

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**Producción y caracterización de la Superóxido
Dismutasa A (SodA) de *Nocardia brasiliensis* en
Pichia pastoris.**

Por

Luis Abraham Alonso Rodríguez

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en
Biología Molecular en Ingeniería Genética.**

Junio 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



Producción y caracterización de la Superóxido
Dismutasa A (SodA) de *Nocardia brasiliensis* en *Pichia
pastoris*.

Por

Q.B.P. Luis Abraham Alonso Rodríguez

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en
Biología Molecular en Ingeniería Genética

Junio, 2015

Producción y caracterización de la Superóxido Dismutasa A (SodA) de
Nocardia brasiliensis en *Pichia pastoris*.

Aprobación de la tesis:



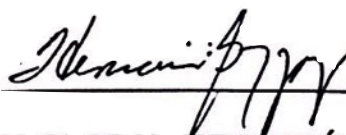
DR. C. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ.

Director de Tesis.



DR. C. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA.

Co-Director de Tesis.



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.

Miembro de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO.

Subdirector de Estudios de Posgrado.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección del Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez, la co- dirección de del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y de la Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez.

"El ser es eterno; existen leyes para conservar los tesoros de la vida, de los cuales el Universo extrae su belleza." Johann Wolfgang von Goethe.

DEDICATORIA.

A mi madre, Ma. del San Juan por siempre creer en mí, por su amor y apoyo incondicional. A mi padre Luis y a mi hermana Rocío, a ellos que son mi familia y que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible, muchísimas gracias.

AGRADECIMIENTOS.

A la vida por permitirme lograr tanto. A esa curiosidad insaciable de donde sea que provenga, que me ha traído hasta aquí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de realizar este trabajo a través de la beca otorgada.

A mi asesor el Dr. C. Jorge Ángel Ascacio Martínez por su confianza al recibirme en su laboratorio, sus acertados consejos, su tiempo y su apoyo en todo momento para la realización de éste trabajo, muchas gracias.

Al Dr. C. Mario César Salinas Carmona por depositar en mí su confianza para la realización de éste proyecto, por sus recomendaciones y todo su apoyo.

A la Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez por permitirme regresar a terminar éste proyecto, por su gran paciencia y su apoyo.

A mis amigos del programa de posgrado Selene, Gysela, Memo, Muza, Rolando, Mauricio, Chuy, Vanessa, Brenda, Ulrich, Nidia, Yazmín, gracias por su amistad, apoyo y agradable compañía a lo largo de todo este proceso. Especialmente a mis compañeros de laboratorio de biotecnología, Guillermo Guerrero y Carlos Muza por toda su ayuda, y a Selene Jacobo, Gysela Guerra y Nancy Garza por sus consejos, y todos esos momentos tan divertidos que compartimos juntos.

A mi gran amigo, el ahora M.C. Jesús Abraham Díaz Páez, por su valiosa amistad, su apoyo incondicional y sus invaluable consejos, muchas gracias roomie.

A mi amiga la Q.B.P. Diana Dominguez por todo su apoyo, por estar siempre al pendiente y ayudarme en tantas cosas, muchas gracias.

A mi amiga de generación en licenciatura, la M.C. Karla Morán por su amistad y consejos en momentos cruciales en la realización de este trabajo, muchas gracias.

A mis amigos, Isaac Hernández, Cesar González, Jorge Luis Castro, Paulo Hernández, Carlos Álvarez, Jorge Covarrubias, Johnny Blanco, Toño Herrera, Erick Beltrán, gracias por animarme en el día a día cuando las cosas parecían imposibles, muchas gracias por estar ahí.

A todo el personal del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular especialmente a Juany, Ariadna y Normita, por siempre estar para nosotros los estudiantes.

Al departamento de Inmunología, especialmente a la Dra. Anna Velia Vázquez Marmolejo por su buena disposición y apoyo, gracias.

A todos a quienes de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, muchísimas gracias.

ÍNDICE.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Biotecnología.....	3
1.2 Proteínas recombinantes.....	4
1.3. Sistemas de expresión.....	4
1.3.1 Bacterias.....	5
1.3.2 Levaduras.....	6
1.4 <i>Pichia pastoris</i>	7
1.4.1 Vectores de expresión.....	8
1.4.2 Promotor AOX1.....	8
1.4.3 Fenotipos de <i>P. pastoris</i> en la utilización del metanol.....	9
1.5 <i>Nocardia spp</i>	10
1.5.1 <i>Nocardia brasiliensis</i>	11
1.5.2 Micetoma.....	12
1.6 Superóxido Dismutasa (SOD).....	12
1.6.1 SOD como factor de virulencia	13
1.6.2 Superóxido Dismutasa como factor de virulencia de <i>N. brasiliensis</i>	13
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....	15
CAPÍTULO III OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIAL.....	17
4.1.1 Material biológico.....	18

4.1.2 Infraestructura.....	19
14.2 METODOLOGÍA.....	19
4.2.1 Estrategia general.....	19
4.2.2 Diseño de los iniciadores.....	21
4.2.2.1 Amplificación la secuencia codificante de SOD A.....	22
4.2.2.2 Purificación del amplicón <i>sodA</i>	23
4.2.2.3 Ligación del fragmento <i>sodA</i> al vector de expresión pPIC9	23
4.3 Transformación de células <i>E. coli</i> TOP10F' electrocompetentes.....	24
4.3.1 Análisis de la clonación en TOP10F' por PCR.....	25
4.3.1.2 Caracterización de la construcción pPIC9- <i>sodA</i>	26
4.4 Transformación de <i>Pichia pastoris</i> GS115 electrocompetentes.....	27
4.4.1. Electroporación.....	27
4.4.1.1 Ensayos de expresión.....	28
4.5 Análisis de la expresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	28
4.5.1 Precipitación de proteínas.....	28
4.5.1.2 Electroforésis en geles de poliacrilamida.....	29
4.6 Análisis de western blot.....	29
4.7 Ensayos de actividad funcional.....	29
CAPITULO V. RESULTADOS.....	30
5.1 Diseño de primers.....	31
5.1.1 Amplificación del gen <i>sodA</i> por PCR punto final.....	34
5.1.2 Digestión enzimática y purificación del vector de expresión pPIC9 y el amplicón <i>sodA</i>	36
5.1.3 Ligación de los fragmentos purificados.....	38

5.2 Transformación de <i>E. coli</i> TOPF10' calciocompetentes.....	39
5.2.1 PCR directo de colonia.....	
405.3 Extracción de ADN plasmídico.....	
41	
5.3.1 PCR a partir de ADN plasmídico.....	42
5.3.2 Caracterización de los plásmidos pPIC9- <i>sodA</i>	43
5.4 Linearización del plásmido pPIC9- <i>sodA</i> y transformación de levaduras.....	44
5.4.1 Caracterización de clonas de <i>Pichia pastoris</i> transformadas.....	45
5.4.1.1 Ensayos de expresión de <i>Pichia pastoris</i> pPIC9- <i>sodA</i>	46
5.4.1.2 Análisis por western blot.....	48
5.5 Ensayos de actividad funcional.....	49
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	50
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.	52
7.1 Perspectivas.....	52
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.	53
ANEXOS.....	56
PROTOSCOLOS.....	56
Extracción de ADN por lisis alcalina.....	56
Precipitación de proteínas.....	59
ELECTROPORACIÓN.....	60
Preparación de células electrocompetentes.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Estrategia general.
- Figura 2.** Construcción del vector de expresión pPIC9-sodA.
- Figura 3.** Iniciadores utilizados para la amplificación del gen sodA de *Nocardia brasiliensis*.
- Figura 4.** Alineamiento de las secuencias
- Figura 5.** Amplificación del gen sodA del plásmido pSAMBEX.
- Figura 6.** Vector de expresión pPIC9 purificado.
- Figura 7.** Amplicón del gen sodA purificado.
- Figura 8.** Placa agar LB.
- Figura 9.** Esquema de la construcción del vector de expresión pPIC9-sodA.
- Figura 10.** PCR directo de colonia.
- Figura 11.** ADN plasmídico extraído por lisis alcalina.
- Figura 12.** PCR a partir de ADN plasmídico extraído.
- Figura 13.** Caracterización con enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*.
- Figura 14.** Placa con agar MD.
- Figura 15.** Gel de agarosa al 1%.
- Figura 16.** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12% (SDS-PAGE).
- Figura 17.** Western blot.
- Figura 18.** Gráfica de actividad funcional.

INDICE DE TABLAS.

- Tabla 1.** Iniciadores diseñados.
- Tabla 2.** Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del gen *sodA*.
- Tabla 3.** Programa para la amplificación del gen *sodA*.
- Tabla 4.** Condiciones para la reacción de ligación del gen *sodA* y el vector de expresión pPIC9.
- Tabla 5.** Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en el vector pPIC9.
- Tabla 6.** Programa de PCR para verificar la clonación en el vector de expresión.
- Tabla 7.** Condiciones para la doble digestión.
- Tabla 8.** Linearización de la construcción pPIC9-*sodA*.
- Tabla 9.** Condiciones de amplificación para gen *sodA*.
- Tabla 10.** Reacción de ligación.
- Tabla 11.** Condiciones usadas durante la linearización.

ABREVIATURAS.

° C	Grados Celsius.
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
µM	Micromolar.
aa	Residuos aminoacídicos.
Abs	Absorbancia.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
aox1	Gen de alcohol oxidasa 1.
AOX2	Alcohol Oxidasa 2.
aox2	Gen de alcohol oxidasa 2
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BMGY	Medio rico amortiguado, con glicerol.
BMMY	Medio rico amortiguado, con metanol.
BSA	Albúmina sérica bovina.
DO	Densidad óptica.
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FDA	Food and Drug Administration.
g	Gramos.
His4	Hisitdinol deshidrogenasa.
kDa	Kilodaltones.
Kg	Kilogramo.

kpb	Kilo pares de bases.
LB	Medio de cultivo de Luria Bertani.
M	Concentración Molar.
mg	Miligramos.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mM	Concentración Milimolar.
mm	Milímetro.
Mut	Methanol utilization minus.
Mut ^s	Methanol utilization slow.
Mut ⁺	Methanol utilization plus.
ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros.
nt	Nucleótidos.
Oligo	Oligonucleótidos o iniciadores.
pb	Pares de bases.
pH	$-\log [H^+]$
PL	Péptido Líder.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
h	Hora
s	Segundos.
SDS	Lauril sulfato de sodio.
Sevag	Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
SS	Secuencia señal
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> .
TE	Tris-Cl-EDTA

TSNT	Técnica universal de extracción de ADN genómico
Unidades.	
V	Voltios.
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa.
YPG	Medio de extracto de levadura, peptona y glicerol.
YNB	Base Nitrogenada de Levadura.

RESUMEN

Luis Abraham Alonso Rodríguez

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Facultad de Medicina.

Título del Estudio: “Producción y caracterización de la Superóxido

Dismutasa A (SodA) de *Nocardia brasiliensis* en *Pichia pastoris*.”

Número de páginas: *Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.*

Área de Estudio: Biotecnología.

Introducción: A mediados de los años 70's del siglo pasado el descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante marca el inicio de la era de la biotecnología moderna. La implementación de estas tecnologías permitió la utilización de organismos como sistemas de expresión que a lo largo de los años ha generado la producción de una gran variedad de productos biológicos. Dentro de estos sistemas *Pichia pastoris* es un sistema de expresión ampliamente utilizado debido a sus características tales como la producción de proteínas en grandes cantidades, la liberación de los productos al medio de cultivo, la obtención de productos complejos que requieren modificaciones postraduccionales típicas de los eucariotas o que contienen puentes disulfuro, entre otras. *Nocardia brasiliensis* es una bacteria parcialmente ácido-alcohol resistente la cual forma colonias granulares, con hifas aéreas escasas, sus colonias exhiben un color anaranjado pardo con bordes en blanco. *N. brasiliensis* es patógena para el ser humano y es el agente causal del actinomicetoma. El actinomicetoma es una enfermedad crónica generalmente localizada en las extremidades. Se caracteriza por ser un proceso lento de tumefacción con nódulos, abscesos y fístulas. La Superóxido Dismutasa (SOD) es una enzima reductora polimérica que cataliza la conversión del ión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La SOD ha sido propuesta como un factor de virulencia de microorganismos patógenos, cuya acción consiste en bloquear los efectores oxidativos del estallido respiratorio iniciado por los fagocitos en el fagolisosoma. Este mecanismo ha sido descrito para bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*. **Objetivo:** producir y caracterizar la Superóxido Dismutasa A (SODA) de *Nocardia brasiliensis* en *Pichia pastoris*. **Metodología:** se realizó el diseño de primers adicionando secuencias de sitios de corte para las enzimas XhoI y AvrII, así como una cola de histidinas en el extremo 5' para la amplificación del gen *sodA* de *N. brasiliensis* a partir del ADN genómico de *Nocardia brasiliensis*. El amplicón se clonó en el vector de expresión pPIC9. Se llevó a cabo la transformación por electroporación de levaduras *Pichia pastoris* GS115. La producción de SOD se llevó a cabo en inducciones de 96 h con metanol como agente inductor. Los sobrenadantes se dializaron con membranas de celulosa. Los dializados se observaron por SDS-PAGE y western blot. Se analizó la actividad funcional de la enzima con el SOD Assay kit de Sigma Aldrich. **Resultados:** Por reacción en cadena de la polimerasa se obtuvo una secuencia de 625 pb correspondiente al gen *sodA*. El fragmento se ligó al vector de expresión pPIC9 y fue caracterizado con las enzimas de restricción XhoI y AvrII. Las cepas transformadas de *P. pastoris* GS115 se caracterizaron con el gen *aox1* obteniendo cepas Mut⁺ y Mut^s. Los análisis por SDS-PAGE mostraron bandas no observadas en el control negativo de expresión mientras en los western blot solo una de las clonas mostró señal. Los análisis de actividad funcional sugieren inhibición de la reacción enzimática infiriendo presencia de la proteína SOD en el medio dializado. **Conclusiones:** Se logró la construcción del sistema de expresión *Pichia pastoris* con el casete de expresión de la SOD de *N. brasiliensis*. Así como la generación de cepas Mut⁺ y Mut^s. En los ensayos de actividad funcional se observó inhibición de la reacción enzimática.

Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez.
Director

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.

