



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Generación y caracterización de versiones truncadas de la  
enzima tirosinasa MelAc de *Rhizobium etli* expresada en  
*Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

María Alejandra Mejía Caballero

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Guillermo Gosset Lagarda  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gloria Saab Rincón  
Dr. Lorenzo Segovia  
Instituto de Biotecnología

MÉXICO, D. F. Octubre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Guillermo Gosset Lagarda. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca para estudios de maestría de CONACyT. Además se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

# Índice

Índice.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de tablas .....	V
Resumen.....	1
Introducción .....	2
Tirosinasas.....	2
<i>Tirosinasas bacterianas</i> .....	4
<i>Aplicaciones biotecnológicas de las tirosinasas</i> .....	6
Melanina.....	7
• Melanina en plantas .....	9
• Melanina en mamíferos.....	9
• Melanina en bacterias .....	9
Antecedentes.....	11
Expresión y caracterización de la enzima MelA en <i>E. coli</i> .....	11
Evaluación de las condiciones óptimas para la producción de eumelanina utilizando una cepa de <i>E. coli</i> que expresa el gen <i>melA</i> .....	12
Generación y caracterización de mutantes del gen <i>melA</i> .....	12
Justificación .....	15
Hipótesis.....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos particulares .....	16

<b>Metodología</b> .....	17
Cepas y plásmidos.....	17
Técnicas genéticas y de DNA recombinante.....	18
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
Purificación de DNA.....	22
Reacciones de restricción.....	23
Reacciones de ligación.....	23
Transformación bacteriana.....	24
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	24
Medios de cultivo.....	24
Condiciones de cultivo .....	24
Caracterización de las clonas obtenidas.....	25
Extracción de ácidos nucleicos totales.....	25
Evaluación cuantitativa de producción de eumelanina de las clonas de la biblioteca ..	25
Cuantificación de proteína por el método de Bradford .....	26
Predicción de la estructura terciaria de la proteína MelA .....	26
Construcción del árbol filogenético para la proteína MelAc .....	27
<b>Resultados y discusión</b> .....	28
Predicción de la estructura terciaria de la proteína MelA .....	28
Deleciones en el gen <i>melA</i> utilizando la técnica “Delete primer” .....	33
Evaluación cuantitativa de producción de melanina de las clonas de la biblioteca .....	37
<b>Conclusiones</b> .....	42
<b>Perspectivas</b> .....	43
<b>Referencias</b> .....	44

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Centro de unión a cobre tipo 3 de las tirosinasas .....	2
<b>Figura 2.</b> Reacciones catalizadas por la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1) .....	3
<b>Figura 3.</b> Configuración de los átomos de cobre y oxígeno del centro catalítico de la enzima... ..	4
<b>Figura 4.</b> Estructuras cristalizadas de tirosinasas .....	5
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de síntesis de Eumelanina y Feomelanina .....	8
<b>Figura 6.</b> Alineamiento múltiple del extremo N-terminal de MelA con otras tirosinasas .....	13
<b>Figura 7.</b> Esquema de la mutante MelAc .....	14
<b>Figura 8.</b> Ejemplo de oligonucleótidos utilizados para generar el banco de versiones truncadas del gen <i>melAc</i> .....	21
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de las primeras cuatro secuencias utilizadas como molde para el modelo de la estructura de la proteína MelA .....	30
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético de las secuencias de tirosinasas .....	31
<b>Figura 11.</b> Modelo de la proteína MelA generado por el programa I-TASSER.....	33
<b>Figura 12.</b> Generación de la biblioteca de versiones truncadas .....	34
<b>Figura 13.</b> Evaluación cualitativa de producción de eumelanina en las clonas del banco .....	35
<b>Figura 14.</b> Extracción de ácidos nucleicos totales .....	36
<b>Figura 15.</b> Secuencias de las clonas seleccionadas .....	37

**Figura 16.** Evaluación cuantitativa de producción de eumelanina .....38

**Figura 17.** Velocidad específica de reacción ..... 39

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las melaninas de acuerdo a su precursor .....	7
<b>Tabla 2.</b> Propiedades bioquímicas de la tirosinasa MelA .....	11
<b>Tabla 3.</b> Cepas y plásmidos utilizados y construidos .....	17
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del primer banco de versiones truncadas de la enzima MelAc .....	18
<b>Tabla 5.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del segundo banco de versiones truncadas de la enzima MelAc .....	19
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del tercer banco de versiones truncadas de la enzima MelAc .....	19
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación de los genes <i>melAc</i> , <i>melAc31-0</i> y <i>melAc2-0</i> de versiones truncadas de la enzima MelAc .....	20
<b>Tabla 8.</b> Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	21
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de reacción del vector e inserto con las enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>XmaI</i> .....	23
<b>Tabla 10.</b> Reacciones de ligación para CR, CL, proporción 1:1 y proporción 1:3 .....	23
<b>Tabla 11.</b> Medios de cultivo empleados .....	24
<b>Tabla 12.</b> C-score para los primeros 5 modelos de la proteína MelA generados por el programa I-TASSER .....	28

<b>Tabla 13.</b> Proteínas utilizadas como molde estructural para la generación del modelo de la proteína MeIA .....	29
<b>Tabla 14.</b> Tirosinasas utilizadas para la elaboración del árbol filogenético, obtenidas por el programa BLAST, del NCBI .....	32
<b>Tabla 15.</b> Velocidad específica de reacción de las proteínas MutMeIA, MeIA, MeIAc, MeIAc1-0, MeIAc y MeIAc31-0 .....	40
<b>Tabla 16.</b> Fenotipo observado de las mutantes del segundo y tercer banco .....	41

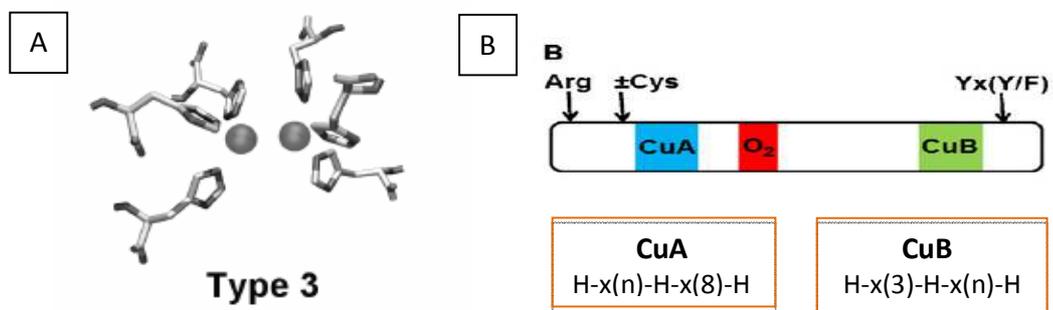
## Resumen

Las tirosinasas son proteínas de unión a cobre tipo 3, involucradas en la síntesis de melanina. Se han descrito en varios grupos filogenéticos, entre los que se encuentra la bacteria *Rhizobium etli* (Cubo *et al.*, 1988). El gen *melA* de *Rhizobium etli* CFN42, que codifica para la proteína MelA de 609 aminoácidos, con actividad de tirosinasa (González *et al.*, 2003), se clonó y expresó en *E. coli* (Cabrera-Valladares *et al.*, 2005). Posteriormente, se encontró una mutante espontánea (MelAc) con un cambio que introduce un codón de paro, dando como resultado una proteína trunca 106 aminoácidos más corta que MelA, la cual mantiene la actividad. En un análisis computacional se predijo la presencia de un posible péptido señal de 31 aminoácidos en la mutante MelAc (Echeverría, 2010). En este estudio, se construyó una biblioteca de mutantes con versiones truncadas de la enzima MelAc, con el objetivo de identificar la secuencia mínima que codifique para una proteína con actividad de tirosinasa. La biblioteca se construyó utilizando el método PCR delete-primer, el cual consiste en una mezcla de oligonucleótidos que difieren en tamaño por un codón, por lo que es posible obtener una librería de mutantes con hasta 16 deleciones secuenciales en el extremo amino y carboxilo de la proteína. Las primeras deleciones realizadas fueron en la secuencia de 31 aminoácidos predicha como posible péptido señal, posteriormente se deletaron 16 aminoácidos del extremo amino y carboxilo. Los genes truncados resultantes se clonaron en la cepa *E. coli* MC1061 y se probaron alrededor de 2000 colonias en el medio de producción de eumelanina (LB, Tir 0.4 g/L, CuSO<sub>2</sub> 40 µg/mL). Se seleccionaron y secuenciaron 40 clonas al azar. De estas clonas se midió su actividad específica a partir de un extracto celular. De todas las mutantes secuenciadas solo MelAc1-0 mantuvo el nivel de actividad de la proteína MelAc, a todas las demás no se les detectó actividad. Sin embargo, se detectaron mutantes que mostraban un nivel bajo de actividad de tirosinasa. En este estudio se concluye que la proteína con una deleción en el extremo amino de MelAc (MelAc1-0) es la versión mínima con actividad para su aplicación biotecnológica. Debido a que la eliminación de la secuencia de 30 aminoácidos, que fue predicha como un posible péptido señal, causó la pérdida de la actividad de la enzima, se concluye que esta secuencia no codifica para un péptido señal. La caracterización molecular, bioquímica y funcional obtenida contribuirá a comprender de mejor manera la relación estructura-función en esta proteína.

## Introducción

### Tirosinasas

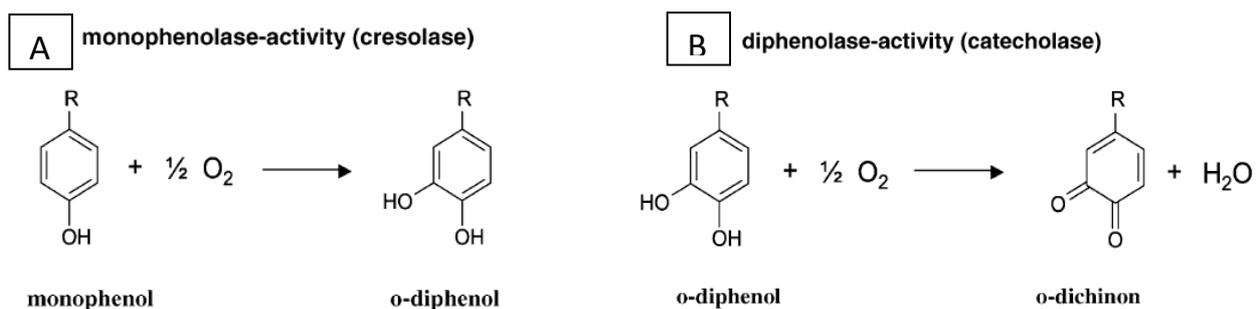
Las tirosinasas (monofenol monooxigenasa EC 1.14.18.1) se encuentran ampliamente distribuidas en todas las escalas filogenéticas. Es la enzima clave en el oscurecimiento de vegetales, frutas y hongos. En mamíferos son las responsables de la melanización en piel, ojos, cabello e interior del oído, de igual forma se ha reportado que esta enzima se encuentra vinculada en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas (Fenoll *et al.*, 2001). Pertenece a la familia de proteínas de unión a cobre tipo 3, junto con las catecol oxidasas y las hemocianinas. Estas contienen un par de iones de cobre en su sitio activo, cada uno coordinado por tres residuos de histidina altamente conservados, llamados CuA y CuB (Figura 1). Estos se encuentran en un grupo de cuatro  $\alpha$ -hélices; estas enzimas se caracterizan por estar involucradas en el transporte o activación de  $O_2$  (Claus *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2007).



**Figura 1. Centro de unión a cobre tipo 3 de las tirosinasas.** (A) Estructura del sitio de unión a cobre tipo 3 encontrado en las tirosinasas, formado por 6 residuos de histidina y dos átomos de cobre. (B) Motivos conservados de unión a cobre [Modificado Fairhead *et al.*, 2012].

Las tirosinasas catalizan la hidroxilación de compuestos monofenólicos a *o*-difenoles (actividad de cresolasa), y la subsecuente oxidación a *o*-quinonas (actividad de catecolasa), ambas reacciones requieren oxígeno molecular para llevarse a cabo (Fenoll, 2001; Chávez-Béjar, 2013). Para la reacción de hidroxilación un átomo del  $O_2$  se incorpora en el anillo aromático del compuesto monofenólico, y el otro átomo se reduce para formar una molécula de  $H_2O$ , donde

el monofenol dona el átomo de hidrógeno (Figura 2) (Claus *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2007). Las *o*-quinonas son moléculas altamente reactivas y pueden someterse a una polimerización no enzimática para formar diferentes tipos de melanina, dependiendo de su precursor (Ito, 2003).

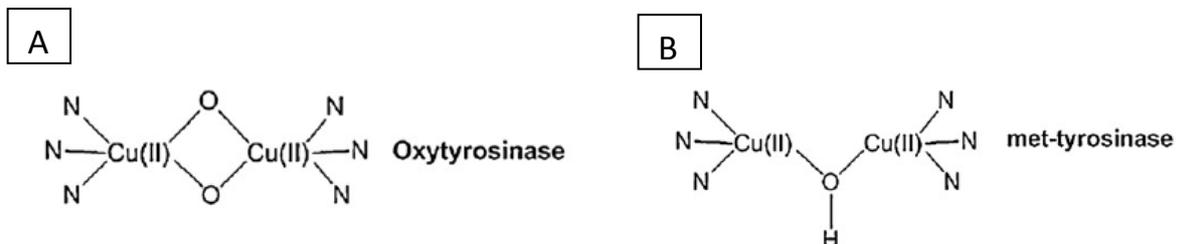


**Figura 2. Reacciones catalizadas por la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1).** (A) Actividad de cresolasa, hidroxilación del compuesto monofenólico en la posición *orto*. (B) Actividad de catecolasa, oxidación del compuesto difenólico para formar una *o*-quinona [Modificado Claus *et al.*, 2006].

