



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

### ESPECIALIDAD EN CIENCIAS AMBIENTALES

“Obtención de enzimas recombinantes para biorremediación”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES.

PRESENTA

**Biólogo Geoovanny Naim Melchor Partida**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr en Cs. Jesus Bernardino Velázquez Fernández**

**CO. DIRECTOR DE TESIS**

**Dra en Cs. Saé Muñoz Hernández**

TEPIC NAYARIT, NOVIEMBRE DEL 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/438/14

Xalisco, Nayarit; 10 de diciembre de 2014

**Ing. Alfredo González Jáuregui**  
**Director de Administración Escolar**  
**P r e s e n t e.**

Con base al oficio de fecha 09 de diciembre de 2014, enviado por los **CC. Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, Dra. Saé Muñoz Hernández, Dra. Abril Bernardette, Martínez Rizo y Dra. Veronica Alejandra Mondragón Jaimés**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la **C. Geovanny Naim Melchor Partida**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por lo Nuestro a lo Universal"**

**Dr. J. Diego García Paredes**  
**Coordinador del Posgrado**



C.c.p.-Expediente.

Ref.

Tepic, Nayarit, 9 de diciembre 2014

**Dr. Diego García Paredes**  
Coordinador del Programa de  
Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias  
Presente

Los que suscribimos, integrantes del comité tutorial de la **Biol. Geovanny Naim Melcher Partida**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada: "Obtención de enzimas recombinantes para biorremediación" y determinamos que la tesis puede ser presentada por la estudiante de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Ambientales.

Atentamente

**EL COMITÉ TUTORIAL**

  
Director de Tesis: **Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**

  
Co-Directora de Tesis: **Dra. Saúl Méndez Hernández**

  
Asesora de Tesis: **Dr. Abril Bernadette Martínez Rizo**

  
Asesora de Tesis: **Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes**

Este trabajo de investigación se realizó en Laboratorio de Bioquímica Toxicológica bajo la dirección del Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández. Estuvo financiado por el proyecto CONACYT CB-2012-01-183659 cuyo responsable es el Dr. Velázquez Fernández, Dr. Antes mencionado.

CONACyT apoyó con la beca para la formación de recursos humanos para posgrados PNPC (Posgrado en Ciencia Biológicas Agropecuarias y Pesqueras) a la estudiante Geovanny Naim Melchor Partida con registro 480740 y matrícula 12705750.



### *Dedicatoria*

Dedico esta tesis, a todas las buenas conciencias que se dedican por el bienestar de todos, a las nuevas esperanzas de un ambiente estable, y cada vez más habitable, a nuestra y todas las especies que han estado y estarán en la tierra. Y también a todos aquellos seres vivos y científicos que han muerto en el intento, de una vida mejor.

*Dedico esta tesis a la naturaleza ...*



## *Agradecimientos*

### **Doctores y compañeros académicos.**

Al finalizar un trabajo tan laborioso y lleno de dificultades como es realizar un proyecto de posgrado, nos damos cuenta que en el camino hay muchas personas a las cual agradecer, puesto que en la vida no podemos nadie hacer nada solos, como buenos mamíferos somos seres sociales y gregarios.

Primero y antes que nada quiero agradecer a mi cuerpo, a cada órgano a cada célula a mis NADH y FADH<sub>2</sub> por proveerme de energías y a muchas funciones más que son el motor necesario para que esté viva.

Al Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, por la oportunidad que me dio en su proyecto y aceptarme a pesar de saber que no tenía las suficientes bases en esto. Por sus enseñanzas, sencillez, apoyo, por incrementar mis ganas de seguir en investigación, por el buen ambiente de trabajo que brinda, por su responsabilidad en su trabajo y con sus alumnos y también sin dejar a menos por la rica comida que lleva al laboratorio de trabajo, serán inolvidables los brownies. Y por muchas cosas más. ¡¡Gracias Doctor!!.

También agradecer a la doctoras, Verónica Mondragón, por su paciencia, tiempo y buenos consejos. A la Dra. Abril B. Martínez R., al Dr. José Navarro P., a la Dra. Irma Paz y a la Dra. Sae Muñoz H. Y un especial agradecimiento, a la doctora Adela Rendón, a su esposo Iñiqui López, y su linda hija Lucía, por su grata compañía, comprensión, apoyo y por su gran calidad humana que hicieron de mi estancia en España más llevadera.

Al doctor Álvaro Villarroel y a su grupo Covadonga Fuentes, Ganeko Bernardo, y Alexandro Alaimo por compartir amablemente sus conocimientos académicos.

Agradecimientos también a mis buenos compañeros de maestría, a mi buena amiga Sarahí Gonzales por su compañía, consejos, apoyo emocional, a Guadalupe Pacheco, Armando Quintero y Diana Ibarra, por sus gratas compañías, también a mi compañeros del laboratorio de bioquímica toxicológica, Benjamin Dávalos, Roberto Rodríguez, Charytin Gonzales, Yarazeth Ochoa, Gabriel Palma, por su apoyo, disposición y compañerismo, también a mis compañeros Sergio Villegas, Aideé Ibarra y Elisa Delgado, que hacían amenos mis días de trabajo.

Al Conejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por darme el apoyo económico para realizar mi proyecto de posgrado por medio del programa del CBAP.

### **Para mi familia y amigos**

Quiero agradecer a mi familia: a mis padres Martha Partida y Pablo Melchor que me apoyaron en mis primeros estudios y que de una manera u otra siempre conté con su apoyo. A mis hermanas Nadia, Angélica, Martha, Pablo y Miryam por darme alientos para seguir adelante, a mis sobrinos: Nayara, Tulio, Alheli y Jessica. Y a mis queridos amigos: Lucina Aguilar por su actitud emprendedora y su impulso a no rendirme, a mi gran amigo Juan Yáñez por acompañarme, aconsejarme, y ayudarme en los momentos de tristeza, a mi lindo amigo Tonatiuh García, por su intelecto, apoyo emocional y sabios consejos, a mis amigos Wagner Carrillo y su Madre Carmen Carrillo, por su gran apoyo incondicional. A Jorge Aguilera por compartirme sus conocimientos de matemáticas. A todos ellos muchas gracias... su apoyo fue, es y seguirá siendo muy importante para mí.

Finalmente quiero agradecer a mi reciente esposo, Abraham Antonio Arreola Rosales, por su paciencia, comprensión, apoyo, amor incondicional, sencillez y su excelente calidad humana, pero sobre todo por su enorme sentido común al soportar mi estrés en días de seminario o mucho trabajo, gracias amado mío.

**ÍNDICE GENERAL**

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>2</b>
2.1. Contaminantes orgánicos persistentes	2
2.2. Plaguicidas organoclorados	3
2.3. Biorremediación	4
2.4. Biorremediación enzimática	6
2.5. Glutatión-S-transferasa	7
2.6. Dioxigenasa (catecol 2,3 dioxigenasa)	9
2.7. Plásmido pGEX-6p-2	11
2.8. Transformación bacteriana	11
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>12</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>12</b>
<b>5. Objetivo</b>	<b>12</b>
5.1. Objetivo general	12
5.2. Objetivos específicos	12
<b>6. Materiales y Métodos</b>	<b>13</b>
6.1. Diseño del estudio	13
6.2. Producción de la enzima recombinante GST	14
6.2.1. Preparación de celular competentes	14
6.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> BSL	14
6.2.3. Extracción plasmídica	14
6.2.4. Verificación de la restricción del plásmido pGEX-6p-2	15
6.2.5. Transformación de <i>E. coli</i> BL21	16



6.2.6. Expresión de GST	16
6.2.7. Purificación de pretina	17
6.3. Determinación de la actividad de GST	18
6.4. Determinación de proteínas totales	19
6.5. Diseño e oligonucleótidos par el gen <i>nahH</i> (catecol 2,3 dioxigenasa)	20
<b>7. Resultados y Discusión</b>	<b>21</b>
7.1. Transformación de <i>E. coli</i> BSJ y BL21	21
7.2. Expresión de GST	22
7.3. Purificación de la enzima GST por cromatografía de afinidad.	22
7.4. Actividad enzimática de GST	24
7.5. Análisis bioinformático de las secuencias de gen codificante de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa y diseño de oligonucleótidos	26
<b>9. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>10. Prospectivas</b>	<b>30</b>
<b>11. Bibliografía</b>	<b>31</b>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i> .
<b>LB</b>	Luria Bertani.
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
<b>PBS</b>	Solución salina con amortiguador de fosfatos (phosphate buffered saline solution).
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico.
<b>GST</b>	Glutation-S-transferasa.
<b>MW</b>	Peso Molecular (Molecular Weight).
<b>o/n</b>	Toda la noche, del inglés "overnight".
<b>GSH</b>	Glutación.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>MSA</b>	Multiple Sequence Alignment
<b>MEME</b>	Multiple Expectation-maximization for Motif Elicitation

## INDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1.</b> Estructura química de los organoclorados	3
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de biorremediación.	5
<b>Figura 3.</b> Modelos de reacciones catalizadas por GST.	8
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de dioxigenasas en compuestos aromáticos.	10
<b>Figura 5.</b> Plásmido pGEX-6P-2.	10
<b>Figura 6.</b> Fotografía escaneada de electroforesis de DNA plasmídico digerido con las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>XhoI</i> .	21
<b>Figura 7.</b> Gel de SDS-PAGE de eluciones de GST	22
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas de purificación de GST	23
<b>Figura 9.</b> Gel de SDS-PAGE de las fracciones de GST	24
<b>Figura 10.</b> Cambio de absorbancia a 340 nm por GST	25
<b>Figura 11.</b> BLAST de las secuencias de los aminoácidos de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa	27
<b>Figura 12.</b> Alineamiento múltiple de los aminoácidos de catecol 2,3 dioxigenasa	28
<b>Figura 13.</b> MSA del gen <i>nanH</i> secuencias de <i>Pseudomonas putida</i> y oligonucleótidos propuestos para su amplificación.	29

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<i>Pág.</i>
<b>Tabla 1.</b> Primera lista de COPs, establecida por el convenio de Estocolmo	<b>3</b>
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas del uso de enzimas en biorremediación.	<b>7</b>

La biorremediación enzimática es una tecnología derivada de la biorremediación con la finalidad de disminuir los efectos indeseables de los contaminantes en el ambiente. Entre los contaminantes más peligrosos se encuentran los denominados persistentes, que en su mayoría son compuestos organoclorados. Su persistencia en el ambiente se debe principalmente a su estabilidad física y química, así como a la baja biodegradabilidad en el ambiente. En trabajos realizados previamente por nuestro grupo de investigación, en el laboratorio de bioquímica toxicológica, se encontró que la planta *Ocimum basilicum* tiene un efecto biorremediador sobre el endosulfán, un plaguicida organoclorado. En el proceso de biorremediación realizado por la planta, se encontraron datos que sugieren que la enzima GST tiene un papel activo. Lo anterior se refuerza con datos bibliográficos que sustentan que la enzima GST tiene la capacidad para biodegradar compuestos organoclorados. Por otro lado, algunos estudios sugieren que las enzimas dioxigenasas catalizan la biodegradación de compuestos aromáticos y organoclorados. Debido a lo anterior es probable el uso de ambas enzimas para biorremediar los contaminantes persistentes organoclorados.

