suposición es necesario el clonar la segunda forma de Cu,Zn SOD en *Deb. hansenii*, y realizar tanto análisis de similitud, como de alineamiento de las secuencias clonadas.

Tabla XI. Composición de aminoácidos de las proteínas Cu,Zn SOD y ENO1

Aminoacido		SOD Sc	Sec C11	SOD 32	SOD 37	ENO *Dh*	ENO *Sc*
Alanina	A	13	12	15	9	34	55
Cisteina	C	2	2	ID	ID	ID	1
Aspartico	D	10	11	**	**	**	31
Glutamico	E	9	6	*	*	*	25
Fenilalanina	F	6	6	6	5	4	16
Glicina	G	22	22	22	26	18	37
Histidina	H	6	6	6	3	6	11
Isoleucina	I	4	6	7	7	17	22
Lisina	K	10	8	7	7	20	37
Leucina	L	6	9	9	14	38	40
Metionina	M	1	0	-	2	-	5
Aspargina	N	9	12	**	**	**	19
Prolina	P	8	4	6	4	15	15
Glutamina	Q	3	4	*	*	*	9
Arginina	R	4	5	8	8	16	14
Serina	S	11	11	10	14	12	31
Treonina	T	11	14	13	7	13	20
Valina	V	17	14	13	8	16	34
Triptofano	W	0	1	ID	ID	ID	5
Tirosina	Y	1	0	2	5	10	9
	*	10	10	11	20	30	34
	**	19	23	19	10	24	50

Nota: SOD, Cu,Zn superoxido dismutasa; ENO, enolasa; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Dh*, *Deb. hansenii*; SOD Sc, contenido de aminoácidos derivado de la traducción de la secuencia de nucleótidos de *sc sod-1*; Sec C11, clones *dh sod-1* C115 y C116 (4); SOD 32, contenido de aminoácidos de *Deb. hansenii* IMAC 32; SOD 37, IMAC 37; ENO *Dh*, contenido de aminoácidos de IMAC 70; ENO *Sc*, contenido de aminoácidos derivado de la traducción de la secuencia de nucleótidos de *sc eno-1*.

Aunque la fracción IMAC 37 presenta buena actividad de superóxido dismutasa (~8,000 U/mg de proteína, Tabla XII), es 50% menos activa que la fracción IMAC 32 (17,300 U/mg de proteína). A través de pruebas de inhibición (Halliwell y Gutteridge, 1991), que son utilizadas para distinguir entre los diferentes tipos de SODs (Fe-, Mn- y Cu,Zn-SOD) podemos concluir que

la actividad SOD en ambas fracciones es causada por enzimas tipo Cu,Zn, debido a que éstas fracciones pierden actividad (~99%) en presencia de 5 mM NaCN y 10 mM H_2O_2 (IV).

La existencia de dos tipos de enzima Cu,Zn SOD en la levadura marina *Deb. hansenii*, también se apoya en las observaciones hechas en electroforésis nativa. En geles nativos al 8%, teñidos mediante la técnica del NBT, se pueden observar tres bandas de actividad en extractos semi-purificados (Figura 6A, línea 1; Figura 6B, línea 3). En las muestras IMAC (Figura 6B), la fracción 32 solo presenta dos bandas (Figura 6, línea 1, bandas intermedia e inferior), mientras que la fracción 37 tres (Figura 6, línea 2).

Tabla XII. Actividad específica de varias preparaciones de SOD derivadas de IMAC.

		FRACCIONES					
IMAC	**Extracto**	10-15		33-36		37-43	
13 - 14	10	0.022 mg/mL 4 160 U/mg	**L10A** (5 mL)	0.026 mg/mL 16 400 U/mg	**L10B** (8 mL)	0.011 mg/mL 5 430 U/mg	**L10C** (7.5 mL)
15 - 16	9,00	nd	NC	0.034 mg/mL 29 310 U/mg	**L9B** (7.5 mL)	0.014 mg/mL 15 310 U/mg	**L9C** (8 mL)
17-23	8,00	nd	NC	0.033 mg/mL 14 990 U/mg	**L8B** (30 mL)	0.014 mg/mL 7 240 U/mg	**L8C** (32 mL)
24 - 30	7,00	nd	NC	0.016 mg/mL 8 470 U/mg	**L7B** (31 mL)	0.011 mg/mL 3 660 U/mg	**L7C** (35 mL)
Promedio		0.022 mg/mL 4 160 U/mg		0.027 mg/mL ± 0.007 17 292 U/mg ± 7555		0.012 mg/mL ± 0.001 7 910 U/mg ± 4455	

Nota: El contenido proteico fue determinado por el metodo de Lowry y la actividad SOD por el metodo de NBT. NC, no colectado; nd, no determinado.

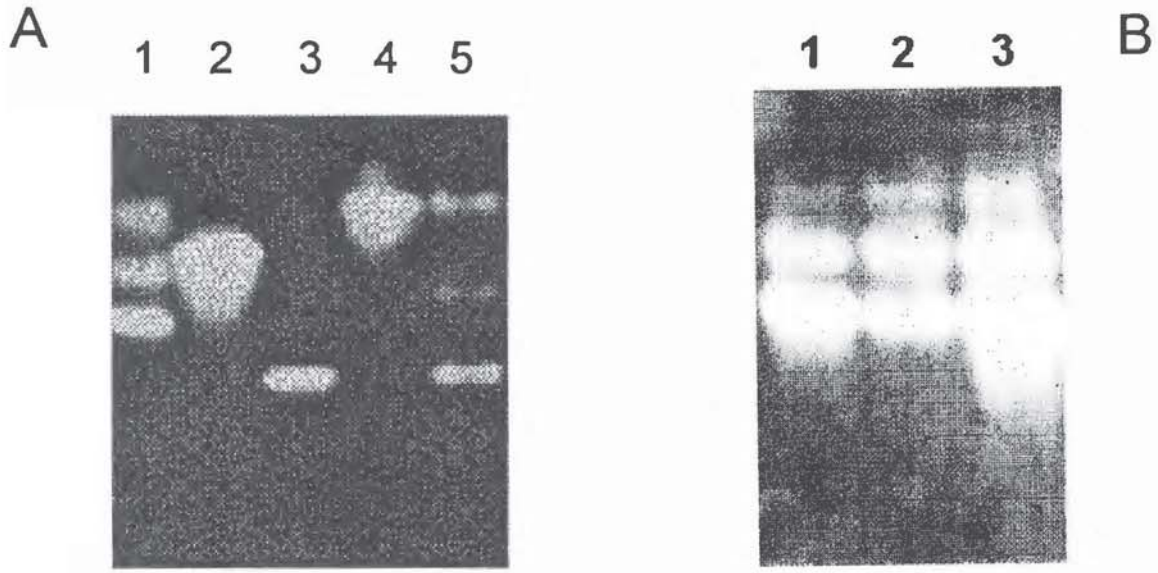

Figura 6. Electroforésis no-desnaturalizante al 8% de enzimas SOD. Gel A: línea 1, enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*; línea 2, *Bos taurus* Cu, Zn SOD; línea 3, Fe SOD de *E. coli*; línea 4 Mn SOD de *E. coli*; y línea 5, extracto crudo de *E. coli* TOP 10. Gel B, Electroforésis 8% no desnaturalizante de la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*. Línea 1, fracción IMAC-32; línea 2, fracción IMAC-37; y línea 3, extracto semipurificado (Sf). Técnica de tinción: NBT.