Durante el ciclo catalítico el centro de unión a cobre tipo 3 puede adoptar diferentes formas funcionales: 1) el estado *oxy* [Cu(II)-O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Cu(II)], 2) estado *deoxy* [Cu(I) Cu(I)], 3) estado *half met* [Cu(I) Cu(II)] y 4) el estado *met* [Cu(II)-OH<sup>-</sup>-Cu(II)]. En ausencia de cualquier sustrato, más del 85 % de la enzima se encuentra en la configuración *met*, denominado estado de reposo de la enzima. Los estados *met* y *oxy* de la tirosinasa son capaces de realizar la oxidación de los compuestos difenólicos, mientras que la reacción de hidroxilación de los compuestos monofenólicos solo puede ser llevada a cabo por el estado *oxy* de la proteína. En la Figura 3 se muestra la configuración *oxy* y *met* de los átomos de cobre y oxígeno del centro catalítico de la proteína (Claus *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2006; Fairhead *et al.*, 2012).

Las tirosinasas no son específicas para un solo sustrato y pueden catalizar las dos reacciones con diferentes tipos de compuestos fenólicos y difenólicos; sin embargo, se ha demostrado que los compuestos fenólicos sustituidos en la posición 2 del anillo aromático, pueden actuar como inhibidores de la enzima. Los sustratos típicos de estas enzimas incluyen a la L-tirosina, a la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), a la tiamina, al fenol y al pirocatecol. Cuando la L-tirosina reacciona con la tirosinasa se oxida produciendo L-DOPA y, posteriormente sufre la oxidación

a dopaquinona. Este último compuesto después de una serie de reacciones de oxidoreducción no enzimáticas se polimeriza para formar un tipo de melanina denominada eumelanina (García-Borrón *et al.*, 2002; Fairhead *et al.*, 2012).



**Figura 3. Configuración de los átomos de cobre y oxígeno del centro catalítico de la enzima.** (A) Estado *oxy* de la enzima tirosinasa (cataliza la hidroxilación del compuesto monofenólico). (B) Estado *met* de la enzima tirosinasa (cataliza la oxidación de compuestos difenólicos) [Modificado Fairhead *et al.*, 2012].

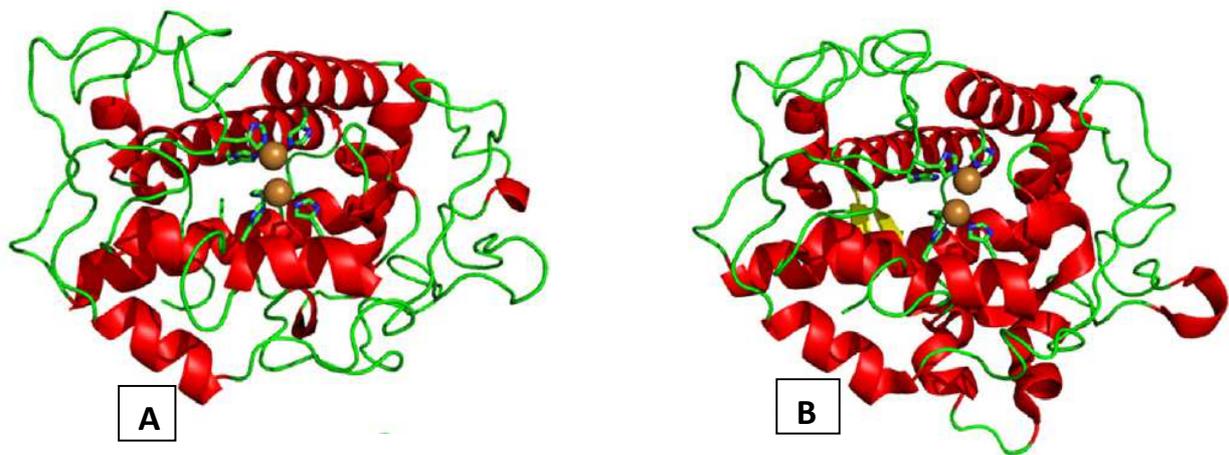
#### *Tirosinasas bacterianas*

Las tirosinasas y su capacidad para sintetizar melanina se han descrito en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Entre estas bacterias se encuentran: *Pseudomonas maltophilia*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Shewanella colwelliana*, *Marinomonas mediterránea* MMB-1, *Bacillus thuringiensis* subsp Kurstaki, además de muchas especies del género *Vibrio* (Wang, 2000; Faccio *et al.*, 2012; Zaidi *et al.*, 2014).

Las primeras tirosinasas bacterianas fueron purificadas a partir de extractos celulares de *Streptomyces nigrifaciens* y *Streptomyces glaucescens*. Al contrario de las tirosinasas eucariotas, la forma activa de la proteína de *S. glaucescens* es un monómero, con un peso molecular de 29 KDa y su máxima actividad es a un pH de 6.8 (Claus *et al.*, 2006). De igual forma fue purificada la tirosinasa de *Streptomyces michiganensis* la cual mostró actividad con varios monofenoles (tirosina, ester-tirosina y ácido *p*-cumárico) y difenoles (L-DOPA, ácido cafeico y catecol). Se ha identificado la tirosinasa inducible con calor de *Bacillus thuringiensis*, con un peso molecular de 14 kDa, y una de las tirosinasas más pequeñas conocidas hasta el momento (Nosanchuk *et al.*, 2003).

En las bacterias Gram-negativas se encuentra la tirosinasa termoestable de *Thermomicrobium roseum*, con un máximo de actividad a 70 °C y un pH de 9.5, su forma activa parece ser la de un homodímero de 43 kDa cada subunidad. También se identificó a la tirosinasa intracelular de *Marinomonas mediterránea*, la cual es un ejemplo de la presencia de esta enzima en bacterias marinas (Nosanchuk *et al.*, 2003; Claus *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han reportado solo dos estructuras de tirosinasas bacterianas, la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (PDB id: 1WX4) y la tirosinasa de *Bacillus megaterium* (PDB id: 3NM8). Estas estructuras se muestran en la Figura 4, donde se indica el sitio activo de ambas proteínas, el cual está conformado por seis residuos conservados de histidina coordinando dos átomos de cobre. El plegamiento general de las dos proteínas resulta ser muy similar, siendo predominante la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, el sitio activo de ambas proteínas está conformado por seis residuos conservados de histidina coordinando dos átomos de cobre. A nivel de secuencia también se pueden encontrar similitudes entre distintas tirosinasas reportadas, por ejemplo se puede encontrar el motivo PYWDW, el cual se ha propuesto que está involucrado en la unión con el oxígeno molecular (Fairhead *et al.*, 2012).



**Figura 4. Estructuras cristalizadas de tirosinasas.** (A) Estructura de la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (PDB id: 1WX4). (B) Estructura de la tirosinasa de *Bacillus megaterium* (PDB id: 3NM8) [Modificado Fairhead *et al.*, 2012].

Para la mayoría de las tirosinasas bacterianas no se ha reportado la existencia de alguna modificación post-traducciona l y aún no se conoce si son expresadas constitutivamente o no; sin embargo, se encontró que la expresión de las tirosinasas de *S. antibioticus* y *S.*

*castaneoglobisporus* son inducidas por metionina. La expresión de la tirosinasa de *S. michiganesis* por la presencia de cobre y reprimida por amonio (Nosanchuk *et al.*, 2003; Zaidi *et al.*, 2014). De igual forma se demostró que la tirosinasa de *M. mediterranea* se encuentra sujeta a una regulación coordinada, ya que durante el crecimiento del organismo en un medio de cultivo complejo, la expresión de la enzima es inducida hasta la fase estacionaria. Se encontró que la cinasa PpoS, la cual actúa como sensor, tiene una regulación positiva en la expresión de la tirosinasa, sin embargo, las señales ambientales detectadas por esta cinasa aún no se conocen. A nivel de proteína, las tirosinasas de *M. mediterranea* y de *B. thuringiensis* son activadas por la presencia de SDS, ya que el detergente puede inducir cambios conformacionales que dan como resultado una mejor accesibilidad del sustrato al sitio catalítico de la enzima (Lucas-Elío *et al.*, 2002; Nosanchuk *et al.*, 2003; Zaidi *et al.*, 2014).

#### *Aplicaciones biotecnológicas de las tirosinasas*

El estudio de las tirosinasas lo motivó el deseo de entender y prevenir el pardeamiento enzimático que ocurre en la presencia de oxígeno cuando los hongos, las frutas o los vegetales se cortan. Este fenómeno está estrechamente ligado a la acción de las tirosinasas y causa pérdidas económicas significativas en la industria de los alimentos. A partir de estos estudios, las investigaciones se han orientado a aplicaciones ambientales y biotecnológicas, por ejemplo para la producción de melanina (Cubo *et al.*, 1988; Henson *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2002). A continuación se describe la aplicación de las tirosinasas en diferentes áreas de investigación.

- *Producción de fármacos.* Un uso potencial de las tirosinasas es en la producción del fármaco L-DOPA, que se utiliza mayormente en el tratamiento contra la enfermedad de Parkinson. Se ha probado que es posible producir L-DOPA utilizando una cepa de *Bacillus* sp., con tirosina como sustrato. Otro fármaco que se obtiene a partir de la actividad de la tirosinasa es la lincomicina, este antibiótico se produce a partir de una cepa de *Streptomyces lincolnensis*. La tirosinasa activa a la L-tirosina, lo que da inicio a la biosíntesis del antibiótico (Faccio *et al.*, 2012; Zaidi *et al.*, 2014).
- *Bioremediación.* Se ha probado que las tirosinasas pueden oxidar compuestos como clorofenol y fluorofenol, los cuales son tóxicos. La oxidación de estos compuestos, lleva a su subsecuente polimerización, y seguido de una precipitación es posible eliminar estos contaminantes durante el tratamiento de aguas residuales (Faccio *et al.*, 2012).

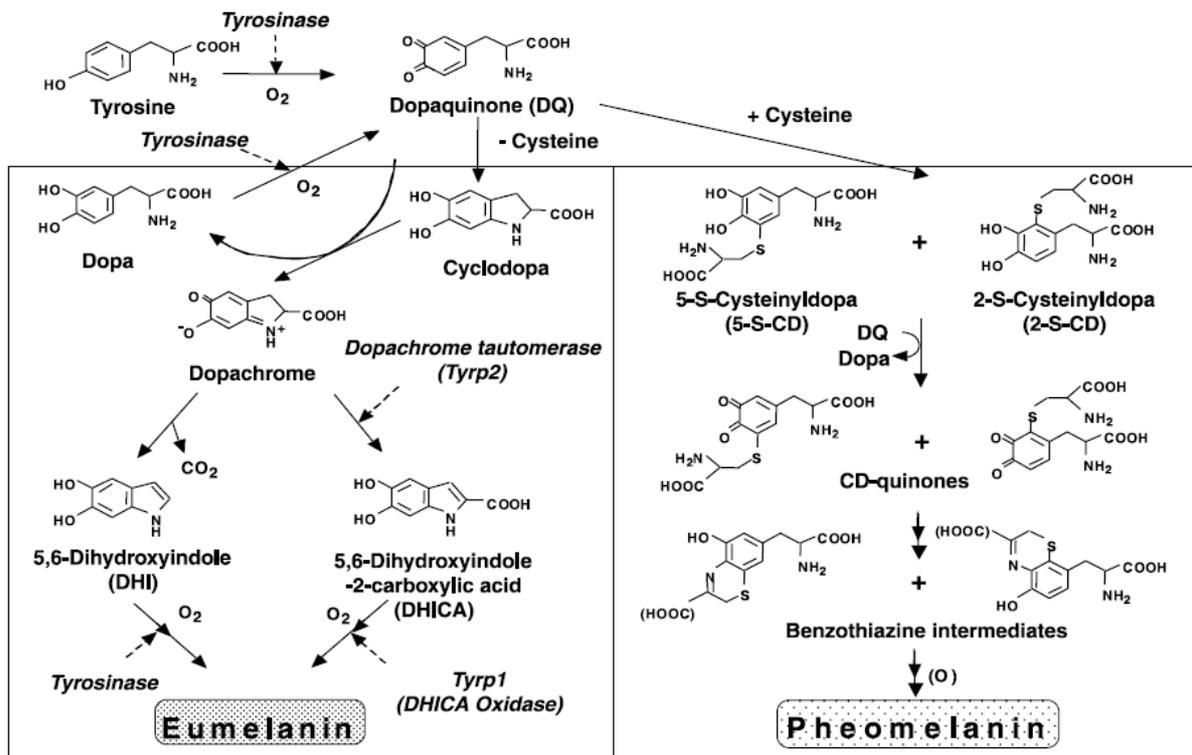
- **Biosensores.** Por medio de este sistema pueden detectarse en un gran número de mono y difenoles. La desventaja obvia es que la baja especificidad por los diferentes sustratos que tiene la enzima, vuelve complicado distinguir su actividad en presencia de dos o más sustratos. Sin embargo, se ha utilizado efectivamente la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* para detectar bajas concentraciones de los sustratos (5 nM), como son el catecol, L-DOPA y la adrenalina (Faccio *et al.*, 2012).