En este trabajo de investigación se propuso clonar y producir la enzima recombinante GST y analizar secuencias de la catecol-2,3-dioxigenasa para su posterior clonación. Se han seleccionado dichas enzimas por su capacidad de degradación de compuestos halogenados respectivamente, este estudio tiene como finalidad sentar las bases bioquímicas que nos permitan utilizar estas enzimas en un biorreactor, que permita utilizar esta tecnología en la biorremediación de suelos contaminados.

## 1. INTRODUCCIÓN

A causa de la gran demanda antropogénica alimentaria, industrial y tecnológica, se ha ampliado la producción de monocultivos agrícolas y la liberación de desechos tóxicos en el mundo. Lo cual ha llevado a una inestabilidad en los ecosistemas. Esto ha provocado plagas indeseables en las cosechas y en las comunidades. Por lo que, el uso de compuestos orgánicos persistentes como los organoclorados, es abundante y en muchas ocasiones no moderado, causan problemas importantes de salud (cáncer, malformaciones, daños neurológicos, reproductivos entre otros) y ambientales (desertificación, y pérdida de biodiversidad) (Souza, 2013).

En 2001, en la convención de Estocolmo se estableció "La docena tóxica" formada por los compuestos más persistentes y tóxicos para el humano y el ambiente. Destacando los organoclorados (convenio de Estocolmo, 2011). El convenio busca medidas sustentables para disminuir o eliminar la presencia de estos compuestos.

Por esta razón, se debe destacar el valor de desarrollar tecnologías sostenibles como; la biorremediación como alternativa para saneamiento ambiental. La biorremediación puede disminuir o eliminar compuestos orgánicos persistentes del ambiente, con el uso de organismos o derivados de ellos como son las enzimas. A lo que se le llama biorremediación enzimática. Esta tecnología utiliza enzimas para transformar contaminantes. Se ha demostrado que las enzimas tienen mecanismos para degradar compuestos halogenados. Dos enzimas importantes que se han propuesto es Glutatión-S-transferasa y la catecol 2,3 dioxigenasa.

Durante el desarrollo del presente trabajo se clonó el gen de la enzima GST usando el plásmido pGEX-6p-2, se expresó, purificó y se determinó su actividad enzimática.

Se buscaron las secuencias del gen *nabII*, que codifica para la enzima catecol 2,3 dioxigenasa, en diversas especies de *Pseudomonas* y se analizaron por multialineamientos con el programa Clustal W 2.1 [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). La identificación de dos secuencias conservadas que flanquean la longitud completa del gen permitió diseñar un par de oligonucleótidos complementarios para la obtención completa del gen y su posterior clonación en un vector de expresión. La expresión de los genes de las enzimas Glutatión-S-transferasa y Catecol 2,3 dioxigenasa clonadas permitirá su uso posterior en biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes como los organoclorados.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Contaminantes orgánicos persistentes**

Los compuestos orgánicos persistentes (COPs) son generados por la actividades antropogénicas como las industriales, alimenticias y tecnológicas. Estos compuestos, son llamados así, debido a su acumulación y difícil degradación del ambiente y de los organismos (5 años o más) (EPA, 2004). Esto causa graves daños en el ambiente y a la salud humana (Convención de Estocolmo, 2002).

La exposición a los COPs está vinculado a muchas enfermedades crónicas, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, pérdida de biodiversidad y desertificación en los ecosistemas (Lee y Jacobs, 2014). Mucho de estos efectos adversos se debe a la persistencia de estos compuestos en el ambiente. Esta persistencia es causada principalmente por las siguientes razones:

- Son resistentes al ataque rápido de los microorganismos.
- Son metabolizados muy lentamente en la naturaleza.
- Algunos son eliminados en ciertos ambientes, y en otros no.

Otra de las razones de la persistencia de estos compuestos es su estabilidad y composición química; son compuestos aromáticos que derivan del anillo bencénico. Este anillo posee una estructura química resonante lo que les da una elevada estabilidad termodinámica, siendo por ello difíciles de atacar físico-químicamente por la radiación ultravioleta, oxidación, acidez, etc., así como biológicamente. Son de baja polaridad, lo que les confiere que sean poco hidrosolubles y muy liposolubles; característica que les permite acumularse fácilmente en los organismos y/o que pasen fácilmente a través de las cadenas tróficas, con lo que se biomagnifica su presencia (Alexander, 1999).

La convención de Estocolmo, surge en 2001, con el objeto de proteger la salud humana y el ambiente frente a los diversos COPs, así como promover las mejores tecnologías disponibles para eliminarlos. El Convenio propuso a una docena de COPs, como; la "docena tóxica" (Tabla 1), debido a sus efectos ambientales y su persistencia en el interior del cuerpo humano, la mayoría de ellos, compuestos organoclorados representan el 87% de dicha lista. En el 2009, se agregaron diez compuestos más a la lista (The New POPs), entre los que se encuentran siete plaguicidas organoclorados (Convención de Estocolmo, 2010).

Tabla 1. Primera lista de COPs establecida por el convenio de Estocolmo. El convenio se estableció en el año 2010 y se propusieron los siguientes compuestos tóxicos, por lo que se le nombró "La docena tóxica".

Compuestos orgánicos persistentes	
• Aldrina	• Bifenilos policlorados (PBC)
• Heptacloro	• Dicloro Difénil Tricloroetano (DDT)
• Clordano	• Hexaclorobenceno
• Dieldrina	• Mirex
• Dioxinas	• Toxafeno
• Endrina	• Furanos

Convenio de Estocolmo, 2010

## 2.2 Plaguicidas organoclorados.

Los plaguicidas organoclorados, fueron sintetizados a finales del siglo XXI, con la finalidad de combatir plagas de insectos, tanto en la industria como en la agricultura; lo que provocó su amplia distribución en la biosfera (Hwang, 2014). A principios de la década de los 70, fueron los plaguicidas con mayor aplicación agrícola.

Químicamente son moléculas orgánicas, cuya estructura general corresponde a hidrocarburos clorados, que pueden tener o no átomos de oxígeno, azufre, o ambos, y todos ellos contienen anillos cíclicos o aromáticos en su estructura. En la Figura 1 se ejemplifica la estructura química de algunos compuestos organoclorados (Tomado de, Narváez y col., 2012). Poseen baja solubilidad en agua, elevada solubilidad en compuestos orgánicos, baja presión de vapor y alta estabilidad química. Todo lo anterior los hace difíciles de degradar por los organismos, lo que los convierte en compuestos persistentes (Akber y col., 2013).

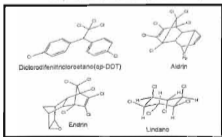


Figura 1. Estructura química de los organoclorados.



Los plaguicidas organoclorados en humanos, pueden ingresar al organismo por ingestión, inhalación, o por contacto en la piel. Una vez absorbidos se almacenan generalmente en el tejido adiposo (Narváez y col., 2012). La exposición prolongada o crónica a estos compuestos, puede causar daños de tipo: teratogénicos como malformaciones en el feto, mutagénesis que pueden causar retrasos mentales, carcinogénicos, atrofas al sistema nervioso central, entre otros (Darko y col., 2008).

Causan muerte en peces, adelgazamiento en el cascarón de huevos de aves, e infertilidad en mamíferos. En ecosistemas naturales y agroindustriales provocan desertificación de suelos y grandes pérdidas económicas (Liu y col., 2012). Los organoclorados fueron prohibidos en el mundo a mediados de la década de los 70's por la EPA (Environmental Protection Agency). Sin embargo, en algunos países como México se siguen utilizando sin ningún control (Darko y col., 2008).

Los organoclorados pueden además bioacumularse y biomagnificarse. Eso hace que cuando están acumulados en el organismo, limiten su biodisponibilidad hacia otros organismos, por lo que estos sirven de reservorio para el contaminante; de tal forma que, hasta que el organismo muere el contaminante se "desplaza" ya sea en la red trófica o regresa al ambiente. En el ambiente, la mayoría de los organoclorados alcanzan entre el 75 y el 100 % de su degradación en un tiempo de 4 a 30 años (Sankararamakrishnan y col., 2005).

### 2.3 Biorremediación.

La biorremediación es una estrategia de saneamiento ambiental, donde se utilizan animales, plantas, microorganismos o derivados de ellos como las enzimas, para disminuir o eliminar los efectos indeseados de los contaminantes en el ambiente (Velázquez y col., 2012). La biorremediación surgió como una rama de la biotecnología, a mediados del siglo XX con las primeras investigaciones para identificar el potencial de los microorganismos para degradar contaminantes (Vallejos y col., 2013). En la actualidad, se han desarrollado diversos proyectos con el uso de la biorremediación, por lo que la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de América la ha recomendado como una tecnología adecuada para la sanación ambiental (EPA, 2000). Debido a las diferentes problemáticas ambientales, se han adecuado diferentes tipos de biorremediación como se muestra en la Figura 2. Elegir el tipo de biorremediación a utilizar ante un problema de contaminación depende de la naturaleza del contaminante, del ecosistema y de las ventajas propias del organismo o compuesto remedador.