La presencia de las tres bandas de actividad, puede interpretarse como el resultado de un gen con sus dos alelos, o de dos genes. Dos bandas pueden corresponder homodimeros de la enzima, y la tercera banda puede ser la forma heterodimérica. En este momento, no es posible distinguir entre los dos genes o alelos, ya que se desconocen las características genéticas de esta especie. Para establecer el origen de cada forma de Cu,Zn SOD, es necesario confirmar las diferencias en la composición de aminoácidos de la fracción IMAC-37 y determinar su secuencia peptídica precedida por digestión con tripsina. Estas estrategias nos permitirían diseñar sondas oligonucleotídicas para monitorear la correspondiente librería genómica o para clonar el gen de la Cu,Zn SOD-2 por medio de RT-PCR (V).

Influencia del ClO_2 en la expresión del gen dh sod-1.

La concentración normal de ClO_2 que se utiliza para el cultivo de *Deb. hansenii* es una dilución 1:250 (v/v) de la preparación comercial denominada Halox E-100, que presumiblemente contiene 130 mg/mL de ClO_2 en una solución tampón (I). En el lote de biomasa no.1, la concentración de ClO_2 se elevó 2.5 veces, observándose una disminución en la velocidad específica de crecimiento (μ), así como una caída en el rendimiento de 200g a 68g. Después del rompimiento celular y el procesamiento del homogeneizado (IV), el extracto Sf resultante mostró una actividad enzimática de 27 000 U/mg de proteína, y una sola banda en su perfil de actividad en electroforésis no-desnaturalizante (Figura 7, flecha).

Si consideramos que la expresión del gene que codifica para la Cu,Zn SOD es constitutiva (Warner, 1995), altas concentraciones de ClO_2 implican una condición de estrés para *Deb. hansenii*. Si la isoformas de la Cu,Zn SOD fueran el producto de un solo gen con dos alelos diferentes, el resultado esperado sería un incremento en la actividad de las tres bandas (en electroforésis no-desnaturalizante). Sin embargo, como bajo estas condiciones solo se observa la presencia de una banda (Figura 7), podemos sugerir la existencia de dos genes.

Para descartar el posible efecto del ClO_2 de una de las isoformas de la enzima, se realizó un experimento en el que se expuso enzima de la levadura (y otras enzimas SOD como controles) a varias concentraciones de ClO_2 (de 1:5 a 1:100).

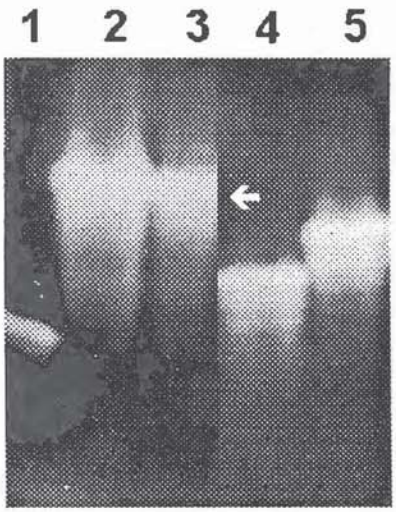

Figura 7. 8% PAGE no desnaturalizante de enzimas SOD. Línea 1, Fe-SOD de *E. coli*; línea 2, Mn-SOD de *E. coli*; línea 3, Cu,Zn SOD de extracto Sf de *Deb. hansenii* (estres por Halox; concentrado de biomasa numero 1); línea 4, Cu,Zn SOD de *Sacch. cerevisiae*; línea 5, Cu,Zn SOD de *B. taurus* (eritrocito). La flecha denota una sola banda con actividad SOD. Técnica de tinción: NBT.

Como se muestra en la Figura 8, encontramos que la actividad de las enzimas Cu,Zn SOD de levadura se mejora a altas concentraciones de ClO_2, mientras que la actividad de las enzimas Fe- y Mn-SOD permanece sin cambio o disminuye, respectivamente.

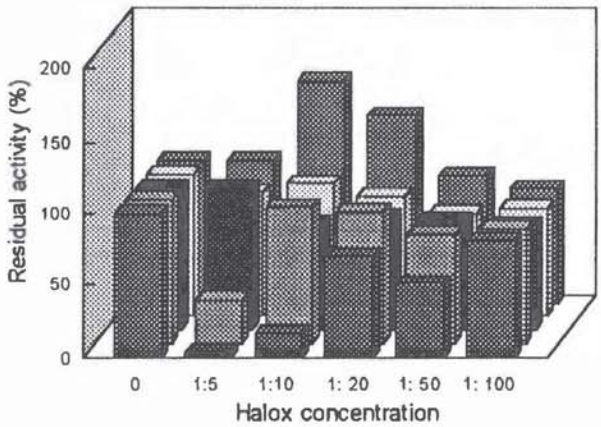

Figura 8. Efecto de la concentración de ClO_2 en la actividad de varias enzimas SOD. De adelante hacia atrás: Fe-SOD y Mn-SOD de *E. coli*; Cu,Zn SOD de bovino (hígado y eritrocitos respectivamente) y Cu,Zn de levadura. Concentración de proteína en el ensayo: 0.5 mg/ml.

Caracterización de la Cu,Zn SOD de Deb. hansenii.

Las pruebas de inhibición (Halliwell y Gutteridge, 1991) mostraron que la actividad de la preparación de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* se inhibe en presencia de NaCN 5 mM y H_2O_2 10 mM (en solución y electroforésis nativa); mientras que ningún efecto es observado después de 5 min a 37°C en la presencia de SDS 1 mM (IV). La enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* mostró ser tan termotolerante como la enzima de *Sacch. cerevisiae* y más estable que la de *B. taurus*. Con respecto a su estabilidad a diferentes pHs, la actividad de la SOD de *Deb. hansenii* se incrementó bajo condiciones de pH de 6 y 7. Un efecto similar fue observado con la proteína de *Sacch. cerevisiae*, sin embargo, en este caso el mayor incremento en la actividad se encontró entre pH 6 y 9. Aparentemente, la enzima Cu,Zn de *Deb. hansenii* es más sensible a pH extremos (5 y 10), ya que alrededor de un 40% a 60% de actividad se pierde bajo estas condiciones mientras que la enzima bovina, mostró ser más estable en función del pH, ya que no se observó ningún cambio significativo en la actividad entre pH 5 y 10.

Resumiendo, la levadura marina *Deb. hansenii* puede ser considerada como una fuente alterna para la obtención de Cu,Zn SOD, dado que esta enzima muestra características fisicoquímicas comparables a las preparaciones comercialmente disponibles (IV). En lo que se refiere a actividad específica, la fuente marina ofrece ventajas sobre las otras fuentes (bovina y levadura marina) exhibiendo 300% mayor actividad.

Uso clínico de la SOD de Deb. hansenii.

Para darnos una idea acerca de las implicaciones de la inyección de la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* en animales se diseñó un experimento inmunológico. Cuando se inmunizaron conejos intra-peritonealmente con un complejo de enzima marina-adyuvante, no se observó ningún efecto

deletéreo (IV), mientras que cuando la enzima, en fragmentos de acrilamida al 12%, se inyectó en ratones causó efectos dramáticos en su salud.

El experimento de inmunización de ratones fue llevado a cabo de la siguiente manera: 50 µg de cada proteína (ENO y SOD, Tabla XIII) se aplicaron en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida al 12%; las electroforésis se realizaron a temperatura ambiente aplicando una corriente de 100V. Los geles se tiñeron con Coomassie Blue B R-250, y las bandas de proteína se recuperaron al cortarlas del gel. Las bandas de cada proteína se juntaron y fueron llevadas a un volumen final de 3 mL con solución salina estéril (Boulard y Lecroisey, 1982). Los trozos de gel se homogenizaron con la solución salina mediante el uso de una jeringa 5 mL, para posteriormente inocular 300 µL del homogenizado en ratones BALB/c de ~16 a 18 g de peso (5 semanas de edad). En total, se realizaron 4 inmunizaciones utilizándose diez animales para cada proteína. El peso de los animales se determinó antes de cada inmunización (Tabla XIII).