## Melanina

Las melaninas constituyen un amplio grupo de polímeros aromáticos que conservan propiedades similares y se encuentran distribuidos en todos los reinos biológicos. Estos compuestos se forman por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. En general, se han descrito a las melaninas como pigmentos oscuros, negros o cafés, aunque también pueden presentar otros colores. Las melaninas derivadas de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) son llamadas eumelaninas y son generalmente negras o café oscuros; las melaninas amarillas o rojizas son llamadas feomelaninas e incorporan cisteína con L-DOPA; las piomelaninas son otro tipo de melaninas de color café, están formadas por compuestos del ácido homogentísico; y las melaninas de dihidroxinaftaleno (alomelanina) son pigmentos derivados a partir de acetatos y, generalmente, son de color negro o café (Tabla 1) (Ito, 2003; Cano, 2008). En la Figura 5 se resume la vía de síntesis de la eumelanina y la feomelanina (Ito, 2003).

**Tabla 1.** Clasificación de las melaninas de acuerdo a su precursor.

Precursor	Nombre	Color
L-tirosina	Eumelaninas	Negro
L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA)		
Cisteína y glutatión	Feomelaninas	Café, amarillo o rojo
Catecol y acetatos	Alomelaninas	Café
Ácido homogentísico	Piomelaninas	Café o rojo



**Figura 5. Mecanismo de síntesis de Eumelanina y Feomelanina.** El primer paso es la oxidación de la tirosina por la tirosinasa, hasta la formación de dopaquinona. (A) Formación de eumelanina: en ausencia de cisteína, a la dopaquinona se le adiciona un grupo amino, formando ciclodopa (leucodopacromo). El intercambio redox entre leucodopacromo y dopaquinona da como resultado dopacromo. Dopacromo se descompone gradualmente para dar como resultado principalmente 5,6-dihidroxiindol (DHI) y en menor proporción ácido 5,6-dihidroxiindol (DHICA). Finalmente estos compuestos son oxidados hasta formar eumelanina. (B) Formación de feomelanina: en presencia de cisteína, dopaquinona reacciona con la cisteína para formar principalmente 5-S-cisteinildopa y en menor proporción 2-S-cisteinildopa. Estos compuestos son posteriormente oxidados para formar intermediarios de benzotiazina. Finalmente se produce feomelanina [Modificado Ito, 2003].

Las melaninas son moléculas de alto peso molecular muy estables, hidrofóbicas, amorfas, cargadas negativamente y resistentes a la degradación con ácidos pero susceptibles a degradarse con bases fuertes. (Riley, 1997; Cano, 2008). Su propiedad más sobresaliente es la capacidad de absorber luz, por ejemplo, las eumelaninas absorben todo el espectro visible y el ultravioleta (200 a 700 nm), debido al alto nivel de enlaces conjugados de la molécula (López-Serrano *et al.*, 2004; Cano, 2008; Roulin, 2011).

Otra de las propiedades de interés de las melaninas, es la protección que ejercen frente a agentes oxidantes. Las melaninas tienen una fuerte afinidad por los metales, especialmente por metales de transición, por lo que actúan como quelantes con alta afinidad por los radicales libres; además de sus propiedades de transferencia de electrones, estabilizan radicales libres en sistemas biológicos y atrapan electrones no apareados neutralizando su potencial dañino. Por resonancia paramagnética de electrones se encontró que las melaninas estabilizan la transferencia de electrones libres del superóxido (Roulin, 2011). Las funciones biológicas de las melaninas, están relacionadas con protección al estrés ambiental y virulencia en bacterias (Fairhead *et al.*, 2012).

- Melanina en plantas

Los pigmentos de origen vegetal, desde rojos, cafés, hasta negros, generalmente se producen por sustancias no nitrogenadas. Estas sustancias en las plantas se denominan alomelaninas o melaninas DHN, por su precursor el dihidroxinaftaleno. Es posible aislar tirosina, L-DOPA, tiramina, dopamina y epinefrina de las legumbres y frutas, por ejemplo en plantas como *Sarothamnus scoparius* y *Vicia faba* se encuentra gran cantidad de estos compuestos melanogénicos. En todas las plantas, las polifenoloxidasas son muy comunes, pero no siempre participan en la formación de melanina. Las enzimas que participan en su síntesis están distribuidas a lo largo de toda la planta (Cano, 2008).

- Melanina en mamíferos

En los animales, la melanina está localizada en vacuolas especializadas denominadas melanosomas. Gracias a todos estos pigmentos los animales pueden camuflarse, mimetizarse, usarlos para las manifestaciones sexuales y el apareamiento. En humanos, la melanina se encuentra en la piel, el cabello, la retina, la médula, la zona reticular de la glándula suprarrenal y el oído interno. En la mancha azul del cerebro se produce neuromelanina que se sintetiza químicamente por la oxidación de las catecolaminas dopamina y norepinefrina (Cano, 2008).

- Melanina en bacterias

Entre las bacterias, la producción de melanina se ha descrito en muchos géneros, incluyendo *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Rhizobium*, en todos los casos el gen que codifica para la tirosinasa se encuentra en plásmidos. En *R. etli*, el gen *melA* está presente en el plásmido simbiótico p42d y codifica para la única tirosinasa del género *Rhizobium* caracterizada hasta el momento. Esta

localización y el tipo de regulación genética que comparte con algunos genes simbióticos sugieren que esta enzima está involucrada de alguna manera en la simbiosis (Piñero *et al.*, 2007).

Debido a la importancia que tienen estas moléculas, actualmente son utilizadas en cosméticos, como son tintes para cabello, cremas con antioxidantes, lentes de sol con protección para rayos UV y bloqueadores de sol. Aunque las melaninas pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, es difícil controlar su composición química y su grado de polimerización, lo que resulta en un problema cuando se desea caracterizar o cuantificar. Una forma de controlar la producción de melanina, así como su composición química es a partir de cultivos de bacterias, por ejemplo, el uso de *E. coli* recombinante expresando el gen heterólogo de la tirosinasa (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Fairhead *et al.*, 2012; Chávez-Béjar *et al.*, 2013).

## Antecedentes

González *et al.*, 2003, reportan la secuencia completa del plásmido simbiótico p42d de *Rhizobium etli* CFN42. En una región de 125 Kb de este plásmido se encuentran los genes involucrados en la nodulación y la fijación de nitrógeno. Es en esta región en donde se encuentra el gen *melA* (número de acceso U80928.5 en NCBI), el cual codifica para una proteína con posible actividad de fenoloxidasas (González *et al.*, 2003).

### Expresión y caracterización de la enzima MelA en *E. coli*

El gen *melA* de *R. etli* CFN42 (González *et al.*, 2003) se clonó en el vector pTrc99A y se expresó en la cepa de *E. coli* W3110. Se encontró que la proteína codificada por este gen tiene actividad de tirosinasa, la cual cataliza la síntesis de eumelanina usando L-tirosina como sustrato. Se evaluó la capacidad de producción de eumelanina en medio mínimo suplementado con IPTG, CuSO<sub>4</sub>, glucosa y L-tirosina, a distintos valores de pH y temperatura. El rendimiento máximo se obtuvo incubando a una temperatura de 30 °C y un pH de 7. Posteriormente se realizó la purificación parcial de esta enzima y se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre su actividad y estabilidad; también se determinó su actividad sobre distintos compuestos fenólicos (Tabla 2) (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006).

**Tabla 2.** Propiedades bioquímicas de la tirosinasa MelA.

Temperatura (°C)	Vida media (h)	pH
30	24	6.5-7.5
37	3.9	
50*	1.87	
<b>Sustratos</b>	L-tirosina, L-tirosina etil éster, N-acetil-tirosina, L-DOPA, ácido cafeico y catecol	

## **Evaluación de las condiciones óptimas para la producción de eumelanina utilizando una cepa de *E. coli* que expresa el gen *melA***

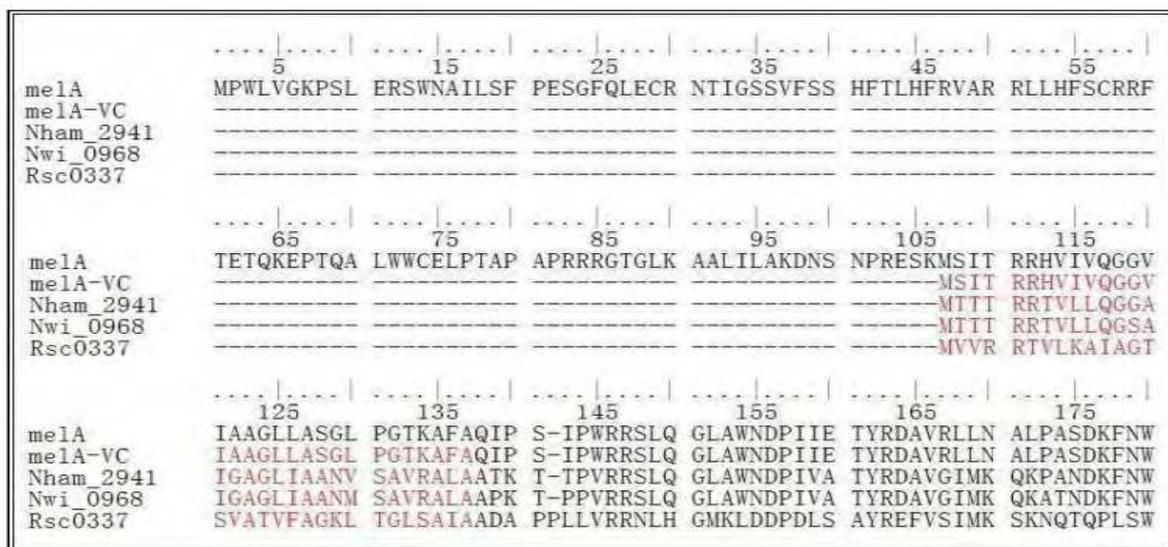
Lagunas-Muñoz *et al.* (2006) desarrollaron un proceso fermentativo para la producción de eumelanina, basado en un estudio paramétrico donde se definieron las condiciones óptimas para obtener mayor productividad usando una cepa de *E. coli* que expresa el gen *melA* (200 µg/mL de ampicilina, 0.1 mmol/L de IPTG, 30 °C y pH 7.5). Durante la clonación se encontró una mutante espontánea que presentaba un cambio de un residuo de aspártato por glicina en la posición 535, que fue llamada MutMelA; al inocular esta mutante en medio sólido con L-tirosina presentó una coloración negra en menor tiempo que la cepa de *E. coli* que expresa el gen silvestre *melA*, indicando una mayor productividad en la síntesis de eumelanina. También se determinó que la síntesis de eumelanina inicia justo cuando el cultivo entra en fase estacionaria, o dicho de otra forma, cuando la glucosa en el medio se agota (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006).

Posteriormente se determinó que la cepa de *E. coli* que expresa el gen *mutmelA* presenta mejores parámetros de producción de eumelanina en comparación con la cepa que expresa el gen silvestre *melA*. Este resultado refleja que el cambio de color debido a la producción de eumelanina puede utilizarse de forma simple y directa para visualizar la identificación de mutantes con aumento o disminución en su actividad de tirosinasa (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006).

### **Generación y caracterización de mutantes del gen *melA*.**

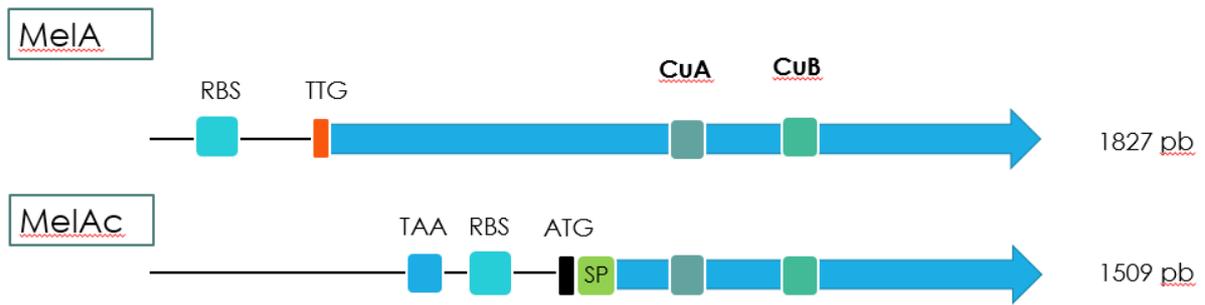
Se generó una biblioteca de mutantes del gen *melA* mediante mutagénesis al azar (Robledo-Arratia, 2008). Se seleccionaron las clonas de la biblioteca capaces de polimerizar sustratos distintos a la tirosina (ácido cumárico y ácido para-hidroxibenzoico). Se identificó una mutante con una sustitución del residuo de glutamato por uno de glicina en la posición 335, dentro de la región CuB. Además de este cambio, se encontró una mutación que introduce un codón de paro, el cual da como resultado un nuevo inicio de traducción a 318 bp del comienzo reportado del gen *melA*, el cual codifica para una proteína con 106 aminoácidos menos en el extremo amino terminal. Para comprobar que el nuevo marco abierto de lectura diera como resultado una proteína funcional, a *melA* se le deletaron 106 aminoácidos y se clonó en el vector

pTrc99A. Se determinó que la expresión de la nueva mutante en *E. coli* aumentaba la productividad en la conversión de L-tirosina en eumelanina. A esta mutante se le llamó MelA-VC (Echeverría, 2010), para fines de este trabajo se le llamará MelAc. Con el fin de caracterizar proteína truncada se llevaron a cabo algunas predicciones bioinformáticas. A través del programa *SignalP* 3.0 se realizó un análisis de la posible presencia de un péptido señal (SP) en la región N-terminal de la proteína, se reporta un péptido señal de 31 aminoácidos, con una probabilidad de 0.994. Se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de MelA y de las tres proteínas con las que comparte mayor identidad en su secuencia (*Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter winogradskyi* y *Ralstonia solanacearum*). Se encontró que la secuencia de la proteína truncada MelAc comparte con las otras proteínas tanto el inicio del gen como la presencia de un péptido señal (Figura 6).