La humanidad desde hace miles de años ha venido utilizando algunas prácticas biotecnológicas para la generación de diversos productos. Sin embargo es hasta mediados de los años 70's del siglo pasado cuando el descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante marca el inicio de la era de la biotecnología moderna. La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos, con beneficios directa e indirectamente para el ser humano.

En la actualidad los métodos modernos de biotecnología abarcan desde el cultivo de tejidos, las técnicas inmunológicas, la genética molecular y las técnicas del ADN recombinante. Gracias a estos nuevos métodos la producción de proteínas recombinantes ha tomado gran importancia a partir de las últimas décadas debido a los altos beneficios técnicos y económicos en diversas áreas como la industria farmacéutica, de alimentos, entre otras.

La tecnología del ADN recombinante ha permitido la utilización de organismos como sistemas de expresión que a lo largo de los años ha generado una gran variedad de productos biológicos. Dentro de estos sistemas, las levaduras han probado ser hospederos adecuados capaces de producir y secretar proteínas directamente al medio de cultivo, proteínas de cadenas largas, con puentes disulfuro y variadas modificaciones postraduccionales, así como productos libres de toxinas, ADN oncogénico o viral.

Los factores de virulencia son moléculas secretadas por determinados patógenos las cuales permiten su propagación en el hospedero. La enzima Superóxido Dismutasa ha sido señalada como un factor de virulencia en una amplia cantidad de microorganismos, principalmente bacterias.

En los años recientes se han reportado la producción y clonación de Superóxido Dismutasas de diferentes especies, pero teniendo como objetivo principal la optimización de procesos industriales. Por ejemplo la SOD1 humana (Yoo, Kim, & Rho, 1999), SOD extracelular humana (Chen et al., 2006), así como SODs de *Saccharomyces cerevisiae* (P. Yu, 2007), *Thermoascus aurantiacus* (Song, Zheng, E, & Li, 2009) y *Deschampsia antarctica* (Sanchez-Venegas et al., 2009). Por ello la obtención en cantidades relevantes de moléculas involucradas en el desarrollo de diferentes patologías es una área de interés en los procesos biotecnológicos para el sector salud.

1.1 Biotecnología.

La biotecnología se define también como la aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para el beneficio de la sociedad. La biotecnología ha existido desde hace miles de años desde la producción de bebidas alcohólicas, pan, queso, yoghurt y vinagre, entre otros (Sánchez-Cuevas, 2003).

El advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, marca el inicio de la era de la biotecnología moderna. Dicha tecnología permitió modificar genéticamente diversos tipos de células las cuales funcionan como “reactores” biológicos, capaces de sintetizar diversas proteínas recombinantes (Drago Serrano, 2006).

La industria de las enzimas floreció en los 80's y 90's cuando las enzimas microbianas aparecieron. En los 70's la mayoría de las enzimas usadas eran derivadas de sus fuentes naturales lo cual se traducía en un bajo nivel de disponibilidad, altos precios y un rezagado crecimiento de la industria. Las enzimas microbianas han demostrado ser económicamente más favorables debido a que el cultivo de organismos es mucho más simple y rápido que el de plantas y animales, además de su fácil manipulación genética para producir enzimas en cantidades y calidad deseables. Para el año 2002, más de 155 fármacos y vacunas habían sido desarrollados y aprobados por compañías farmacéuticas. Algunas de ellas son la insulina humana, la albúmina, la hormona del crecimiento (HGH), factor VIII, entre otras (Demain & Vaishnav, 2009).

Algunos usos de las enzimas a nivel industrial manufacturera incluye la amidasa producida en *Escherichia coli* para producir ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) a niveles de 40,000 toneladas por año. Otro ejemplo es la xilosa isomerasa de *Streptomyces* utilizada para isomerizar la D-glucosa a D-fructosa a niveles de 100,000 toneladas por año y por último la nitrilohidratasa para producir acrilamida de acrilonitrilo a 30,000 toneladas al año (Jaeger, Eggert, Eipper, & Reetz, 2001).

1.2 Proteínas recombinantes.

Una gran variedad de proteínas son producidas en la industria actualmente, con la ayuda de la ingeniería genética. Proteínas nativas o recombinantes benefician a grandes sectores de la industria biofarmacéutica y la industria agrícola. Productos de estas industrias permiten el desarrollo de otras áreas como la medicina, diagnósticos, nutrición, detergentes, textiles, etc. (Demain & Vaishnav, 2009).

1.3 Sistemas de expresión.

Los sistemas de expresión han sido ampliamente utilizados para la explotación controlada de diversos productos de interés comercial como la industria de alimentos, farmacéutica e industrias biotecnológicas (Lee, Mattanovich, & Villaverde, 2012).

Un sistema de expresión se compone principalmente de un vector de clonación, el cual contiene el gen que codifica para el producto de interés, un origen de replicación, un marcador de selección por ejemplo el gen que codifica para la resistencia a diferentes antibióticos como ampicilina, kanamicina y tetraciclina, además de un promotor que regula la transcripción del gen insertado y un gen de terminación de transcripción (Jonasson, Liljeqvist, Nygren, & Stahl, 2002).

El primer paso para la producción de la proteína recombinante es obtener el ADN clonado deseado, después la proteína debe ser producida en el sistema de expresión de elección. Existen una gran cantidad de sistemas de expresión disponibles como cultivos celulares, levaduras, hongos, mamíferos, plantas o insectos o a través de plantas y animales transgénicos. La calidad de la proteína, la funcionalidad, velocidad de producción y rendimiento, son los factores más importantes a considerar en la elección del correcto sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes (Demain & Vaishnav, 2009).

1.3.1 Bacterias.

De entre la gran variedad de organismos utilizados como sistemas de expresión, la bacteria *Escherichia coli* es el más ampliamente utilizado como hospedero para la producción de proteínas heterólogas (Terpe, 2006). Los cultivos de *E. coli* a escala industrial suelen llevarse a cabo en medios químicamente definidos, el establecimiento de los medios sintéticos facilita el aislamiento y purificación del producto y reducen el costo de su producción. Sin embargo el sistema *E. coli* presenta varios inconvenientes que deben superarse para una producción eficiente. Altas densidades celulares resultan en toxicidad debido a la formación de acetato. Las proteínas producidas como cuerpos de inclusión son frecuentemente inactivas, insolubles y requieren replegamiento (Demain & Vaishnav, 2009).

Otras bacterias utilizadas como sistemas de expresión son los bacilos gram positivos. Las especies utilizadas generalmente son *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus brevis*. Estos tienden a utilizarse en la expresión homóloga de enzimas como las proteasas (para detergentes) y amilasas (para almidón y para cocinar).

Algunas ventajas de utilizar el sistema *Bacillus* se encuentran: una gran secreción sin cuerpos de inclusión, fácil manipulación, genéticamente bien caracterizados, características superiores de crecimiento. Sin embargo posee desventajas como la alta producción de proteasas propias de la bacteria lo cual lleva a una degradación de las proteínas recombinantes (He, Brückner, & Doi, 1991).

1.3.2 Levaduras.

Las levaduras son organismos fúngicos unicelulares eucariotas utilizados para producir proteínas recombinantes. Las cepas de levaduras están bien caracterizadas genéticamente y son conocidas por realizar modificaciones postraduccionales, además su producción en medios químicamente definidos y la ausencia de endotoxinas bacterianas, lo cual se traduce en la reducción de costos de producción (Gerngross, 2004).

Las más utilizadas han sido *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Sin embargo la glicosilación de *S. cerevisiae* en la mayoría de los casos es inaceptable para la producción de proteínas de mamífero, debido a que los oligosacáridos unidos por enlaces O⁻ sólo contienen manosa mientras las proteínas de eucariotas superiores tienen cadenas de ácidos siálicos unidos por enlaces O⁻. Además las sobreglicosilaciones tipo N llevan a la reducción en la actividad biológica y a la unión a receptor causando problemas inmunológicos.

A través de los años se ha demostrado su utilidad en la expresión de proteínas en altas cantidades, como por ejemplo, la producción de 14.8 g/l de gelatina en *Pichia pastoris*. (Werten, van den Bosch, Wind, Mooibroek, & de Wolf, 1999).

La primera levadura caracterizada como sistema de expresión fue *Saccharomyces cerevisiae*, desarrollada en los 80's, sin embargo problemas en la inestabilidad de los plásmidos, bajos rendimientos en la producción y la hiperglicosilación de proteínas han limitado el número de productos comerciales procedentes de *S. cerevisiae* en el mercado. (Gellissen, 2000).

1.4 *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica, capaz de utilizar metanol como única fuente de carbono y, recientemente reclasificada como *Komagataella pastoris*, la cual se ha vuelto imprescindible a través de los años en la industria biotecnología, especialmente en la producción de proteínas recombinantes. (Kurtzman, 2009).

La historia de *Pichia pastoris* comenzó hace más de 40 años cuando la empresa Phillips Petroleum la utilizó con el fin de producir proteína unicelular (SCP) como aditivo alimenticio de ganado, esto basándose en un proceso de fermentación de alta densidad celular utilizando metanol como fuente de carbono. Fue hasta los años 80's que *P. pastoris* se implementó como un sistema de expresión para la producción de proteínas heterólogas usando el promotor altamente regulado, AOX1. (Cregg, Madden, Barringer, Thill, & Stillman, 1989).

Por ello *P. pastoris* se ha vuelto una alternativa importante a los sistemas de expresión bacteriana tales como *E. coli*, especialmente cuando se trata de producir proteínas en grandes cantidades o la obtención de productos complejos que requieren modificaciones postraduccionales típicas de los eucariotas o que contienen puentes disulfuro. (Cereghino, Cereghino, Ilgen, & Cregg, 2002).

1.4.1 Vectores de expresión.

Los vehículos de clonación empleados en levadura suelen poseer promotores como el del gen PGK (3-fosfoglicerato cinasa), ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), fosfatasa ácida y genes del cluster GAL (galactosa).

La generación de una proteína heteróloga en un sistema de expresión como *P. pastoris* involucra varios pasos cruciales: 1) seleccionar la cepa hospedera que permita las correctos plegamientos y modificaciones postraduccionales, 2) elegir un vector adecuado (episomal o integrativo) con un promotor apropiado (constitutivo, inducible o represivo) y un marcador de selección, 3) codones preferenciales para optimizar el gen, 4) fusionar el gen a una etiqueta si es necesario para la purificación o detección de la proteína, 5) escoger la secuencia señal para dirigir la proteína a un medio extracelular o intracelular(Çelik & Çalık, 2012).

1.4.2 Promotor AOX1.

Una ventaja del sistema de expresión *P. pastoris* respecto a otras levaduras es el uso del promotor altamente regulado derivado de la alcohol oxidasa I (AOX1) de la vía del metanol para el control de un gen heterólogo. Cuando las células crecen en glucosa, la expresión del promotor AOX1 es indetectable, sin embargo cuando es inducido se incrementa hasta mil veces cuando la levadura es expuesta a un medio con metanol. Otra ventaja es que el sistema es su fuerte preferencia para el crecimiento respiratorio,

característica que facilita el cultivo a altas densidades celulares (>100 g/L de peso seco). Es debido a estas características que el sistema ha sido tan exitoso y se han producido más de 300 proteínas heterólogas, a niveles tan altos como 1 g/ L de medio de cultivo. (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014).

1.4.3 Fenotipos de *P. pastoris* en la utilización del metanol.

Respecto a su capacidad para la utilización del metanol existen tres fenotipos de *P. pastoris*. El fenotipo Mut⁺ (Methanol utilization plus) el cual tiene la capacidad de crecer en metanol a una tasa similar al silvestre y que requiere altas cantidades de metanol durante las fermentaciones a gran escala. El fenotipo Mut^s (Methanol Utilization Slow), el cual tiene truncado el gen AOX1, por tanto las células se valen del gen AOX2 para metabolizar el metanol, resultando en un crecimiento lento y una utilización más lenta del metanol. Por último se encuentra el fenotipo Mut⁻ (Methanol Utilization Minus), el cual es incapaz de crecer en metanol ya que ambos genes AOX se encuentran truncados (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005).

1.5 *Nocardia spp.*

El género *Nocardia* pertenece a un grupo de bacterias ubicuas denominadas actinomicetos. Los actinomicetos se describen como bacterias gram positivas de importancia ecológica, involucradas principalmente en el reciclaje de la materia orgánica, celulosa y la quitina de insectos. Habitan en el suelo, en la vegetación descompuesta y en otra materia orgánica, así como en agua dulce y salada. *Nocardia* se encuentra dentro del subgrupo *Corynebacterineae*, los cuales son organismos caracterizados por la producción de ácidos micólicos que proveen fuerza a la pared celular bacteriana y comparten su clasificación con patógenos humanos especializados como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* y *Corynebacterium diphtheriae* (Stackebrandt E., 1997).

Su historia se remonta a 1889 cuando Trevisan introduce el género *Nocardia* en honor a Edmond Nocard quien fue el primero en reportar una enfermedad producida por bacterias de este género ("farcin du boeuf") al realizar el aislamiento de lesiones granulomatosas en bovinos. *Nocardia farcínica*, como así se nombró a la bacteria causante de esta enfermedad, fue la especie prototipo del recién creado género *Nocardia* (M. C. Salinas-Carmona, 2000).

El género se encuentra incluido dentro del orden de los *Actinomycetales* donde también se encuentran otros géneros importantes desde el punto de vista clínico, tales como *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, etc. (Beaman & Beaman, 1994).

Algunas especies de *Nocardia* no son patógenas para el hombre e incluso han sido utilizadas en diversas áreas productivas, por ejemplo, dada su capacidad para la degradación de hidrocarburos algunas especies de *Nocardia* se utilizan en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Baek et al., 2004).

Sin embargo, algunas otras especies son consideradas patógenas para el hombre y son causantes de diversas enfermedades que se agrupan bajo el término médico de nocardiosis (Beaman y Beaman, 1994).

Beaman y Beaman en 1994 han propuesto una clasificación de las nocardiosis humanas según su localización, reconociendo seis tipos básicos de nocardiosis:

1. Pulmonar.
2. Sistémica.
3. Sistema nervioso central.
4. Extrapulmonar.
5. Cutánea, subcutánea y linfocutánea.
6. Actinomicetoma.

1.5.1 *Nocardia brasiliensis*.

