

Identificación y caracterización del gen superóxido dismutasa aislado de “Chan” *Hyptis suaveolens*.

F.J. Espitia-Orozco^{1,2}, P.I. Bautista-Espinoza², S. Gutiérrez-Vargas², M.F. León-Galván^{2*}

¹ Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401, Colonia Peña de Guisa, Abasolo, Guanajuato. ² Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca Posgrado en Biociencias, Departamento de Alimentos. Carretera Irapuato Silao Km 9. Col. Ex Hacienda el Copal. Cp. 36000. Irapuato, Guanajuato.

*fabiola@ugtomx

RESUMEN:

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos normales, como las regulaciones oxidación-reducción, en la fosforilación de proteínas y en factores de transcripción. El estrés oxidativo ocurre cuando las defensas antioxidantes endógenas son insuficientes para capturar las EROs por completo, superóxido dismutasa una de las enzimas antioxidantes intracelulares más efectivas (SOD- EC 1.15.1.1). En este trabajo se aisló y se caracterizó bioinformáticamente el gen que codifica para la proteína superóxido dismutasa de Chan, el cual resulta ser parte de la superfamilia de Cu/Zn SOD. De acuerdo a los resultados obtenidos se logró la amplificación del gen *Hs-sod*, generó un marco de lectura abierto de 458 pb. Analizando la secuencia en la base de datos se observó que el gen codifica para una enzima SOD. El modelamiento *in silico* de la proteína Hs-SOD predijo que la enzima pertenece súper familia de Cu-Zn SOD, con dominios conservados de unión a Cu⁺⁺ (Hys 51, 53, 78 y 140) y el sitio de unión a Zn⁺⁺ (Hys 78, 87, 96 y Asp 99). Se logró identificar y caracterizar bioinformáticamente el gen que codifica para a enzima SOD en semillas de la planta de chan.

Palabras clave: Superóxido dismutasa; *Hyptis suaveolens*; Antioxidante; Enzimas; Estrés oxidativo.

ABSTRACT:

Reactive oxygen species (ROS) play a crucial role in normal physiological processes, such as oxidation-reduction regulation, protein phosphorylation, and transcription factors. Oxidative stress occurs when endogenous antioxidant defenses are insufficient to capture ROS superoxide dismutase, one of the most effective intracellular antioxidant enzymes, is superoxide dismutase (SOD-EC 1.15.1.1). In this work the gene coding for Chan superoxide dismutase protein was isolated and bioinformatically characterized, which turned out to be part of the Cu / Zn SOD superfamily. According to the obtained results the amplification of the *Hs-sod* gene was achieved, generated an open reading frame of 458 bp. analyzing the sequence in the database it was observed that the gene codes for a SOD enzyme. The *in silico* modeling of the Hs-SOD protein predicted that the enzyme belongs to the Cu-Zn SOD superfamily, with conserved Cu ++ binding domains (Hys 51, 53, 78 and 140) and the Zn ++ binding site (Hys 78 , 87, 96 and Asp 99). It was possible to identify and bioinformatically characterize the gene coding for SOD enzyme in seeds of the chan plant.

Keywords: Superoxide dismutase; *Hyptis suaveolens*; Antioxidant; Enzyme; Oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo ocurre cuando las defensas antioxidantes endógenas son insuficientes para capturar las EROs por completo (Bourdon y Blache, 2001), sin embargo los seres vivos han desarrollado en el proceso evolutivo diferentes maneras de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. Existen factores que son considerados como pro-oxidantes, sin embargo, existe una contraparte que consiste en un complejo sistema antioxidante para contrarrestarlo, en la siguiente figura se observa cuáles son éstos (Reuter, *et al.*, 2010).

Las EROs juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos normales, como las regulaciones oxido-reducción, en la fosforilación de proteínas y en factores de transcripción. Las EROs son requeridas diversos procesos en procesos biosintéticos, en los que se incluyen la producción de la hormona tiroidea (Brieger *et al.*, 2012). La mayoría de las EROs son generadas por la mitocondria por la cadena respiratoria (Poyton, *et al.*, 2009). Por otra parte estas moléculas de radicales son químicamente inestables y muy reactivas. Estas actúan contra moléculas insaturadas, tales como el DNA, proteínas, y lípidos especialmente poliinsaturados, que son sensibles a la peroxidación (Raes *et al.*, 1986). De la misma manera, estas moléculas de radicales son químicamente inestables y muy reactivas, actuando contra moléculas insaturadas, tales como el DNA, proteínas, y lípidos especialmente poliinsaturados, que son sensibles a la peroxidación (Raes *et al.*, 1986).

