



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE  
DE LA TIROSINASA DE Rhizobium etli

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LUIS ROBLEDO ARRATIA

TUTOR  
DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

2008





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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Robledo  
Arratia  
Luis  
53 17 30 93  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
301008912

2. Datos del Tutor

Dr  
Guillermo  
Gosset  
Lagarda

3. Datos del Sinodal 1

Dra  
María Isabel  
Saad  
Villegas

4. Datos del Sinodal 2

Dr  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

5. Datos del Sinodal 3

Dr  
José Adelfo  
Escalante  
Lozada

6. Datos del Sinodal 4

M en IBB  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky

7. Datos del Trabajo Escrito

Generación y caracterización de una mutante de la tirosinasa de Rhizobium etli  
89 p  
2008

## AGRADECIMIENTOS

A mi “abue” Esperanza, cuyos consejos sobre la vida y la muerte han definido gran parte de quien soy y de quien quiero llegar a ser.

A mi mamá que ha soportado y moldeado mi carácter durante 22 años; por su enorme apoyo académico y emocional y porque con su frase “No hagas lo que los demás hacen” me ha llevado a buscar satisfacciones que van más allá de las socialmente establecidas.

A mi papá por sus consejos, que han sido una guía en mis decisiones y porque su constante “Nadie hará las cosas por nosotros” me ha hecho autónomo, me ha empujado a fijarme siempre nuevas metas y a cumplirlas, a sobresalir y ser exitoso.

A ambos porque fueron las únicas personas que apoyaron mi intención de ser Biólogo, gracias a su confianza hoy lo he conseguido.

A Yolanda y Diego, mis hermanos, porque los juegos, las peleas y las pláticas nos han hecho fuertes y nos han permitido reírnos del mundo.

A Circe, por ser mi mejor amiga y compartir conmigo la pasión por la Biología.

A Javier, por acompañarme y animarme a lo largo de la escritura de este trabajo.

A Viridiana, Erika y Haven porque sobrevivimos a Cuernavaca. A todos mis amigos.

Al Dr Gosset por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo. Al Dr. Joel Osuna por su asesoría en la realización de algunos protocolos. A Naty e Inés por todos sus consejos.

A todos los profesores que lograron transmitirme todo su amor por la Biología.

*Entre los hombres de esta especie (artistas, científicos, héroes..., pensadores) ha surgido el pensamiento peligroso y horrible de que acaso toda la vida humana no sea sino un tremendo error, un aborto violento y desgraciado de la madre universal, un ensayo salvaje y horriblemente desafortunado de la naturaleza. Pero también entre ellos es donde ha surgido la otra idea de que el hombre acaso no sea sólo un animal medio razonable, sino un hijo de los dioses y destinado a la inmortalidad.*

(Me incluyo en el primer grupo)

“El lobo estepario”, Hermann Hesse

*La única posición que me deja sin disonancias cognitivas es el ateísmo.*

*No es un credo.*

*La muerte es inevitable y reemplaza a la vez*

*a las sirenas del paraíso y a las amenazas del infierno.*

*La vida en esta Tierra, con todo su misterio y su belleza y su dolor,  
debe ser vivida intensamente:*

*caemos y nos levantamos, estamos tristes, confiados, inseguros,  
sentimos soledad y alegría y amor.*