N. brasiliensis es una bacteria parcialmente ácido-alcohol resistente, crece bien pero lentamente en medios ricos como el Sabouraud y el Brain Heart Infusion (BHI), en un rango de temperatura que va de 10-45° C y a un pH óptimo de 6.0-9.0. Forma colonias granulares, con hifas aéreas escasas. Sus colonias exhiben un color anaranjado pardo con los bordes en blanco. *Nocardia brasiliensis* es patógena para el ser humano y es el agente causal del actinomicetoma (M. C. W. Salinas-Carmona, O.; Casillas, S. M., 1993).

1.5.2 Micetoma.

La enfermedad clásica producida por *Nocardia brasiliensis* es el actinomicetoma, el cual se describe como una enfermedad crónica generalmente localizada en las extremidades caracterizada por ser un proceso lento de tumefacción con nódulos, abscesos y fístulas. Es una lesión sin dolor que secreta un líquido ceroso el cual contiene microcolonias llamadas granos o gránulos. Los micetomas se clasifican en eumicetoma y actinomicetoma de acuerdo a su agente etiológico. El término eumicetoma se refiere a una lesión producida por un hongo como *Madurella mycetomatis*. Mientras que el agente etiológico del actinomicetoma es una bacteria. La infección ocurre por una inoculación traumática a través de la piel con espinas o astillas, lo cual explica su localización generalmente en pies, manos y brazos, aunque también se ha reportado en esternón, pericardio, pulmones y mediastino (M. C. Salinas-Carmona, 2000).

1.6 Superóxido Dismutasa (SOD).

La SOD es una enzima reductora polimérica que cataliza la conversión del ión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, de acuerdo a la siguiente reacción química:



Posee un origen ancestral al encontrarse ampliamente distribuida en la naturaleza ya que es producida por todos aquellos organismos que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones durante la respiración. La enzima acelera la reacción en aproximadamente 1×10^9 veces la tasa de decaimiento normal de sustrato (Medina-Villanueva, 2008).

1.6.1 SOD como factor de virulencia.

Anteriormente se ha observado que muchos organismos, principalmente en bacterias, existe una concentración de Superóxido Dismutasa más elevada de la que es necesaria teóricamente para neutralizar el O_2^- intracelular. Por lo tanto, se ha propuesto la participación de SOD en funciones alternas. Una gran variedad de organismos poseen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno, incluyendo al ion O_2^- para destruir a parásitos invasores o para eliminar a la competencia del medio. Por ello se piensa que la SOD podría jugar un papel importante como un mecanismo de defensa contra tales ataques (Gort & Imlay, 1998).

Se ha observado, principalmente en bacterias que algunas SOD microbianas están relacionadas con la virulencia de microorganismos patógenos, cuya acción consiste en bloquear los efectores oxidativos del estallido respiratorio iniciado por los fagocitos en el fagolisosoma. La SOD desvía la cascada de generación de radicales libres de oxígeno hacia la generación de agua y oxígeno molecular auxiliada de otras enzimas como la catalasa o la glutatión oxidorreductasa. Esto da la capacidad a los patógenos de resistir la respuesta inmune inicial permitiéndoles sobrevivir y propagarse dentro del hospedero. (Medina-Villanueva, 2008). Este mecanismo ha sido descrito para bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia* (Lynch & Kuramitsu, 2000) (M. Bartos, 2004).

1.6.2 Superóxido Dismutasa como factor de virulencia de *N. brasiliensis*.

Los factores de virulencia son aquellas moléculas que un organismo patógeno utiliza para propagarse en el hospedero. Es poco lo que se sabe sobre los factores de virulencia del género *Nocardia*, sin embargo anteriormente Beaman y Beaman *et al.* en 1985 estudiaron a *Nocardia asteroides* demostrando su resistencia a la actividad microbicida dependiente

de oxígeno de neutrófilos humanos, lo cual se correlacionaba positivamente con sus actividades de catalasa y de superóxido dismutasa.

Estos autores observaron que la virulencia de la bacteria era mayor cuando la infección se realizaba con inóculos en la fase exponencial de crecimiento, justo cuando la producción de SOD se encontraba aumentada. Estos hallazgos indican que la presencia de estas actividades enzimáticas representan un importante mecanismo para la supervivencia de *N. asteroides* durante la infección.

En cuanto a *N. brasiliensis* en los 90's Salinas-Carmona *et al.* estudiando las interacciones de *N. brasiliensis* con el sistema inmune, descubrieron varias proteínas inmunodominantes (P24, P26 y P61) lo que llevó consecuentemente a la realización de una prueba de diagnóstico de ELISA con alta sensibilidad y especificidad (M. C. W. Salinas-Carmona, O.; Casillas, S. M., 1993).

En el 2006 Revol *et al.* buscando estudiar el papel de la SOD de *N. brasiliensis* durante la infección, lograron obtener la secuencia nucleotídica parcial de la SOD A. En ensayos *in vitro* demostraron que durante la primera hora después de la infección de macrófagos peritoneales de ratón, la expresión del gen *sodA* se encontraba disminuida significativamente con respecto a un grupo control. Sin embargo en ese trabajo no se logró concluir cual era el papel que jugaba la SOD como un factor de virulencia durante la patogénesis (Revol, 2006).

A la fecha no se conoce el papel que desempeña la SOD de *N. brasiliensis* en el establecimiento del micetoma, así como tampoco se ha reportado la clonación de la proteína Superóxido Dismutasa en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente la patogénesis del actinomicetoma producido por *Nocardia brasiliensis* no está claramente dilucidada. Y se ha propuesto a la Superóxido Dismutasa (SOD) como un factor de virulencia, que contribuye a evadir el estallido respiratorio de los leucocitos polimorfonucleares. Es necesario tener en cantidad suficiente la SOD A para poder llevar a cabo estudios a futuro que ayuden a estudiar su papel en la patogénesis del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* lo dicho anteriormente. Por lo que se utilizará el sistema de expresión de *Pichia pastoris* para producir la SOD A, ya que previamente se ha demostrado en nuestro laboratorio la capacidad de producción de proteínas recombinantes con actividad biológica demostrada.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Producir y caracterizar la Superóxido Dismutasa A (SODA) de 23kDa de *Nocardia brasiliensis* en la levadura *Pichia pastoris* .

3.2 Objetivos específicos.

1. Construir el vector de expresión pPIC9-*sodA* del gen de *Nocardia brasiliensis*.
2. Generar cepas de *Pichia pastoris* productoras de la Superóxido Dismutasa A.
3. Realizar ensayos de actividad funcional.

CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 MATERIAL.

Los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *sodA* de la Superóxido Dismutasa A de *Nocardia brasiliensis* se mandaron sintetizar a la compañía Alpha DNA (Quebec, Canadá).

Las enzimas de restricción utilizadas se obtuvieron de la casa comercial New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA. EUA). Para las amplificaciones se utilizó el amortiguador GoTaq® Green Master Mix de PROMEGA. (Madison, WI 53711 USA).

Los ensayos de actividad funcional se realizaron utilizando el SOD Assay kit de Sigma Aldrich (Co; St Louis, MO, USA).

Los vectores utilizados se obtuvieron de Invitrogen (vector de expresión pPIC9).

Los reactivos utilizados para la preparación de soluciones, medios de cultivo, amortiguadores, geles de agarosa etc. se obtuvieron de diversas compañías: Sigma Aldrich Chemical Company, Inc (ST, Louis, MO. EUA). Difco (Detroit, MI, EUA), CTR (Monterrey, México) e Invitrogen (La Jolla CA, EUA).

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: medio LB (Luria-Bertani) para los cultivos de *E. coli*, medio YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) para el cultivo de *P. pastoris* y medio BMMY (Buffered Methanol-complex, Medium) para los ensayos de expresión.

Los antibióticos utilizados como marcadores de selección ampicilina 50 µg/mL y Tetraciclina 10 µg/mL.

4.1.1 Material biológico.

La cepa *Escherichia coli* TOP10F' para la clonación de la construcción del vector de expresión pPIC9-sodA, así como la cepas de *Pichia pastoris* GS115 transformadas con la construcción fueron obtenidos con el *Pichia* expresión kit de Invitrogen Co (Gaithersburg, MD. EUA).

4.1.2 Infraestructura.

El desarrollo de este trabajo se realizó empleando los siguientes aparatos: horno de microondas GoldStar modelo MA-875M, Ultracongelador So-Low de Environmental Equipment (Comcomato. Ohio, EUA), termociclador Axygene, microcentrifuga Eppendorff, Sistemas de esterilización por calor húmedo Market Forge (Sterilmatic). Incubadoras Shell Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc) modelo 1535 y 1330GX y agitador orbital (ORBIT) de Lab Line, Espectrofotómetro UV/Vis DU70.

Concentrador al vacío CENTRIVAP de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA) modelo 500, cámaras de electroforesis horizontal Thermo EasyCastTM. Las transformaciones por electroporación se realizaron utilizando el electroporador modelo Gene Pulser II y se utilizaron celdas de 0.2 mm de la marca BIO-RAD (Hercules, CA, EUA). IA Electroforesis de proteínas se realizó en cámaras de electroforesis vertical mini-protean II de BIO-RAD y fuente de poder Labnet.

Para la elaboración de los iniciadores se utilizaron los siguientes programas ClustalW Multiple Sequence Alignment program version 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), NEBcutter V2.0 de New England Biolabs disponible en (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) y Oligo version 7.9 (1267 Vondelpark Colorado Springs, CO 80907, USA).

4.2 METODOLOGÍA.

4.2.1 Estrategia general.

Para abordar los objetivos específicos, primeramente se realizaron el diseño de primers mediante el programa de Oligo 7 (5.57). Después se llevó a cabo la amplificación del fragmento correspondiente a la secuencia codificante del gen *sodA* a partir del ADN genómico/vector clonado (pSAMBEX).

El gen *sodA* amplificado se ligó en el vector de expresión pPIC9. La construcción pPIC9-*sodA* se propagó en *E. coli* TOP10F'. Posteriormente se llevó a cabo la transformación por electroporación de *P. pastoris* GS115.

Se seleccionaron las clonas y se realizaron los ensayos de expresión. El medio de cultivo después de la inducción fue analizado por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Western blot utilizando un anticuerpo anti-histidina. Por último se realizaron los ensayos de actividad funcional utilizando el kit SOD assay de Sigma Aldrich.

Figura 1. Estrategia general.



4.2.2 Diseño de los iniciadores.

El diseño de primers se realizó utilizando la secuencia reportada en la tesis doctoral de Medina-Villanueva (2008) bajo el no. de registro DQ402038.2 y la reportada en el artículo del Dr. Lucio-Vera (2013) *et al* no. de registro O3I_000385, ambas localizadas en la plataforma Genbank.

El diseño de los oligos se llevó a cabo utilizando el programa Oligo 7 Primer Analysis Software. En la construcción de los iniciadores se adicionaron los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoR I* y *Not I* (lo cual permitió insertar la secuencia *sodA* en el vector de expresión pPIC9), secuencia del péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, una secuencia de histidinas para su purificación y un sitio de corte para enterocinasa. Todo ello evaluando las temperaturas óptimas y evitando la formación de estructuras secundarias. Posteriormente teniendo la secuencia de los primers se mandaron sintetizar a la compañía Alpha DNA (Montreal, Canadá).

Tabla 1. Iniciadores diseñados.

Nombre	Secuencia.
Forward	5'TCACTCGAGAAAAGACATCACCATCACACCACGACGATGACGATAAA GTGGCTGAGTACACG 3'
Reverse	5' GCCCCTAGGTCAGCCGAAGAAGAG 3'

4.2.2.1 Amplificación la secuencia codificante de SODA.

Utilizando los iniciadores diseñados previamente y en base al ADN genómico se amplificó la secuencia codificante de la Superóxido Dismutasa A de *Nocardia brasiliensis* a partir de ADN genómico. Las condiciones de la amplificación se muestran en la tabla 2. El programa para amplificar se muestra en el cuadro.

Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del gen *sodA*.

	Volumen	Concentración
Master mix	10 µL	1X
Iniciador 5'	1 µL	200 mM
Iniciador 3'	1 µL	200 mM
Agua miliQ	1 µL	30''
ADN (200 ng/µL)	2 µL	200 ng/µL
Colonia	Asada	——
Volumen total	10 µL	——

Tabla 3. Programa para la amplificación del gen *sodA*.

x 30	Temp	Tiempo
D. inicial	95 °	5'
Desnaturalización	94°	45''
Alineamiento	60°	30''
Extensión	72°	30''
Extensión final	72°	5'

5.2.2.2 Purificación del amplicón *sodA*.

Se realizó la purificación del fragmento amplificado del gen *sodA* utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System de PROMEGA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez purificado se procedió con la ligación del gen en el vector de expresión pPIC9.

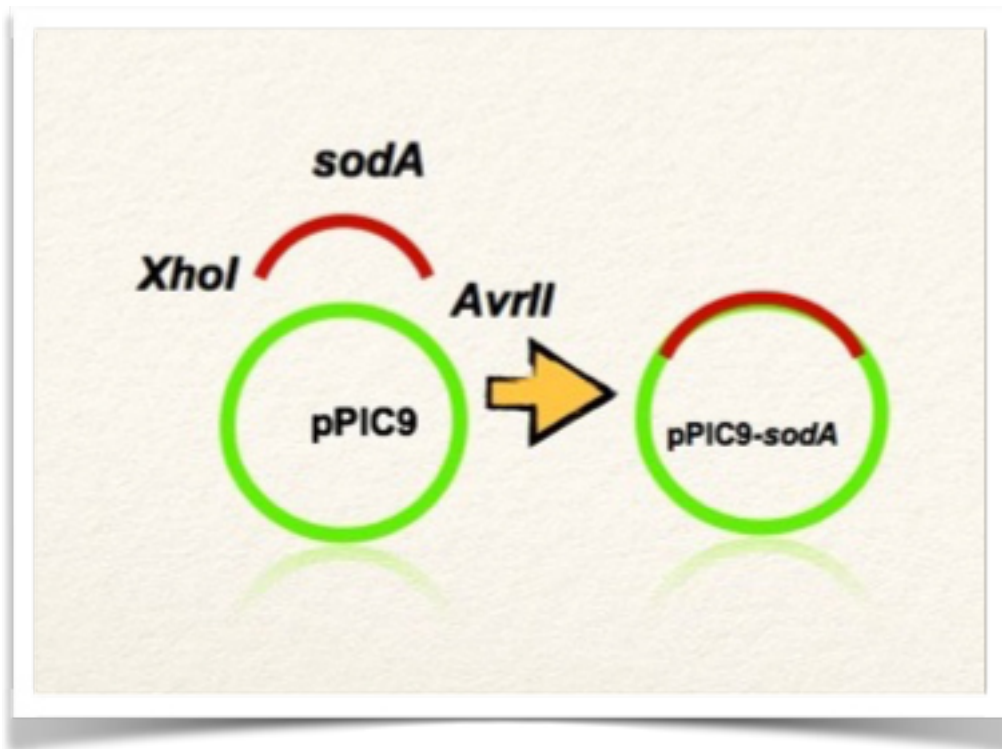
4.2.2.3 Ligación del fragmento *sodA* al vector de expresión pPIC9.