Las defensas naturales de contra las EROs consiste principalmente en un conjunto de enzimas antioxidantes. Los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo inducido por los radicales libres (Valko, *et al.*, 2007). En el caso particular de las defensas antioxidantes estas pueden ser de origen enzimático o no, y de la misma manera estas defensas pueden ser endógenas o exógenas:

- Antioxidantes Enzimáticos: Superóxido Dismutasa, Glutatión peroxidasa (GPx) y Catalasa (CAT).
- Antioxidantes no enzimáticos: Ácido ascórbico (Vitamina C), Tocoferol (Vit E), Glutatión (GSH), Carotenoides, Flavonoides entre otros.

Una de las enzimas antioxidantes intracelulares más efectivas es la superóxido dismutasa (SOD- EC 1.15.1.1) (Valko *et al.*, 2006). Las SODs, son la primera línea de defensa en contra del daño oxidativo y han sido aisladas de organismos de todos los reinos (Karpinska, 2001; Amo, 2003; Dolashka-Angelova, 2004; Wu, 2006). La SOD es una metaloproteína, es encontrada tanto en células eucariotas y células procariotas (Diplock, 1998). Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo el de identificar y caracterizar del gen superóxido dismutasa de “Chan” *Hyptis suaveolens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE). Para la obtención de los extremos del gen hacia el extremo 5' y 3' fue utilizada la técnica RACE. En la primera reacción se utilizaron los oligonucleótidos SMART II A y SOD R, este par de oligos copian en dirección 3' a 5' con respecto al templado (5' RACE-PCR). El 3' RACE-PCR se obtuvo utilizando el par de oligos SOD F y para cada caso y 3' SMART CDS Primer II A. Las secuencias obtenidas mediante el RACE se secuenciaron y se analizaron en el programa DNASTAR y BLASTx para la obtención de la secuencia completa codificante para el gen *sod* de chan, en base a las secuencias codificantes obtenidas del RACE para el gen de *sod* se diseñarán los primers forward y reverse.

Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento de SOD se obtuvo por medio de PCR considerando las siguientes condiciones. Se prepara una mezcla de reacción que contendrá DNA, oligonucleótidos sod 3 fw y sod 3 rv, desoxinucleotidos (dNTPs), MgCl₂, como catalizador y la enzima que catalizará la reacción (Taq DNA polimerasa invitrogen). El programa de amplificación será analizado cuando se tengan los oligonucleótidos. El producto de la amplificación se secuenció y posteriormente se hará un análisis comparativo con la base de datos BLAST de NCBI.

Análisis Bioinformático. En análisis bioinformático se realizó en la base de datos del NCBI en el Blast para la comparación de SODchan y CATchan con otras SODs y CATs reportadas respectivamente. El empalme de las secuencias para la obtención del ORF y el alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos se realizara mediante el uso de programa BioEdit.

Modelamiento de la proteína SODchan. El modelamiento de la proteína se realizó utilizando la base de datos de SWISS-MODEL, a través de la comparación de modelos de estructuras tridimensionales de proteínas previamente caracterizadas.

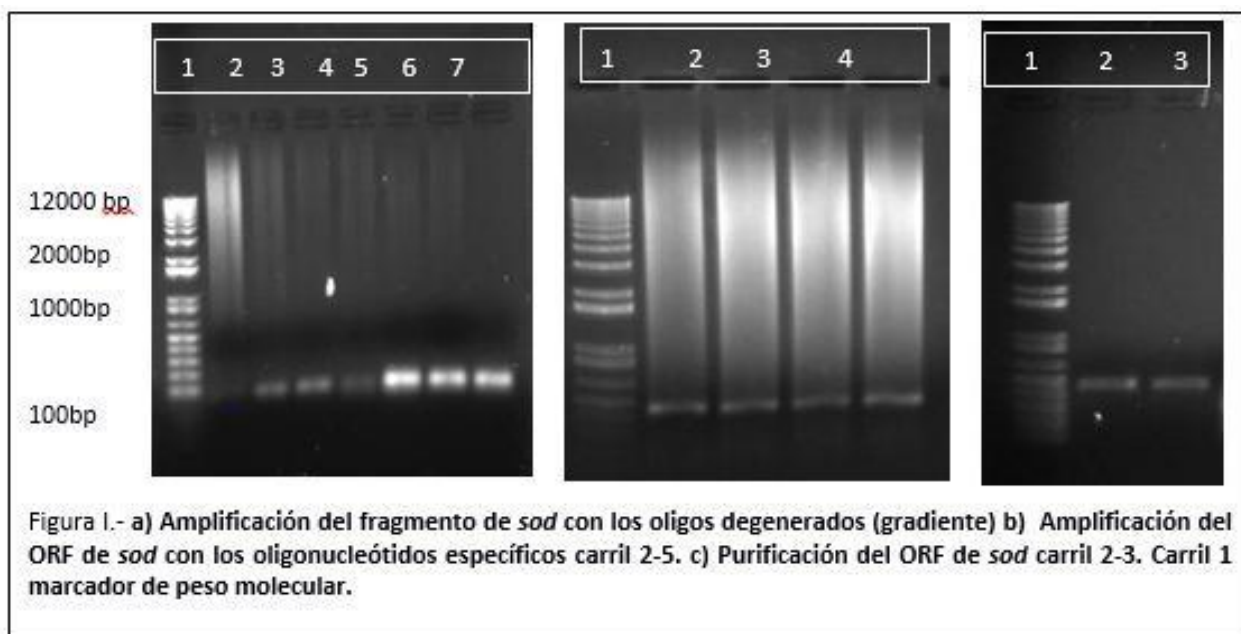
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizando los oligonucleótidos SodF BB y SodR BC1 se logró tener un fragmento de aproximadamente 120 bp de SOD de Chan lo cual fue confirmado mediante secuenciación. En el entendido que el fragmento obtenido pertenecía a Cu/Zn SOD de *Hyptis suaveolens* se realizó la amplificación rápida de los extremos 5' y 3'. Los fragmentos obtenidos se secuenciaron y analizaron en el software BioEdit. Una vez realizado el ensamble bioinformático de la secuencia 5'SOD-SOD-3'SOD, en la **Figura I** se puede observar la amplificación del fragmento SodF BB1-SodR BC1 así como la de el gen *sod* como la purificación del mismo.