**Figura 6. Alineamiento múltiple del extremo N-terminal de MelA con otras tirosinasas.** MelA-VC (MelAc), Nham\_2941 (*Nitrobacter hamburgensis*), Nwi\_0968 (*Nitrobacter winogradskyi*) y Rsc0337 (*Ralstonia solanacearum*). En rojo se muestra la secuencia de 31 aminoácidos que pertenecen a un péptido señal, además de compartir una metionina en la posición 106 de MelA y al inicio de las otras tirosinasas.

Se realizó un análisis de la presencia de un sitio de unión a ribosoma (RBS) asociado al marco abierto de lectura del gen *melAc*. Se encontró un posible RBS, el cual se encuentra situado en la posición -6, mientras que en el caso de *melA*, el posible RBS se encuentra en la posición -19. La posición reportada como consenso se encuentra de 6 a 7 nucleótidos antes del inicio del gen. En la Figura 7 se muestra el esquema del MelAc comparándola con MelA.



**Figura 7. Esquema de la mutante MelAc.** Se muestra la comparación entre la versión MelA y MelAc, se muestra la mutación que genera un codón de paro haciendo a la proteína 106 aminoácidos menor que MelA.

En este proyecto se utilizó un acercamiento mutagénico para generar y caracterizar la secuencia mínima de la tirosinasa MelA que conserve actividad. Se generó una librería de versiones truncadas de la enzima MelAc expresadas en *E. coli* y se seleccionaron de acuerdo a su actividad en la producción de eumelanina.

## Justificación

Dentro de los objetivos de nuestro laboratorio, se encuentra el desarrollo y la optimización de cepas sobreproductoras de compuestos aromáticos, utilizando metodologías de ingeniería metabólica en cepas de *E. coli*. Por ejemplo, se realizó la expresión del gen heterólogo *melA* para la producción de eumelanina (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque estas herramientas han sido muy efectivas en aumentar el rendimiento de producción, dentro de las estrategias de optimización de la producción de estos compuestos, es necesario utilizar otras técnicas que nos permitan comprender la relación estructura-función en las proteínas y en un futuro poder optimizar las enzimas de mayor importancia dentro de cada vía.

Con la información obtenida en otros trabajos desarrollados dentro del grupo (Echeverría, 2010), en este proyecto se aplicó una metodología para la eliminación de hasta 16 codones en los extremos 5' y 3' del gen que codifica para la enzima con actividad de tirosinasa MelA, en una sola reacción de PCR, y se evaluaron las clonas generadas de forma cualitativa, mediante la producción de eumelanina en medio sólido, además de determinar la actividad específica de las mutantes, lo que permitió hacer un barrido en menor tiempo de diferentes versiones truncadas de la enzima MelA.

## **Hipótesis**

Existen residuos de aminoácidos en los extremos amino y carboxilo terminal en la tirosinasa MelAc que son dispensables para su actividad enzimática y para la integridad de la estructura de la proteína.

## **Objetivo general**

Determinar cuál es el derivado más pequeño de la enzima tirosinasa MelAc de *R. etli* expresada en *E. coli* que aun conserve su actividad.

## **Objetivos particulares**

1. Generar una librería de versiones truncadas de los extremos amino y carboxilo de la enzima MelAc.
2. Determinar cualitativamente su actividad mediante la producción de eumelanina, y determinar las secuencias nucleotídicas de cada una de ellas.
3. Determinar la actividad de tirosinasa en el extracto celular de la cepa que exprese la versión mínima de MelAc.
4. Determinar la capacidad de producción de eumelanina en cultivos líquidos con cepas de *E. coli* que expresan mutantes truncadas de MelAc con alta actividad.

## Metodología

### Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 3. La cepa MC1061 se utilizó como hospedera de la biblioteca de versiones truncadas del gen *melAc*. Las versiones truncas de *melAc* obtenidas de esta biblioteca se nombraron de acuerdo al número de aminoácidos deletados, el primer número indica la delección en el extremo amino y el segundo número la delección en el extremo carboxilo, separados por un guion. Todas estas versiones se clonaron en el plásmido pTrc99A2.

**Tabla 3.** Cepas y plásmidos utilizados y construidos.

Cepas	Características	Referencia
W3110 Trp <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> ) <sub>1</sub> , RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	Jensen, K., 1993
MC1061	Δ <i>lacX74</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>araABC-leu</i> ) <sub>7679</sub> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	Casadaban y Cohen, 1979
Plásmidos	Características	Referencia
pCR-Blunt II-TOPO	Promotor <i>lac</i> , promotor T7, gen letal <i>ccdB</i> , gen de resistencia <i>kan</i> y resistencia a Zeocina.	Cat. K2800-02, Invitrogen
pTrc99A2	Derivado del plásmido pTrc99A, Amp <sup>R</sup> , porta los genes γ, β y <i>exo</i> de la recombinasa Red del fago λ bajo regulación de P <sub>araB</sub> y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101, con el cambio del sitio de restricción de NcoI por NdeI del sitio de clonación múltiple.	Muñoz, I., 2013
pTrc <i>melA</i>	Derivado del plásmido pTrc99A2, que expresa el gen <i>melA</i> bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
pTrcMut <i>melA</i>	Derivado del plásmido pTrc99A2, que expresa el gen Mut <i>melA</i> bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Lagunas-Muñoz <i>et al.</i> , 2006
pTrc <i>melAc</i>	Derivado del plásmido pTrc99A2, que expresa el gen <i>melAc</i> bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Este trabajo
pTrc <i>melAc</i> 31-0	Derivado del plásmido pTrc99A2, que expresa el gen <i>melAc</i> 31-0 bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Este trabajo
pTrc <i>melAc</i> 2-0	Derivado del plásmido pTrc99A2, que expresa el gen <i>melAc</i> 2-0 bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	Este trabajo

## Técnicas genéticas y de DNA recombinante

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de la biblioteca generada en este trabajo, se utilizó la enzima KAPA HiFi DNA polimerasa (KAPA Biosystems®). Para la amplificación de la biblioteca de versiones truncas de la enzima MelA se utilizó el mix de oligonucleótidos Fw y Rv correspondientes a cada banco, en la Tabla 4, 5 y 6 se muestra la mezcla y condiciones de reacción para el primer, segundo y tercer banco, respectivamente. Para la amplificación de los genes *melAc*, *melAc31-0* y *melAc2-0* se utilizó la enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems®). La mezcla de reacción se presenta en la Tabla 7.

**Tabla 4.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del primer banco de versiones truncadas de la enzima MelAc.

Mezcla de reacción			Condiciones de reacción		
			Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos / etapa
Componente	Volumen	Concentración final			
Buffer con Mg <sup>2+</sup> (1X)	10 µL	1X	95	3 min	1 /desnaturalización inicial
dNTP Mix (10 mM)	1.5 µL	0.3 mM	98	20 seg	25 / amplificación
mix Fw (10 µM)	1.25 µL	0.3 µM	58	15 seg	
mix Rv (10 µM)	2.5 µL	0.3 µM	72	2 min	
Templado (~20 ng)	1.0 µL	---	72	3 min	1 / extensión final
Enzima Kapa HiFi (1 U/ µL)	1.0 µL	0.5 U/ µL reacción			
Agua	c.b.p 50 µL	---			

**Tabla 5.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del segundo banco de versiones truncadas de la enzima MelAc.

Mezcla de reacción			Condiciones de reacción		
			Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos / etapa
Componente	Volumen	Concentración final			
Buffer con Mg <sup>2+</sup> (1X)	10 µL	1X	95	3 min	1 /desnaturalización inicial
dNTP Mix (10 mM)	1.5 µL	0.3 mM	98	20 seg	25 / amplificación
mix Fw (10 µM)	1.25 µL	0.3 µM	70	15 seg	
mix Rv (10 µM)	2.5 µL	0.3 µM	72	2 min	
Templado (~20 ng)	1.0 µL	---	72	3 min	1 / extensión final
Enzima Kapa HiFi (1 U/ µL)	1.0 µL	0.5 U/ µL reacción			
Agua	c.b.p 50 µL	---			

**Tabla 6.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del tercer banco de versiones truncadas de la enzima MelAc.

Mezcla de reacción			Condiciones de reacción		
			Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos / etapa
Componente	Volumen	Concentración final			
Buffer con Mg <sup>2+</sup> (1X)	10 µL	1X	95	3 min	1 /desnaturalización inicial
dNTP Mix (10 mM)	1.5 µL	0.3 mM	98	20 seg	25 / amplificación
mix Fw (10 µM)	1.5 µL	0.3 µM	62	15 seg	
mix Rv (10 µM)	1.5 µL	0.3 µM	72	2 min	
Templado (~20 ng)	1.0 µL	---	72	3 min	1 / extensión final
Enzima Kapa HiFi (1 U/ µL)	1.0 µL	0.5 U/ µL reacción			
Agua	c.b.p 50 µL	---			

**Tabla 7.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación de los genes *melAc*, *melAc31-0* y *melAc2-0*.

Mezcla de reacción			Condiciones de reacción		
			Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos / etapa
Componente	Volumen	Concentración final			
Buffer con Mg <sup>2+</sup> (1X)	10 µL	1X	95	3 min	1 / desnaturalización inicial
dNTP Mix (10 mM)	1.5 µL	0.3 mM	98	20 seg	25 / amplificación
mix Fw (10 µM)	1.5 µL	0.3 µM	73	15 seg	
mix Rv (10 µM)	2.5 µL	0.3 µM	72	2 min	
Templado (~20 ng)	1.0 µL	---	72	3 min	1 / extensión final
Enzima Kapa HiFi (1 U/ µL)	1.0 µL	0.5 U/ µL reacción			
Agua	c.b.p 50 µL	---			

De acuerdo al antecedente de Echeverría, 2010, se realizó un alineamiento con las secuencias de proteínas homólogas a MelAc, y se encontró una secuencia de 31 aminoácidos que codifica para un posible péptido señal; por lo anterior se decidió generar tres bancos. En el primer banco se realizaron deleciones a partir del codón que codifica para el primer aminoácido hasta el aminoácido 15, en el segundo banco, además de esos primeros 15 aminoácidos, se deletaron los aminoácidos 16 al 31, y por último en el tercer banco se realizaron las deleciones a partir del aminoácido 31 al 47 y los últimos 16 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína, para evaluar qué efecto tienen estas deleciones en la actividad de la enzima.

Para realizar las deleciones en el gen *melAc* se utilizó una mezcla de 15 oligonucleótidos Fw, estos oligonucleótidos diferían en tamaño de tres bases para mantener el marco abierto de lectura (Figura 8). El oligonucleótido Rv amplificó al gen sin ninguna deleción en el extremo carboxilo para el primer y segundo banco, en el caso del tercer banco se utilizó de igual forma una mezcla de 16 oligonucleótidos. Los oligonucleótidos conservan dos secuencias en común, la que forma parte del gen estructural y la que tendrá la secuencia para cada una de las enzimas de restricción (*NdeI* y *XmaI*). Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBt) a cargo del Dr. Paul Gaytán. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR el

DNA cromosomal, plasmídico, así como para realizar la secuenciación de los genes, se describen en la Tabla 9.

## Forward set

```

5'TTCATTCCCATATG AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw1
5'TTCATTCCCATATG cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw2
5'TTCATTCCCATATG tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw3
5'TTCATTCCCATATG aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw4
5'TTCATTCCCATATG tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw5
5'TTCATTCCCATATG aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw6
5'TTCATTCCCATATG tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw7
5'TTCATTCCCATATG gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw8
5'TTCATTCCCATATG ctg gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw9
5'TTCATTCCCATATG aaa ctg gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw10
5'TTCATTCCCATATG cac aaa ctg gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw11
5'TTCATTCCCATATG gga cac aaa ctg gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw12
5'TTCATTCCCATATG ctg gga cac aaa ctg gaa tac aac tat aac tca cac AATGTATACATCATGGCAGACAAAAC 3' Fw13

```

## Reverse set

```

Rv1 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv2 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv3 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv4 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv5 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv6 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv7 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv8 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv9 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ttg ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv10 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ttg ata ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv11 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ttg ata ttg ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv12 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ttg ata ttg agt ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'
Rv13 3'GCTGAAAGTTCCTTCTGCCGTTGTAG gac cct gtg ttt gac ctt atg ttg ata ttg agt gtg ATTGAGCTCGGCAGCAA 5'

```

**Figura 8. Ejemplo de oligonucleótidos utilizados para generar la biblioteca de versiones truncadas del gen *melAc*.** Los oligonucleótidos difieren en tamaño por tres nucleótidos y cada mezcla está integrada por un máximo de 16 oligonucleótidos.