El gen *sodA* purificado así como el vector de expresión pPIC9 linearizado y purificado se sometieron a una reacción de ligación. La reacción de ligación se llevó a cabo en base a las recomendaciones de la Quick Stick Ligase de BIOLINE, como se observa en la tabla, en una relación molar 3:1

Tabla 4. Condiciones para la reacción de ligación del gen *sodA* y el vector de expresión pPIC9.

Reactivo	Cantidad
4X QS Buffer	3 μ L
QS Ligase	1 μ L
pPIC9	2 μ L
<i>sodA</i>	6 μ L
Total	12 μ L

Figura 2. Construcción del vector de expresión pPIC9-sodA.



4.3 Transformación de células *E. coli* TOP10F' electrocompetentes.

El vector de expresión pPIC9-sodA se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes TOP10F'. Se utilizaron 2 μL de la construcción y se llevaron a un volumen final de 20 μL . Los parámetros de electroporación para la transformación fueron los siguientes: 200 Ω , 25 μF y 2.5 kV. Después de inducir el pulso eléctrico se añadieron 500 μL de medio LB y se transfirieron las bacterias a un tubo de 1.5 mL para su incubación a 37°C en agitación (250 r.p.m.) durante una hora. Posteriormente se centrifugaron 3 min a 4000 r.p.m. Después se decantó y se resuspendió la pastilla en el medio remanente. La suspensión se resembró por extensión con varilla de vidrio en una placa con LB agar suplementada con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente se incubó a 37°C por 16 horas.

4.3.1 Análisis de la clonación en TOP10F' por PCR.

Se analizaron las construcciones haciendo PCR directo de colonia empleando los iniciadores *sodA* Forward y Reverse. Se tomó una pequeña asada de cada colonia y se resuspendió en el volumen de reacción para realizar la PCR cuyas condiciones fueron las siguientes:

Cuadro 5. Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en el vector pPIC9.

	Volumen	Concentración
Master mix	10 µL	1X
Iniciador 5'	1 µL	200 mM
Iniciador 3'	1 µL	200 mM
Agua miliQ	1 µL	30''
ADN (200 ng/µL)	2 µL	200 ng/µL
Colonia	Asada	—
Volumen total	10 µL	—

Cuadro 6. Programa de PCR para verificar la clonación en el vector de expresión.

x 30	Temp (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °	5'
Desnaturalización	94°	50''
Alineamiento	52°	45''
Extensión	72°	1'
Extensión final	72°	5'

Después de verificar la clonación en el vector de expresión. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB con ampicilina 50 µg/mL a 37° C en agitación durante 18 horas. Los cultivos se cosecharon y se extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina (descrita en la sección de Anexos) y se procedió a su caracterización con enzimas de restricción.

4.3.1.2 Caracterización de la construcción pPIC9-sodA.

El plásmido pPIC9-sodA se sometió a una doble digestión enzimática con *XhoI* y *AvrII* con la finalidad de liberar la secuencia del gen *sodA* de 625 pb gracias a la inserción de los sitios de corte integrados en el diseño de los iniciadores. Las condiciones de la doble digestión se muestran abajo.

Cuadro 7. Condiciones para la doble digestión. Se incubo a 37° C por 1 hora.

	Volumen	Concentración
ADN plasmídico	7.5 µL	1 µg
Buffer Cutsmart	1 µL	1x
<i>XhoI</i>	0.2 µL	
<i>AvrII</i>	0.2 µL	
Volumen total	10 µL	——

El producto de la doble digestión se purificó utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Posterior a esto se obtuvieron los fragmentos purificados visualizados en geles de agarosa al 1%.

4.4 Transformación de *Pichia pastoris* GS115 electrocompetentes.

Se realizó la integración del vector de expresión pPIC9-*sodA* por recombinación homóloga. El vector se linearizó con la enzima de restricción *Pme I*. Las condiciones de la reacción de restricción fueron las siguientes:

Cuadro 8. Linearización de la construcción pPIC9-*sodA*.

	Volumen (μL)
Vector pPIC9- <i>sodA</i>	17 μL
Amortiguador	2 μL
Enzima de restricción <i>PmeI</i>	1 μL
Volumen total	20 μL

El resultado de la digestión fue visualizado en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio 0,5 mg / mL.

4.4.1 Electroporación.

La transformación de las levaduras se realizó por electroporación. Se mezclaron 80 μL de levaduras electrocompetentes con 5-20 μg de ADN linearizado. Se incubaron durante 5 min en hielo, posteriormente se dio el pulso con los siguientes parámetros: 400 Ω , 25 μF y 1.5 kV. Después se añadieron 600 μL de sorbitol 1M a la celda y el contenido se transfirió a un tubo estéril para microcentrifuga. Se sembró en placa en medio de selección agar MD, seguido de una incubación a 30° C hasta observar colonias (aproximadamente 3-4 días). Posteriormente se tomaron colonias y se sembraron en agar YPD, se incubó a 30° C por 24-48 h.

4.4.1.1. Ensayos de expresión.

Los ensayos de expresión se realizaron sembrando una colonia en 15 mL de medio BMMG en tubos cónicos de 50 mL. Se dejó crecer a 30° C en agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 5$. El medio fue centrifugado a 4,400 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante, eliminando residuos de glicerol, la pastilla se resuspendió en agua estéril para lavarla y nuevamente se centrifugó a 4,400 rpm por 5 min (se repitió dos veces), posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio inductor BMMY agregando metanol para obtener una concentración final de 0.5% y se incubó a 30° C durante 96 horas, con una adición de metanol cada 24 horas para obtener una concentración final de 1%, manteniendo así la inducción activa. Al terminar la inducción se centrifugó a 4,400 rpm por 5 min a 4°C (todo se manejó en hielo) y el sobrenadante se dializó en membranas de nitrocelulosa con corte de 12 kDa con agua destilada a 4° C en agitación durante toda la noche haciendo cambios de agua.

4.5 Análisis de la expresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

4.5.1 Precipitación de proteínas.

Se tomaron 500 µL del sobrenadante colectado y se colocaron en un tubo de 1.5 mL para microcentrífuga, se añadieron 600 µL de metanol y se mezclaron suavemente. Posteriormente se agregaron 450 µL de cloroformo, se mezcló suavemente por inversión durante 1 min y centrifugó por 5 min a 14, 000 rpm. Se descartó la fase acuosa, sin dañar la interfase (proteínas). Se adicionaron nuevamente 450 µL de metanol y se mezcló suavemente por inversión durante 1 min y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se descartó con pipeta sin tocar la pastilla. Se secó la pastilla a 50° C en el termoblock.

4.5.1.2. Electroforésis en geles de poliacrilamida.

Se visualizaron los precipitados por electroforésis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12% (SDS-PAGE). Las muestras cargadas se corrieron a 80 V hasta su ingreso al gel separador. Una vez ahí se incrementó el voltaje a 120 V. Se tiñó el gel con azul de Comassie G250 por un mínimo de 2 h. Posterior a la tinción, se procedió a desteñir el gel empleando una solución decolorante hasta observar las bandas.

4.6 Análisis de western blot.

Una vez observados los SDS-PAGE se procedió a su análisis por western blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas para detectar la cola de histidinas en la SOD recombinante agregada en sus codones durante el diseño de los iniciadores. La membrana de nitrocelulosa se reveló con HRP.

4.7 Ensayos de actividad funcional.

Para confirmar la actividad biológica de la SOD recombinante, se utilizó el kit SOD activity de Sigma Aldrich. El fundamento del ensayo consiste en que al producirse los aniones superóxido, generados por la conversión de la xantina a ácido úrico y peróxido de hidrógeno debido a la actividad de la xantina oxidasa (XOD), reducen una sal de tetrazolio, el WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno disulfonate sodium salt) a cristales de formazán solubles en agua, los cuales pueden medirse mediante absorbancia a 440 nm. Las SODs disminuyen el poder de reducción de la reacción bajando las concentraciones del anión superóxido. Además, el porcentaje de inhibición de la reacción de reducción, puede interpretarse como una medida de la actividad SOD. Así, el IC50 (es decir, el 50% de inhibición de actividad de SOD) puede determinarse por un método colorimétrico.

4. RESULTADOS.

CAPÍTULO V. RESULTADOS.

5.1. Diseño de primers.

Se realizó el diseño de primers utilizando el programa Oligo 7. (Figura 1) Se compararon las secuencias de la Superóxido Dismutasa reportada en la tesis doctoral de (Medina-Villanueva, 2008) y la secuencia reportada en la secuenciación del genoma completo de *Nocardia brasiliensis* por (Vera-Cabrera, 2012) bajo el número de registro en Genbank DQ402038.2 y O3I_000385, respectivamente. Se realizó un alineamiento utilizando el programa Clustal Omega, observándose una correspondencia casi exacta (Figura 2). En base a está secuencia se adicionaron las siguientes secuencias: señal de secreción KEX2 [(la cual es reconocida por el producto del gen KEX2, eliminando el factor α -MF (Brake et al., 1984)] sitios de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*, la secuencia de una cola de histidinas His Tag 6x, una secuencia de corte de enterocinasa y un codón de terminación.

1 Diseño de primers.

FWD

63 pb

5' TCACTCGAGAAAAGACATCACCATCACCACCACGACGATGACGATAAAAGTGGCTGAGTACACG 3'

RVS

5' GCCCTAGGTCAGCCGAAGAAGAG 3' **24 pb**

Selected	
File: Human eIF-4E.seq	
Human eIF-4E--18F63	
5' TCACTCGAGAAAAGAC...AAAGTGGCTGAGTACACG 3'	
Length:	63-mer
Score:	281 points
5' Position:	-18
T _m /t _m :	--/ 73.2 °C
ΔG/Δg (25 °C):	-1.8 -97.1 kcal/mol
ΔS/Δs:	-100.9 -1379.2 cal/*K * mol
ΔH/Δh:	-31.9 -508.3 kcal/mol
3'ΔG:	-7.7 kcal/mol
Degeneracy:	1
P.E.#:	649/52
1/E:	1.57 nmol/A ₂₆₀ 30.7 μg/A ₂₆₀

Selected Primers	
File: Human eIF-4E.seq	
Human eIF-4E--18R24	
5' GAGAAGAAGCCGACTGGATCCCG 3'	
Length:	24-mer
Score:	724 points
3' Position:	-18
T _m /t _m :	--/ 65.5 °C
ΔG/Δg (25 °C):	-0.6 -38.7 kcal/mol
ΔS/Δs:	-32.8 -511.0 cal/*K * mol
ΔH/Δh:	-10.4 -191.1 kcal/mol
3'ΔG:	-8.7 kcal/mol
Degeneracy:	1
P.E.#:	565/52
1/E:	4.21 nmol/A ₂₆₀ 31.4 μg/A ₂₆₀

Figura 3. Iniciadores utilizados para la amplificación del gen sodA de *Nocardia brasiliensis*. Se observa el iniciador forward y reverse así como las condiciones de los mismos obtenidos por el programa Oligo 7.



Figura 4. Alineamiento de las secuencias. Alineamiento de las secuencias del gen *sodA* de *N. brasiliensis* reportadas en la tesis doctoral de Medina Villanueva (2008) y el trabajo de secuenciación del genoma completo de *N. brasiliensis* de Vera Cabrera *et al* (2013) utilizando el programa Clustal Omega. Se observan asteriscos indicando los sitios idénticos en ambas secuencias.

5.1.1 Amplificación del gen sodA por PCR punto final.

La secuencia del gen sodA se amplificó utilizando los primers diseñados anteriormente. La reacción se realizó utilizando las siguientes condiciones:

Tabla 9. Condiciones de amplificación para gen sodA.

	Volumen	Concentración
Master mix	10 μ L	1X
Iniciador 5'	1 μ L	200 mM
Iniciador 3'	1 μ L	200 mM
Agua miliQ	1 μ L	30''
ADN (200 ng/ μ L)	2 μ L	200 ng/ μ L
Colonia	Asada	---
Volumen total	10 μ L	---

Se obtuvo una sola banda correspondiente al tamaño esperado de aproximadamente 625 pb reportada en la tesis doctoral de Medina Villanueva, 2008.

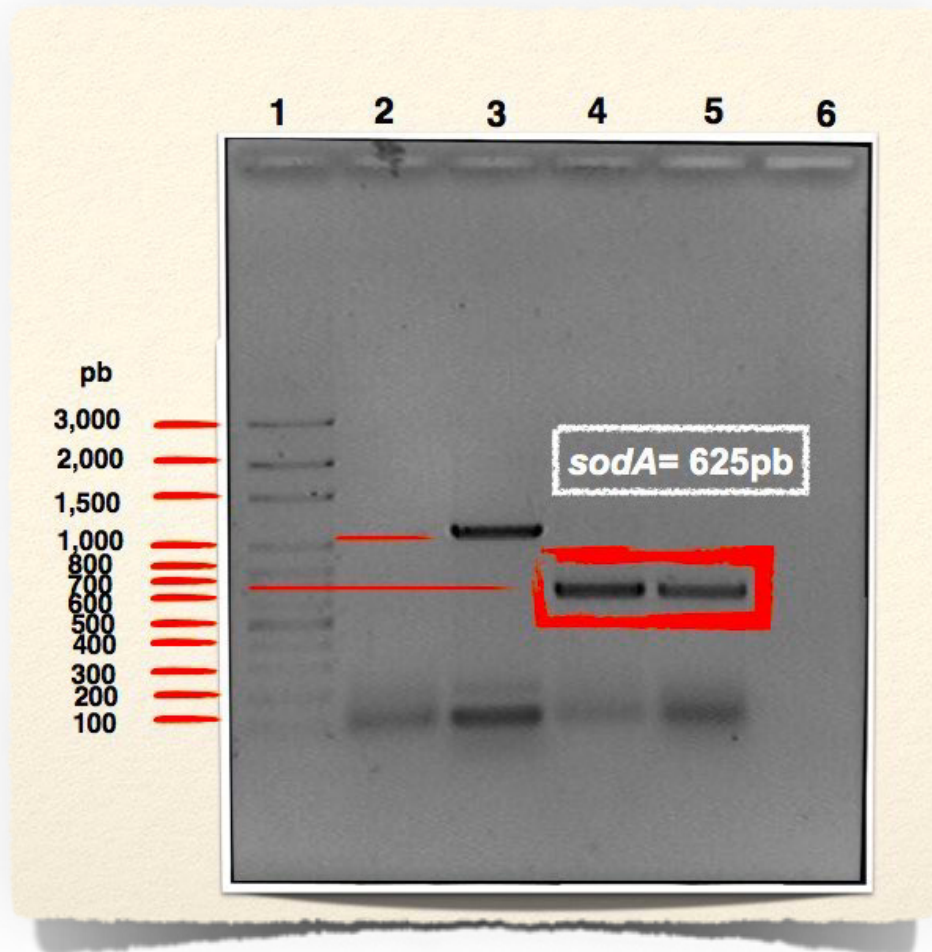


Figura 5. Amplificación del gen sodA del plásmido pSAMBEX. Carriles. 1. Marcador de pares de base escalera de 100 pb Axygene. 2. Control negativo (agua). 3. Control positivo (gen aox1). 4-5. gen sodA. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.1.2 Digestión enzimática y purificación del vector de expresión pPIC9 y el amplicón *sodA*.