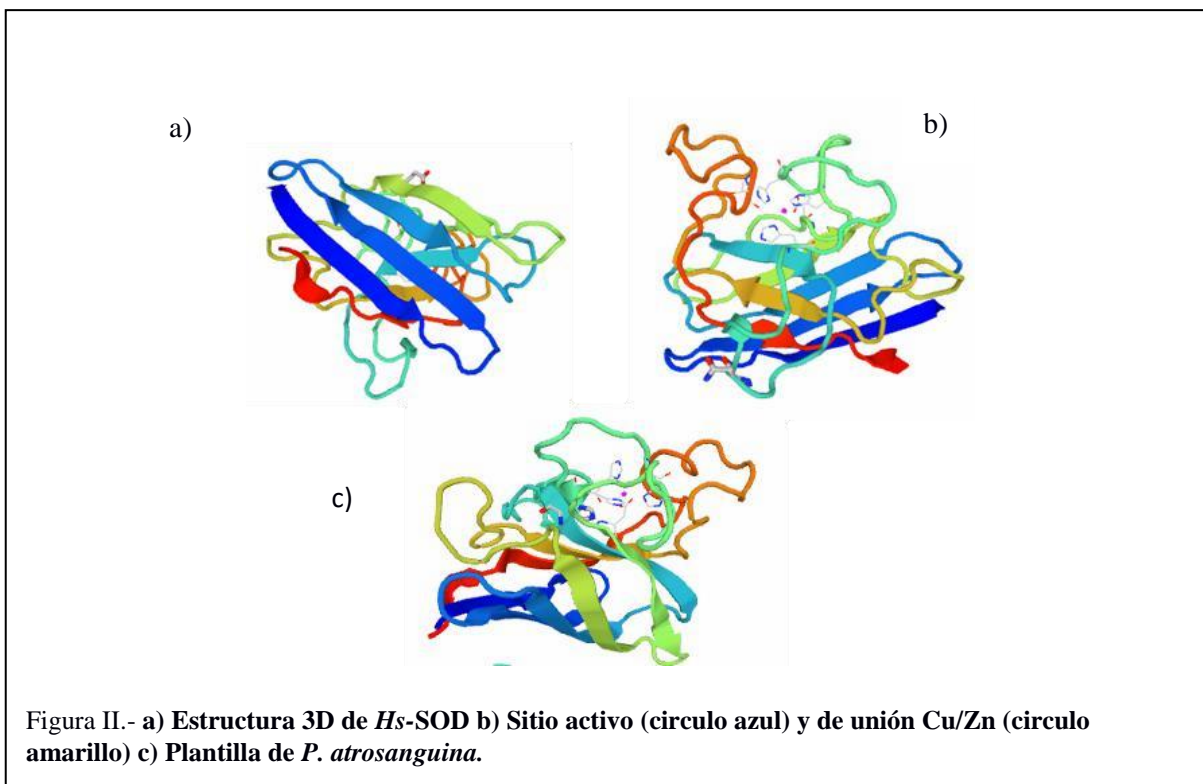
Análisis Bioinformático. Los resultados de la secuenciación y el ensamblaje dio como resultado un marco de lectura abierto de 458 pb que codifica para una proteína de 156 residuos de aminoácidos identificada dentro de la familia de la Cu/Zn SOD en la en la **Tabla I** se pueden observar la secuencias. Los resultados de la secuenciación del ORF del gen al cual denominaremos *Hs-sod* fueron analizados mediante un BlastN, el cual compara la secuencia blanco con la base de datos de NCBI, los resultados muestra que Hs-sod cuenta con un porcentaje de identidad de arriba de un 90%, por ejemplo, con Cu-Zn sod de *Amaranthus hypochondriacus* tiene un porcentaje de identidad de 99 % como lo reporta Montero-Morán (2015), con una predicción de *Beta vulgaris* CU-Zn sod comparte una identidad de 90% y por ultimo dentro de los resultados remarcables se encuentra *Salicornia europea* y *Suaeda salsa* con 88 % de identidad en ambos casos.