**Tabla 8.** Secuencia de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5' - 3')
Pr-Ser2/Ala16 Forward	5'atatctcagctccatag <b>AGC ATC ACA CGC AGA CAT GTC ATC GTT CAG GGT GGC</b> <b>GTC ATT GCA</b> gca ggc ctg ctg gcc agc ggc ct 3'
Pr-Ala17/Ala31 Forward	5'atatctcagctccatag <b>GCA GGC CTG CTC GCC AGC GGC CTA CCG GGG ACA</b> <b>AAA GCC TTC GCG</b> gag ata ccg tca atc cct tgg cgg 3'
MelAcFw	5'atatctcagctccat <b>ATG CAG ATA CCG TCA ATC CCT TGG CGG CGC TCA CTG</b> <b>CAG GGC TTG GCC</b> tgaacgacccgatcatcgagacc 3'
MelAcRv	5'cagcatgttcccgggta <b>GGC GGA CAC TAT GGC TAT TTC TAG CTT TGC GGG CTC</b> <b>TAC GGC GCC GGG</b> ttgcccgtcccgatccgacagg 3'
MelAcReverse	ATA ATC <b>CCC GGG</b> CTA TTA GGC GGA CAC TAT GGC TA

### Clonación *melAc*

MelAcForward	CCAAGGGAGAGTCATATGAGCATCACACGC
MelAcReverse	ATA ATC <b>CCC GGG</b> CTA TTA GGC GGA CAC TAT GGC TA

### Clonación *melA30-0*

MelApepF	ACAAAAGCC <b>ATATG</b> CAGATACCGTCAATC
MelAcR	ATAAT <b>CCCCGGG</b> CTATTAGGCGGACACTATGGCTA

### Clonación *melA2-0*

MelAc-2Fw	TTGGCCTGGCATATGACACGCAGACATGTCA
MelAcR	ATAAT <b>CCCCGGG</b> CTATTAGGCGGACACTATGGCTA

### Secuenciación

pTrcFw	CAT CCG GCT CGT ATA ATG TG
pTrcRv	ACC GCT TCT GCG TTC TGA TT
MelA500Fw	AAC ACC ATC CTA ACG GCG AA
MelA1000Fw	TTT CGC TGC CGA TCA AGA TC

\*En el caso de los oligonucleótidos utilizados para generar las deleciones se muestra en negritas la secuencia con identidad con el gen *melAc*. En la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación de los genes *melAc*, *melA30-0* y *melA2-0* los sitios de restricción de las enzimas *NdeI* (Forward) y *XmaI* (Reverse) se muestran en negritas.

## Purificación de DNA

Se realizó la extracción de los plásmido utilizados para la clonación y el análisis de las clonas recombinantes por el método de lisis alcalina, este método se basa en la lisis alcalina de las células y la precipitación selectiva del DNA de alto peso molecular a pH 12 con acetato de potasio, mientras que las moléculas de DNA plasmídico permanecen en doble cadena. Después de la extracción, se realizó la cuantificación de DNA en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific). El DNA cromosomal, se extrajo usando el kit MO BIO para aislamiento de DNA microbiano. Para la purificación de los productos de PCR, se utilizó el kit PCR MO BIO (Thermo scientific®).

## Reacciones de restricción

Se realizaron las reacciones de restricción del vector pTrc99A2 y de los productos de PCR, cada reacción se realizó utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *XmaI* (Fermentas®), de forma simultánea en el buffer 4 (New England Biolabs®). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 14 h, posteriormente se inactivaron a 65 °C por 20 minutos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Mezcla de reacción con las enzimas de restricción *NdeI* y *XmaI* del vector e inserto.

	PCR <i>melA31-0</i> (µL)	pTrc99A2 (µL)
<b>Agua mQ</b>	6	15
<b>DNA (~2 µg)</b>	12	3
<b>BSA (10X)</b>	2.5	2.5
<b>Buffer 4 (10X)</b>	2.5	2.5
<b>Enzima <i>NdeI</i> (10 U)</b>	1	1
<b>Enzima <i>XmaI</i> (10 U)</b>	1	1
<b>Volumen total</b>	25	25

## Reacciones de ligación

Para las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific®), se realizaron cuatro reacciones de ligación: 1) Control de la reacción de digestión (CR), 2) Control de la reacción de ligación (CL), 3) Ligación con una proporción vector/inserto 1:1 y 4) Ligación con una proporción vector/inserto 1:3 (Tabla 10); para conocer la concentración de vector e inserto necesarias para estas reacciones, se utilizó el programa en línea REviewer, de Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/reviewer/>). Las reacciones se incubaron a 22 °C durante 12 h.

**Tabla 10.** Reacciones de ligación para CR, CL, proporción 1:1 y la proporción 1:3.

Componente de la mezcla de reacción	CR (µL)	CL (µL)	1:1 (µL)	1:3 (µL)
<b>Agua mQ</b>	13	12	10	7
<b>Buffer T4 ADN ligasa (10X)</b>	2	2	2	2
<b>DTT (100mM)</b>	2	2	2	2
<b>pTrc99A2 / <i>NdeI</i>, <i>XmaI</i> (50 ng)</b>	3	3	3	3
<b>PCR <i>melAp</i> / <i>NdeI</i>, <i>XmaI</i></b>	-	-	2 (18.3 ng)	5 (54.9 ng)
<b>T4 DNA ligasa (1 U)</b>	-	1	1	1
<b>Volumen total</b>	20	20	20	20

## Transformación bacteriana

Para la incorporación del DNA a las células de *E.coli* se empleó el método de electroporación, utilizando un electroporador marca Eppendorf® modelo 2510 a 2500 volts. Para la preparación de las células electrocompetentes de un cultivo A continuación, las células se recuperaron en medio líquido SOC+ glucosa a 37 °C por una hora.

## Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### Medios de cultivo

A continuación se describen los medios de cultivo utilizados en este trabajo:

**Tabla 11.** Medios de cultivo empleados.

Medio de cultivo	Componentes
<b>Medio Lisogeny Broth (LB)</b>	10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl
<b>Medio mineral M9</b>	6 g/L de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5 g/L de NaCl, 3 g/L de KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g/L de NH <sub>4</sub> Cl, 246.5 mg/L de MgSO <sub>4</sub> , 14.7 mg/L de CaCl <sub>2</sub> , 10 µg/mL de vitamina B1 y 2 g/L de glucosa.
<b>Medio bajo en sales YENB</b>	7.5 g/L de extracto de levadura y 8 g/L de caldo nutritivo.
<b>Medio SOC+glucosa</b>	20 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de MgSO <sub>4</sub> , 2 g/L de MgCl <sub>2</sub> , 0.58 g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl y 2 g/L de glucosa.

### Condiciones de cultivo

Para el crecimiento rutinario de todas las cepas utilizadas en este trabajo se utilizó el medio LB líquido o sólido, para seleccionar las clonas generadas y asegurar la presencia del plásmido

deseado en *E. coli*, se utilizaron los antibióticos ampicilina o carbenicilina (200/100 µg/mL). Todas las cepas se incubaron a 37 °C, excepto en el caso que se buscaba la producción de eumelanina, que fue a 30 °C. Para la evaluación cualitativa de la actividad de las diferentes clonas, se sembraron en cajas con medio sólido LB para la producción de eumelanina, el cuál contenía 0.2 g/L glucosa, 0.4 g/L tirosina, 40 µg/mL CuSO<sub>4</sub>, 0.1 mmol/L IPTG y 100 µg/mL de carbenicilina. Se incubaron a 30 °C por 3 días.

## **Caracterización de las clonas obtenidas**

### **Extracción de ácidos nucleicos totales**

Se obtuvieron ácidos nucleicos totales por medio de una extracción con fenol/ cloroformo y se analizaron en geles de agarosa como se describe en Beuken, 1997.

1. Se inoculó con una asada de cada una de las clonas de la biblioteca almacenadas a -70 °C en glicerol 40%, 3 mL de medio LB, suplementado con 100 µg/mL cb100, contenidos en un tubo de ensaye de 16x150mm y se incubó a 37 °C, a 300 rpm por 12 h.
2. De este cultivo se tomaron 500 µL y se colocaron en un tubo para centrifuga de 2 mL. Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante con ayuda de una micropunta.
3. Se resuspendieron las células en 40 µL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.1 %, sacarosa 6 %). Se añadieron 14 µL de una mezcla de fenol /cloroformo 1:1, homogenizando con vórtex.
4. Se centrifugó por 10 minutos para lograr la separación de la fase orgánica de la fase acuosa (la cual contiene los ácidos nucleicos).
5. Se tomaron 10 µL de la fase acuosa y se cargaron en un gel de agarosa al 0.8 %.

### **Evaluación cuantitativa de producción de eumelanina de las clonas de la biblioteca**

Para evaluar la actividad de las versiones truncadas de la biblioteca de forma cuantitativa se siguió el siguiente protocolo:

1. Se inoculó con una asada de cada una de las clonas de la biblioteca almacenadas a -70 °C en glicerol 40%, 4 mL de medio LB, suplementado con 40 µg/mL CuSO<sub>4</sub>, 0.1 mmol/L IPTG y 100 µg/mL cb100, contenidos en un tubo de ensaye de 16x150mm y se incubó a 30°C, a 300 rpm por 12 h.
2. Se ajustó la concentración de células a 10 g/L, a un volumen final de 1.5 mL de buffer de fosfatos pH 7 (P7). Se pesaron 0.5 g de perlas de vidrio (400-500 micras) y se colocaron en un tubo para centrifuga de 2 mL.
3. Se lisaron las células en vortex con 4 ciclos, cada ciclo de 1 minuto en vortex y un minuto en hielo. Se centrifugaron a 13000 rpm/ 4 °C por 5 minutos.
4. Se colocaron en una celda para espectrofotómetro 600 µL de buffer P7, 200 µL del extracto crudo de las células y 200 µL de una solución 5 mM de tirosina.
5. Se incubaron a 30 °C y se midió la absorbancia a 400 nm cada hora durante 7 horas.

Se utilizó la cepa de *E. coli* W3110/pTrc*melA* como control positivo, y a la cepa silvestre *E. coli* W3110/pTrc99A2 como control negativo.

### **Cuantificación de proteína por el método de Bradford**

Para el cálculo de la velocidad específica de reacción (mg de Eumelanina/g proteína\*h) de los extractos celulares se cuantificó la proteína total del extracto celular por el método de Bradford. Se utilizó el kit de la marca BioRad® y se siguieron las especificaciones del proveedor para la cuantificación.

### **Predicción de la estructura terciaria de la proteína MelA**

Se utilizó el servidor en línea I-TASSER, el cual utiliza un método jerárquico para la predicción de la estructura y la función de proteínas. Los plantados estructurales son identificados del Protein Data Bank (PDB) por medio de un segundo programa del servidor (LOMETS). A partir de estos plantados, se genera un modelo con la energía libre más baja, estos modelos son comparados de nuevo con la base de datos del PDB, y se identifica la función más probable de la proteína problema (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012).

## **Construcción del árbol filogenético para la proteína MelAc**

Se analizó la secuencia de la proteína MelAc mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para encontrar las regiones de similitud de las secuencias biológicas contenidas en la base de datos de esta página, donde se observó el porcentaje de identidad, el valor de expectancia y el porcentaje de cobertura. Se eligieron y compararon 14 secuencias, estas secuencias junto con la secuencia de MelAc se alinearon utilizando el programa ClustalW y con ayuda del programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) se realizó un árbol filogenético por medio del método Neighbor-Joining utilizando el algoritmo Jukes Cantor.

## Resultados y discusión

### Predicción de la estructura terciaria de la proteína MelA

Debido a que la proteína MelA de *R. etli* no se ha cristalizado fue necesario realizar un modelo de dicha proteína para poder tener una idea de las regiones que se eliminarían durante las deleciones secuenciales. Por medio del programa I-TASSER se obtuvieron 5 modelos de la estructura terciaria de MelA, el programa proporcionó diferentes valores con los que se puede elegir el modelo proteico más probable. El valor “C-score” indica el nivel de confianza, el modelo con mayor valor en un rango de -5 a 2, será el más confiable. En la Tabla 12 se muestra el “C-Score” obtenido para los primeros 5 modelos. Se eligió el modelo con el “C-Score” más alto.

**Tabla 12.** C-score para los primeros 5 modelos de la proteína MelA generados por el programa I-TASSER.

Modelo	C-score
1	-2.98
2	-3.20
3	-3.23
4	-3.41
5	-3.52

En la Tabla 13 se muestran las 10 proteínas que presentaron mayor identidad, tomadas de la base de datos del PDB. Se encontró mayor porcentaje de identidad con la tirosinasa MelB del hongo *Aspergillus oryzae*, con lo cual se puede tener más confianza en el modelo ya que la proteína MelB es de la misma familia de tirosinasas que MelA. Las otras proteínas que se muestran son proteínas involucradas en el transporte de oxígeno, las cuales contienen un sitio de unión a cobre tipo 3, al igual que la tirosinasa MelA. Aunque resulta interesante resaltar que, a pesar que las proteínas MelA y MelB (PDB Id: 3w6qA) tienen un tamaño similar aproximado de 600 aminoácidos (Tabla 13), la región de 106 aminoácidos que se perdió en la mutante MelAc (Echeverría, 2010) es muy diferente a la encontrada en la proteína MelB (Figura 9), lo que indica que esta región no se encuentra conservada entre las tirosinasas, como es el caso

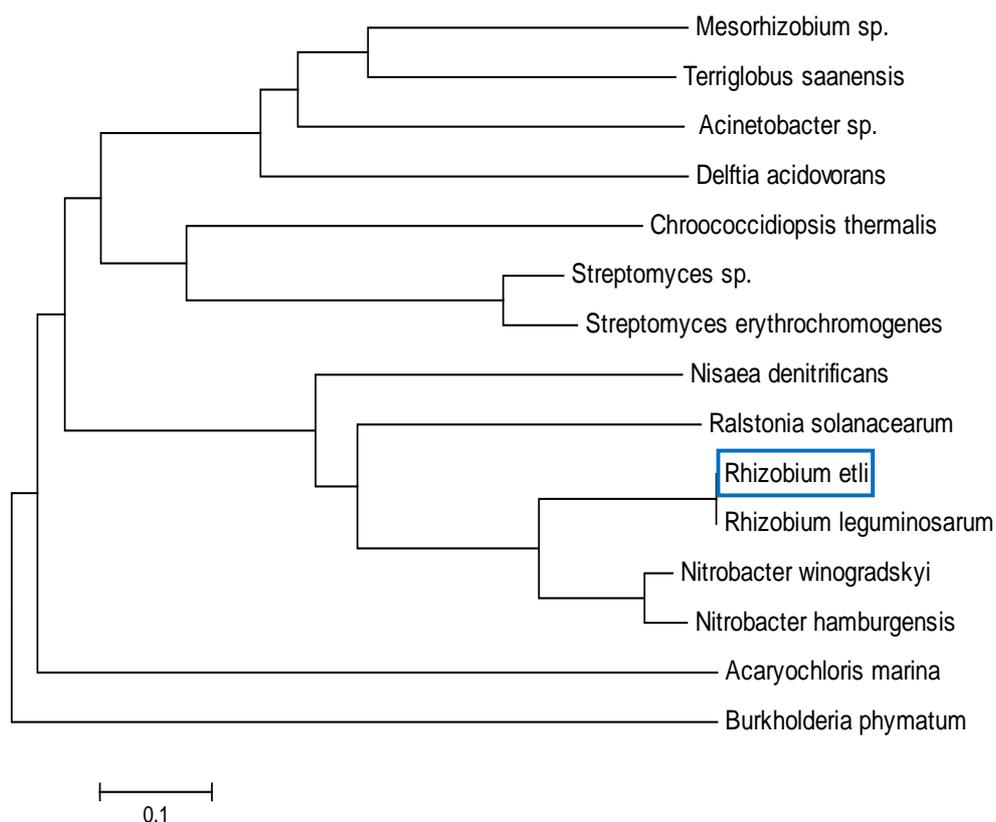
de los sitios de unión a cobre CuA y CuB. En el caso de las demás proteínas el tamaño varía de 300 a 400 aminoácidos, por lo que tampoco se encuentra esta región en su secuencia.