El vector pPIC9 obtenido del *Pichia expression kit* de INVITROGEN, propagado previamente en *E. coli* TOP10F', se extrajo por lisis alcalina (Sambrook) y se sometió a una doble digestión enzimática con las enzimas *XhoI* y *AvrII*. Esto para posteriormente realizar el ensayo de ligación. De igual manera el amplicón de *sodA* se sometió a la doble digestión para permitir la ligación en el vector de expresión. Ambos ADNs se sometieron a purificación utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA.

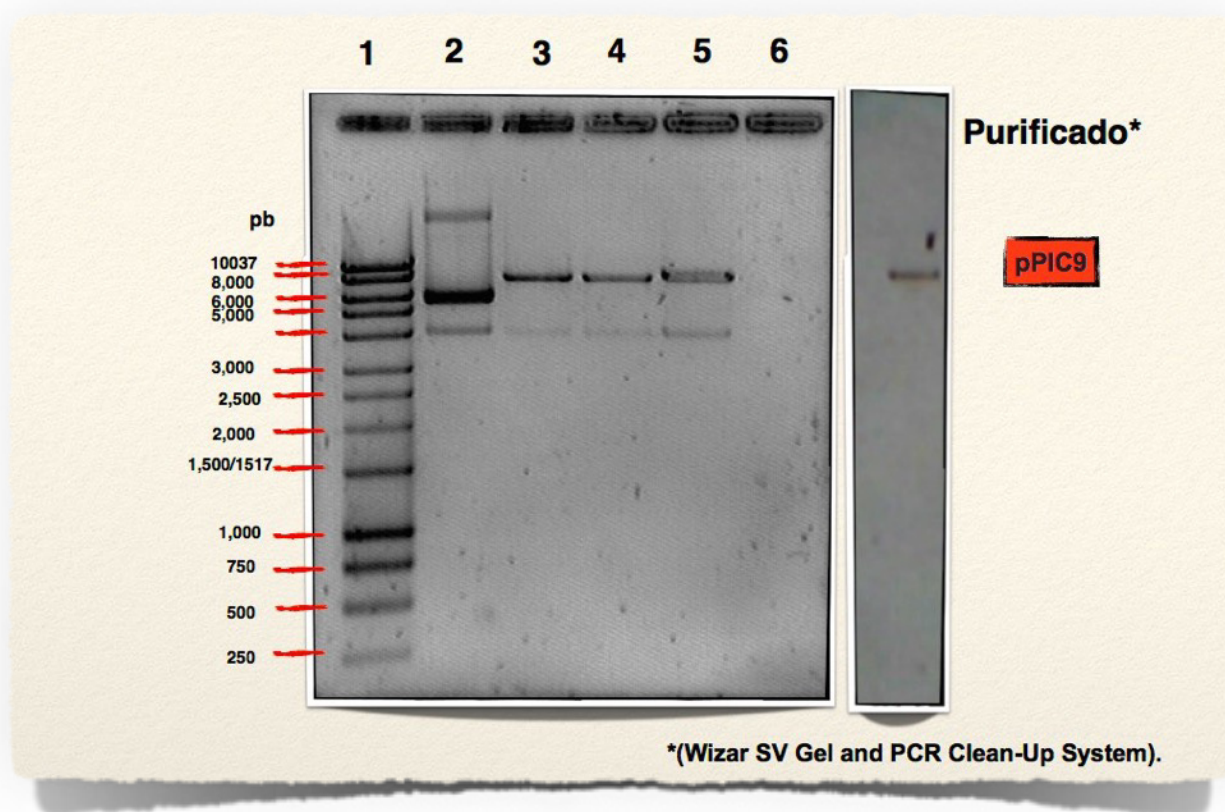


Figura 6. Vector de expresión pPIC9 purificado. Se observa un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1. Marcador de pares de bases 1 Kb Axygene. Carril 2. pPIC9 sin digerir. Carriles 3-4. pPIC9 digerido con enzimas *XhoI* y *AvrII*. En el lado derecho se puede ver la banda después de la purificación utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA.

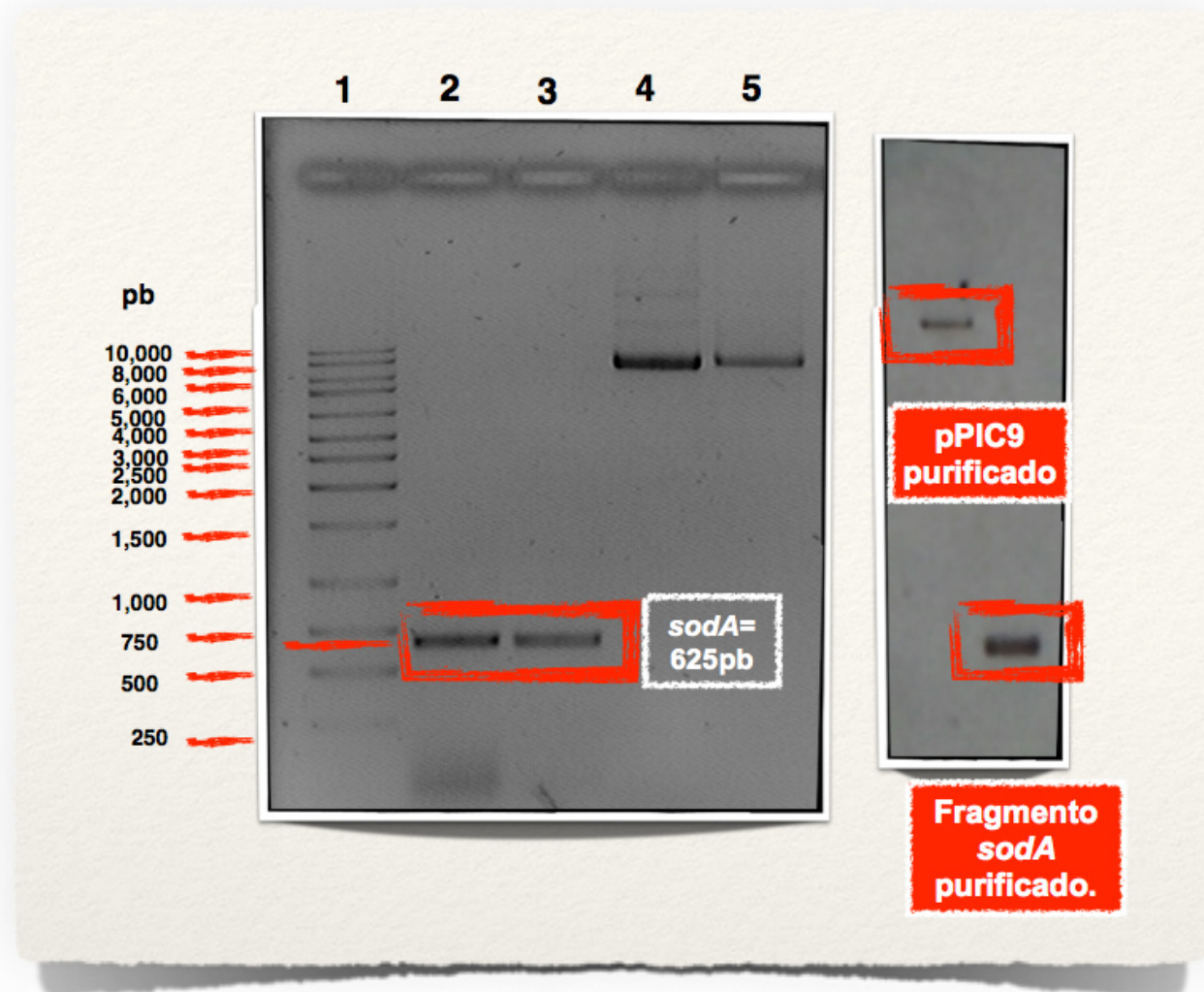


Figura 7. Amplicón del gen *sodA* purificado. Se observa un gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador de pares de bases 1 Kb Axygene. Carril 2-3. Amplicón *sodA*. Carriles 4-5. pPIC9 sin digerir y digerido con enzimas *XhoI* y *AvrII*. En el lado derecho se puede ver la banda después de la purificación utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA tanto de amplicón como del vector.

5.1.3 Ligación de los fragmentos purificados.

Los fragmentos purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA se sometieron a una reacción de ligación con la Quick stick ligase de Bionline de acuerdo a la reacción de la tabla 10.

Tabla 10. Reacción de ligación.

Reactivo	Cantidad
4X QS Buffer	3 μ L
QS Ligase	1 μ L
pPIC9	2 μ L
sodA	6 μ L
Total	12 μ L

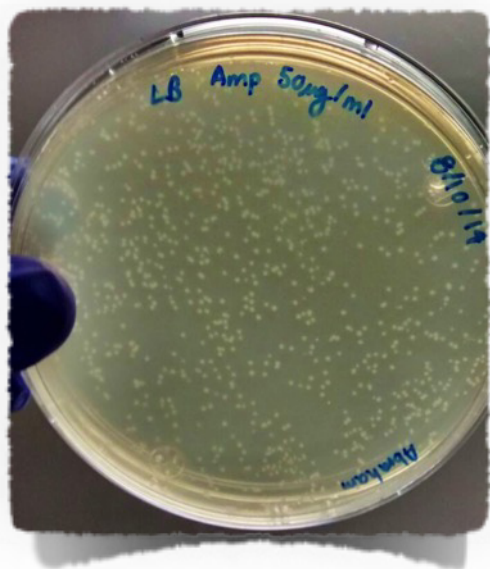
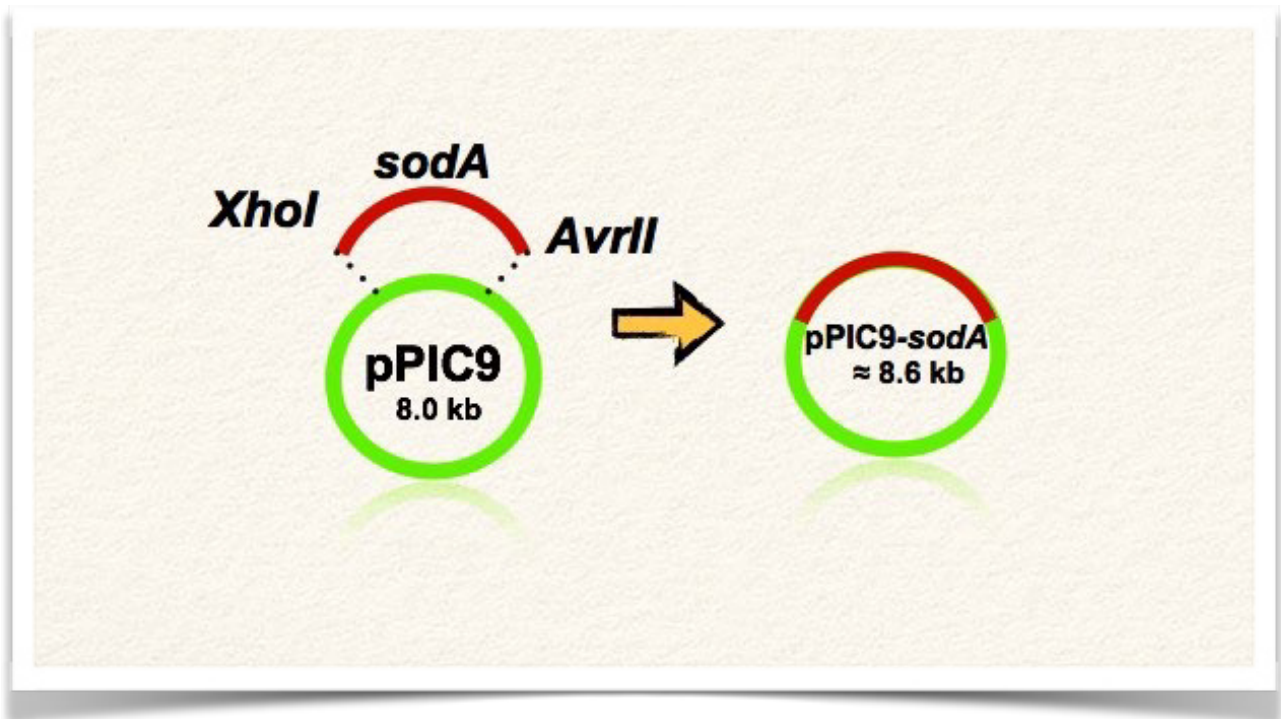


Figura 8. Placa agar LB. Placa con medio LB agar, ampicilina 50 μ g/mL, sembrada con bacterias calciocompetentes transformadas con el plásmido pPIC9-sodA.

5.2 Transformación de *E. coli* TOPF10' calciocompetentes.

La reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias calciocompetentes *E.coli* TOP10F' con la finalidad de propagar la construcción.

Figura 9. Esquema de la construcción del vector de expresión pPIC9-sodA.



5.2.1 PCR directo de colonia.

Se realizó un PCR con iniciadores del gen AOX1, utilizando las colonias crecidas en la placa con medio LB agar/ampicilina 50µg/mL. El PCR se realizó de acuerdo a las mismas condiciones que se utilizaron para la amplificación del fragmento *sodA* descrito anteriormente.