Tabla XIII. Esquema de inmunización para los experimentos en ratón.

		Peso del ratón			
Enzima	**Origen**	Dia cero	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Cu,Zn SOD	*Deb. hansenii*	17 g	~18 g	~22 g	~22 g (1†)
ENO	*Deb. hansenii*	17 g	~25 g	~29 g	~30 g
Fe-SOD	*E. coli*	17 g	2 †	7 †	1 †
Mn-SOD	*E. coli*	17 g	3 †	4 †	~ 25 g

†: Número de ratones muertos

La obtención de la sangre se llevó al cabo al día 120. Antes del sangrado, los ratones fueron anestesiados con éter. La sangre se colectó del plexo branquial con una pipeta Pasteur, colectándose en tubos eppendorf estériles (1.7 mL). Las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se almacenaron toda la noche a 4°C. Además de las muestras de sangre (y debido al fenómeno de pérdida de peso; Figura 9), se disectaron varios órganos (corazón, bazo, una porción de hígado y una de riñón) que fueron fijados en un tampón de glutaraldehido-cacodilato (10 mL de glutaraldehido 25% + 40 mL de tampón de cacodilatos 0.2 M, pH 7.4) para ser analizados histológicamente.

El suero se obtuvo por centrifugación del plasma, durante 15 min a 5000 r.p.m. a temperatura ambiente. Los sueros se titularon mediante una prueba de ELISA (Hornbeck *et al.*, 1995) en placas Nunc (Immuno MaxiSorp/96 pozos) utilizando como antígeno, 200 ng de cada proteína. El antígeno se preparó en tampón de carbonatos 0.06 M (pH 9.6), incubándose toda la noche a 4°C en placas de ELISA. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 y se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% (Svelty®) en PBS-Tween 20 durante una hora a temperatura ambiente. El suero se diluyó seriadamente con PBS-Tween 20 iniciando con 1:50 hasta 1:12,800. Antes de agregar el suero diluido, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20. Una vez que se adicionó el suero, las placas se incubaron 3 horas a temperatura ambiente. Después de otro lavado, las placas se incubaron durante una hora con un segundo anticuerpo (1:2000 IgG de conejo anti-ratón, marcado con peroxidasa) . El substrato para el

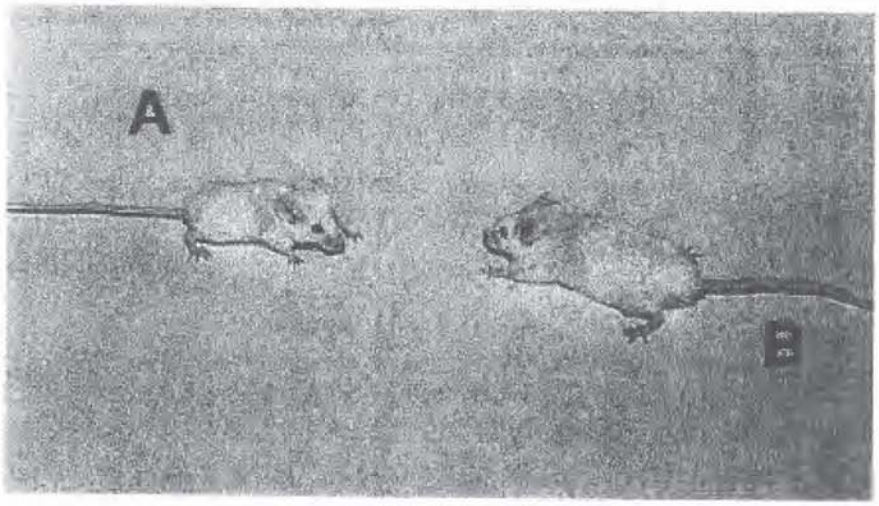

Figura 9. Ratones inununizados con Cu,Zn SOD de la levadura marina *Deb. hansenii* (A) y enolasa (B). Fotografía tomada al día 120 (ver texto).

segundo anticuerpo se preparó en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 2.10%, Na_2HPO_4 2.84%, pH 5.0) disolviendo 20 mg de o-fenilendiamina en 50 mL. El substrato (100 μL) fue entonces agregado a cada pozo, incubando las placas en obscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente, las microplacas se leyeron en un lector BioRad (modelo 3550 UV) a 450 nm.

La Tabla XIV muestra los títulos de anticuerpos de cada suero obtenidos por la técnica de ELISA. Obviamente, la proteína que actúa mejor como inmunógeno es la Mn-SOD, sin embargo, más del 30% de los ratones inmunizados con este antígeno murieron (7 ratones). La enolasa también mostró ser un buen inmunógeno, pero en este caso no se registraron muertes. La enolasa no causó ningún deterioro en la salud de los ratones, ya que su peso al final del esquema de inmunización fue similar al del control. En el caso de los ratones inmunizados con la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*, sólo se registró una muerte, sin embargo, la pérdida de peso de estos ratones es sorprendente. La Mn SOD de *E. coli* puede ser fácilmente reconocida como extraña por el sistema inmune del ratón, ya que las bacterias se encuentra más distante del ratón que de la levadura, en términos evolutivos.

Existen dos posibles explicaciones del efecto de la SOD de levadura en ratón: primero, la proteína no es reconocida como una substancia extraña por lo que se observan bajos títulos de anticuerpos. Si este fuera el caso, ¿por qué la pérdida de peso? Con esta pregunta, una segunda posibilidad surge.

La segunda posibilidad considera que la inmunización de SOD de levadura promueve un acelerado envejecimiento del ratón. A pesar de que las muestras fueron hervidas bajo condiciones reductoras durante 10 minutos antes de ponerlas en el gel (SDS-12.5%), se ha observado que hasta un 30% de la actividad se recupera cuando la enzima se eluye del gel.

Tabla XIV. Titulos en suero de ratones.

	Numero de suero-titulo								
Anticuerpo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
α *Deb. hansenii* SOD	-	-	1:200	-	1:300	1:200	1:100	1:100	1:100
α *Deb. hansenii* ENO	1:600	1:600	1:100	1:600	1:300	1:800	1:300	1:800	1:100
α *E. coli* Mn SOD	1:1600	1:1600	1:1600	-	-	-	-	-	-

Se ha demostrado que la dosis es muy importante para balancear los efectos benéficos-dañinos de la Cu,Zn SOD (Michiels *et al.*, 1994). Un exceso de la enzima, podría generar un desarreglo hemostático del sistema inmune del ratón para producir, en exceso, moléculas de H_2O_2; más de las que pueden ser convertidas en agua, por la catalasa y la glutatión peroxidasa del ratón (Warner, 1995). El bajo titulo de anticuerpos puede explicarse fácilmente si asumimos que la enzima no es reconocida como una substancia extraña por el ratón.

7. Clonación de la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii.*

Un procedimiento que implica el uso de transcripción reversa, amplificación por PCR y clonación fue utilizado para obtener clones que codifican la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* (V). Mediante este procedimiento, se obtuvieron dos clones idénticos (C115 y C116) que consisten en fragmentos de 470 pb. Mediante la secuencia de nucleótidos de estos clones, llamados *dh sod-1*, se determinó que los fragmentos contienen una región codificante de 462 pb que codifica una proteína de 153 aminoácidos con una masa molecular calculada de 15.92 kDa. Estos datos concuerdan con la masa molecular de la proteína pura obtenida de *Deb. hansenii* (Tabla VII; IV). Además, el mismo tamaño y secuencia de nucleótidos fueron obtenidos en varios clones cuando se utilizó como templado en la amplificación por PCR, ADN genómico parcialmente digerido y oligonucleótidos específicos (V). De esta forma, se excluye la existencia de intrones en el gen *dh sod-1*.