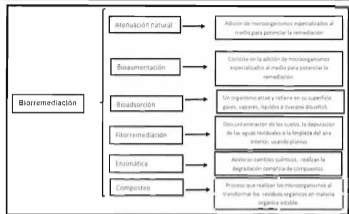


Figura 2. Ejemplos de biorremediación. Tomado y modificado de Olguin y col., 2007.

El uso de microorganismos biorremediación y plantas fitorremediación para remediar ambientes contaminados es un área prometedora y creciente de la biotecnología ambiental. Una de las desventajas de estas dos herramientas es la producción de biomasa, que parecería no tener ningún problema si se degrada el contaminante orgánico hasta compuestos minerales. Sin embargo, cuando el contaminante no es totalmente degradado, los contaminantes se confinan en una biomasa cada vez mayor, debido a que los microorganismos pueden seguir reproduciéndose y las plantas seguir creciendo (Velázquez y Muñoz, 2013).

En el laboratorio de bioquímica toxicológica de la Universidad Autónoma de Nayarit, se realizó un proyecto de biorremediación usando a la planta *Ocimum basilicum* L. como modelo. La exposición de la planta al compuesto organoclorado endosulfán fue a través del suelo. Se observó que la planta redujo los niveles de endosulfán, por lo que se sugirió un proceso de degradación del contaminante donde enzimas como la glutatión S-Transferasa (GST), podrían estar participando. Por lo que se realizaron ensayos específicos para medir la actividad enzimática de la GST y se observaron variaciones de acuerdo al órgano de la planta (incluyendo raíz y rizósfera) y la concentración de endosulfán a la que estuvo expuesta (Ramírez et al, 2013). Este trabajo ejemplificó claramente que la albahaca, de manera similar a otras plantas, es una planta fitorremediadora; cuya efecto puede

ser explicado en términos de las capacidades de biotransformación de la planta o de su rizósfera.

Por esta razón, se ha propuesto el uso de otras tecnologías como la biorremediación enzimática, debido a que éstas son las principales implicadas en los procesos de biotransformación o biodegradación en los organismos.

#### **2.4 Biorremediación enzimática.**

Las enzimas son catalizadores biológicos que facilitan la conversión de sustratos en productos, proporcionando condiciones favorables que disminuyen la energía de activación de la reacción (Chandrakant y Shwetha, 2011). Para hacer biorremediación enzimática se deben hacer inicialmente pruebas de degradación de xenobióticos preferentemente con bacterias. Como por ejemplo en los metanótrofos, la enzima metano monooxigenasa soluble es la encargada de realizar la primera oxidación catabólica del metano, pero además es activa sobre compuestos aromáticos policíclicos y una gran variedad de sustancias derivadas del petróleo consideradas como contaminantes (Inostroza, 2011). Esto se debe a que las enzimas son las principales participantes en los procesos de biotransformación y de biodegradación de contaminantes (Copley, 2009, Ramírez, 2013).

Las enzimas aisladas de microorganismos no pierden sus propiedades y pueden ser más eficaces cuando se purifican (Arias, 2012). Muchos enfoques de ingeniería genética se han desarrollado para demostrar la utilidad de las enzimas en los procesos de degradación de xenobióticos (Velázquez y Muñiz 2013, Copley 2009).

La biorremediación enzimática consiste en utilizar la capacidad catalizadora, eficaz, estable, promiscua, y degradativa de las enzimas, con el fin de degradar sustancias nocivas del ambiente (Copley, 2009).

Las enzimas seleccionadas para biorremediación deberán tener características únicas, como: actividad promiscua, estabilidad, eficacia y bajo costo de producción, entre otras, de tal forma que resulte sustentable su uso como remediadoras de ambientes contaminados (Velázquez y Muñiz, 2013). En la Tabla 2 se muestran las principales ventajas y desventajas del uso de enzimas como biorremediadores.

Para llevar a cabo la biorremediación basada en el uso de enzimas, se han sugerido diversas familias de estas, como las peroxidasas y oxidasas, transferasas y oxigenasas.

Tabla 2. Ventajas y desventajas del uso de enzimas en biorremediación.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"><li>• No generan biomasa.</li><li>• Transforman la estructura y propiedades toxicológicas de los contaminantes, hasta disminuirla o eliminarla.</li><li>• Son el principal efector de todas las transformaciones que ocurre en la biota.</li><li>• Son catalizadores ya sea con uno o varios sustratos (promiscuas).</li><li>• Se puede utilizar en altas concentraciones del contaminante</li><li>• Estabilidad, ya que, no son consumidas durante la catálisis.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Puede ser difícil aislarlas</li><li>• Al inicio hay que hacer muchas pruebas de investigación para determinar que enzimas son las degradadoras, esto puede llevar años.</li><li>• Inicialmente el proceso de aislamiento y purificación es costoso</li></ul>

(Tabla 1) EPA, 2000, Copley, 2002, Chandrakant y col., 2011, Velázquez-Fernández y col., 2013).

- **Peroxidasas y oxidasas:** son producidas por bacterias, hongos, plantas y animales. Participan en la respuesta celular al daño oxidativo.
- **Transferasas:** son producidas en bacterias, hongos, algas, plantas y animales. Catalizan el traspaso de un grupo químico (metilo, aldehído, glucosilo, amino, etc.) a otra molécula. Participan principalmente en la protección celular al daño oxidativo.
- **Oxigenasas:** son producidas por plantas, hongos y bacterias. Oxidan sustratos mediante la transferencia de uno o dos oxígenos (Mondoxigenasas y Dioxigenasas). Participan en la protección celular como respuesta a xenobióticos.

## 2.5 Glutatión S transferasa.

A partir del conocimiento de las enzimas para biodegradación de contaminantes, y mediante técnicas de ingeniería genética, se han desarrollado estrategias de eliminación de contaminantes como es el caso, del uso de la glutatión S-transferasa (GST) del grupo de las transferasas y las dioxigenasas del grupo de la

como catecol 2,3 dioxigenasa del grupo de las oxigenasas. Estas enzimas están presentes en casi todos los organismos y pueden degradar compuestos aromáticos y halogenados. Estas enzimas muestran ventajas sobre otras enzimas como las citocromo P450, que al degradar este tipo de compuestos generan epóxidos tóxicos (Velázquez y cols., 2012). De entre las transferasas conjugadas, la GST es la principal implicada en la biodegradación para fines de biorremediación. GST pertenece a una superfamilia de enzimas que se han encontrado en bacterias, hongos, algas, plantas y animales (Velázquez y col., 2012). Catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos como parte del mecanismo de defensa de organismos contra tóxicos (Cota, 2010). Por ejemplo, *Sphingobium chlorophenolicum* ha demostrado tener la capacidad de biodegradar pentaclorofenol mediante la función de varias enzimas siendo una de ellas la GST (Huan y col., 2008).

La GST cataliza el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico glutatión (GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas (Fig. 3). El GSH es cosustrato de las GST, es un compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH), formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Martínez y col., 2006).

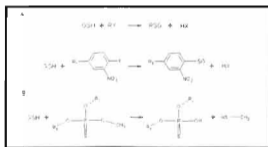


Figura 3. Modelos de reacciones catalizadas por GST. Se muestran ejemplos de la reacción de des-halogenación (A) y O-dealquilación (B). Tomado de Velázquez-Fernández y col., 2012.

La superfamilia de enzimas GST tienen un peso molecular de aproximadamente 25 kDa; se clasifican en  $\alpha$  (alfa),  $\delta$  (delta),  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa),  $\theta$  (teta),  $\zeta$  (zeta),  $\pi$  (pi),  $\tau$  (tau),  $\omega$  (omega) y microsomal. Estas se diferencian en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico (Hayes y col., 1995). La clase  $\pi$

participa en los mecanismos de desintoxicación de herbicidas, mientras que : puede ser inducida por ataque de patógenos, metales pesados, daño oxidativo y estrés térmico (Frova, 2003). La GST es uno de los pocos ejemplos de enzimas que pueden verse involucradas en las tres fases de la biotransformación, es decir, pueden catalizar reacciones de deshalogenación, oxidación, reducción e hidrólisis (fase I), conjugación (fase II) y compartimentalización (III). Esto resulta muy interesante, en especial porque esta enzima se encuentra evolutivamente conservada, lo que quiere decir es que se encuentran en una gran variedad de organismos (Ramírez, 2013).

## 2.6 Dioxigenasa (Catecol 2,3 dioxigenasa).

Se ha reportado la participación de las dioxigenasa en la degradación de contaminantes recalcitrantes como fenantreno, fluoranteno y benzopireno (Melchor y col., 2013). Además, se ha demostrado que dioxigenasas bacterianas son responsables de la biodegradación in situ del naftaleno, benceno, tolueno, ethylbenzeno, y xilenoand en sedimentos contaminados (Jeon y col., 2003, Melchor y col., 2013) Bacosaa y Inouea, 2014, Hassan y col., 2014 ). Una de estas dioxigenasas es la catecol 2,3 dioxigenasa (Hassan y col., 2014) (EC 1.13.11.2). Esta enzima pertenece a la familia de las intradiol dioxigenasas, está formada por cuatro subunidades idénticas de 32 kDa y contiene un catión ferroso en cada subunidad. El rango de sustrato de esta enzima es bastante amplio, oxida 3-metil-, 3-etil-, 4-metil- y 4-cloro-catecol (Kaitlyny col., 2014). Está presente en varios tipos de bacterias, principalmente en las del género *Pseudomonas*. Esta enzima rompe anillos aromáticos de varios contaminantes ambientales, tales como derivados de tolueno, xileno, naftaleno y bifenilo (Figura 4) (Ajao y col., 2012).



Figura 4. Mecanismo de acción de dioxigenasas en compuestos aromáticos. A) anillo aromático hidroxilante *intradiol*; B) dioxigenasa oxidación anillo extadiol; y C) intradiol escisión de anillos dioxigenasa (Arora y cols.,2009).