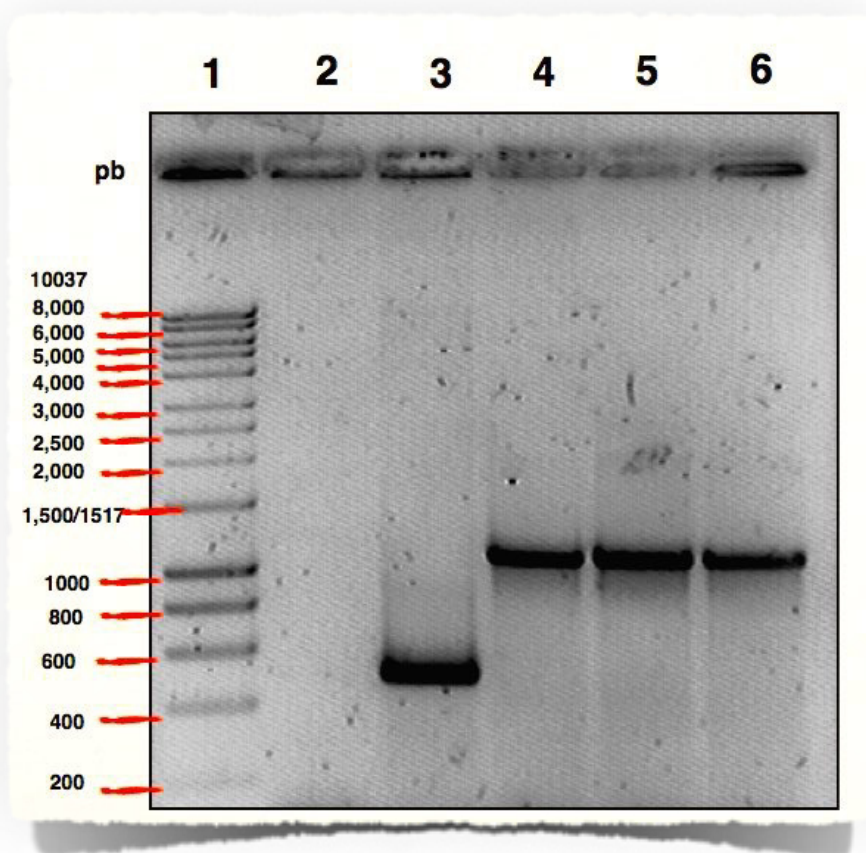


Figura 10. PCR directo de colonia. Se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1100 pb, correspondiente a parte del gen AOX1 de 500 pb más el gen *sodA* de 625 pb para tres colonias distintas. Carriles. Carril 1. Marcador de pares de bases 1 Kb Bioline. Carril 2. Control negativo (agua destilada). Carril 3. Control positivo (vector pPIC9 vacío). Carril 4-5. Colonias 1,2, 3 de *E. coli* TOP10F' transformadas respectivamente con el plásmido pPIC9-*sodA*.

5.3 Extracción de ADN plasmídico.

A partir de las cepas de las que se corroboró la inserción del gen *sodA* se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina miniprep. (Sambrook *et al* 1989). En la figura de abajo se puede observar el resultado de la extracción.

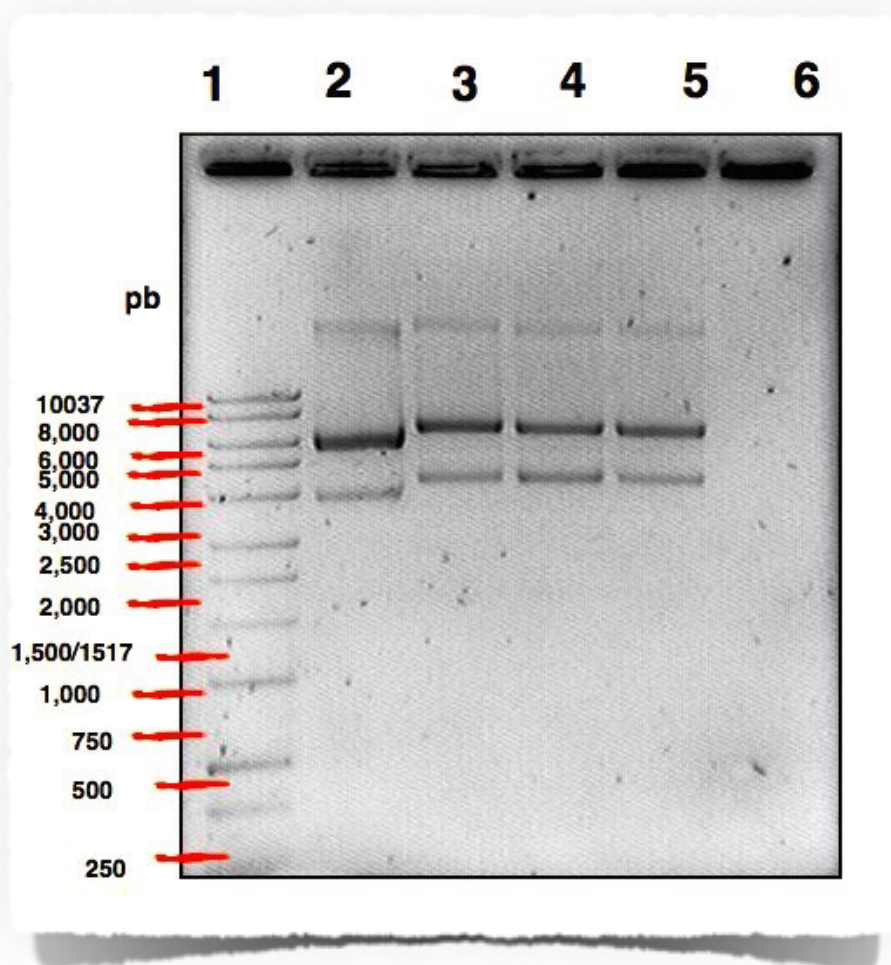


Figura 11. ADN plasmídico extraído por lisis alcalina. Se observa en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio el ADN plasmídico correspondiente a la construcción pPIC9-*sodA*. Carriles. Carril 1. Marcador de pares de bases 1 Kb Axygene. Carril 2. ADN vector pPIC9. Carril 3-4. ADN plasmídico correspondiente a las colonias transformadas 1, 2, 3 respectivamente.

5.3.1 PCR a partir de ADN plasmídico.

Se realizó una reacción de PCR, utilizando los iniciadores diseñados en este trabajo, a partir del ADN plasmídico extraído de las colonias *E. coli* TOP10F' transformadas, por medio de lisis alcalina de acuerdo a Sambrook *et al* 1989.

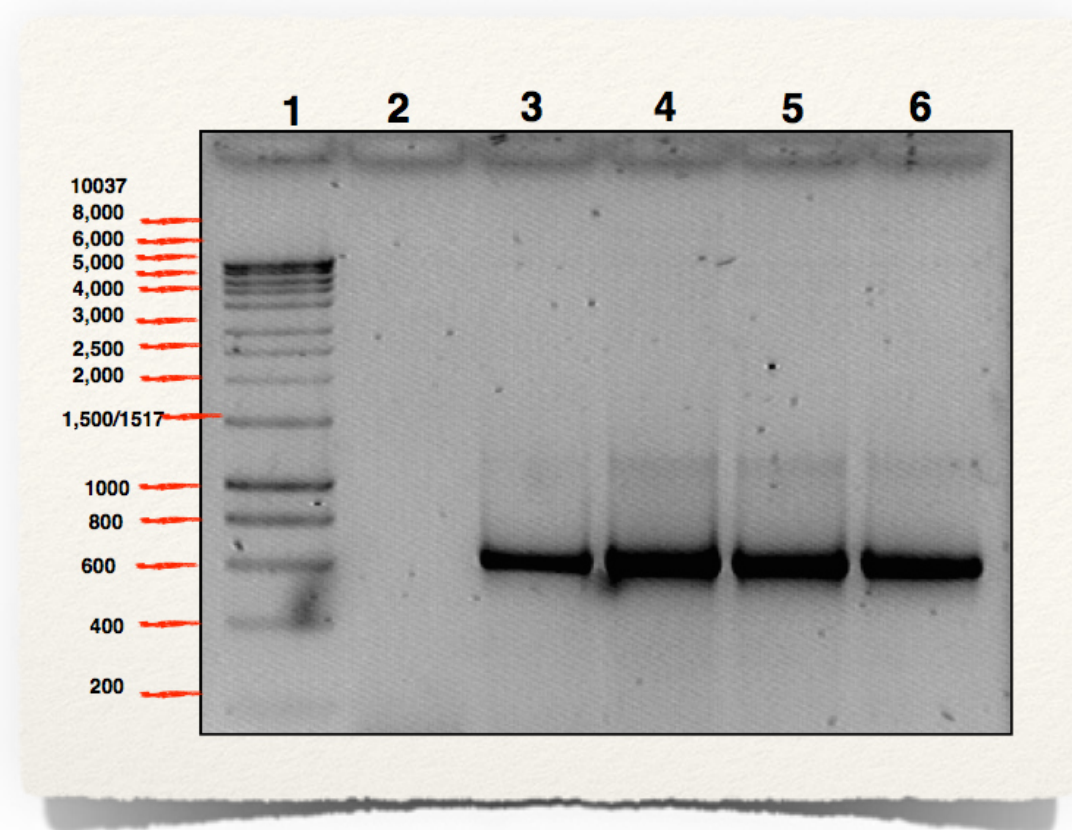


Figura 12. PCR a partir de ADN plasmídico extraído. Se observa una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con la amplificación del gen *sodA* a partir del ADN plasmídico extraído de las colonias transformadas. Carriles. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 Kb Axygene. Carril 2. Control negativo (agua MiliQ), Carril 3. Control positivo (ADN pSAMBEX). Carriles 4-6. Gen *sodA* a partir de las colonias transformadas 1,2 ,3 respectivamente.

5.3.2 Caracterización de los plásmidos pPIC9-sodA.

Con la finalidad de determinar la correcta construcción del plásmido pPIC9-sodA se realizó una caracterización por enzimas de restricción, utilizando las enzimas *XhoI* y *AvrII*, buscando la liberación del fragmento del gen *sodA* de aproximadamente 625 pb. Determinando de esta manera la inserción del fragmento deseado.

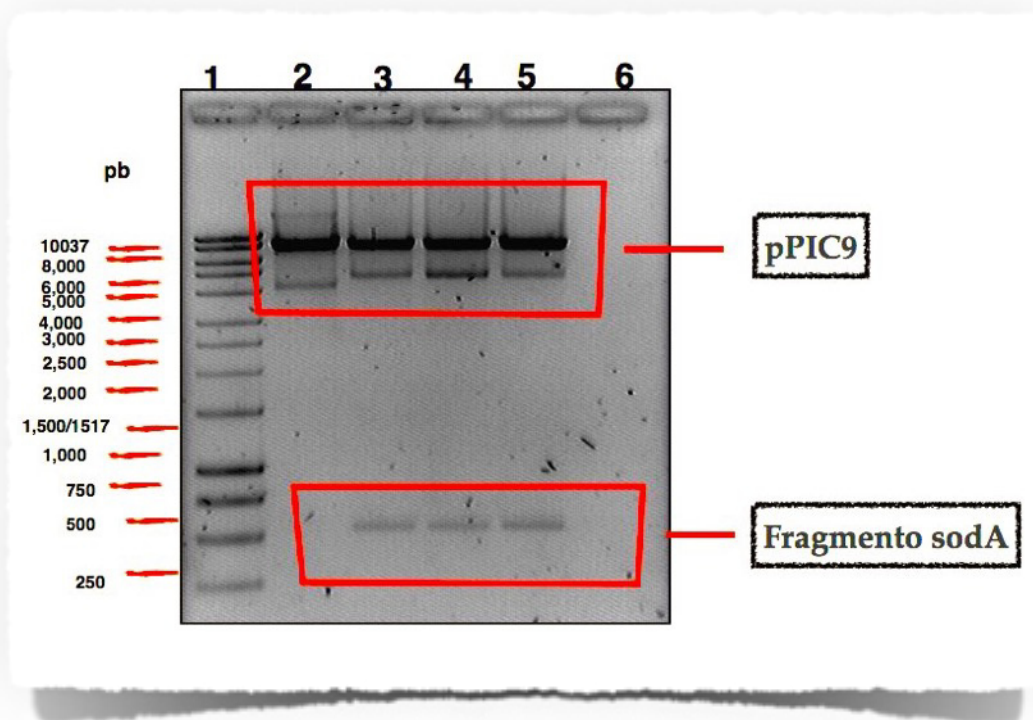


Figura 13. Caracterización con enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*. Carriles. Carril 1. Marcador de peso molecular 1Kb Bioline. Carril 2. Control positivo pPIC9 digerido. Carril 3-5. ADN plasmídico pPIC9-sodA digeridos. Carril 6. vacío. Se observa una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observa la liberación del fragmento correspondiente al gen *sodA* de aproximadamente 625 pb.

5.4 Linearización del plásmido pPIC9-sodA y transformación de levaduras.

La construcción se sometió a digestión enzimática utilizando la enzima *PmeI* (previamente se corroboró *in silico* en el programa NEBcutter que no cortara la secuencia del gen *sodA*). El producto linearizado se empleó para transformar a la levadura *Pichia pastoris* por electroporación.

Tabla 11. Condiciones usadas durante la linearización. Se incubó a 37° C durante 1 hora.

	Volumen (μL)
Vector	17 μL
Amortiguador	2 μL
Enzima de restricción <i>PmeI</i>	1 μL
Volumen total	20 μL

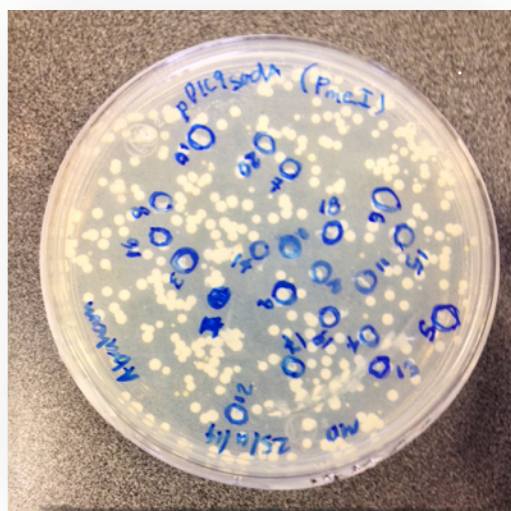


Figura 14. Placa agar MD. Se observan las colonias de *Pichia pastoris* transformadas. El medio carece de histidina, solo aquellas que llevan el casete integrado son capaces de producir histidina y son capaces de crecer en el medio carente de histidina.