**Tabla 13.** Proteínas utilizadas como molde estructural para la generación del modelo de la proteína MelA.

Proteína	Id	Aminoácidos	PDB Id	Descripción
<b>Hemocianina 1</b>	0.18	491	316wA	Proteína multimérica involucrada en el transporte de oxígeno, sitios de unión a cobre tipo 3
<b>Catecol oxidasa (Ipomoea batatas)</b>	0.17	345	1bugA	Centro dinuclear de cobre
<b>Protirosinasa MelB (Asperugillus oryzae)</b>	0.21	620	3w6qA	----
<b>Catecol oxidasa (Ipomoea batatas)</b>	0.17	345	1bugA	Centro dinuclear de cobre
<b>Hemocianina deoxigenada (Rapana thomasiiana)</b>	0.15	408	1InIA	Proteína involucrada en el transporte de oxígeno
<b>Hemocianina</b>	0.16	394	1js8A	Proteína multimérica las cuales contienen varias copias de su sitio activo, involucrada en el transporte de oxígeno unido por átomos de cobre
<b>Hemocianina</b>	0.16	394	1js8A	Proteína involucrada en el transporte de oxígeno, coordinado por átomos de cobre en el sitio activo. Encontrada en artrópodos y moluscos.
<b>Hemocianina</b>	0.16	394	1js8A	Proteína involucrada en el transporte de oxígeno, coordinado por átomos de cobre en el sitio activo. Encontrada en artrópodos y moluscos.
<b>Protirosinasa MelB (Asperugillus oryzae)</b>	0.21	620	3w6qA	----
<b>Protirosinasa MelB</b>	0.21	620	3w6qA	----



Debido a las diferencias de tamaño se decidió realizar una comparación con la secuencia de otras tirosinasas reportadas, y verificar cual es el tamaño promedio de estas proteínas. En la Tabla 14 se muestra el número aminoácidos de las tirosinasas que se utilizaron para la elaboración del árbol filogenético (Figura 10), se puede observar que las proteínas que se encuentran más cercanas a MelA de *R. etli* tienen aproximadamente el mismo número de aminoácidos que MelAc, además que MelA es la proteína con actividad de tirosinasa más grande que se ha reportado en microorganismos, con lo que surge la hipótesis de que MelAc pudiera ser la versión silvestre, o que bajo ciertas condiciones de la célula puedan ser expresadas ambas versiones de la proteína; es necesario realizar otros experimentos para comprobarlo. Por otro lado se observa que las tirosinasas del género *Rhizobium* son más similares a las del género *Nitrobacter*, lo cual tiene sentido ya que ambas bacterias se encuentran clasificadas como fijadoras de nitrógeno, y como alfa-proteobacterias.

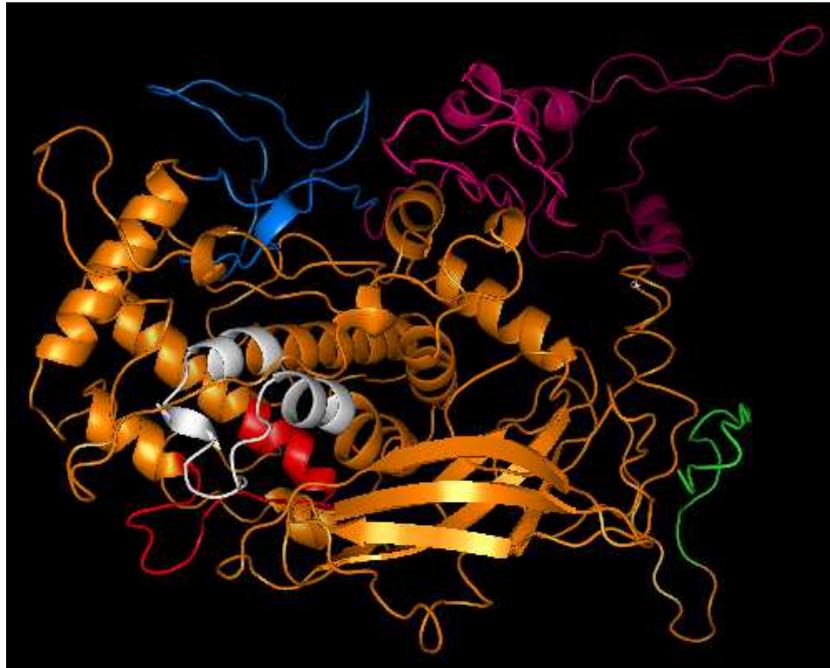


**Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias de tirosinasas.** Elaborado por el método de Neighbor-Joining, empleando el algoritmo de comparación Jukes Cantor.

**Tabla 14.** Tirosinasas utilizadas para la elaboración del árbol filogenético, obtenidas por el programa BLAST, del NCBI.

<b>Organismo</b>	<b>Aminoácidos</b>
<i>Mesorhizobium</i> sp.	543
<i>Terriglobus saanensis</i>	540
<i>Acinetobacter</i> sp.	508
<i>Delftia acidovorans</i>	493
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	503
<i>Streptomyces</i> sp.	478
<i>Nisea denitrificans</i>	506
<i>Ralstonia solanacearum</i>	496
<i>Rhizobium etli</i>	609 (503)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	503
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	514
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	515
<i>Acaryochloris marina</i>	488
<i>Burkholderia phymatum</i>	503

En la Figura 11 se muestra el modelo de la proteína MelA, en rosa se resaltan los aminoácidos que se perdieron en la mutante MelAc (Echeverría, 2010), a partir de esta estructura se observa que los 106 aminoácidos perdidos en la proteína MelAc no cuentan con una estructura periódica, ya sea hojas beta o alfas hélices y estos aminoácidos no se encuentran interactuando directamente con los aminoácidos del sitio activo. A partir del modelo de la proteína, se decidió realizar la delección de 46 aminoácidos en el extremo amino (remarcados en azul), los cuales incluye la secuencia predicha como péptido señal en MelAc, por el programa SignalP 3.0. Estos aminoácidos se encuentran formando estructuras no periódicas de asas, además que no se encuentran cerca del sitio activo de la proteína (Rojo: CuA, Blanco: CuB). De igual forma, en el extremo carboxilo se decidió deletar los últimos 16 aminoácidos (remarcados en verde). Con el antecedente de Echeverría (2010), se infiere que estas estructuras no periódicas en el extremo de la proteína, al no interactuar de forma directa con el sitio activo de la proteína pueden generar una estructura más estable, y en consecuencia aumentar su actividad. O por otro lado, no tener influencia directa en la actividad y mantener la actividad observada de la proteína MelAc.



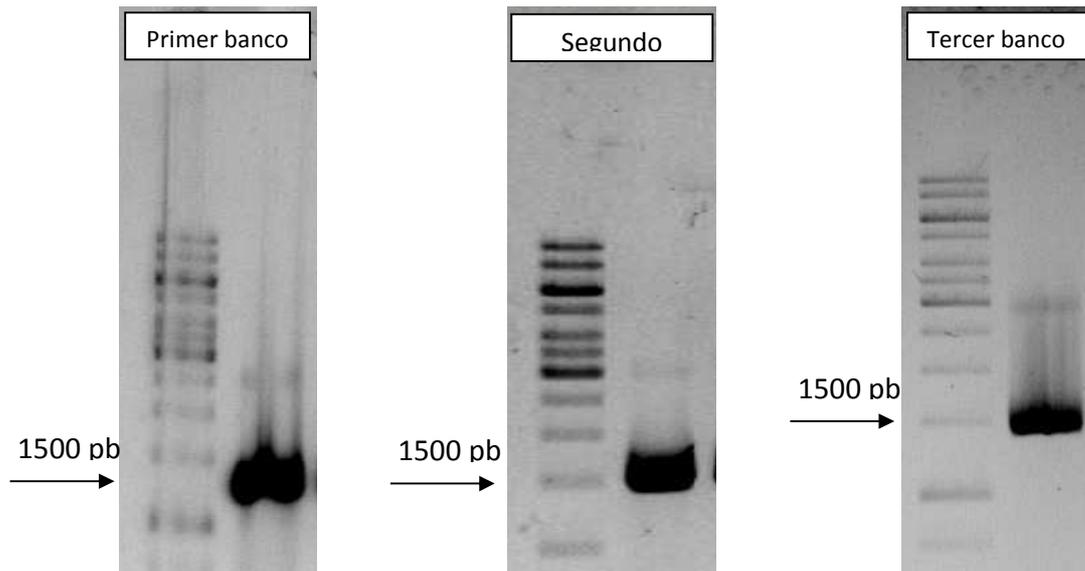
**Figura 11. Modelo de la proteína MelA generado por el programa I-TASSER.** En rosa se resaltan los 106 aminoácidos perdidos en la mutante MelAc. En azul se remarcan los 46 aminoácidos deletados en el extremo amino, los cuales incluyen la secuencia de 31 aminoácidos predicha como péptido señal, por el programa SignalP. En verde se muestran los 16 aminoácidos deletados en el extremo carboxilo de la proteína. En rojo se muestra la región conservada CuA (H-x(n)-H-x(8)-H). En blanco se muestra la región CuB (H-x(3)-H-x(n)-H).

### **Deleciones en el gen *melA* utilizando la técnica “Delete primer”**

El primer paso para la construcción de la biblioteca de versiones truncadas del gen *melA* fue generar una población de productos de PCR utilizando los oligonucleótidos sintetizados por el Dr. Paul Gaytán en la Unidad de síntesis y secuenciación, del Instituto de Biotecnología (UNAM) (Tabla 9). Se deletaron 46 aminoácidos del extremo amino y 16 del extremo carboxilo, en total en los tres bancos. Al observar el gel de agarosa con el producto de PCR se encontró una banda de 1.5 Kbp aproximadamente, debido a que este tipo de gel no tiene la resolución necesaria para identificar productos de amplificación que difieren en 100 pb o menos, se consideró que en esta banda estaban incluidos los productos de diferentes fragmentos generados en el PCR (Figura 12).

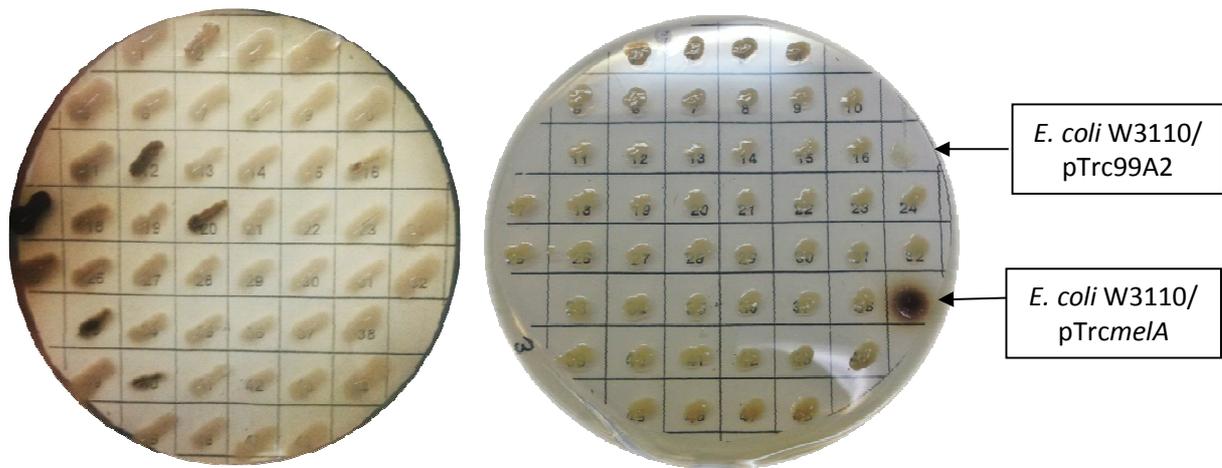
Se clonó estos fragmentos en el plásmido pTrc99A2, el cual es un derivado del plásmido pTrc99A, se utilizó la cepa MC1061 como hospedera de la biblioteca. Los controles se

encuentran clonados en el plásmido pTrc99A y transformados en la cepa de *E. coli* W3110. Para comprobar que el fondo genético de la cepa MC1061 no influyera en la actividad de las mutantes, se comparó la producción de eumelanina de la cepa MC1061 con la cepa W3110, ambas transformadas con el plásmido pTrcMelAc, se encontró que no hay diferencia entre las dos cepas utilizadas (datos no mostrados).