GST y catecol 2,3 dioxigenasa podrían ser utilizadas para llevar a cabo procesos de degradación o transformación de compuestos, para fines industriales o ambientales. Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética como la transformación bacteriana, es posible producir una gran cantidad de enzimas (Copley, 2009). Sin embargo, se debe estudiar para conocer sus características enzimáticas y saber si es adecuada o no para su uso en biorreactores.

## 2.7 Plásmido pGEX-6P-2.

Un vector de expresión, o construcción de expresión, es usualmente un plásmido diseñado para la expresión de la proteína en las células. Se utiliza para introducir un gen específico en una célula diana, y que esta produzca la proteína objetivo. El plásmido está diseñado para contener secuencias reguladoras que actúan como potenciador y regiones promotoras y dar lugar a la transcripción eficiente del gen (Douillarda y col., 2011). Este vector es portador de la secuencia de expresión de la enzima (GST; EC 2.5.1.18) de 25 kDa. La enzima fue aislada del parásito *Schistosoma japonicum helminthosm* por Smith y Johnson en 1988. Este vector está compuesto por un origen de replicación, un gen *lacI* (gen regulador), y *lacZ* (gen de  $\beta$  galactosidasa) un promotor *tac* que le permite ser inducible por IPTG, un gen que confiere resistencia a ampicilina y un sitio múltiple clonaje (Figura 5) (Smith y Johnson, 1988).

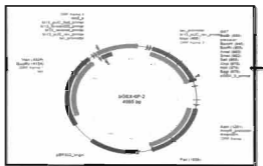


Figura 5. Plásmido pGEX-6P-2. Se muestran los diferentes genes que lo conforman y los sitios de restricción (imagen tomada de la compañía Addgene). Las flechas moradas señalan los sitios de corte de las enzimas *EcoRV* y *XhoI*.

## 2.8 Transformación bacteriana.

Para poder expresar una enzima por ingeniería genética, es necesario dos elementos fundamentales, los cuales son; el vector de expresión y la célula hospedera. El vector lleva la secuencia del gen, y el hospedero es la célula donde se introducirá este vector, a este proceso se le conoce como transformación. La transformación genética ocurre cuando una célula incorpora dentro de ella material genético exógeno, esto puede ser de manera natural o *in vitro*, para que estas células expresen un nuevo segmento de DNA (Brock, 2009).

El proceso de transformación genético puede ser natural o por ingeniería genética preferentemente en bacterias, por la fácil reproducibilidad y manejo de estos organismos. Para poder transformar una célula o bacteria *in vitro*, es necesario que previamente se les haya hecho competentes, o sea, que sean capaces de tomar el plásmido exógeno de una manera eficiente. Para ello, existen diferentes métodos. Los más usuales por su éxito en la transformación son la choque térmico y por poros hechos por calcio. La electroporación consiste en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso (Frandsena y col., 2014). La competencia por medio del  $Ca^{2+}$  más la combinación de la temperatura, aumenta la porosidad de la membrana celular, lo que facilita la asimilación de los plásmidos (Brzezinski y col., 2012). El choque térmico, se refiere al uso de gradientes extremos de temperatura que va desde 95 °C a -80 °C por periodos establecidos de tiempo, para lograr una membrana más permeable para la asimilación del plásmido (Brock, 2009).

*Escherichia coli* DL21 es una de las bacterias que posee los elementos genéticos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción, es una de las bacterias que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas, lo que la hace a la cepa de *E. coli* BL21 más utilizada en técnicas de clonación plasmídica (Wildt y col., 2005).



### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los compuestos orgánicos persistentes causan daños ambientales y de salud, la mayoría de estos compuestos son relativamente nuevos en el ambiente debido a su origen sintético (actualmente a nivel mundial, se liberan al año entre 80,000 y 120,000 de estos compuestos al ambiente) y su degradación natural es poca o nula. El 87% de estos compuestos son plaguicidas organoclorados, los cuales causan daños neurotóxicos, que afectan tanto a insectos como a organismos no blanco, provocando daños físicos, mentales e incluso la muerte. La poca información que hasta ahora se tiene acerca de la degradación de estos compuestos hace imprescindible desarrollar tecnologías de biorremediación.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las enzimas son las principales moléculas implicadas dentro de los procesos de biodegradación de contaminantes en los organismos; por lo que la biorremediación enzimática resulta ser una estrategia sustentable que permita eliminar o disminuir los contaminantes persistentes en el ambiente, como los organoclorados. Existen varios reportes donde se reconoce la capacidad de la glutatión S transferasa (GST) y la catecol 2,3 dioxigenasa (CaDiox), de biodegradación de compuestos halogenados. Por lo anterior se propone utilizar técnicas de ingeniería genética para la producción de GST y CaDiox para su posterior uso en biorremediación.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Obtener enzimas recombinantes con actividad de GST y dioxigenasa.

#### **5.2 Objetivos específicos**

5.2.1 Producción de la enzima recombinante GST.

5.2.2 Purificación de la GST recombinante y determinación de su actividad.

5.2.3 Análisis bioinformático de las secuencias de catecol 2,3 dioxigenasa

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Diseño del estudio.**

Con base en el objetivo de estudio se trabajó con dos estrategias diferentes, una para la enzima GST y otra para la dioxigenasa catecol.

- **Producción de la enzima recombinante GST.** El vector de expresión pGEX-6P-2 que se usó en este trabajo es un plásmido de 4,985 bp y fue donado por el Doctor Álvaro Villarreal, de la Unidad de Biofísica Centro Mixto Consejo Superior de Investigación Científica -Universidad del País Vasco, España. El gen que codifica para la enzima glutatión-S- transferasa se clonó en este vector de expresión. La estructura del plásmido pGEX-6P-2 se describe en la Figura 5 brevemente; contiene un cassette de resistencia a ampicilina y el gen GST cuya expresión se encuentra regulada bajo el promotor tac que le permite ser inducible por IPTG. El vector se utilizó para transformar 2 tipos de bacterias *E. coli* BL21 por que permite una mejor expresión de proteína (Wildt y col., 2005) y *E. coli* BSJ que presenta una mayor probabilidad de clonación. Aunado a esto, se estableció expresar la proteína para posteriormente purificarla por cromatografía de afinidad y exclusión de tamaño, para finalmente determinar su actividad.
- **Estrategia de obtención de la secuencia del gen *nahH*.** El gen *nahH*, codifica para la enzima catecol 2,3 dioxigenasa. Con la finalidad de obtener la secuencia completa del gen *nahH*, se planteó diseñar un par de oligonucleótidos con secuencias conservadas que permitieran abarcar la totalidad de amplificación del gen en *Pseudomonas spp.* Para diseñar el par de oligonucleótidos putativos, se recurrió al análisis bioinformático de varias secuencias del gen *nahH* de diferentes especies de *Pseudomonas* obtenidas de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Se realizó un MSA (Multiple Sequence Alignment) de las secuencias de los genes *nahH* con el programa Clustal W 2.1 [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) para definir las regiones constantes entre ellas, las que se usaron para el diseño de los oligonucleótidos Forward y Reverse.

## 6.2. Producción de la enzima recombinante GST.

### 6.2.1 Preparación de células competentes.

Previo a la transformación bacteriana, se obtuvieron células competentes de acuerdo a la técnica realizada según el método de Sambrook, 1989, con algunas modificaciones propuestas por el Dr. Villarreal, de la Unidad de Biofísica Centro Mixto Consejo Superior de Investigación Científica -Universidad del País Vasco, España. Brevemente, las cepas de *E. coli* BSJ y BL21, se crecieron toda la noche a 37 °C en 3 mL de medio LB. Posteriormente en un matraz Erlenmeyer de 500 mL se adicionaron 200 mL del medio LB estéril y 2 mL de inóculo de los cultivos previos por separado. Ambos frascos se incubaron por espacio de 2 a 3 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta lograr una OD<sub>600nm</sub> de 0.3. Una vez alcanzada la densidad esperada, se centrifugó el cultivo a 2500 rpm por 12 min, el sobrenadante se desechó y la biomasa bacteriana se resuspendió en 5 mL de una disolución de 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> previamente colocada sobre hielo. La suspensión se colocó en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en una mezcla de una disolución de 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> con glicerol al 20 %. Finalmente, alícuotas de 200 µL fueron conservadas a -80 °C.

### 6.2.2 Transformación de *E. coli* BSJ.

Una vez obtenidas las células competentes, se realizó primeramente la transformación de las células de *E. coli* BSJ por choque térmico según el método de Sambrook 1988 modificado en la unidad de biofísica de la UPV (Universidad del País Vasco). Brevemente, en un tubo ependorff de 1.5 mL se agregaron 1 µL de plásmido a una concentración de 1 µg/µL, y 50 µL de células competentes. Las células se colocaron en hielo por 20 min y posteriormente se incubaron por 45 s en termoplacas a 42 °C. A continuación, se incubaron 5 min sobre hielo, y al término de esta incubación se agregaron 500 µL de medio LB fresco y se incubaron inmediatamente 45 min a 37 °C. Después de esto, el tubo se centrifugó 1 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente y se eliminó aproximadamente la mitad de su volumen. Con el volumen restante, se resuspendió el pellet y se sembró en masivo en cajas con agar LB con ampicilina 100 mg/ml, a 37 °C toda la noche.

### 6.2.3 Extracción plasmídica.

De las colonias bacterianas anteriormente cultivadas que fueron capaces de crecer en agar con ampicilina se tomaron 6 colonias al azar, y se realizó la extracción plasmídica por lisis alcalina de acuerdo al Sambrook y col., 1989. Las celdas se cosecharon del agar por pitadura y se crecieron en 3 mL de medio LB con ampicilina 100 mg/mL, 37 °C en agitación toda la noche, por no más de 16 h.