5.4.1 Caracterización de clonas de *Pichia pastoris* transformadas.

Para determinar que el vector de expresión haya sido integrado en el genoma de la levadura y la caracterización de los fenotipos probables (Mut^+ o Mut^s) se realizó PCR directo de colonia utilizando los iniciadores para el gen *aox1*.

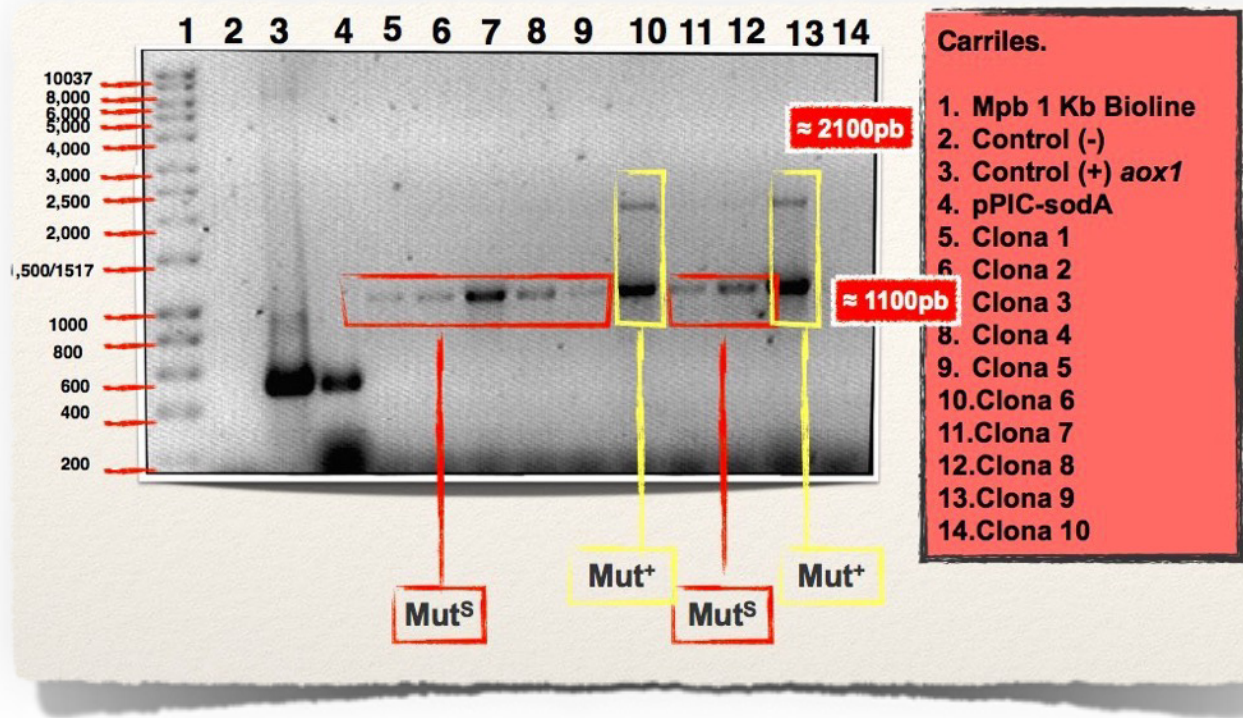


Figura 15. Gel de agarosa al 1%. Se observa en carril número 1 el marcador de peso molecular 1 Kb de bioline. Carril 2. Control negativo. Carril 3. Control positivo (pPIC9), Carril 4. Clona pPIC9 solo. Carril 5-14. Clonas 1-10 respectivamente. Las clonas con una sola banda corresponden a cepas Mut^s , mientras las que muestran dos bandas corresponden cepas Mut^+ .

5.4.1.1 Ensayos de expresión de *Pichia pastoris* pPIC9-sodA.

Primeramente se realizó el crecimiento de una semilla en un cultivo de 4 mL en medio YPD para generar biomasa. Posteriormente se realizó la inducción en tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de medio BMMY por 18 h hasta alcanzar una $OD_{600} = 5$. La inducción se realizó por 94 horas, adicionando metanol a una concentración de 1% cada 24 h para la compensación del metanol evaporado y consumido. Después del tiempo de inducción el medio de cultivo se centrifugó a 4°C a 4500 rpm y se manipuló en hielo para evitar la degradación de proteínas.

El sobrenadante se dializó utilizando membranas que presentaban un corte de peso molecular entre 10-14 kDa. La diálisis se llevó a cabo durante un día haciendo cuatro cambios de agua destilada. Una vez dializado se tomaron 0.5 mL para precipitar por medio de solventes utilizando metanol y cloroformo. Después se visualizó en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12%. En la figura 16 se aprecia un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se observa en los carriles 4 al 11 los sobrenadantes de las cepas transformadas pPIC9-sodA. Resalta la presencia de bandas entre 25 a 30 kDa (recuadro). mientras estas bandas no se observan en el carril 3 (el control negativo, transformado con el casete vacío pPIC9) en el cual se aprecian las proteínas propias secretadas al medio de cultivo de la levadura *P. pastoris*.

Ensayos de expresión.

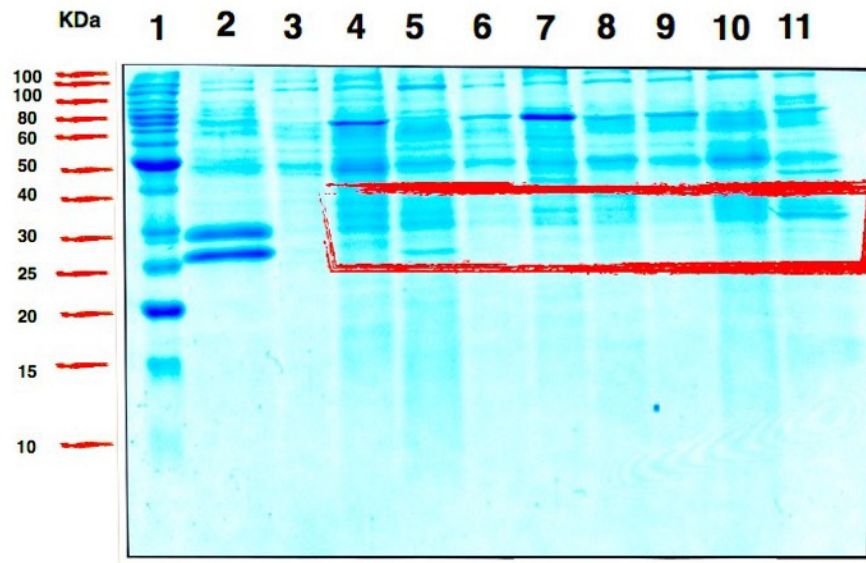


Figura 16. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes al 12% (SDS-PAGE). Carril 1. Marcador de peso molecular BenchMark protein ladder. Carril 2. Control positivo (Prolactina). Carril 3. Control negativo de expresión (pPIC9). Carriles 4-11. sobrenadantes dializados de clonas 13-20. Se observan bandas no presentes en el control negativo, entre los 25 y 30 kDa (recuadro).

5.4.1.2 Análisis por western blot.

Posteriormente se realizaron los análisis por western blot. Se utilizó un anticuerpo anti-histidinas para detectar la SOD A recombinante, la membrana de nitrocelulosa fue revelada con HRP. En la figura .. se observa la membrana revelada, mostrando señal solamente en el sobrenadante correspondiente a una de las clonas, la clona 13 (recuadro).

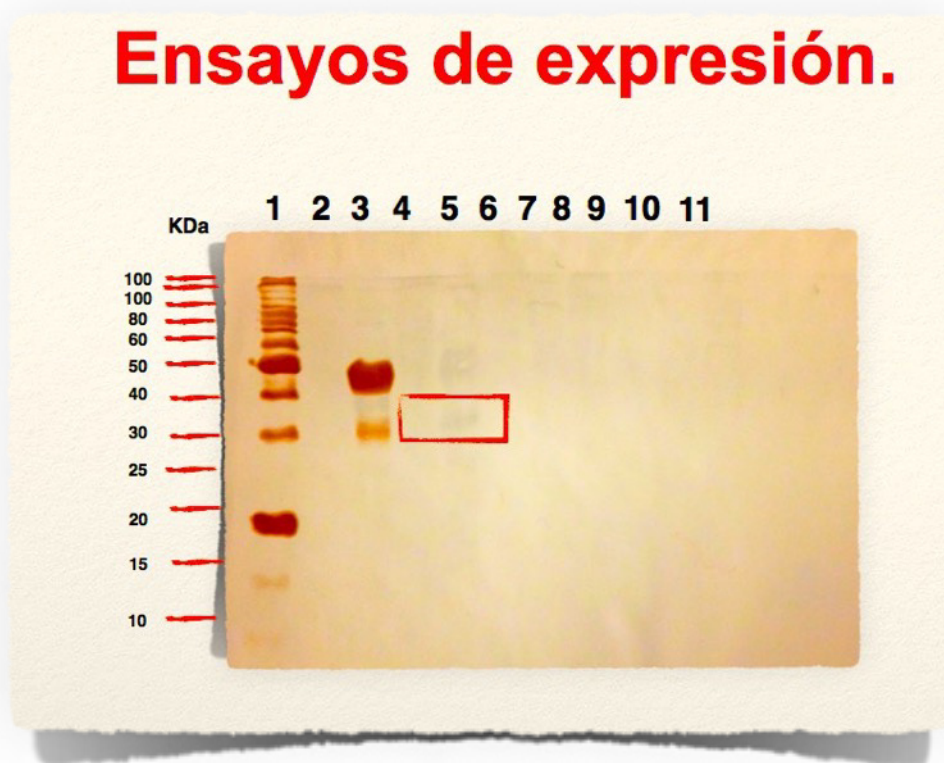


Figura 17. Western blot. Carril 1. Marcador de peso molecular Benchmark protein ladder. Carril 2. Control negativo (pPIC9). Carril 3. Control positivo (ONAR) (pPIC9). Carril 4-11. Clonas 13-20 respectivamente. Se puede observar en el recuadro el sobrenadante de la clona 13 en el cual se observa una señal débil.

5.5 Ensayos de actividad funcional.

Utilizando el SOD Assay kit se llevaron a cabo los ensayos de actividad funcional, empleando los sobrenadantes dializados obtenidos de los ensayos de expresión. En la gráfica se observa en la barra del blanco 1, el control positivo, es decir, la generación de aniones superóxido sin ninguna inhibición. Las barras del blanco 2 y 3 representan controles negativos de la reacción, inhibición completa de la reacción. La barra pPIC9 representa el sobrenadante de una cepa de *Pichia pastoris* GS115 pPIC9, (sólo contiene el casete de expresión sin el gen de la proteína) la cual es el control negativo de expresión para SOD A. Se puede observar en las barras correspondientes a los sobrenadantes de las cepas pPIC9-sodA cierto grado inhibición, en algunos de ellos mayor que los observados en los sobrenadantes del control negativo de expresión.

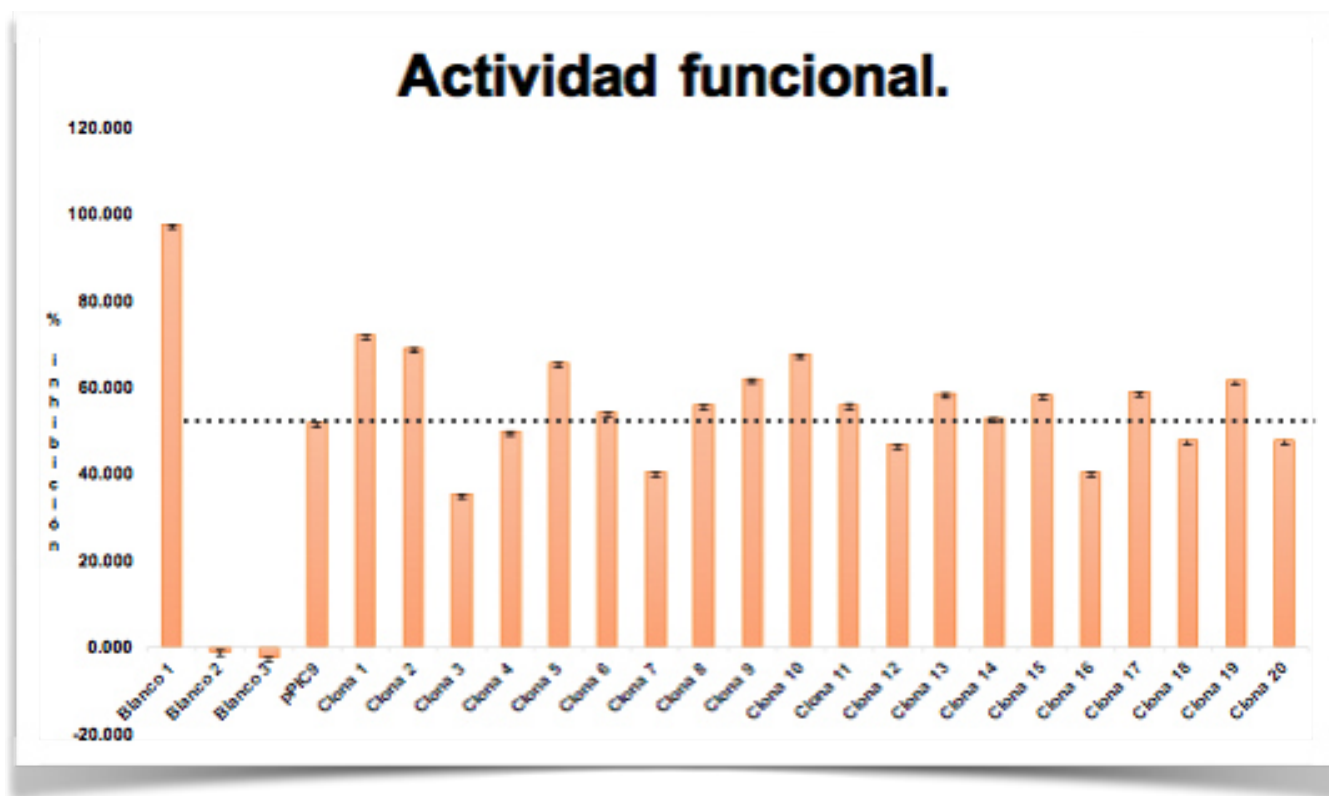


Figura 18. Gráfica de actividad funcional. Se observa una gráfica expresando el porcentaje de inhibición de actividad con respecto a las clonas pPIC9-sodA

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se describe la clonación y caracterización de la Superóxido Dismutasa de *Nocardia brasiliensis* de 27 kDa en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.

