

CLONACION, SECUENCIACION Y MAPEO CROMOSOMICO DE LAS DOS FORMAS DE LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA TIPO COBRE-ZINC DE LA LEVADURA MARINA *Debaryomyces hansenii*.

Delia I. Rojas Posadas, Gopal Murugan, Felipe Ascencio Valle, Norma Y. Hernández-Saavedra*
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. Laboratorio de Genética Molecular.
Mar Bermejo 195. Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz 23090, B.C.S. Fax: 6121253625
e-mail: nhernan@cibnor.mx

Palabras clave: levaduras marinas, superóxido dismutasa, CuZn SOD.

Introducción. La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que se encuentra en los organismos aerobios y juega un papel central en el metabolismo de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno. La SOD cataliza la reacción $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ [1], sirviendo como primer mecanismo de defensa antioxidante celular. El uso de las levaduras marinas como fuente alterna para la obtención de SOD se basa en su presencia en cantidades significativas y en su inusual actividad específica [2]. La levadura marina *Debaryomyces hansenii* presenta tres isoformas de la enzima (2 homodímeros y un heterodímero) [2,3]. Hernández-Saavedra [2] realizó un estudio sobre la clonación de la secuencia que codifica para una de las dos formas básicas de la CuZnSOD (SODC), denominada *dh sod1*. La presencia de tres bandas de actividad puede interpretarse como la expresión de un gen con dos alelos o de dos genes.

Objetivos. Clonar y secuenciar la *dh sod2* en la levadura marina *D. hansenii*, realizar el tamizado de una librería genómica (para conocer las secuencias promotoras y de terminación) y mapear ambas formas (*dh sod1* y *dh sod2*) en cromosomas separados electroforéticamente.

Material y Métodos. La clonación de la secuencia codificante *dh sod2* se realizó mediante PCR, usando como templado ADN_g y primers diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos SODC2 pura [2]. Los productos de PCR fueron ligados al vector pCR2.1. Para la titulación y tamizado de la librería genómica se utilizó como sonda la secuencia clonada marcada con digoxigenina [4].

Resultados. Utilizando oligos específicos para la SOD2 se obtuvieron amplicones de ~420 pb. Mediante el análisis de la secuencia (Fig. 1) se encontró un 97% de homología con la *dh sod1* de *S. cerevisiae*, mientras que la homología con la *dh sod1* de *D. hansenii* sólo fue del 69%. El análisis de conglomerados mostró la misma tendencia al compararse con otras especies de levaduras marinas del mismo género y otras relacionadas, segregándose en dos grupos principales: marinas y terrestres, siendo en este último donde se agrupó la *dh sod2*. Se obtuvieron varias clonas positivas de la librería genómica, 2 de las cuales fueron secuenciadas, obteniéndose dos registros de 656 y 660 bases, una de ellas con homología parcial al cromosoma VII de *S. cerevisiae*. Mediante la electroforesis de campo pulsante se logró

obtener un patrón no definido de cromosomas pequeños, uno de los cuales hibridó con la sonda *dh sod2* marcada con digoxigenina.

```
1          Y K A V A V L R G D S N V S G V V
+  GAATTCGGCTCAGACGCCAAGTCCGAGCCCAACCACTGTCTCTAGCCAGATGCCTGGTAA
18  R F E Q T H E S E P T T V S S E I A G N
61  CAGTCCCTAACGCCAGAAOSTGGGTCCACATTCATGAGTTTGGAGATGCCACCAATGGTTG
38  S D N A E R G P H I H E F G D A T N G C
121 TGTCTGTGCTGGTCCCTCACTTCAATCCCTTCAAGAAGACACATGGTCTCCAACCTGACGA
58  V S A G P H F N P F K K T H G A P T D E
181 AGTCAGACATGTCGGTGCACATGGTAAAGTAAAGAAGGACGAAATGGTGTGGCCAAAGGG
78  V R H V G D N G N V K T D E N G V A K G
241 CTCTTCAAGGACTCTTTCATCAAGCTTATCCGTCCTAOCCTCCGTTGTAGGCAGAAGGT
98  S P K D S L I K L I G P T S V V G R S V
301 CGTTATCCACGCCGCGCCAAAGATGACTTAGSTAAAGGTSACACTGAAGAATCTTTGAAGAC
118 V I H A G Q D D L G K G D P E S L K T
361 TGGTAATGCCGGTCCAGACCCAGCCGCTGTGGCGTATCGGCCCTCACCAACCAAGCCGATTC
138  G N A G P R P A C G V I G L T N
```

Fig. 1. Secuencia parcial de nucleótidos (420 pb) de la región codificante del gen *dh sod-2* de *D. hansenii* (NCBI AY116213) y su correspondiente secuencia teórica de aminoácidos.

Conclusiones. En la levadura marina *D. hansenii* existen dos secuencias que codifican las SODC 1 y 2 observadas en geles de actividad. Reportes de expresión diferencial de ambos genes bajo condiciones de estrés dados por compuestos clorados [2,5] y metales [5], ponen de manifiesto su probable origen génico. La secuencia *dh sod2* obtenida presentó una alta homología con la de *S. cerevisiae*, así como la formación de clusters que incluyen solo a las especies marinas (*dh sod1*), o terrestres (*dh sod2*). La presencia y función de estos dos genes en la levadura son probablemente el resultado de la adaptación de este microorganismo a ambientes marinos y terrestres durante su evolución, lo cual explica en cierta medida el papel que juegan ambas formas de la enzima (*dh sod1* y *dh sod2*) de la levadura marina.

Agradecimientos. Esta investigación fue financiada a través de los proyectos RP-1 y J31395-N. El autor recibió beca CONACyT con No. de registro 158427.

Bibliografía. [1] McCord y Fridovich, 1969, *J. Biol. Chem.* 224:6049-6055. [2] Hernández-Saavedra, 1997. PhD. Thesis. CIBNOR. [3] Hernández-Saavedra y Ochoa, 1999. *Yeast.* 15:657-668. [4] Sambrook *et al.*, 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* Vol.1. [5] Ramírez-Serrano, 2003. Tesis de Maestría. CIBNOR.