Una vez crecidas las bacterias, se tomaron 2 mL de este cultivo, se pasaron a tubos falcon de 2 mL y se centrifugaron por 1 min a 13,000 g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante con una bomba de vacío. Al pellet resultante se le agregaron 150 µL de TE (Tris-HCl 1 M pH 8, EDTA 0.5 M pH 7.5), los tubos se mezclaron "contra gradilla". Se les agregaron 150 µL de solución de lisis SDS (NaOH 5 M, SDS 10%), se volcaron los tubos 2 veces y rápidamente se agregaron 150 µL de sales de neutralización (Acetato potásico 3 M y Ácido Acético 5 M). Se volcaron otra vez dos veces, se le agregaron 80 µL de etanol y se mezclaron en vortex tres veces por 2 seg. Después, las muestras se centrifugaron 5 min a 4 °C por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y fue pasada a tubos eppendorf de 1.5 mL, con 200 µL de isopropanol, y se centrifugaron nuevamente 5 minutos a 13,000 rpm, a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se agregaron 200 µL de etanol al 70%, se centrifugó igual que los anteriores 3 pasos. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y se dejaron volatizar los restos de etanol en el tubo en una campana de flujo laminar. Una vez volatizado el etanol se le agregaron 30 µL de TE con RNAsa, y se guardaron en congelación a -20 °C.

### 6.2.4 Verificación de la restricción del plásmido pGEX-6P-2.

La reacción por enzimas de restricción se siguió según lo establecido en el manual de Thermo Scientific 2010. Para hacer la verificación de restricción se tuvo cuidado en elegir enzimas que cortaran una sola vez el plásmido, y que ambas compartieran el buffer de reacción. El DNA plasmídica extraído de las bacterias previamente transformadas, se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y XhoI. La mezcla de reacción de cada digestión contenían 0.2 µL de cada una de las enzimas, 1 µL de DNA a digerir en un volumen final de 20 µL. Las reacciones se incubaron toda la noche a 37 °C. Los fragmentos esperados para este corte fueron 2 con un peso 1,811 y 3,174 bps. Posteriormente, se corrió en un gel de agarosa al 1%, 6 muestras de la extracción plasmídica digerida, usando como marcador molecular λ EcoRV (Fermentas®) a 110 V por 1 h.

### 6.2.5 Transformación de *E. coli* BL21.

Las células competentes de *E. coli* BL21 se transformaron siguiendo este procedimiento; en tubos eppendorf de 1.5 mL se agregaron 80  $\mu$ L de TB (Transformation Buffer of CaCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ L de plásmido a una concentración de 1 $\mu$ g/ $\mu$ L, y se dejó en hielo por 20 min. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente 10 minutos, y se agregaron 100  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* BL21, para después incubar por 45 minutos a 37 °C. A continuación, los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente y se extrajeron 600  $\mu$ L de sobrenadante, el pellet se resuspendió en lo que resta de medio en el tubo, y se tomaron 150  $\mu$ L para sembrar en agar LB con ampicilina. Se dejaron crecer toda la noche a 37 °C.

### 6.2.6 Expresión de GST.

La expresión de la proteína se realizó de acuerdo al método descrito en GST Gene Fusión System Handbook 1994. De las clonas que lograron crecer en el paso anterior, se picaron 4 colonias, se crecieron en 3 mL de medio LB también con ampicilina toda la noche a 37 °C en agitación. De las bacterias *E. coli* BL21 anteriormente crecidas o/n, se tomaron 4 inóculos de 100  $\mu$ L, y se agregó a 4 tubos Falcon de 50 ML con 10 mL de medio LB con ampicilina 100 mg/mL. Se incubó en agitación a 37 °C hasta lograr una DO<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8, para después ser inculadas con 5  $\mu$ L IPTG 0.5 mM por 4 h. Una vez observado el crecimiento, se centrifugaron los tubos a 4 °C a 5,500 g por 15 min. Se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de PBS 1X a pH 7.4. El pellet celular se pasó a tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior lisis por sonicación. Los tubos con el paquete celular se incubaron sobre hielo un cuarto frío a -4 °C. Para la lisis de la célula se usó una sonda ultrasonic FISHERBRAND® con micropunta por 2 ciclos 90 seg. Hasta que el medio se viera transparente. Después de sonicar se centrifugaron las muestras a 20,000 rpm por 30 min. a 4 °C, se extrajo el sobrenadante y se vertió a tubos eppendorf de 1.5 mL. El pellet resultante se resuspendió con 50  $\mu$ L de PBS 1x (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl y 10 mM buffer de fosfatos a pH 7.4). Las muestras resuspendidas, se corrieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% a 110 V por casi 2 h.

Una vez que se comprobó en el gel SDS-PAGE una banda de 25 kDa, que corresponde al peso de GST, se procedió a producirla en gran cantidad, para posteriormente purificarla. En un matraz Erlenmeyer con 1 L de medio LB con ampicilina 100 mg/ml, se agregó 1 mL de bacterias transformadas crecida previamente en medio LB con ampicilina. Se incubó por en agitación a 37 °C, hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8, posteriormente, la expresión se indujo

con 500  $\mu$ L de IPTG 1 mM por 3 h. Después, las células se centrifugaron a 20,000 rpm por 30 min a 4 °C. Una vez centrifugados, el líquido de cultivo, se desechó sobrenadante y el pellet se introdujo a nitrógeno líquido por 5 min. Se resuspendió el pellet en 25 mL de buffer PBS 1X pH 7.4 y se vertió posteriormente en un tubo Falcon 50 mL para lisar las células. Se sonicó por 10 min bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Una vez lisadas las células se centrifugó por 30 min a 20,000 rpm a 4 °C. Se recuperó todo el sobrenadante para con este hacer la purificación de la proteína.

### 6.2.7 Purificación de proteína.

La purificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de GST Gene Fusión System Handbook 1994 usando el equipo de cromatográfico Äkta ® para la purificación de proteína. Los buffers requeridos fueron: buffer de elución GST (50mM Tris-HCl, 10 mM de GSH, pH 8.0), PBS 1X ( 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl y 10 mM buffer de fosfatos a pH 7.4.) y como fase estacionaria Glutación sefarosa GST<sub>TRAP</sub> GE® de 1 mL a 4 °C con un flujo de 1 mL/min.

Para insertar la muestra de donde se pretendía purificar GST. Previamente La columna se lavó con Agua mili Q, y para equilibrarla con buffer PBS 1X pH 7.4. Una vez hecho esto se inyectó la muestra (15 mL). Primero en la columna se inició lavando con el buffer PBS 1X pH 7.4, para eliminar las proteínas no fueran GST. Una vez hecho esto se procedió a lavar con el buffer de elución GST, finalmente como lavado de la columna se volvió a usar PBS 1X. Todas las fracciones las cuales fueron de 1 mL, fueron colectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los resultados de la cromatografía de afinidad fueron expresados en un cromatograma, que registró todo lo eluido a una  $DO_{280\text{nm}}$ .

Para tener una enzima cromatográficamente pura, se realizó una segunda cromatografía, Cromatografía por exclusión molecular (SEC), esta técnica realizó según el método Pierce® Glutathione Agarose de Thermo scientific 1997. Para esta cromatografía se usó el equipo cromatográfico Äkta ®. Los buffers requeridos fueron: buffer de elución GST: (50mM Tris-HCl, pH 8.0 contiene 10 mM de glutatión reducido) y Buffer de lavado/calibración: (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0). Se utilizó una columna Superdex 10/30 200, con un superloop de 500  $\mu$ L todo esto se realizó a una temperatura de 4 °C con un flujo de 0.5 mL/min.

Para esta cromatografía se tomaron solo las fracciones de la cromatografía de afinidad donde se observó GST. Estas fracciones fueron pasadas a una membrana de diálisis de 25 mm, la cual fue sumergida en buffer PBS 1X pH 7.4 previamente filtrado y se dejó sumergida toda la noche a -4 °C. Antes de inyectar

la muestra, primero se lavó la columna con agua mili-Q, y después se lavó con el buffer de lavado pH 8. Una vez lavada la columna se procedió a equilibrarla, para esto se usó el mismo buffer de lavado. Cuando la columna estuvo equilibrada se procedió a inyectar la muestra (2 mL). Después se usó el buffer de elusión para obtener la enzima. Se obtuvieron 10 fracciones en tubos de 2 mL. Los resultados de la cromatografía de exclusión molecular fueron expresados en un cromatograma, se leyó a 280 nm.

Se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS PAGE al 12% a 200 V por 2 h, 3 fracciones que correspondían a GST según el pico indicado en cromatograma. Como marcador molecular se usó kaleidoscope de Bio-Rad® con un rango de 10-250 kd. En el gel se colocaron solo las 3 eluciones que correspondían a GST según el pico indicado en cromatograma.

Finalmente, las fracciones que contenían la enzima GST se liofilizaron. Brevemente, en una membrana de diálisis de 25 mm se vertieron solo las fracciones que habían expresado ser GST, se sumergió la membrana en buffer PBS 1X pH de 7.4 toda la noche a -4 °C. Después las eluciones fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL vertiendo en estos, solo 500 µL de las eluciones. Fueron colocadas en el liofilizador que hizo un vacío de 30 mTorr a 17 °C durante 24 horas.

### **6.3 Determinación de la actividad de GST.**

Para calcular la actividad enzimática, se utilizó el promedio de las diferencias del cambio de absorbancia a 340 nm, después de restar la línea basal (blanco) y el coeficiente de extinción molecular del producto ( $9,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad enzimática se expresó en nmoles de producto/min mg de proteína total del extracto.