Modelamiento de la proteína SODchan. De la estructura se secundaria se puede apreciar en la **Figura II** que en su mayor parte está compuesta por laminas β y una pequeña hélice α en uno de los extremos expuestos de la proteína, de la misma manera se puede ver el sitio activo, así como la unión Cu/Zn.

Tabla I. Secuencia de nucleótidos para el marco de lectura abierto de <i>Hs-sod</i> b) Secuencia de aminoácidos de la proteína <i>Hs-SOD</i> .	
Secuencia de nucleótidos <i>sod</i>	% de Identidad
ATGGGCAAGGGCGTGACTGTTCTGAACAGTAGTGAGGGTGTT ACTGGAACATCTACTTCACCCAGGAAGGAGATGGTCCCCT ACTGTGTCCGAAATATCTCAGGCCTCAAGCCTGGGCTCCATG GATTCCATGTTTCATGCCCTTGGTGACACCACAAATGGCTGCAT GTCAACTGGACCACACTTAAATCCTGCTGGAAAAGAGCATGG TTCTCCAGAAGGTGATGTTTCGCCATGCTGGTGATCTTGGGAAC ATTACAGCTGGAGATGATGGTACTGCTACCTTTACACTTATTG ATAGCCAGATTCTCTTTTACAGGAGCCAATTCTATTGTGGGGAG GGCTGTTGTTGTCATGCTGATCCTGATGATCTTGGAAAGGGGA GGACATGAGCTCTGCAAGACCACTGGCAATGCAGGTGGAAGA ATTGCTTGCGGTATTATTGGTCTTCAAGGT	99% <i>Amaranthus hypochondriacus</i> 90% <i>Beta vulgaris</i> 88% <i>Salicornia europea</i> 88% <i>Suaeda salsa</i>
Secuencia de aminoácidos SOD	% de Identidad
MGKGVTVLNSSEGVGTGIYFTQEGDGPTTVSG NISGLKPLHGFHVHALGDTTNGCMSTGPHFN PAGKEHGSPEGDVRHAGDLGNITAGDDGTATF TLIDSQIPLSGANSIVGRAVVVHADPDDLGRG GHELCKTTGNAGGRIACGIIGLQG	98% <i>Amaranthus hypochondriacus</i>



La estructura modelada por la plataforma SWISS-MODEL tomó como base la estructura cristal de superóxido dismutasa de *P. atrosanguina* 2p21.1 obtenida por difracción de rayos X, la secuencias de SOD de *P. atrosanguina* y Hs-SOD, un 86.8 % de identidad entre ambas secuencias lo que permite establecen un modelo aproximado como se muestra en la **Figura II**, la proteína pertenece súper familia de Cu-Zn SOD, con sitio de unión a Cu⁺⁺ (Hys 51, 53, 78 y 140) y el sito de unión a Zn⁺⁺ (Hys 78, 87, 96 y Asp 99).



CONCLUSIONES

Se aisló y se caracterizó bioinformáticamente el gen que codifica para la proteína superóxido dismutasa de Chan, el cual pertenece a la superfamilia de Cu/Zn SOD, con una identidad de 99% a superóxido dismutasa de *Amaranthus hypochondriacus* y con un potencial de uso como antioxidante.

El modelamiento *in silico* de la *Hs-SOD* dio como resultado una aproximación la estructura de la proteína, un monómero donde se puede apreciar los motivos conservados de unión a Cu y a Zn y su sitio catalítico.

BIBLIOGRAFÍA

Bourdon, E., Blache, D. 2001. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(2), 293-311.

Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., & Krause, K. H. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 142, w13659.

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Diplock, A. T. 1998. Defence against reactive oxygen species. *Free radical research*, 29(6), 463-467.
- Montero-Morán, G. M., Sampedro, J. G., Saab-Rincón, G., Cervantes-González, M. A., Huerta-Ocampo, J. Á., De León-Rodríguez, A., & de la Rosa, A. P. B. (2015). Biochemical and Molecular Characterization of a Novel Cu/Zn Superoxide Dismutase from *Amaranthus hypochondriacus* L.: an Intrinsically Disordered Protein. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(8), 2328-2345.
- Poyton, R. O., Ball, K. A., Castello, P. R. 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20:(7), 332-340.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1): 44-84.