Mediante en análisis de los clones obtenidos, se concluye que contienen toda la información necesaria para producir una proteína funcional (V). Los residuos de aminoácidos que ligan los metales, así como los aminoácidos disulfurados, responsables del correcto pliegue de la proteína (Parker *et al.*, 1986), se encuentran presentes en la secuencia clonada. Las histidinas 16, 48, 63, y 120 teóricamente funcionan como sitios de enlace de Cu^{+2}, de la misma forma que las histidinas 63, 71, 80 y 83, funcionan como sitios teóricos de enlace de Zn^{+2}. Se cree que las cisteínas 57 y 146 están implicadas en la formación de uniones disulfuro, mientras que la arginina 143 guía al anión superóxido hacia el sitio activo (Linder, 1993).

Expresión de dh sod-1.

Para estudiar su expresión, el fragmento que codifica la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* (*dh sod-1*) fue subclonado en el sitio *Eco RI* del vector pTrcHis® (Invitrogen). El vector de expresión bacteriano contiene el promotor Trp (que induce la expresión de secuencias extrañas en presencia de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM, IPTG), un codón ATG de inicio de traducción, y un conjunto de seis residuos de histidina que funcionan como el dominio enlazante del metal en la proteína de fusión traducida. En este plásmido, se obtuvieron 8 construcciones correctas (Figura 10), confirmadas mediante digestión con *Kpn I*, de los clones C115 y C116 (pTrcHis/*dh sod-1*).

De acuerdo con el manual del proveedor (vector de expresión pTrcHis®, Invitrogen), para calcular la masa molecular de la proteína recombinante de deben sumar 3 kDa (que corresponden principalmente a las histidinas acopladas. Con estas construcciones se transformaron células TOP 10, sin embargo, al realizar los experimentos de inducción no se detectó ningún producto expresión mediante anticuerpos, análisis electroforéticos, cromatográficos o de actividad enzimática (en líquido y en gel) 5 horas después de la inducción con IPTG (Figura 11). La flecha denota el lugar esperado de la proteína recombinante (~ 19 kDa); sin embargo, ninguna de las proteínas inducidas correspondía (por masa molecular) a la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii.* Adicionalmente, se realizó una electroforésis nativa (8%) para detectar la posible actividad de la proteína recombinante. Para discriminar las SOD bacterianas (Fe- y Mn-), se realizaron pruebas

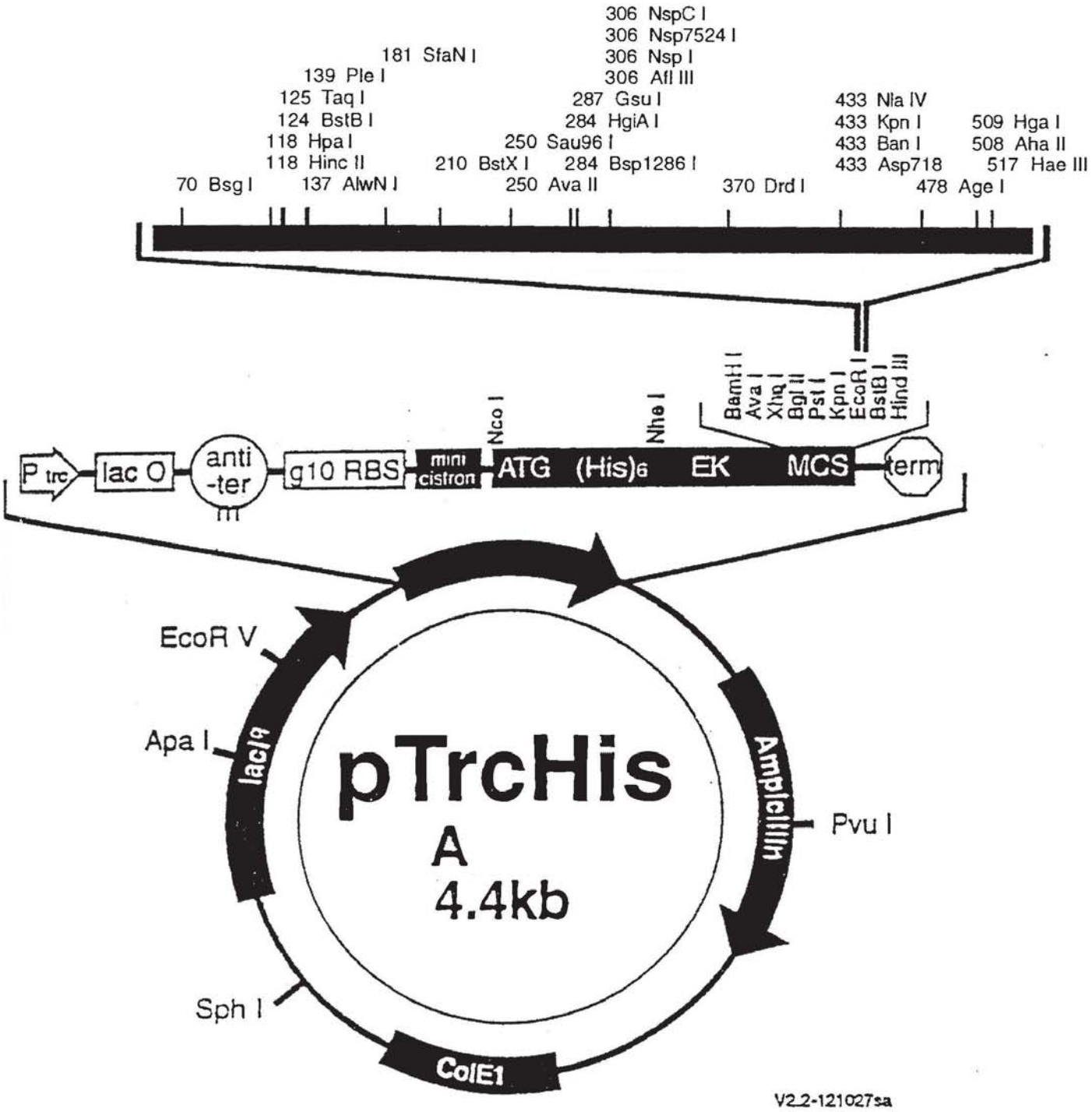

Figura 10. Construcción pTrcHis/*dh sod-1*. El fragmento *dh sod-1* de *Deb. hansenii* que codifica para la Cu,Zn SOD se subclonó en el sitio *EcoRI* del "poly-linker" del vector. En la barra (fragmento *dh sod-1*) están indicados (en pares de bases) la localización relativa de los sitios únicos de corte. El vector pTrcHis®, contiene el promotor Trp, un codón ATG como señal de inicio de la traducción, y un motivo de seis residuos de histidina.

de inhibición con extractos de las bacterias transformadas (Figura 12). Los extractos de *E. coli* TOP10, presentan tres bandas de actividad (Figura 12, línea E), una banda corresponde a la Mn-SOD y las dos restantes a isoformas de Fe-SOD, por lo que ninguna banda corresponde a la Cu,Zn SOD recombinante.