La determinación de la actividad de GST se tomó como sustrato estándar al CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzenu). Esta determinación fue previamente estandarizada por nuestro grupo de trabajo (Cota, 2010 y Ramírez, 2012). Con este procedimiento se determina el cambio de absorbancia del producto del CDNB al ser conjugado con GSH por la enzima GST para la formación del tioéster, en donde el pico máximo de absorbancia se presenta a 340 nm (Ramírez, 2013). De esta manera, para determinar la actividad enzimática, se agregaron, en una celda de cuarzo (para espectrofotometría), 25 µL de CDNB 40 mM a 900 µL del amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 M (pH 6.5) más 50 µL de GSH 0.1 M (pH 7.0) y el extracto enzimático. Se midió con el cambio de absorbancia a 340 nm cada 30 s durante los tres primeros min. Previo a ello, se leyó la línea basal antes de agregar

el extracto enzimático. Posteriormente, con los datos de las absorbancias resultantes se calcula el promedio del cambio de absorbancia por minuto con y sin la enzima. Al cambio de absorbancia con la muestra enzimática se le restó el cambio de absorbancia basal. A partir de dicho dato se calculó la actividad enzimática utilizando el coeficiente de extinción molecular del producto ( $9,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Habig y Jakoby, 1981). Así, la actividad enzimática se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Ae = \frac{(\Delta A_m - \Delta A_b) \left( \frac{V_{750} + V_p}{V_e} \right) 10^6}{\text{prot}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde Ae=actividad enzimática en nmoles de producto (en nmoles de producto/min-mg de proteína), Ve=volumen del extracto enzimático colocado en la cubeta de cuarzo (en  $\mu\text{L}$ ), prot=concentración de proteína (ver siguiente apartado) en ese extracto enzimático (en  $\text{mg/ml}$ ),  $\epsilon$ =coeficiente de extinción molecular ( $9,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), b=peso de la luz (1  $\text{cm}$ ),  $10^6$ =factor de conversión de  $\text{M}$  a  $\text{nmoles/ml}$ ,  $\Delta A_m$ =promedio del cambio de absorbancia de la muestra/min,  $\Delta A_b$ =promedio del cambio de absorbancia de la línea basal. Este cambio se calcula de la siguiente manera:

$$\Delta A_x = \frac{\sum_{t=0}^n (A_{t+1} - A_t)}{0.5(n-1)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $A_t$  es la medición de absorbancia a un tiempo  $t$ , y  $A_{t+1}$  es la absorbancia del tiempo siguiente. 0.5 es el factor de corrección para expresar la diferencia por minuto, porque las  $n$  (seis) mediciones se realizaron cada 30 s. De esta manera  $\Delta A_m$  y  $\Delta A_b$  es el promedio del cambio de las absorbancias de la muestra y de la línea basal respectivamente.

#### 6.4 Determinación de proteínas totales.

La determinación de la proteína total se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. La concentración de proteína se calcula a partir de una curva estándar con BSA a diferentes concentraciones conocidas que van desde 0.001 a 1.5  $\text{mg/mL}$ . La concentración de proteína en la muestra se calcula a partir de la interpolación de la absorbancia observada a 750  $\text{nm}$  de la muestra en la curva estándar. Para esta determinación se utilizan tres soluciones: solución A (NaOH 2 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 g, tartrato de sodio y potasio 0.134 g, aforado a 500 mL con agua), solución B (Sulfato cúprico al 0.5%) y solución de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich).





En tubos de ensaye de 5 mL se hicieron reaccionar 2  $\mu$ l de muestra de GST pura con 2 mL del reactivo de Lowry (preparado de partes iguales de la sol. A y la sol. B) y se agitó en vórtex. Después sin dejar pasar tiempo, se agregaron 100  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu y se agitaba en Vortex inmediatamente. Se dejaron reaccionar por 40 a 50 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro visible de Thermo Scientific®. Cada determinación se realizó por duplicado.

#### **6.5 Diseño de oligonucleótidos para el gen *nahH* (catecol 2,3 dioxigenasa).**

Para el diseño de los oligonucleótidos se tomó en cuenta las secuencias conservadas de los sitios de flaqueo del gen catecol 2,3 dioxigenasa. Para obtener lo anterior, se usaron los siguientes programas informáticos.

Primero se localizó en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), la secuencia codificante del gen catecol 2,3 dioxigenasa, después se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), y se obtuvieron las secuencias que se presentaron una identidad de más del 90%. De las secuencias obtenidas en BLAST, se realizó un multialineamiento para identificar la secuencia consenso entre las áreas del flaqueo del gen. Finalmente se usó la base de datos MEME (Multiple Expectation-maximization for Motif Elicitation) para identificar los aminoácidos altamente conservados en las secuencias de flaqueo de la proteína catecol 2,3 dioxigenasa.

## 7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 7.1 Transformación de *E.coli* BSJ y BL21.

Se logró transformar las células competentes de *E.coli* BSJ. De estas células transformadas seleccionadas en presencia de ampicilina, se tomaron 6 clones para hacerles extracción plasmídica por miniprep con lisis alcalina. La verificación de los plásmidos por medio de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI*, produjo dos bandas del tamaño esperado, una de 1,811 pb y la segunda de 3,174 pb (Figura 6). El esquema del plásmido pGEX-6P-2-GST mostrado en la Figura 5, señala los sitios de corte de las enzimas usadas en este trabajo y los fragmentos producto de estas digestiones, lo que corresponde a los resultados obtenidos. Las bandas que se observaron en el gel según el marcador de peso molecular,  $\lambda$ BstEII, fueron las esperadas.

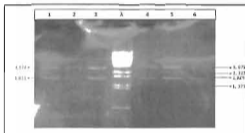


Figura 6. Fotografía escaneada de electroforesis de ADN plasmídico digerido con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*. Los plásmidos purificados a partir de seis clones de *E. coli* BSJ, transformadas con el plásmido pGEX-6P-2-GST, se digirieron con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*. En los carriles 1 a 3 y 4 a 6 se muestran los productos de digestión observados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 1%. En el carril marcado como  $\lambda$ , se muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ BstEII.

Otras investigaciones ya han probado estos métodos obteniendo resultados parecidos a los nuestros, como lo hicieron en trabajos en el uso GST como proteína de fusión. La proteína se expresó en *E. coli* BL21, transformada con un vector pGEX, con el segmento de GST situado en el extremo N-terminal seguido por la proteína diana. Donde el uso de GST fue como etiqueta de fusión fue el esperado, puesto que puede actuar como una chaperona para facilitar el plegamiento de proteínas (Harper y Speicher, 2011). Los plásmidos pGEX son



comúnmente utilizados por sus altos niveles de expresión de proteínas recombinantes. El uso de *E. coli* BL21, se usa como un sistema de expresión muy eficiente por la versatilidad que tiene para su posterior purificación, además de ser ideal para la expresión de proteína, por la delación del gen *ompT* el cual confiere una deficiencia de proteasas y con esto se evita degradar productos recombinantes (Rojas, 2007).

### 7.2 Expresión de GST.

Después de ser confirmado el plásmido objetivo, se transformó con el mismo la cepa *E. coli* BL21 para expresar las proteínas GST. Las bacterias que fueron clonadas se recrieron, inducidas con IPTG para después lisarse, se extrajo la proteína y se corrió en un gel de Gel de SDS-PAGE (Figura 8), donde se observaron bandas de 25 kDa que corresponde al tamaño esperado para la enzima GST.

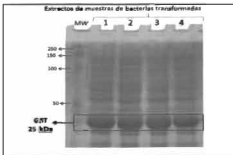
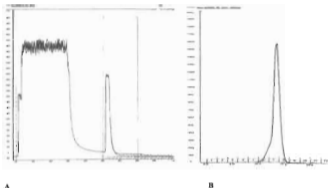


Figura 7. Gel de SDS-PAGE de eluciones de GST, Gel de SDS-PAGE (12% Bis-Tris) los números de los carriles representan a las muestras lisadas enumeradas del 1 al 4. En el carril sin número se muestra el marcador de peso molecular kaleidoscope Bio-Rad.

### 7.3 Purificación de la enzima GST por cromatografía de afinidad y de exclusión por tamaño.

La purificación de GST por afinidad (Figura 8-A) resulta ser una de las más acertadas para esta enzima sin que sufra desnaturalización, como lo describe Harper y Speicher, 2011. Con la cromatografía de afinidad se logró purificar la proteína glutatión y otras con éxito y se han utilizado en estudios inmunológicos,

determinaciones de estructura, producción de vacunas, proteína-proteína, y estudios de interacción proteína-DNA y otros análisis bioquímicos (Harper y Speicher, 2011).

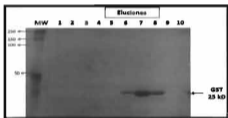


**Figura 8. Cromatogramas de purificación de GST.** En la figura A se muestra el resultado de la cromatografía por afinidad con glutatión sefarosa, columna, GSTrap, 1 ml/min, 4° C, la línea azul representa la absorbancia a 280 nm, la línea verde indica el gradiente de la elución. En la figura B se muestra el cromatograma por exclusión molecular GST, columna Superdex 10/30 200 pg, 0.5 ml/min, 4 °C. La línea azul representa la absorbancia a 280 nm.

Para el caso de la cromatografía por exclusión de tamaño (Figura 8-B) el pico resultante implica el volumen de elución que se determina desde la base del pico hasta su límite equivalente del principio o al final de la zona. Esta posición de elución refleja el tamaño promedio de la proteína en su concentración de carga inicial entre mas alto el pico, mayor concentración (Legaz y col, 2011). Aunque bien si se comparan ambos diagramas (Figura 8) el pico cromatográfico es igualmente puro, pues en ambos casos no se detectan contaminaciones u otras proteínas diferentes a GST que habrían resultado con la aparición de otros picos en el cromatograma. De esta manera, la enzima tiene una gran confiabilidad con respecto a que se está obteniendo la proteína pura.

En investigaciones recientes, la GST sigue siendo purificada por métodos semejantes al nuestro como en el caso de Ghoshal y Ghosh en 2014, donde usan a GST como etiqueta de un factor cancerígeno sFRP1. Se clonó en pGEX-4T2 vector de expresión y la proteína recombinante se sobreexpresó en *E. coli* BL21. Para purificarla utilizaron cromatografía de afinidad de glutatión agarosa y finalmente la proteína purificada se caracterizó mediante Western Blot, y el análisis de espectroscopia de dicroísmo circular (Ghoshal y Ghosh, 2014). Aunque bien en este caso GST no es la proteína objetivo.

Las eluciones resultantes de cromatografía de exclusión molecular, se corrieron en Gel de SDS-PAGE al 12% para corroborar el peso y pureza de la proteína GST (Figura 9). Se puede observar que de las fracciones 6 a 9 se observa una proteína electroforéticamente pura, de 25 kDa que corresponde al tamaño esperado para la enzima GST.