El diseño de los iniciadores para la amplificación del gen *sodA* de *N. brasiliensis* se realizó comparando las secuencias reportadas por el trabajo doctoral de Medina Villanueva (2008) el cual tenía una secuencia parcial y el de la secuenciación completa realizada por Vera Cabrera (2013). El alineamiento de las secuencias permitió distinguir la secuencia completa. La secuencia nucleotídica se analizó por el software ExPASy para determinar el correcto marco de lectura, comprobando así que corresponde a parte de la secuencia aminoacídica ya reportada por Medina Villanueva (2008). El diseño de los iniciadores nos permitió enlazar el ADN del gen *sodA* a la secuencia del vector de expresión de *Pichia pastoris* pPIC9, además de facilitar la clonación por la adición estratégica de los sitios de restricción para construir el plásmido de expresión pPIC9-*sodA*, sin embargo es necesario determinar la secuencia nucleotídica de las construcciones por secuenciación para verificar que la secuencia es totalmente correcta.

Durante los ensayos de expresión se observó la presencia de bandas proteicas en los sobrenadantes (pPIC9-*sodA*) que no se encuentran con el sobrenadante proveniente del control negativo de expresión (pPIC9) lo que probablemente debe corresponder a la SOD A recombinante.

Las clonas de *Pichia pastoris* transformadas con la construcción pPIC9-*sodA* fueron caracterizadas fenotípicamente, obteniéndose clonas Mut⁺ y Mut^s. Sin embargo durante los ensayos de expresión no se observó una diferencia notable en la expresión de la SODA recombinante.

Solamente una de las clonas (clona 13) mostró una débil señal durante los ensayos de Western Blot en comparación con el resto de los sobrenadantes dializados. La falta de señal en los ensayos podría deberse a una falta de exposición de los epítopes necesario para el reconocimiento del anticuerpo anti-histidinas. En base a esto también sería más conveniente utilizar un anticuerpo anti-SOD comercial para comprobar directamente la presencia de la proteína SOD A (P Yu, 2007).

Durante la transformación se seleccionaron 20 clonas, por lo que sería conveniente el tamizaje de un mayor número de clonas para ensayar su expresión. También es conveniente la realización de más ensayos de transformación utilizando otras enzimas de restricción opcionales como la enzima *Nsi* para analizar diferentes cepas.

Con el fin de establecer la presencia funcional de la proteína, se realizaron los ensayos de actividad biológica, notándose una posible inhibición de la reacción por parte de los sobrenadantes donde se encuentra la SOD A. Aunque el medio de cultivo así como las proteínas propias de levadura podrían estar inhibiendo la reacción enzimática, inferimos la presencia de actividad por parte de la SOD A recombinante debido a las diferencias mayores de inhibición comparadas con el sobrenadante del control negativo de expresión.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.

Durante este trabajo se logró la construcción del vector de expresión pPIC9-*sodA*, así como el sistema de expresión de SODA en la levadura *Pichia pastoris*.

Se generaron cepas Mut⁺ y Mut^s. En los ensayos de expresión se logró observar una banda de ligera intensidad correspondiente a la SOD A. Por otro lado, fue posible observar una inhibición de la reacción enzimática en los sobrenadantes de los ensayos de expresión de SODA comparadas con el control negativo.

7.1 PERSPECTIVAS.

- Secuenciar las construcciones pPIC9-*sodA*.
- Buscar mejores clonas productoras.
- Optimizar los ensayos de expresión.
- Escalar la producción en biorreactor.
- Construir nuevas cepas de *P. pastoris* con el gen *sodA* modificado con codones preferenciales.
- Generar anticuerpos anti-SODA.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(12), 5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Baek, K. H., Kim, H. S., Oh, H. M., Yoon, B. D., Kim, J., & Lee, I. S. (2004). Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 39(9), 2465-2472.
- Beaman, B. L., & Beaman, L. (1994). *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev*, 7(2), 213-264.
- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., . . . Barr, P. J. (1984). Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(15), 4642-4646.
- Çelik, Eda, & Çalık, Pınar. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1108-1118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
- Cereghino, Geoff P. Lin, Cereghino, Joan Lin, Ilgen, Christine, & Cregg, James M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329-332. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0)
- Chen, H. L., Yen, C. C., Tsai, T. C., Yu, C. H., Liou, Y. J., Lai, Y. W., . . . Chen, C. M. (2006). Production and characterization of human extracellular superoxide dismutase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 54(21), 8041-8047. doi: 10.1021/jf061379x
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., & Stillman, C. A. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 9(3), 1316-1323.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27(3), 297-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Drago Serrano, Sainz Espuñes. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Volumen 37.
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54(6), 741-750.
- Gerngross, Tillman U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotech*, 22(11), 1409-1414. doi: 10.1038/nbt1028
- Gort, Amy Strohmeier, & Imlay, James A. (1998). Balance between Endogenous Superoxide Stress and Antioxidant Defenses. *J Bacteriol*, 180(6), 1402-1410.
- He, X. S., Brückner, R., & Doi, R. H. (1991). The protease genes of *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 142(7-8), 797-803. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90058-I](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508(91)90058-I)

- Jaeger, K. E., Eggert, T., Eipper, A., & Reetz, M. T. (2001). Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55(5), 519-530.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A., & Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 35(Pt 2), 91-105.
- Kurtzman, CletusPaul. (2009). Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(11), 1435-1438. doi: 10.1007/s10295-009-0638-4
- Lee, S. Y., Mattanovich, D., & Villaverde, A. (2012). Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Microb Cell Fact*, 11, 156.
- Lynch, M., & Kuramitsu, H. (2000). Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect*, 2(10), 1245-1255.
- M. Bartos, J. O. Falkinham, III, I. Pavlik. (2004). Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria. *Vet. Med. – Czech*, 49, 2004 (5): 161–170.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270. doi: 10.1002/yea.1208
- Revol, Agnès; Espinoza-Ruiz, Marisol; Medina-Villanueva, Igor; Salinas-Carmona, Mario Cesar. (2006). Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1255-1260. doi: 10.1139/w06-075
- Salinas-Carmona, M. C. (2000). *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect*, 2(11), 1373-1381.
- Salinas-Carmona, M. C.; Welsh, O.; Casillas, S. M. (1993). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol*, 31(11), 2901-2906.
- Sánchez-Cuevas, Maria Claudia. (2003). Biotechnology: Advantages and disadvantages for agriculture. *Revista UDO Agrícola* 3 (1): 1-11. 2003.
- Sanchez-Venegas, Jaime, Navarrete, Alejandro, Dinamarca, Jorge, Bravo Ramirez, Leon, Moraga, Ana, & Gidekel, Manuel. (2009). Cloning and constitutive expression of *Deschampsia antarctica* Cu/Zn superoxide dismutase in *Pichia pastoris*. *BMC Research Notes*, 2(1), 207.
- Song, N. N., Zheng, Y., E, S. J., & Li, D. C. (2009). Cloning, expression, and characterization of thermostable manganese superoxide dismutase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. *J Microbiol*, 47(1), 123-130. doi: 10.1007/s12275-008-0217-9
- Stackebrandt E., Rainey F. A., Wartd-Rainey N. L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 479-491. doi: 10.1099/00207713-47-2-479
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(2), 211-222. doi: 10.1007/s00253-006-0465-8

- Vera-Cabrera, et al. (2012). Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *J Bacteriol*, 194(10), 2761-2762. doi: 10.1128/jb.00210-12
- Villanueva, Medina. (2008). Papel de la Superóxido Dismutasa en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. UANL.
- Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., & de Wolf, F. A. (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 15(11), 1087-1096. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199908)15:11<1087::aid-yea436>3.0.co;2-f
- Yoo, HY, Kim, SS, & Rho, HM. (1999). Overexpression and simple purification of human superoxide dismutase (SOD1) in yeast and its resistance to oxidative stress. *J Biotechnol*, 68, 29 - 35.
- Yu, P. (2007). A new approach to the production of the recombinant SOD protein by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 93 - 98.
- Yu, P. (2007). A new approach to the production of the recombinant SOD protein by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(1), 93-98. doi: 10.1007/s00253-006-0629-6

ANEXOS.

PROTOSCOLOS.

Extracción de ADN por lisis alcalina.

Preparación de células.

1. Inocular 4mL de medio rico que contenga antibiótico con una sola colonia de bacteria transformada. Incubar el cultivo toda la noche a 37° C con agitación vigorosa.

- Para asegurar que el cultivo esta adecuadamente aireado el volumen del tubo de cultivo debe ser al menos cuatro veces más que el volumen del cultivo bacteriano.
- EL tubo debe estar tapado ligeramente.
- El cultivo debe ser incubado con agitación vigorosa.

2. Verter 2 mL de cultivo en un tubo eppendorf. Centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos a 4° C en una microcentrifuga. Almacenar la porción no usada del cultivo original a 4° C.

3. Cuando la centrifugación se ha completado, remover el medio con cuidado con pipeta, dejando la pastilla lo más seca posible.

Lisis celular.

4. Resuspender la pastilla bacteriano en 100 µL de solución I fría y mezclar por vortex.

Asegurarse que la pastilla este completamente dispersa en la solución I.

5. Agregar 200 μ L de Solución II recién preparada. Mezclar el contenido por inversión cinco veces. NO USAR VORTEX.

Colocar el tubo en hielo.

6. Agregar 150 μ L de Solución III fría. Mezclar por inversión varias veces. Colocar el tubo en hielo de 3-5 minutos.

7. Centrifugar el lisado bacteriano a máxima velocidad por 5 minutos a 4° C en una microcentrifuga. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

8. Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo. Mezclar la fase orgánica y acuosa por vortex y después centrifugar la emulsión a máxima velocidad por 2 minutos a 4° C en una microcentrifuga. Transferir la fase acuosa en un tubo nuevo.

Recuperación de ADN.

9. Precipitar ácidos nucleicos del sobrenadante agregando 2 volúmenes de etanol al 100% frío. Mezclar la solución por vortex y después dejar reposar por 2 minutos a temperatura ambiente.

10. Colectar el precipitado de ácidos nucleicos por centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos y almacenar a 4° C.

Colocar siempre los tubos en el mismo arreglo, con las bisagras hacia afuera. Así se podrá saber en que parte se espera el precipitado.

11. Remover el sobrenadante con puntilla con cuidado. Colocar el tubo de manera invertida sobre una toalla de papel para drenar el exceso de etanol.

12. Agregar 1 mL de etanol frío al 70% a la pastilla y mezclar por inversión varias veces. Recobrar el ADN por centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos a 4° C en una microcentrifuga.

13. Remover una vez más el sobrenadante y retirar con pipeta cuidadosamente (CUIDADO: La pastilla puede soltarse).

Remover cualquier gota de etanol que se adhiera a las paredes del tubo. Dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente (5-10 minutos).

14. Disolver los ácidos nucleicos en 50 µL de TE 1X (pH 8) conteniendo 20 µg/mL de ARNasa A libre de ADNasa (ARNasa pancreática). Mezclar por vortex con cuidado por pocos segundos. Almacenar a -20° C hasta su uso.

Precipitación de proteínas.

Nota: usar reactivos fríos hace más eficiente la precipitación.

1. Agregar 500 μL de muestra a un tubo Eppendorf. Adicionar 600 μL de metanol y 450 μL de cloroformo.
2. Mezclar por inversión durante 1 minuto. Centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos.
3. Retirar sobrenadante (fase superior) teniendo cuidado de no tocar interfase. Conservar fase inferior.
4. Agregar 600 μL de metanol y mezclar por inversión durante 1 minuto.
5. Centrifugar a 12,000 rpm por 7 minutos. Retirar sobrenadante y dejar secar la pastilla. Se puede secar en termoblock a una temperatura máxima de 50° C.

ELECTROPORACIÓN.

Parámetros

1.5 kV

2.5 uF

400 Ω

1. Añadir 2-3.5 μ L (>1 μ g) de ADN plasmídico en un tubo con levadura electrocompetente (80 μ L) dejar incubar en hielo de 30-60 segundos. Incluya los controles positivo y negativo apropiados.
2. Transferir el mix apropiados una cubeta de electroporador fría y seca. Asegurarse la mezcla esté en el fondo de la cubeta.
3. Colocar la cubeta en la cámara de descarga, hasta el fondo.
4. Aplicar el pulso presionando los dos botones al mismo tiempo. Soltar cuando suene el generador.
5. Quitar la cubeta y anotar la desviación de pulso.
6. Añadir lo más rápido posible 600 μ L de sorbitol 1M y transferir a un tubo de 1.5 mL estéril
7. Incubar con agitación 30 minutos a 30° C
8. Centrifugar, retirar la mitad, resuspender y sembrar la mitad (150 μ L) esparcir hasta secar e incubar la placa de MD invertida a temperatura ambiente por 4 días hasta observar colonias.

Preparación de células electrocompetentes.

Método.

1. A partir de un cultivo axénico de *Pichia pastoris* (caja petri) inocular una asada en un tubo con 4 mL de YPD. Dejar crecer aproximadamente 18 horas a 30° C/agitación vigorosa.
2. Diluir el inóculo (1:100) en un matraz con 50 mL de YPD y dejar crecer con agitación hasta una $DO_{600} = 0.6-0.9$ (2 horas aproximadamente).
3. Una vez alcanzada la DO, poner el matraz en hielo por 10 minutos y recuperar las células en un tubo Falcon de 50 mL estéril, centrifugar a 5000 rpm 5 minutos
4. Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 20 mL de sorbitol 1 M e incubar en hielo 20 min
5. Centrifugar en las mismas condiciones del paso 3, resuspender en 1 mL de sorbitol 1 M frío y dejar 10-20 minutos en baño de hielo.
6. Utilizar 80 μ L de células competentes para cada transformación.
7. En tubos de 1.5 mL dividir en alícuotas de 80 μ L con 15 % de glicerol.
8. Almacenar a -80° C.