La expresión del gene *sod-1* in sistemas bacterianos, no es sencillo; algunos autores han reportado inestabilidad del plásmido-sod en ciertas cepas bacterianas (Haas y Wegner, 1992). Considerando esto, las construcciones (pTrcHis/*dhsod-1*) se utilizaron para transformar *E. coli* cepa BL21. Sin embargo, en este caso tampoco se observó ningún producto de expresión. Para explicar estos resultado se tiene que considerar la estabilidad del ARNm, una posible traducción alterada del mensaje, la disponibilidad de ARNt en la bacteria (causado por diferencias en el uso de codones), y quizás, diferencias críticas en la secuencia de la proteína.

Entre estas posibilidades, es importante considerar que la bacteria (*E. coli*, BL21 y TOP10) produce sus propias enzimas SOD (Fe- y Mn-), por lo que la proteína Cu,Zn SOD recombinante no es necesaria para la sobrevivencia de la bacteria, pudiendo ser rápidamente degradada.

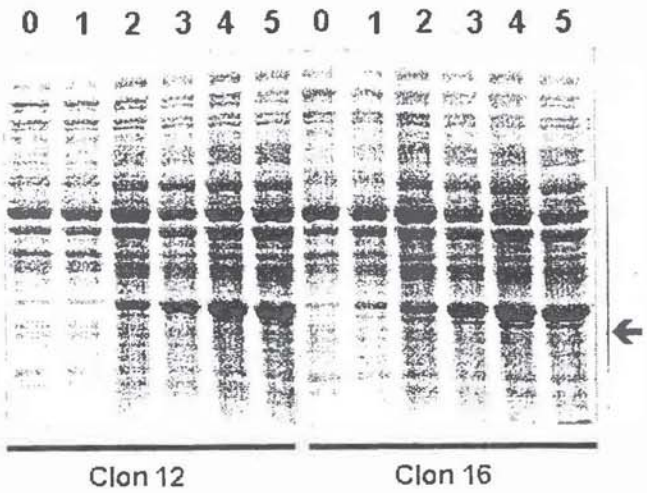

Figura 11. Electroforésis desnaturalizante (12%) de lisados células TOP 10 transformadas con la construcción de expresión pTrcHis/*dhsod-1*. Clon 12 (C115) y clon 16 (C116). Las líneas cero a 5 corresponden al tiempo de muestreo después de la inducción con IPTG. La flecha denota la posición esperada de la proteína recombinante. Técnica de tinción: Coomassie Blue B G-250.

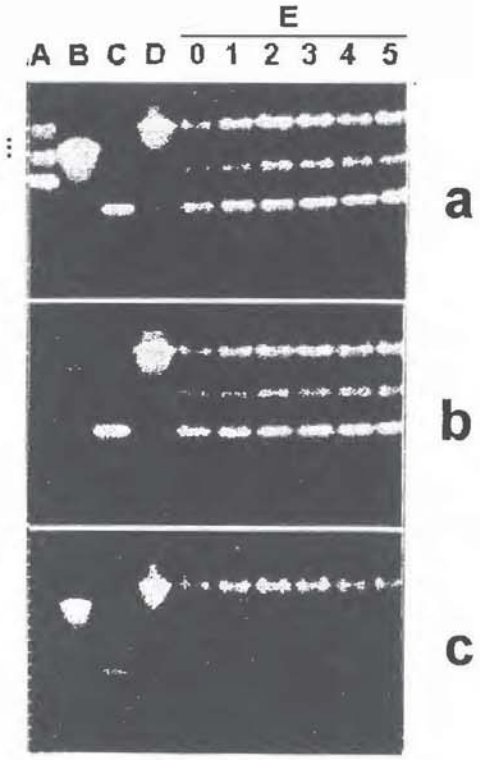

Figura 12. Electroforésis nativa (8%) de varias enzimas SOD (líneas A a D) y extractos crudos de *E. coli* TOP 10 (líneas cero a 5), transformada con pTrcHis/*dhsod-1*. Línea A, Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*; línea B, Cu,Zn SOD de *B. taurus* (eritrocito); línea C, Fe-SOD de *E. coli*; línea D, Mn-SOD de *E. coli*. Líneas cero a 5 corresponden al tiempo de muestreo (h) después del pulso de inducción con IPTG (Clon 12). Geles: **a**, condiciones normales; **b**, inhibición con NaCN 5 mM, y **c**, inhibición con H_2O_2 10 mM. Técnica de tinción, NBT.

Recientemente, se ha observado que la expresión de la propia Cu,Zn SOD de *E. coli* se detecta (a muy bajos niveles) únicamente en mutantes nulos para *sod a* y *sod b*; por lo tanto, su expresión se ve restringida a la ausencia de las otras SODs (Benov y Fridovich, 1996). Como resultado de esto, se deben buscar nuevos sistemas de expresión para el gen *dh sod-1*.

Importancia evolutiva.

El análisis de homología de secuencias (FASTA, GCG) mostró que *dh sod-1* tiene entre 55 y 71% de identidad con las secuencias correspondientes de 15 especies de eucariontes, dentro de las que se incluye la enzima extracelular humana (V). La homología de nucleótidos con las secuencias correspondientes de *Sacch. cerevisiae* y *N. crassa* es >70%, mientras que sólo un 62% de identidad se observó al realizar la comparación con *Schiz. pombe*. Mediante un análisis de conglomerados (cluster analysis), considerando únicamente 17 secuencias eucarióticas, se observó a una distancia del 78% la formación de 4 ramas principales (V). La rama principal incluye a los eucariontes mayores (nemátodos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), la segunda abarcaba a los organismos fungi, mientras que las dos restantes están formadas por artrópodos y la forma extracelular de la enzima humana.

En un segundo análisis de conglomerados, además de las secuencias de eucariontes, se consideraron ocho secuencias de organismos no-eucariontes (Figura 13). En caso particular la secuencia de Cu,Zn SOD de *Salmonella typhymurium* (Tabla IV), no se incluyó en el análisis ya que el reporte solo considera un fragmento de 87 aminoácidos (P53636). En el caso de Cu,Zn SOD de virus, solo se consideró la secuencia correspondiente al virus ACMNPV (Tabla IV). Al incluir en el análisis a los organismos no-eucariontes, en general, se evidencian dos grandes ramas: una constituida por organismos eucariontes y una segunda que incluye a los procariontes (Figura 12). La secuencia del virus ACMNPV se encuentra en el grupo eucarionte, asociándose primero con levaduras (~85%). El grupo de las bacterias está aislado, mostrando ser más heterogéneo si se compara con las levaduras. Las secuencias de *H. parainfluence* y *H. influence* son las más cercanamente relacionadas. Las diferencias gráficas se deben a un solo cambio de aminoácido: una histidina es reemplazada por una tirosina en la posición 82 (por lo que la enzima de *H. influence* carece de actividad). Todas las secuencias Cu,Zn SOD de bacterias poseen una secuencia señal potencial, generalmente del residuo 1 al 23 (la única excepción es *Brucella abortus*).
En algunas cepas bacterianas patógenas, se ha reportado que la Cu,Zn SOD funciona como herramienta extra-invasiva (Scott *et al.*, 1987). En el caso particular de *E. coli*, el principal papel de la enzima es como defensa antioxidante en mutantes dobles (*sod a sod b*) que carecen de las formas Fe- y Mn-SOD (Benov y Fridovich, 1996). No se observó ninguna relación especial entre la secuencia de Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* y aquella de las bacterias.

En general, el análisis de conglomerados produce tipologías similares a la de los árboles evolutivos construidos a partir de las secuencias de citocromo C (Ayala *et al.*, 1994), otras secuencias de SOD (Parker *et al.*, 1986) y de aquellos derivados de la taxonomía y la paleontología clásicas (Dobzanzky *et al.*, 1979).