**Figura 12. Generación de la biblioteca de versiones truncadas.** Electroforesis para los productos de PCR de los tres bancos de versiones truncadas del gen *melAc*. Gel de agarosa 0.8% + Bromuro de etidio 0.05%, 100 V.

Las colonias seleccionadas al azar de los tres bancos se inocularon en medio de producción de melanina, junto con un control positivo (*E. coli* W3110 / pTrc*melA*) y con un control negativo (*E. coli* W3110/pTrc99A2). Se comparó el cambio de coloración de las clonas seleccionadas y los dos controles, solo en el primer banco se encontraron colonias con actividad. Por el contrario en el segundo y tercer banco no se encontró ninguna colonia que presentara cambio de color significativo con respecto al control positivo. En la Figura 13 se muestra una de las cajas inoculada con 50 colonias seleccionadas al azar del primer banco, y otra con colonias del tercer banco.

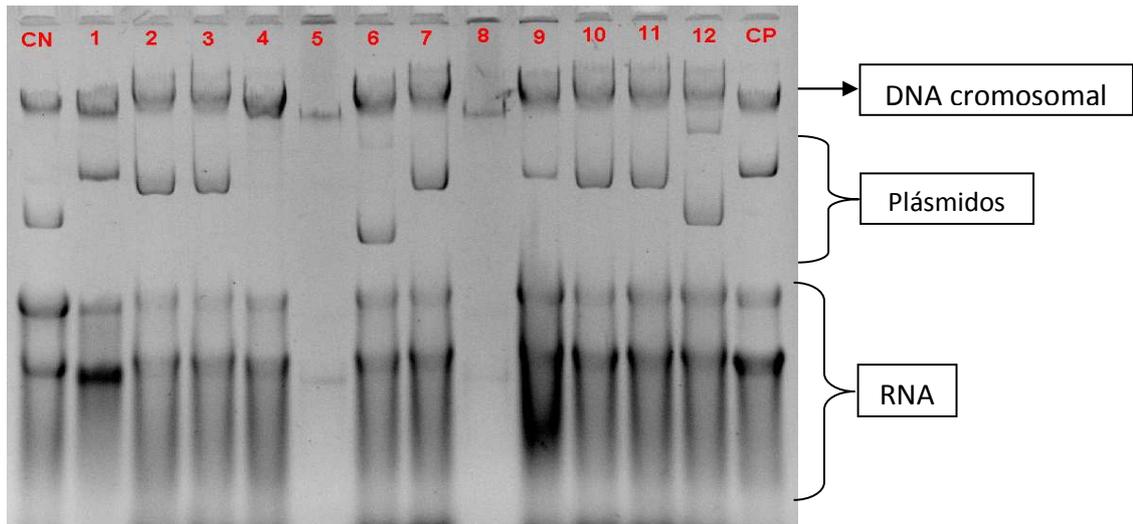


**Figura 13. Evaluación cualitativa de producción de eumelanina en las clonas de la banco.** Inoculadas en medio de cultivo para la producción de eumelanina, con un control positivo y negativo. *Izquierda*: clonas obtenidas de la clonación del tercer banco, al secuenciar las clonas que presentaron el fenotipo positivo de producción de eumelanina, se encontró que es la versión MelAc1-0. *Derecha*: clonas obtenidas de la clonación del primer banco.

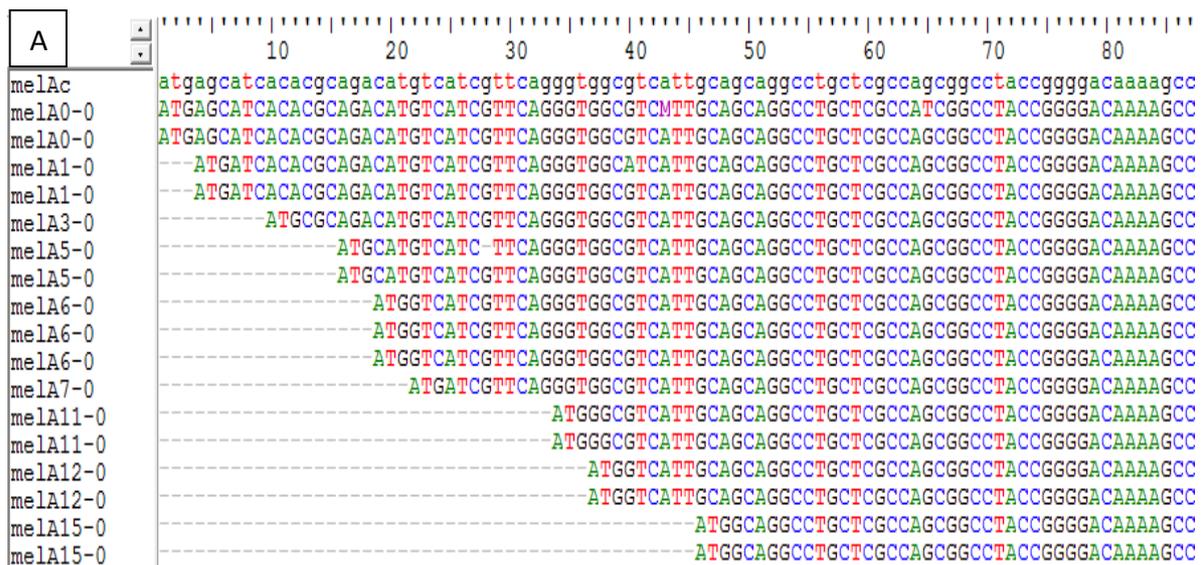
Debido a que la mayoría de las colonias obtenidas del banco no presentaron actividad, se escogieron colonias al azar sin actividad para evaluar si el plásmido contenía el gen de interés, utilizando la técnica de extracción de ácidos nucleicos totales. Posteriormente, aquellas colonias que contenían el inserto se mandaron a secuenciar, para evaluar si la pérdida de actividad fue debida a las deleciones generadas, o por mutaciones puntuales dentro del gen. En la Figura 14 se muestra un ejemplo del gel de agarosa en donde se corrieron las muestras de la extracción de las clonas seleccionadas al azar en la evaluación cualitativa, con esto se pudieron seleccionar aquellas colonias que presentaron un patrón en el gel similar al control con inserto (*E. coli* W3110/ pTrcmelA).

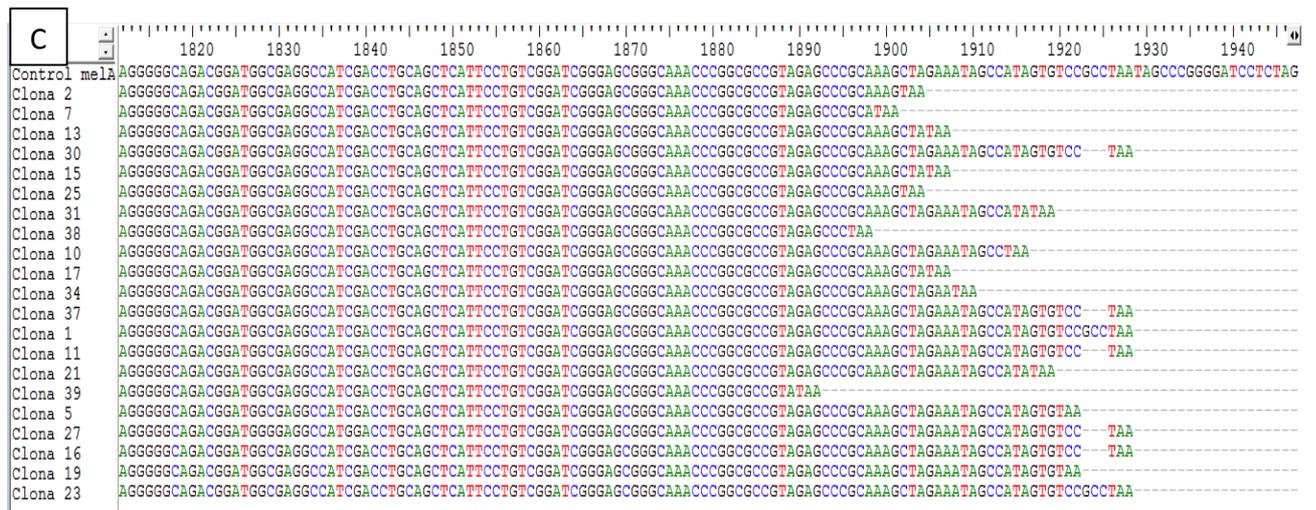
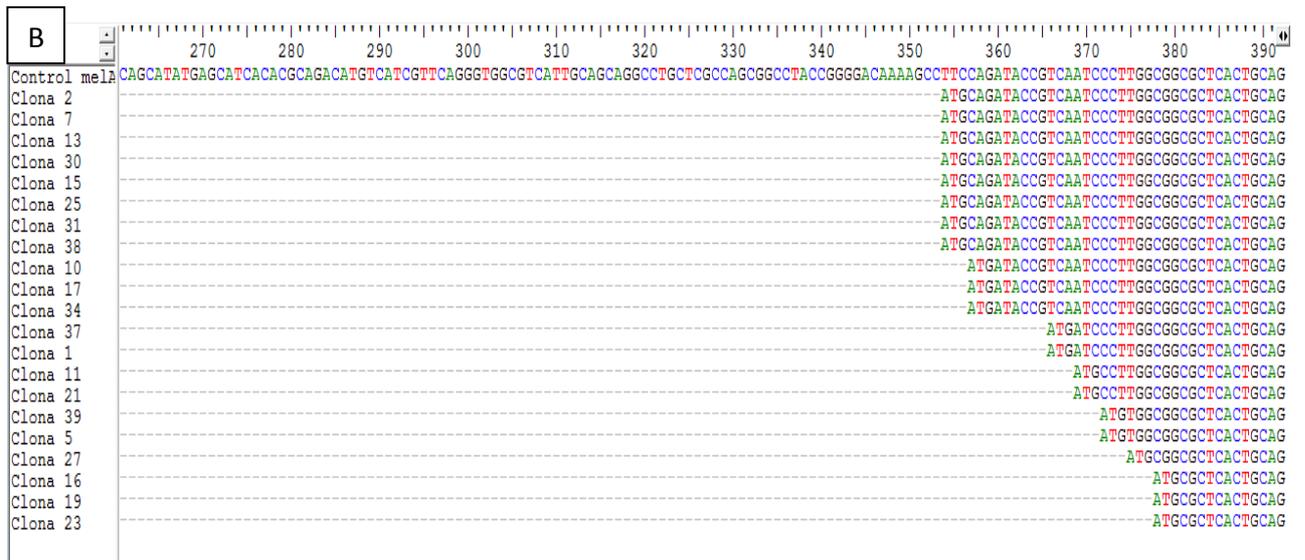
Se obtuvo la secuencia de las 50 clonas seleccionadas al azar de los tres bancos generados, se utilizaron los oligonucleótidos pTrcFw y pTrcRv (Tabla 9) los cuales tienen identidad con el plásmido pTrc99A2, por lo cual únicamente se obtuvo la secuencia de los extremos 5' y 3'. Se encontró que todos los genes que se secuenciaron presentaban deleciones en alguno o ambos de los extremos 5' y 3', además que por la diversidad encontrada se puede inferir que en el banco se encontraban representadas todas las deleciones esperadas. Por otro lado, se secuenció totalmente el gen de 20, utilizando los oligonucleótidos pTrcFw, MelA500Fw y MelA1000Fw (Tabla 8), con el objetivo de verificar que durante la clonación no se haya

generado ninguna mutación al azar que pudiera cambiar la actividad de la proteína o cambiar el marco abierto de lectura; de las 20 clonas secuenciadas se encontró que no había ningún cambio dentro del marco de lectura del gen. En la Figura 15 (A, B y C) se muestra un ejemplo del alineamiento de las secuencias obtenidas con las mutantes del primer y tercer banco contra la construcción pTrc*melAc* generada *in silico*.



**Figura 14. Extracción de ácidos nucleicos totales.** Electroforesis para la extracción de ácidos nucleicos totales de clonas seleccionadas al azar del tercer banco generado, con un control negativo (*E. coli* W3110/pTrc99A2) y un control positivo (*E. coli* W3110/ pTrc*melA*). Gel de agarosa 0.8% + Bromuro de etidio 0.05%, 100 V.





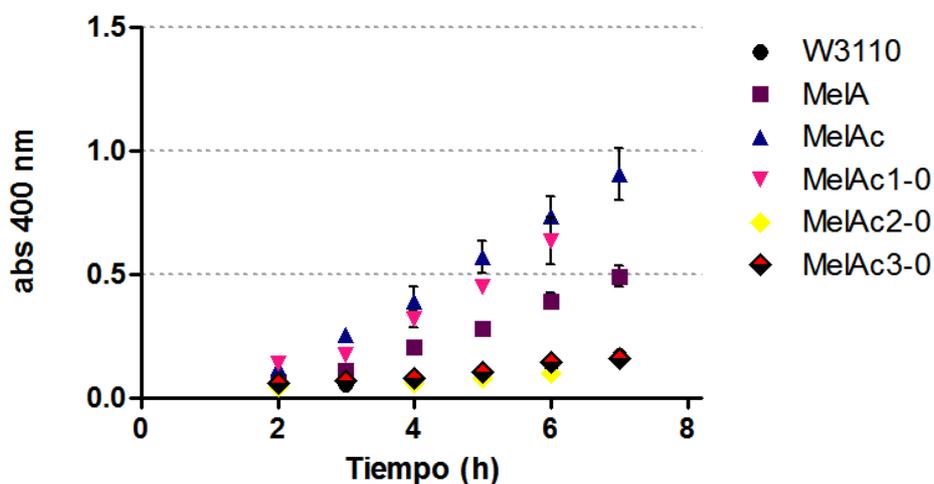
**Figura 15. Secuencias de las clonas seleccionadas.** Alineamiento realizado con el programa BioEdit, de las secuencias obtenidas del extremo 5' y 3' de las clonas del primer y tercer banco contra pTrcmelA. (A) Secuencia del extremo 5' de las clonas obtenidas del tercer banco. (B) Secuencia del extremo 5' de las clonas obtenidas del primer y segundo banco. (C) Secuencia del extremo 3' de las clonas obtenidas del primer y segundo banco.