**Figura 9. Gel de SDS-PAGE de las fracciones de GST.** Las fracciones de cromatografía de exclusión por tamaño se sometieron a electroforesis de policacrilamida (12%) desnaturizante. Se muestra la banda que corresponde a GST. Los números del 1 al 10 señalan la fracción cromatográfica de exclusión por tamaño descrito en la Fig. 3. MW: Marcador de peso molecular kaleidoskope de Bio-Rad.

El gel corrobora lo obtenido en los cromatogramas. En el gel se puede ver que la elución 7 muestra una banda más abundante en comparación en las otras lo cual coincide con el pico alto del cromatograma de exclusión molecular. Por lo que se vuelve a observar una enzima pura.

#### 7.4 Actividad enzimática de GST.

A la proteína purificada se le determinó la actividad enzimática y se observó la absorbancia del producto de la reacción de GSH y CDNB a 340 nm. Dicha determinación se hizo por triplicado. Los resultados se muestran en la Figura 10.



La actividad de GST pura sin sustrato, no muestra actividad significativa puesto que los valores obtenidos de absorbancia casi son constantes. La actividad de GST pura con sustrato (CDNB más GSH) es evidente con el incremento de la absorbancia del producto. El valor de la actividad enzimática es de  $1.2 \pm 0.2 \cdot 10^6$  nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína.

Finalmente, la actividad obtenida de GST  $1.2 \pm 0.2 \cdot 10^6$  nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína, demuestra que es mucho más alta que los obtenidos en otros estudios. Sobre todo si se le compara con la actividad de GST en la bacteria del presente proyecto, la cual es virtualmente cero.

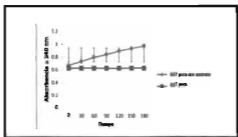


Figura 10. Cambio de la absorbancia a 340 nm por GST. A GST purificada se colocó en amortiguador de PBS 1X pH. 7.4 (pH 7.0), se le agregó CDNB 40 mM y GSH 0.1M (línea azul) y GST. Como blanco se colocó la GST sin los sustratos a la misma concentración (línea roja). Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar de una muestra determinada por triplicado.

En el mosquito *Culex quinquefasciatus* tras ser expuesto al xenobiótico lambda-dialotrina presentó una actividad de GST (utilizando CDNB 40 mM y GSH, y buffer de fosfato 0,1 M, pH 7,4) de 0.171 nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína (Díaz y col., 2004). La actividad GST en la membrana sinovial de las articulaciones metacarpofalángicas normales provenientes de animales equinos fue de  $84, 45 \pm 7,92$ , nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína y en las alteradas fue de  $74, 88 \pm 5, 27$  nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína (Galleguillos y col., 2012). La actividad GST está presente en fracciones citosólicas y mitocondriales analizadas. De acuerdo a Frova (2003), la GST presente en mamíferos se relaciona más con respuesta inmune más que con respuesta a contaminantes. La estudiada en este proyecto de origen bacteriano se encuentra implicada mayormente en la degradación de compuestos xenobióticos.

Como se puede notar en las actividades enzimáticas citadas anteriormente, es mucho menor con respecto a la obtenida en esta investigación. Esto resulta de una manera esperada puesto que un organismo natural ya sea expuesto o no, habrá otras enzimas o mecanismos que respondan a ciertos factores ambientales. Por ello la actividad de la enzima se verá variable, a diferencia de cuando es GST pura. Lo que sí cabe destacar es que en los estudios aquí citados, GST es una de las enzimas que por lo regular se relaciona con la resistencia o repuesta de los organismos a compuestos contaminantes, siendo a veces esta sugerida como posible degradadora. Pero cabe mencionar que aunque la enzima GST ha sido muy estudiada desde su caracterización a su purificación, no hemos encontrado publicaciones a la fecha, sobre algún resultado de actividad de GST que se asemeje a los nuestros, es decir, donde se mida la actividad de la enzima pura. Todos los reportes de investigación encontrados, miden la actividad de esta enzima en organismos, puesto que la enzima es tomada en cuenta como biomarcador, como factor de resistencia, o en respuestas a daño oxidativo.

En otras investigaciones también se ha purificado GST, pero es usada frecuentemente como proteína fusionada y no como proteína objetivo como es nuestro caso. En la investigación de Harper y Speicher en 2011, por ejemplo, se usó la GST como proteína de fusión del para inducir, la expresión de proteínas de alto nivel y purificación a partir de lisados de células bacterianas. El uso de GST como una etiqueta de fusión es conveniente, ya que puede actuar como una chaperona para facilitar el plegamiento de proteínas, y con frecuencia la proteína de fusión se puede expresar como una proteína soluble en lugar de en cuerpos de inclusión (Harper y Speicher, 2011). Por lo que resulta novedoso y sustentable, nuestra propuesta de: usar esta enzima con enfoques de remediación ambiental, como degradadora de compuestos orgánicos persistentes del ambiente.

#### **7.5 Análisis bioinformático de las secuencias del gen codificante de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa y diseño de oligonucleótidos.**

En una búsqueda detallada de los genes que codifican para catecol 2,3-dioxigenasa se localizó al gen *nahH* de origen cromosomal reportado para *Pseudomonas putida* de origen ambiental (NCIB 9818-4) (Ghosala, 1987; Dennis y Zylstra, 2004). La secuencia del gen se obtuvo de la base de datos Keeg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/>).

Para diseñar de un par de oligonucleótidos que permitieran la amplificación total del gen *nahH*, fue necesario realizar un análisis bioinformático con la finalidad de comprobar la identidad de la secuencia en ambos extremos del gen. De igual forma, se buscó la identidad de las regiones usando las secuencias de

aminoácidos del producto de los genes *nahH* analizados. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos Keeg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/>).

Con la secuencia de aminoácidos se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con el uso del programa *blastp* (disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con lo anterior, se logró identificar las secuencias de enzimas catecol 2,3 dioxigenasa provenientes de diversos reportes de *P. putida*. Se seleccionaron las secuencias que mostraron homología con los criterios de *e-value*  $\leq 0$ , *identity* 100%. La búsqueda se realizó considerando el parámetro "Non-redundant protein sequences" (Figura 11). Únicamente se consideraron secuencias homólogas de *P. putida* (NCIB 9816-4), ya que es uno de los géneros bacterianos ambientales reportados con capacidad degradativa de COPs, por la acción de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa (Dennis y Zylstra, 2004). Lo anterior se realizó para poder determinar la constancia o variabilidad en los extremos amino y carboxilo. Las secuencias homólogas encontradas (Figura 12), se sometieron a un multialineamiento por medio del programa bioinformático ClustalW 2.1 [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

Accession	Score	Cons	Pos	Id%	Sim	Accession
C_000011.0.unannotated.Pseudomonas.putida.refseq.M02160	61	61	100%	11	100%	AF_032027
C_000011.0.unannotated.Pseudomonas.putida	60	60	100%	11	100%	AF_032028
C_000011.0.unannotated.Pseudomonas.putida	57	57	100%	11	100%	AF_032029

**Figura 11. BLAST de la secuencia de los aminoácidos de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa. *P. putida* NCIB 9816-4 resultó con los mayores valores de identidad para la enzima.**

De un total de 10 secuencias analizadas, se muestran alineadas en la Figura 13, las tres primeras secuencias de aminoácidos. Como resultado del MSA, se determinó la variabilidad en las regiones amino y carboxilo terminal de los aminoácidos (Figura 12). El número de secuencias analizadas mostró diferencias no conservativas en ambos extremos, por tanto esto es el resultado consecuente de diferencias a nivel de las secuencias nucleotídicas. Por tanto, los resultados sugieren que para diseñar un par de oligonucleótidos que permitan amplificar el gen *nahH* en su totalidad, se debe considerar dichas variabilidades. Al realizar el multialineamiento nucleotídico, se determinó de igual forma diferencias en la secuencia de ambos extremos.



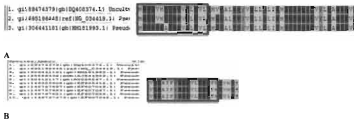


Figura 12. Alineamiento múltiple los aminoácidos de la catecol 2,3 dioxigenasa. El MSA se realizó con el programa ClustalW 2.1 y se determinó variabilidad en las regiones amino (A) y carboxilo (B) terminal.

En la Figura 13 se muestran los resultados del MSA realizado a las secuencias nucleotídicas del gen *nahH* obtenidas de la base de datos del NCBI. En consecuencia, al igual que se determinó variabilidad en las secuencias de aminoácidos, estos resultados muestran la necesidad de trabajar con una cepa de *P. putida* de colección y preferentemente, que su secuencia se encuentre reportada en alguna de las bases de datos disponibles, por ejemplo Kegg y NCBI. Lo anterior para asegurar la amplificación del gen buscado con el uso de los oligonucleótidos que se diseñen. No obstante, se diseñaron un par de oligonucleótidos para ambas regiones variables, los cuales consideran la incorporación de degeneraciones (Figura 13). Sin embargo, los oligonucleótidos propuestos incrementaron en más de un 50% la proporción de G y C. Por lo anterior, se subraya una vez más, la importancia de realizar la amplificación del gen *nahH* de una cepa de *P. putida* cuya secuencia se encuentre en la base de datos, por ejemplo la cepa que se trabajó en este análisis (NCIB 9816-4).

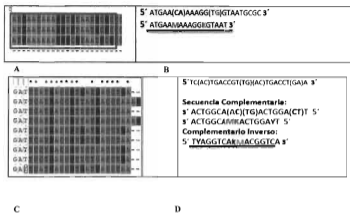


Figura 13. MSA del gen *nahH* en secuencias de *P. putida* y oligonucleótidos propuestos para su amplificación. Se muestra el MSA para los extremos 5' (A) y 3' (C) del gen *nahH*. Considerando la variabilidad encontrada en ambos extremos, se diseñaron los oligonucleótidos *Forward* (B) y *Reverse* (D), para lo cual se consideró la incorporación de degeneraciones. Ambos oligonucleótidos, se marcan con una línea roja.

Por otra parte, para el diseño de los oligonucleótidos, se deberán considerar agregar las secuencias de corte enzimático, con la finalidad de que el amplicón generado, pueda ser clonado en un vector. Esta estrategia permitirá la posterior expresión de la enzima y finalmente su purificación con usos en biorremediación.