Nuestros resultados sugieren un patrón evolutivo distinto para el gen Cu,Zn SOD en *Deb. hansenii*. Aparentemente, el ancestro común del grupo fungi, se dividió en dos ramas, una de las cuales dió origen a levaduras gemantes y mohos (*Sacch. cerevisiae*, *Deb. hansenii* y *N. crassa*), y

otra en la que se incluye la levadura de fisión *Schiz. pombe*. Otros marcadores moleculares filotaxonómicos establecen que los hongo filamentosos (p. ej. *N. crassa*) evolucionaron separadamente de levaduras tempranamente en términos de tiempo geológico. Sin embargo, ¿por qué se observa un ~70% de similitud entre las secuencias de *Deb. hansenii*, *Sacch. cerevisiae* y *N. crassa*?

Las diferencias entre levaduras gemantes, de fisión y mohos pueden explicarse fácilmente mediante la clasificación taxonómica tradicional, ya que pertenecen a diferentes clases (Hemyascomycetes, Archeascomycetes y Pyrenomycetes, respectivamente) (Kreger van Rij, 1989). No obstante, las levaduras gemantes (*Sacch. cerevisiae* y *Deb. hansenii*) pertenecen a la misma familia (Saccharomycetaceae; Kreger van Rij, 1989), y las diferencias en sus secuencias de es alta (28.6%). De esta forma, las diferencias entre *Deb. hansenii* y *Sacch. cerevisiae* pueden ser el resultado de los diferentes ambiente de la que aisladas (terrestre y marino).

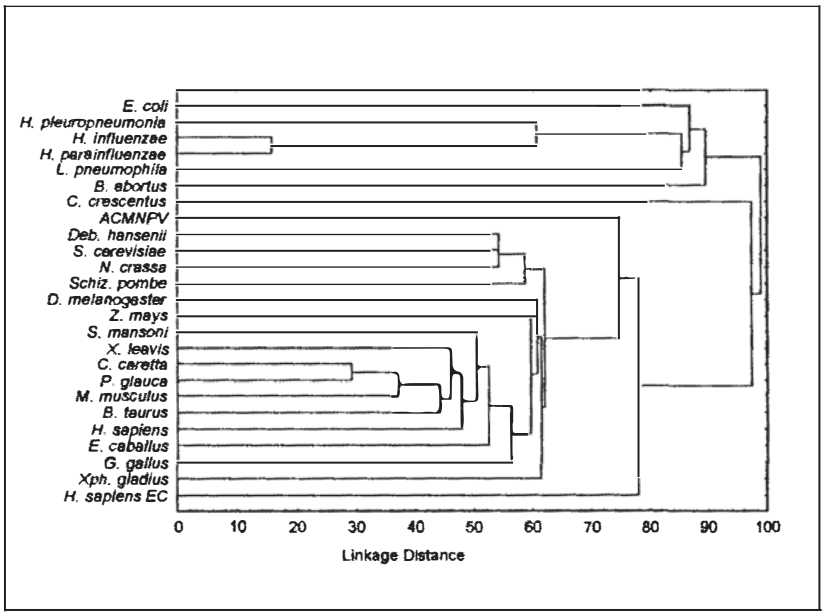

Figura 13. Representación gráfica de las interrelaciones entre las secuencias de las enzimas Cu,Zn SOD.

8. Conclusiones.

1. El proceso de fermentación, que emplea la esterilización química y agua marina como solvente para cultivar *Debaryomyces hansenii*, representa una oportunidad de desarrollo económico de regiones costeras y/o áridas, tales como Baja California Sur, donde la disponibilidad de agua potable es escasa.

2. El proceso de fermentación desarrollado puede utilizarse como modelo para el cultivo y desarrollo de otros microorganismos marinos de los que pueden obtenerse otros productos de importancia comercial (tales como bacterias, mohos u otras levaduras).

3. El rendimiento (proteína pura/biomasa) obtenido a lo largo del proceso de purificación (ruptura celular, extracción con solventes orgánicos y cromatografia IMAC) es elevado. De un kilogramo de biomasa seca de *Deb. hansenii*, se obtienen en promedio 100 mg de Cu,Zn SOD altamente activa. De esta forma, la levadura marina puede considerarse como una fuente alterna y eficiente de Cu,Zn SOD.

4. La enzima Cu,Zn SOD de la levadura marina *Deb. hansenii* presenta características intermedias (en relación a pI, y susceptibilidad bajo diferentes condiciones de temperatura y pH) si se compara con las enzimas bovinas y las derivadas de la levadura de pan. Sin embargo, en lo que se refiere a actividad especifica y estabilidad (en preparaciones liofilizadas), la Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* presenta ventajas competitivas ya que es más activa (300%) y más estable (retiene más del 45% de la actividad después de 5 meses a temperatura ambiente) que las preparaciones disponibles.

5. En la levadura marina *Deb. hansenii* detectamos (mediante electroforésis nativa) tres isoformas de la enzima Cu,Zn SOD bajo condiciones normales de cultivo. Sin embargo, bajo estrés oxidativo, provocado por altas concentraciones de ClO_2, solo es evidente una de las isoformas. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que existen dos genes que codifican para enzimas SOD del tipo cobre-zinc en la levadura marina *Deb. hansenii*. Mediante el empleo de la metodología IMAC, es posible separar dos formas de la enzima Cu,Zn SOD, probablemente producto de dichos genes. Las diferencias entre las enzimas Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* pueden detectarse a nivel de actividad especifica, movilidad en electroforésis nativa o a través de su composición de aminoácidos.

6. Considerando la inducción diferencial de los dos genes Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* (bajo estrés por ClO_2), es posible pensar en diferentes mecanismos de regulación y función para cada gen y cada producto de los mismos. Además, esta conclusión se refuerza con la observación de tres bandas de actividad en extractos Sf (en electroforésis nativa) derivados de cultivos inducidos con $CuSO_4$.

7. El análisis de la composición de aminoácidos de la segunda forma Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* (IMAC 37), así como su comportamiento en cromatografia IMAC, sugieren que los

residuos adicionales de tirosina (3) pudieran participar en la conformación del sitio activo de la enzima.

8. Mediante el empleo un procedimiento que involucra la transcripción reversa, amplificación por PCR y clonación, fue posible obtener dos clones que codifican la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii*. Los clones obtenidos, contienen toda la información necesaria para producir una proteína funcional. Sin embargo, cuando se realizó un experimento de expresión en un sistema bacteriano, no fue posible obtener productos recombinantes, probablemente debido a diferencias en el uso de codones entre la bacterias y levaduras.

9. Considerando la traducción de la secuencia de nucleótidos *dh sod-1*, así como la su composición teórica de aminoácidos, es posible relacionar la secuencia clonada con aquella obtenida de la proteína purificada IMAC 32.

10. Mediante el análisis de alineamiento y similitud (cluster) entre las secuencias de Cu,Zn SOD de organismos eucariontes y no eucariontes, se sugiere un patrón evolutivo diferente para la levadura marina.

11. Los estudios incluidos en este manuscrito representan solo un primer paso en el entendimiento de la enzima Cu,Zn SOD de la levadura marina *Deb. hansenii*. Varias preguntas referentes al papel fisiológico de la existencia de dos formas Cu,Zn SOD en este organismo y sus mecanismos de regulación-expresión se han producido.

9. Referencias.

Ackerman, A.D., Fackler, J.C., Tuck-Muller, C.M., Tarpey, M.M., Freeman, B.A. y Rogers, M.C. 1988. *N. Engl. J. Med.*, **318**:1666-1669.

Adler, L. 1986. Physiological and biochemical characteristics of the yeast *Debaryomyces hansenii* in relation to salinity, *In*: Moss J.(ed.), The biology of marine fungi. 4th International Marine Mycology Simposium. Portsmouth, England. Cambridge University Press, Cambridge, England. pp. 81-90.