### Evaluación cuantitativa de producción de eumelanina de las clonas de la biblioteca

Para realizar el cálculo de la actividad de tirosinasa específica de las clonas se midió la absorbancia a 400 nm utilizando tirosina como sustrato, a partir de los extractos crudos de las

cepas que expresan las proteínas MelA, MelAc, MelAc1-0, MelAc2-0 y MelAc3-0 y como control negativo se utilizó a la cepa W3110/pTrc99A2, cada ensayo se realizó por triplicado. Se graficó la absorbancia medida a 400 nm contra el tiempo por el cual se siguió la producción de melanina (Figura 12). En el caso de las clonas con 3 deleciones o más no fue posible detectar su actividad por este método, por lo que no fueron incluidas en este análisis. La pérdida de actividad puede deberse a que la deleción de estos aminoácidos desestabiliza a la proteína lo que la hace más susceptible a degradación, o la estructura es estable pero no tiene actividad al tener una conformación diferente.

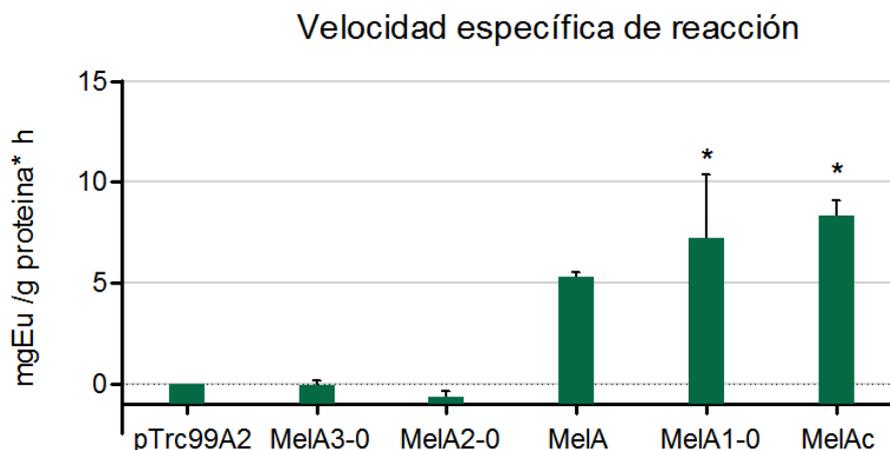
Para calcular la concentración de eumelanina, la  $Abs_{400 \text{ nm}}/h$  se convirtió a peso seco de eumelanina utilizando la relación  $1 Abs_{400} = 0.0676 \text{ g/L eumelanina}$  (Lagunas, 2004), debido a que el control negativo presentó absorbancia a la longitud de onda utilizada, a las pendientes calculadas de MelA, MelAc, MelA1-0, MelA2-0 y MelA3-0 se les restó la pendiente de la cepa W3110 con el plásmido pTrc99A2. A partir de este valor y de la concentración de proteína total del extracto celular se calculó la velocidad específica de reacción (Figura 16, Tabla 15).



**Figura 16. Evaluación cuantitativa de producción de eumelanina.** Medida por absorbancia a 400 nm de las proteínas MelA, MelAc, MelAc1-0, MelAc2-0 y MelAc3-0, en función del tiempo.

En la Figura 17 se puede observar que la velocidad específica de reacción de la mutante MelAc es mayor que la versión silvestre de la proteína MelA. Este resultado indica que la mutación en

MelAc aunque no es en el sitio catalítico de la enzima, aumenta la conversión de tirosina en melanina. Por otro lado, a partir de los antecedentes (Echeverría, 2010), este resultado sugiere que en *R. etli*, el gen que se expresa es *melAc* o que bajo ciertas condiciones en la célula puedan ser expresadas tanto *MelA* como *MelAc*; ya que al perder 106 aminoácidos su actividad aumenta, pero cuando se eliminan dos aminoácidos más su actividad llega prácticamente a cero. Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para poder comprobar que versión de tirosinasa es la que se expresa en *R. etli*. En el caso de *MelAc1-0*, *MelAc2-0* y *MelAc3-0*, se puede observar que la delección de dos aminoácidos da como resultado la pérdida de actividad de tirosinasa en las condiciones probadas, demostrando que el cambio de actividad entre las mutantes generadas en los tres bancos no es gradual, si no que al deletar dos aminoácidos, es suficiente para perder su actividad de forma significativa. Con estos resultados se puede inferir que, aunque estos aminoácidos no se encuentran en el sitio activo, pueden estar implicados en la estabilidad de la estructura de la proteína. Otra hipótesis es que estos aminoácidos pueden estar involucrados en el reconocimiento inicial del sustrato, antes de que llegue al sitio activo.



**Figura 17. Velocidad específica de reacción.** Expresada en g de Eumelanina / g proteína \* h, de los extractos celulares de las clonas *MelA*, *MelAc* y *MelAc1-0*. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3). Los asteriscos indican que no hay diferencia significativa entre la actividad de las proteínas *MelAc1-0* y *MelAc*.

**Tabla 15.** Velocidad específica de reacción de las proteínas MutMelA, MelA, MelAc, MelAc1-0, MelAc2-0 y MelAc3-0.

	<b>Velocidad específica de reacción</b> (mg Eu / g proteína*h)	<b>Porcentaje relativo de actividad</b>	<b>Secuencia</b>
<b>MelA</b>	5.31	64 %	<pre> melAc      atgagcatcacacgcagacatgtcatcgttca melA0-0    ATGAGCATCACACGCAGACATGTCATCGTTCA melA0-0    ATGAGCATCACACGCAGACATGTCATCGTTCA melA1-0    ---ATGATCACACGCAGACATGTCATCGTTCA melA1-0    ---ATGATCACACGCAGACATGTCATCGTTCA melA3-0    -----ATGCGCAGACATGTCATCGTTCA                     </pre>
<b>MelAc</b>	8.34 *	100 %	
<b>MelA1-0</b>	7.21 *	86 %	
<b>MelA2-0</b>	ND	ND	
<b>MelA3-0</b>	ND	ND	

\*No existe diferencia significativa entre estos valores.

A partir de este resultado se decidió aumentar el tiempo de incubación de las mutantes obtenidas, con el fin de poder descartar actividad residual de la enzima que no se pudiera cuantificar con la metodología que se describió anteriormente. Se incubaron las cajas a 4 °C para que el crecimiento de las células no interfiriera con la evaluación cualitativa de producción de eumelanina, los resultados se muestran en la Tabla 16.

A pesar que la actividad de todas las mutantes evaluadas es alrededor de 100 veces menor que el control (MelAc), después de 25 días de incubación a 4 °C algunas cepas presentaron actividad. Cabe señalar que, el cambio de la actividad entre estas mutantes no es lineal con respecto al número de aminoácidos perdidos. Por ejemplo la mutante que tiene 16 deleciones en el extremo amino y cero en el carboxilo (MelA16-0) presenta actividad residual, pero la mutante con 15 deleciones en el extremo amino y cero en el extremo carboxilo no se observa actividad; lo mismo se ocurrió con las mutantes MelA33-0 y MelA33-1. Los resultados anteriores sugieren que los aminoácidos que se deletaron estabilizan la estructura de la proteína y son determinantes para la funcionalidad catalítica; o bien, si presentan actividad pero son degradadas rápidamente dentro de la célula. Las mutantes que presentaron actividad residual podrían tener una versión de MelA estable y con baja actividad catalítica, la cual no puede detectarse cuantitativamente con los métodos utilizados en este estudio.

**Tabla 16.** Fenotipo observado de las mutantes del segundo y tercer banco incubadas en medio sólido LB / Tyr, a 4 °C / 25 días.

Clona	Fenotipo	Clona	Fenotipo
MelA15-0		MelA31-4	
MelA16-0		MelA31-6	
MelA19-0		MelA31-7	
MelA20-0		MelA33-0	
MelA21-0		MelA33-1	
MelA22-0		MelA34-0	
MelA25-0		MelA34-1	
MelA27-0		MelA35-1	
MelA30-0		MelA35-3	
MelA30-1		MelA37-1	
MelA30-3		MelA38-0	
MelA30-7			

Es necesario realizar experimentos complementarios para demostrar qué cambios en la estructura terciaria de la proteína generan las mutaciones realizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo representan un acercamiento a la descripción de la tirosinasa MelA de *R. etli*, la cual tiene gran importancia biotecnológica. Por otro lado es importante destacar que a partir de la pérdida de 106 aminoácidos en la mutante MelAc, a partir de dos deleciones en el extremo amino, o cualquier deleción en el extremo carboxilo, genera la pérdida de actividad de la enzima. Sin embargo, se demostró que aunque no se puede cuantificar su actividad, existen mutantes que conservan actividad residual que se puede observar después de varios días de incubación a 4 °C.

## Conclusiones

- La deleción de dos aminoácidos en el extremo amino, o un cualquier deleción en el extremo carboxilo de la proteína MelAc, es suficiente para generar la pérdida de actividad de tirosinasa.
- Al eliminar la secuencia de los primeros 30 aminoácidos en la versión MelAc, la proteína pierde actividad de tirosinasa bajo las condiciones probadas. Por lo tanto, los aminoácidos 1-31 no forman un péptido señal, y son esenciales para la actividad de tirosinasa en esta enzima.
- Las deleciones realizadas en el extremo carboxilo de la proteína tienen un mayor impacto en la pérdida de actividad.
- La proteína MelAc es la versión mínima con actividad para fines de aplicación biotecnológica.

## Perspectivas

- Realizar la purificación de MelA y las mutantes MelAc y MelA1-0 y obtener su estructura terciaria para comprobar qué cambios hubo en su estructura que generaron los cambios en actividad específica.
- Realizar la purificación de las mutantes MelAc, MelA1-0 y aquellas que presentaron actividad residual en medio sólido de producción de eumelanina, para evaluar su actividad y poder descartar que los cambios no son debidos a la expresión o estabilidad de cada una de las mutantes.
- Realizar experimentos de proteómica en *R. etli* formando nódulos para comprobar que versión de la tirosinasa MelA es la que se expresa bajo estas condiciones.

## Referencias

- Cabrera-Valladares, N., Martínez, A., Piñero, S., Lagunas-Muñoz, V. H., Tinoco, R., De Anda, R., Gosset, G.** (2006). Expression of the melA gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 772–779.
- Cano, L. E.** (2008). Melanina : implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero to evade the host immune response, (574).
- Chávez-Béjar, M. I., Balderas-Hernandez, V. E., Gutiérrez-Alejandre, A., Martinez, A., Bolívar, F., & Gosset, G.** (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. *Microbial Cell Factories*, 12, 108.
- Claus, H., & Decker, H.** (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3–14.
- Cubo, M. T., Buendia-Claveria, a. M., Beringer, J. E., & Ruiz-Sainz, J. E.** (1988). Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1812–1817.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., & Tuczek, F.** (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, 398(1-2 SPEC. ISS.), 183–191.
- Durán, N., Rosa, M. a., D'Annibale, A., & Gianfreda, L.** (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907–931.
- Echeverría, A.** (2010). Tesis, S. D. E., & Lagarda, G. G. (n.d.). *FACULTAD DE CIENCIAS Caracterización de mutantes del gen melA de Rhizobium etli expresadas en Escherichia coli.*

- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., & Thöny-Meyer, L.** (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 47(12), 1749–1760.
- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L.** (2012). Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183–191.
- Fenoll, L. G., Rodríguez-López, J. N., García-Sevilla, F., García-Ruiz, P. A., Varón, R., García-Cánovas, F., & Tudela, J.** (2001). Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1548(1), 1–22.
- García-Borrón, J. C., & Solano, F.** (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 15(3), 162–173.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M. a, Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Dávila, G.** (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology*, 4(6), R36.
- Henson JM.** (2001) Melanin. In: Hofrichter M, Steinbuechel A, editors. Biopolymers. Weinheim: Wiley-VCH. p. 229–47.
- Ito, S.** (2003). A Chemist 's View of Melanogenesis. *Pigment Cells Res*, 16, 230–236.
- Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A.** (2006). Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1002–1008.
- López-Serrano, D., Solano, F., & Sanchez-Amat, A.** (2004). Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene*, 342(1), 179–187.

- Lucas-Elío, P., Solano, F., & Sanchez-Amat, A.** (2002). Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: Identification of ppoS, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology*, 148(8), 2457–2466.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M.** (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981–8990.
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A.** (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5(4), 203–223.
- Piñero, S., Rivera, J., Romero, D., Cevallos, M. A., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G.** (2007). Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1-3), 35–44.
- Riley, P.A.** 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biology*. Vol. 29, No. 11, pp 1235-1239.
- Roulin, A., Almas, B., Meichtry, S., Jenni, L.** 2011. Eumelanin- and pheomelanin- based colour advertise resistance to oxidative stress in opposite ways. *Journal of Evolutionary Biology*. 24, pp2241-2247.
- Urán, E, Cano, L.** 2008. Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune response. Vol. 12-2.
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. a., & Naaz, I.** (2014). Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*, 2014.