## **8. CONCLUSIONES**

- La proteína GST recombinante mostró actividad enzimática.
- La actividad de la enzima GST determinada en este trabajo fue de  $1.2 \pm 0.2 \cdot 10^6$  nmoles producto/min/ $\mu$ g proteína.
- Las secuencias nucleotídicas del gen *nahH* que codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, presentan variabilidad en las regiones 5' y 3'.
- Las secuencias de aminoácidos de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, presentan variabilidad en las regiones amino y carboxilo terminal.
- La variabilidad determinada por los análisis bioinformáticos sugieren amplificar el gen a partir de una cepa tipo cuya secuencia se encuentre reportada en algunas de las bases de datos disponibles.

## **9. PROSPECTIVAS**

- Amplificar el gen de la dioxigenasa para su posterior clonación, y purificación, para su uso en biorremediación.
- Debido a la promiscuidad que la GST y la dioxigenasa presentan, podrían ser utilizadas para biorremediar diferentes contaminantes. Por lo que se podría probar su eficacia para degradar contaminantes aromáticos halogenados.
- Crear un biorreactor con las enzimas, donde se puedan ingresar suelos contaminados con organoclorados para su biorremediación.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- **Ajao A, Kannan M, Yakubu S.** Homology modeling, simulation and molecular docking studies of catechol-2,3-dioxygenase from *Burkholderia cepacia*: Involved in degradation of petroleum hydrocarbons. 2012. *Bioinformation*. 8(18): pag. 848–854.
- **Alexander M.** Biodegradation and Bioremediation 2nd Edition. U.S.A. Academic Press. 1999.
- **Amersham Biosciences.** GST Gene Fusion System Handbook. 18-1157-58. 1994.
- **Arias E, Lastra J.** Tecnología Enzimática. Monografías. 2012.
- **Bacosaa HB, Inouea C.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. 2014. *J Hazard Mater*. 283. pag. 689–697.
- **Brock TD.** Biología de los microorganismos, 12ª Edición. Addison-Wesley. 2009.
- **Brzezinski J, Prasov L, Glaser T.** Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle. 2012. *Dev Biol*. 365(2): pag. 395–413.
- **Convención de Estocolmo.** Secretaría del Convenio de Estocolmo Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) International Environment House (IEH)
- **Copley SD.** Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. *Nat Chem Biol*. 2009. 5(8): pag. 559-566.
- **Cota Ramírez EL.** Determinación de la enzima Glutación S transferasa en *Ocimum basilicum*. 2010. Tesis de licenciatura para QFB Universidad Autónoma de Nayarit. México. 24 pp.
- **Darko G, Akoto D, Oppong C.** Persistent organochlorine pesticide residues in fish, sediments and water from Lake Bosomtwi, Ghana. 2008. *Chemosphere*. 72(1): pag. 21-4.
-

- **Díaz C, Rodríguez MM, Fresneda M, Bisset J.** Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. 2004. *Rev Cubana Med Trop*. 56 (2): pag. 111-116.
- **Douillarda FP, Mahonya J, Campanacci V, Cambillauc C, van Sinderen D.** Construction of two *Lactococcus lactis* expression vectors combining the gateway and the Nisin controlled expression systems. 2011. *Plasmid*. 66 (3): pag. 129-135.
- **Environmental Protection Agency.** EPA. Introduction to Phytoremediation National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati. 2000. Ohio pag.104.
- **Eqani SA, Malik RN, Cincinelli A, Zhang G, Mohammad A, Qadir A, Rashid A, Bokhari H, Jones KC, Katsoyiannis A.** Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: The case of River Chenab. *Sci Total Environ*. 2013. 450. pag. 83-91.
- **Frandsena KS, Gissel H, Hojman P, Eriksen J, Gehl J.** Calcium electroporation in three cell lines: a comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions. 2014. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar. 1840(3):1204-8.
- **Frova C.** The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum*. 2003. Wiley. 119(4): pag. 469-479.
- **Galleguillos M, Plaza de los Reyes R, Kessi E, González E, Letelier ME, Valdívia G, Adames H.** Actividad glutatión S-transferasa en la membrana sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. 2012. *Arch Med Vet* 44, 179-183.
- **Galván Cejudo A, Tejada M, Camargo A.** Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante. 1990. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Córdoba.
- **Ghosal D, You IS, Gunsalus IC.** Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xyIE* of TOL pWWO. 1987. *Gene*. 55(1): pag.19-28.
- **Ghoshal A, Ghosh SS.** Expression, Purification, and Therapeutic Implications of Recombinant sFRP1. 2014. *Appl Biochem Biotechnol*. 33. pag. 2826-2835

- **Hamdy A. Hassan, Zain Eldein AA, Risk NMH.** Cloning and Kinetic Properties of Catechol 2,3-dioxygenase from Novel Alkaliphilic BTEX-
- degrading *Pseudomonas* sp. HB01.2014. *Life Science Journal*. 11(2): pag. 353-360.
- **Harper S, Speicher DW.** Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. 2010. *Methods Mol Biol*. 681, pag. 259-280.
- **Hayes JD, Pulford DJ.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. 1995. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 30(6): pag. 445-600.
- **Huan Y, Xun R., Chen G., Xun L.** Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PopF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenolicum*. 2008. *J. Bacteriol*. 190(23): pag. 7595-7600.
- **Hwang IH, Takahashi S, Matsuo T, Matsuo T.** Decomposition of organochlorine compounds in flue gas from municipal solid waste incinerators using natural and activated acid clays. 2014. *J Air Waste Manag Assoc*. 64(9): pag. 1021-1027.
- **Inostroza AA, Pantoja S, González R.** Actividad enzimática de metanótrofos marinos y su uso potencial en biorremediación. 2011. *Gayana*. 75(2): pag. 138-145.
- **Jeon CO, Park W, Padmanabhan P, DeRito C, Senepe JR, Madsen EL.** Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for *in situ* biodegradation in contaminated sediment. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(23): pag. 13591-13596.
- **Karavangeli M, Labrou NE, Clonis YD, Tsaftaris A.** Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. 2005. *Biomol Eng*. Vol. 22 (4): pag. 121-128.
- **Karigar CS, Rao SS.** Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. 2011. *Enzyme Res*. 2011. pag. 11.
- **Konietzny U, Greiner R.** The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. 2003. *Braz. J. Microbiol*. 34(4): pag. 283-300.

- **Lee DH, Jacobs DR.** Hormesis and public health: can glutathione depletion and mitochondrial dysfunction due to very low-dose chronic exposure to persistent organic pollutants be mitigated? 2014. *J Epidemiol Community Health.* 68(12): pag. 20-31.
- **Legaz González ME, Sacristán San Cristóbal M, Díaz Peña ME, Alarcón Aguares B, Córdoba CV.** Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) 2011. Reduca (Biología). Serie técnicas y métodos.4 (3): pag.1-32.
- **Liu G, Li J, Yin L, Liu L, Qi H, Wu Y.** Distribution characteristics of organochlorine pesticides in surface and vertical sediments from the Zha Long Wetland, China. 2012. *Environ Sci Pollut Res Int.* 19(7): pag. 2681-2689.
- **Melchor Partida GN, Martínez Rizo AB, Muñiz Hernández S, Rendón Ramírez AL, Velázquez Fernández JB.** Chapter 16: Some Enzymes Useful for Bioremediation Technologies on Organic Pollutants. 2013. En: Velázquez Fernández JB y Muñiz Hernández S. Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects. U.S.A. NOVA. pag. 354
- **Narváez Valderrama JF, Palacio Baena JA, Molina Pérez FJ.** Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad. 2012. *Revista Gestión y Ambiente.* 15 (3): pag. 27-38.
- **Okuta A, Ohnishi K, y Harayama S.** Construction of chimeric catechol 2,3-dioxygenase exhibiting improved activity against the suicide inhibitor 4-methylcatechol. 2004. *Appl Environ Microbiol.* 70(3): pag.1804–1810.
- **Olguín EJ, Hernández M. E., Sánchez G.** Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. 2007. *Rev. Int. Contaminación Ambiental.* 23(3): pag.139-154.
- **Ramírez-Sandoval M.** Efecto del endosulfán sobre la actividad de glutatión-S-transferasa de *Ocimum basilicum* L. 2013. Tesis de licenciatura para QFB, Universidad Autónoma de Nayarit. México. 34 pag.
- **Rojas Molano A.** Evaluación de dos clones de *E. coli* transformados mediante un vector plásmico con el ADN complementario de la Iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. 2007. Tesis de licenciatura para Microbiólogo Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 70 pag.
- **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** *Molecular cloning.* Second edition. U.S.A. 1989.

- **Sankararamakrishnan N**, Kumar Sharma A, Sanghi R. Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India, 2005. *Environ Int.* 31(1): pag. 113–120.
- **Sawulski P**, Clipson N, Doyle E. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. 2014. *Biodegradation.* 25(6): pag. 835-47.
- **Smith DB**, Johnson K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. 1988. *Gene.* 15,67(1): pag. 31-40.
- **Souza Casadinho J**. Expansión de los monocultivos; demanda de agrotóxicos e impacto socioambiental. 2013. *ALAI, América Latina en Movimiento.* 07-19.
- **Vallejos J**, Churata E, Mollinedo. Evaluación de actividad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. 2013. *Rev. Bol. Quim.* 31(1) pag. 5-9.
- **Velázquez Fernández JB**, Ramirez Sandoval M., Domínguez Ojeda D., Martínez Rizo A.B. Biodegradation and bioremediation of organic pesticides, Capítulo 12. 2012. En: Mitsch WJ, Stokes A, Jones CG, and Clive G. *Ecological Engineering-Its Development, Applications and Challenges.* Elsevier
- **Velázquez Fernández JB**, Muñiz Hernández S. Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects. U.S.A, NOVA. 2013.
- **Wildt S**, Gerngross TU. Humanization of N-glycosylation pathways in yeast. 2005. *Nat Rev Microbiol.* 3(2): pag. 119-26.
- **Ying X**, Hang M, Gang R, Zhen-mei L, Ji L, Yang-fang Y, Xue-jun D. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. 2005. *Biodegradation.* 16 (5), pag. 393-402.