Adler, L., y L. Gustafsson. 1980. *Arch. Microbiol.*, **124**:123-130.

Amano, A., Shizukuishi, S., Tamagawa, H., Tsunemitsu, A., Maekawa, K. y Tsunasawa, S. 1990. *FEBS Lett.*, **272**:217-220.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., y Hagen, T.M. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:7915-7922.

Avraham, K.B., Schickler, M. Sapoznikow, D., Yarom, R. y Groner, Y. 1988. Cell, **54**:823-829.

Ayala, F.J. 1994. *Ciencia y Desarrollo*, **119**:43-55.

Ayres, M.D., Howards S.C., Kuzio, J., Lopez-Feiber, M. y Possee, R.D. 1994. *Virology*, **202**:586-605.

Baeuerle, P.A. y Baltimore, D. 1988. *Science*, **2421**:540-546.

Beauchamp, C. O. y Fridovich, I. 1971. *Anal. Biochem.*, **44**: 276-287.

Beck, B.L., Tabatabai, L.B. y Mayfield, J.E. 1990. *Biochem.*, **29**:372-376.

Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C.D. y Koppenol, W.H. 1993. *Nature*, **364**:626-632.

Benov, H. y Fridovich, I. 1994. *J.Biol. Chem.*, 25310-25314.

Benov, H. y Fridovich, I. 1996. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327(2):249-253.

Bhuyan, K.C. y Bhuyan, D.K. 1987. *Biochim. Biophys. Acta*, **170**:684.

Boulard, Ch. y Lecroisey, A. 1982. *J. Immunol. Methods*, 50:221-226.

Brown, R.H. 1995. *Curr. Opinion Neurobiol.*, **5**:841-846.

Brunori, M., Falcioni, G., Fioretti, E., Giardina, B. y Rotilio, G. 1975. *Eur. J. Biochem.*, **53**:99.

Bunce, G.E. 1994. *J. Nutr. Biochem.*, **5**:66-77.

Canvin, J., Langford, P.R., Wilks, K.E. y Kroll, J.S. 1996. *FEMS Microbiol. Lett.*, **136**:215-220.

Carpo, J.D., McCord, J.M. y Fridovich, I. 1978. *Methods. Enzymol.*, **53**:382-393.
Carri, M.T., Galiazzo, F., Ciriolo, M.R., y Rotilio, G. 1991. *FEBS Lett.*, **2278**:263-266.

Ceballos-Picot, I., Nicole, A. y Sinet, P.M.1992. Cellular clones and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase: Models for the study of free radical metabolism and aging, *In*: Emerit, I. and Chance, B. (eds.) *Free radicals and aging.* basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. pp. 89-98.

Chedekel, M.R., Smith, S.K., Post, P.W., Pokora, A. y Vessell, D.L. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**:5395.

Ciriolo, M.R., Civitareale, P., Carri, M.T., De Martino, A., Galiazzo, F. y Rotilio, G. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269(41):25783-25787.

Coyle, J.T. y Puttfarcken, P. 1993. *Science*, **262**:689-695.

Djinovic, A., Coda, A., Antolini, L., Pelosi, G., Desideri, A., Falconi, M., Rotilio, G. y Bolognesi, M. 1992a. *J. Mol. Biol.*, 226:227-238.

Djinovic, A., Gatti, G., Coda, A., Antolini, L., Pelosi, G., Desideri, A., Falconi, M., Marmocchi, F., Rotilio, G. y Bolognesi, M. 1992b. *J. Mol. Biol.*, **225**:791-809.

Dobzansky, T., Ayala, F.J., Stebbins, G.L. y Valentine, J.W. (eds.). 1979. Evolution. H.F. Feeman and Co. San Francisco, USA.

Fell, J.W., Statzell-Tallman, S. y Lutz, M.J. 1992. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **1**(3):175-186.

Fleming, J.E.1995. Genetic mutations in aging, *In*: Meyers, R.A. (ed.) *Molecular Biology and Biotechnology*. VCH Publishers. pp. 4-6.

Frazer, P.D. y Brady, F.O. 1978. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **159**:30.

Fridovich, I.1989. *J. Biol. Chem.*, **264**:7761-7764.

Frigerio, F., Falconi, M., Gatti, G., Bolognesi, M., Desideri, A., Marmocchi, F. y Rotilio, G. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**(2):677-681.

Furst, P. y Hamer, D. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**:5267-5271.

Galiazzo, F., Ciriolo, M.R., Carri, M.T., Civitareale, p., Marmocchi, L. y Rotilio, G. 1991. *Eur. J. Biochem.*, **196**:545-549.

Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P. y Paoletti, E. 1990. *Virology*, **179**:247-266.

Goodsell, D.S. 1996. *Our molecular nature: the body's motors, machines and messages.* Springer-Verlag N.Y. 183 p.

Gralla, E.B., Thiele, D.J., Silar, P. y Valentine, J.S. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**:8558-8562.

Greco, M.A., Hrab, D.I., Magner, W. y Kosman, D.J. 1990. *J. Bacteriol.*, **172**:317-325.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L. y Siddique, T. 1994. *Science*, **264**:1772-1775.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1991. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity, *In*: Free Radicals in Biology and Medicine. Claredon Press-Oxford. pp. 86-187.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. 1992. J. *Lab. Clin. Med.*, **119**:598-620.

Halliwell, B. 1995. Free radicals in biochemistry and medicine, *In:* Meyers, R.A. (ed.) *Molecular Biology and Biotechnology.* VCH Publishers. pp. 327-331.

Haas, A. y Wegner, G. 1992. *Mol. Gen. Genetic.*, 231:313-322.

Hernandez, S. D. y Ochoa, J.L. 1992. Aprovechamiento biotecnológico de levaduras marinas: I Producción de biomasa. IX Simposium Internacional de Biología Marina. Junio 1 al 5. La Paz, B.C.S., México. p. 62.

Hernández-Saavedra N.Y., Hernández, D. y Ochoa, J.L. 1992. *Sys. Appl. Microbiol.* **15**:319-322.

Hernández-Saavedra N.Y., Hernández-Saavedra D. y Ochoa J.L. 1995b. *Sys. Appl. Microbiol.*, **18**:109-112.

Hernández-Saavedra N.Y., Ochoa J.L. y Vázquez-Duhalt R. 1995a. *J. Plank. Res.*, **17**(1): 59-69.

Hernández-Saavedra, N.Y. 1990. Aislamiento y caracterización de levaduras marinas aisladas en la costa occidental de B.C.S., Mexico. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala-UNAM. 111 p.

Hernández-Saavedra, N.Y. 1992. Efecto de la salinidad en la composición y concentración de osmoreguladores en levaduras halotolerantes. Tesis de Maestria. CICIMAR-IPN. 120p.

Hjalmarsson, K., Marklund, S.L., Egstrom, A. y Edlund, T. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**:6340-6344.

Hobot, J.A., y D.H. Jennings. 1981. *Exp. Mycol.* **5**:217-228.

Hong, Z., Lo Verde, P., Thakur, A., Hammarskjöld, M.L. y Rekosh, D. 1992. *Exp. Parasitol.*, **75**:308-332.

Hornbeck, P., Winston, S.E. y Fuller, A.S. 1995. Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *In*: Ausubel, F. (ed) *Short Protocols in Molecular Biology*. Third Edition. J. Wiley & Sons, Inc. pp. 11-5 to 11-16.

Imlay, K.R.C. y Imlay, J.A. 1996. *J. Bacteriol.*, **178**:2564-2571.

Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J. Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D. y Beckman, J.S. 1992. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**:431-437.

Jialal, I. y Grundy, S.M. 1992. *Ann. NY Acad. Sci.* **669**:237-248

Johansen, J.T. 1983. Process for isolating Cu/Zn superoxide dismutase from aqueous solutions containing said enzyme together with accompanying proteins. US Ptent 4 390 628.

Korenberg, J.R., Kawashima, H. Pulst, S.M., *et al.* 1990. *Am. J. Hum. Gen.*, **47**:236-246.

Kreger van Rij, N.J.W. 1989. Cassification of yeast, In: Kreger van Rij, N.J.W. (ed) *Yeast*. Vol. I Second edition. Academic Press Inc. London. pp. 5-61.

Kroll, J.S. , Langford, P.R., Wilks, K.E. y Keil, A.D. 1995. *Microbiol.*, **141**:2271-2279.

Kroll, J.S., Langford, P.R. y Loynds, B.M. 1991. *J. Bacteriol.*, **173**:7449-7457.

Kujumdzieva-Savova, A.V., Savov, V.A. y Georgieva, E.I. 1991. *Free Rad. Biol. Med.*, **11**:263-268.

Kurtzman, C.P. 1994. *Yeast*, **10**:1727-1740.

Langford, P.R., Loynds, B.M. y Kroll, J.S. 1992. *J. Gen. Microbiol.*, **138**:517-522.

Linder, M.C. 1993. Copper within vertebrate cells, *In:* Linder M.C. and Goode, Ch. A. (eds.) *Biochemistry of copper*. Plenum Press. N.Y. pp. 163-239.

Loynds, B.M., Langford, P.R. y Kroll, J.S. 1992. *Nucl. Acid. Res.*, **20**:615-615.

Malinowski, D. y Fridovich, I. 1979. *Biochem.*, **18**:5055-5060.

Mann, T. y Keilin, D. 1939. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* **126**:303-315.

Marklund, S.L. 1984. *Biochem. J.*, **222**:649-655.

Marklund, S.L. 1980. *Act. Phys. Sca. Suppl.*, **42**:19-23.

Massung, R.F., Esposito, J.J., Liu, L., *et al*, 1993. *Nature*, **366**:748-751.

Matsumoto, T., Terauchi, K., Isobe, T., Matsuoka, K. y Yamakura, F. 1991. *Biochem*, **30**:3210-3216.

McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969. *J. Biol. Chem.*, **244**:217-220.

Medina, J.J. 1996. *The clock of ages*. Cambridge University Press. Great Britain. 332 p.

Meyers, R.A.1995. Molecular Biology and Biotechnology. VCH Publishers Inc. New York, USA.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. y Remacle, J. 1994. *Free Rad. Biol. Med.*, 17(3):235-248.

Miesel, R. Yanmood, N. y Weser, U. 1995. *Red. Report*, **1**:99-103.

Nadathur, G.S. y Banaszak, A.T. 1992. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **1**(3):215-218.

Nishikimi, M. y Machlin, L.J. 1975. *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**:684.

Ochoa, J.L., Ramírez-Orozco, M., Hernandez-Saavedra N.Y. y Hernandez, S.D. 1995. *J. Mar. Biotechnol.*, **3**: 224-227.

Orr, W.C. y Sohal, R.S.1994. *Science*, **263**:1128-1130.
Õyanagui, Y. 1976. *Biochem. Pharmacol.*, **25**:1473.

Paganelli, M., Romandi, P., Bertoloni, G., Beltramini, M., Tallamandini, L. y Salvato, B. 1988. Induction of superoxide dismutase by methanol and structural modificationsin Candida albicans, *In*: Martini, A. and Martini, V. (eds.) *Yeast as a Main Protagonist of Biotechnology*. Proceddings of the 7th International symposium on Yeast. John Wiley & Sons. Perugia, Italy. pp. S431-S435.

Parker, M.W., Bossa, F., Barra, D., Bannister, W.H. y Bannister, J.V. 1986. Structural and evolutionary relationships between the eukaryotic superoxide dismutases, *In*: Rotilio, G. (ed.) *Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine.* Elsevier Sci. Publ. BV. pp. 237-245.

Peskin, A.V., Koen, Y.M. y Zbarsky, I.B. 1977. *FEBS Lett.*, **78**:41.

Petkau, A., Chelack, S.W., Pleskach, S.D., Meeker, B.E. y Brady, C.M. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**:886.

Puget, M. y Michelson, D. 1974. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **58**:830-838.

Puig-Parellada, P. y Planas, J.M. 1978. *Biochem. Pharmacol.*, **27**:535.

Ramírez-Orozco, M. 1997. Evaluacion del rendimiento celular y actividad Super-oxido Dismutasa en *Debaryomyces hansenii*. Tesis de Maestria. CICIMAR-IPN. La Paz, BCS, Mexico.

Reineckek W.B., Michelson, A.M., Puget, K., Stefens, G.J., y Flohe, L. 1988. *Biol. Chem. Haope Seyler*, **369**:715-725.

Rice-Evans, C.A. y Diplock, A.T. 1993. *Free Rad. Biol. Med.*, **15**:77-96.

Rosen, D.R., Siddique, T. Patterson, D. *et al.* 1993. *Nature*, **362**:59-62

Rothstein, J.D., Bristol, L.A., Hosler, B., brown, R.H. Jr. y Kuncl, R.W. 1994. *Neurobiology*, **91**:4155-4159.

Scandalios, J.G. 1995. Genomic responses to to environmental stress, *In:* Meyers, R.A. (ed.) *Molecular Biology and Biotechnology*. VCH Publishers. pp. 284-289.

Scott, M.D., Meshnick, S.R. y Eaton, J.W. 1987. *J. Biol. Chem.*, **262**(8):3640-3645.

Smith, G.L., Chan, Y.S. y Howard, S.T. 1991. *J. Gen. Microbiol.*, **72**:1349-1376.

Sohal, R.S. y Weindruch, R. 1996. *Science*, **273**:59-63.

Steiman, H.M. 1985. *J.Bacteriol.*, **162**:1255-1260.

Steiman, H.M. y Ely, B. 1990. *J. Biol. Chem.*, **172**:2901-2910.

Steiman, H.M. y Hill, R. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**:3725-3729.

Steiman, H.M. 1993. *J.Bacteriol.*, **175**:1198-1202.

Strain, J.J. 1994. *British. J. Biomed. Sci.*, **51**:241-251.

Strain, J.J., Hannigan, B.M. y McKenna, P.G. 1991. *J. Biomed. Sci.*, **2**:19-24.

Tan, Y.H., Tischfield, J. y Ruddle, F.H. 1973. *J. Exp. Med.*, **137**:317-330.

Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M. y Halling, S.M. 1992. *Infect. Immunol.*, **60**:2863-2869.

Taylor, A. 1992. *Ann. NY Acad. Sci.*, **669**:111-124.

Thiele, D.J. 1988. *Mol.cell. Biol.*, **8**:2745-2752.

Tibell, L., Hjalmarsson, K., Edlund, T., Skogman, G., Engstrom, A. y Marklund, S.L. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:6634-6638.

Warner, H.R. 1995. *Free. Rad. Biol. Med.*, **17**:249-258.

Yim, M.B., Chock, B.P. y Stadman, E.R. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:5006-5010.

Youn, H.D., Kim, E., Roe, J.H. Hah, Y.C. y Kang, S.O. 1996a. *Biochem. J.*, **318**:889-896.

Youn, H.D., Youn, H., Lee, J.W., Yim, Y.I., Lee, J.K., Hah, Y.C. y Kang, S.O. 1996b. *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**:341-348.