*No hay nada más; pero yo no quiero nada más.*

Ayaan Hirsi Ali

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Resumen .....	1
<b>I. Introducción</b>	
1.1 Pigmentos en la naturaleza .....	3
1.2 Melanina .....	4
1.2.1 La melanina como filtro solar .....	5
1.2.2 Otras funciones de la melanina .....	8
1.2.3 Melanina en la microbiota .....	9
1.3 Tipos de melanina .....	11
1.4 Propiedades de la melanina .....	14
1.5 Tirosinasa .....	16
1.5.1 Estructura de la tirosinasa microbiana .....	17
1.5.2 Perspectiva evolutiva de las tirosinasas .....	19
1.6 Otras enzimas melanogénicas .....	22
1.7 Tirosinasa y melanina en los procariontes .....	23
1.7.1 Genética molecular de la melanogénesis bacteriana .....	25
1.7.2 El caso específico de <i>Rhizobium etli</i> .....	26
1.8 Aplicaciones de la tirosinasa y la melanina .....	28
<b>II. Antecedentes</b> .....	30
<b>III. Justificación</b> .....	32
<b>IV. Objetivos</b> .....	34
<b>V. Materiales y métodos</b> .....	35
5.1 Cepas bacterianas .....	35
5.2 Generación del banco de mutantes .....	36
5.3 Búsqueda de mutantes .....	39

5.4 Caracterización genotípica de las mutantes .....	42
5.5 Caracterización fenotípica de las mutantes mejoradas .....	43
VI. Resultados .....	46
6.1 Generación de un banco de mutantes .....	46
6.2 Búsqueda de las mutantes obtenidas .....	47
6.3 Caracterización genotípica .....	50
6.4 Caracterización fenotípica .....	55
6.4.1 Cinéticas en medio rico Luria – Bertani .....	55
6.4.2 Cinéticas en medio rico LB adicionados con glucosa .....	59
6.4.3 Cinéticas en medio mínimo M9 .....	62
VII. Discusión .....	66
VIII. Conclusiones .....	81
IX. Perspectivas .....	83
X. Referencias .....	84

## RESUMEN

La melanina es un pigmento de alto peso molecular y de diversas tonalidades, incluyendo amarillo, rojo, café y negro, dependiendo del tipo del que se trate.

Está presente en prácticamente todas las taxas cumpliendo con funciones muy variadas como la coloración de piel, ojos, cabello, pelo, plumas, crestas, escamas y superficies vegetativas, cuya importancia radica en la protección contra la radiación ultravioleta, aunque también interviene en la termorregulación al dispersar el calor. Es un mecanismo de defensa inmune, tiene propiedades antibióticas y antioxidantes, participa en el saneamiento de daños físicos al proporcionar rigidez a las estructuras; actúa como ornamentación, camuflaje y para la exhibición sexual.

Es un biopolímero de compuestos indólicos cuya composición heterogénea le confiere una configuración amorfa y propiedades físicas y químicas de gran importancia biológica e industrial, por ejemplo su amplio rango de absorción en el espectro, sus capacidades redox, quelantes y de foto-oxidación.

La tirosinasa cataliza la oxidación de monofenoles en dopacromo para que después estos sean polimerizados en el exterior celular hasta llegar a dar melanina. Solamente se conoce la estructura de la enzima de *Streptomyces castaneoglobisporus*, cuyo centro catalítico tiene dos núcleos de cobre coordinados por tres residuos de histidina cada uno, localizados en una cavidad hidrofóbica.

*Rhizobium etli* vive en simbiosis con el frijol y contiene el gen *mela* que codifica para una tirosinasa, su papel es en la nodulación y en la protección contra especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, aunque no así en la fijación de nitrógeno.

Tanto la tirosinasa como la melanina tienen una enorme cantidad de aplicaciones industriales y biotecnológicas dado que ha sido posible su generación a partir de cultivos microbianos. Se han hecho varios esfuerzos por mejorar la producción, entre los últimos estuvo la transformación de una cepa de *Escherichia coli* con el gen *mela* de *R. etli*; se observó que creciendo a 30 °C en un medio con tirosina como sustrato y cobre como cofactor se obtiene el 100% de rendimiento de conversión de tirosina en eumelanina y que no se requiere a la chaperona de cobre para que la proteína lleve a cabo su actividad enzimática como sí ocurre en otros organismos.

Con la finalidad de optimizar algunos parámetros cinéticos de la generación de melanina, sobretodo en cuanto a la rapidez con que la tirosinasa lleva a cabo su actividad, se decidió producir una cepa más eficiente.

Para ello se generó un banco de mutantes del gen *melA* de *R. etli* a través de la técnica de PCR mutagénica y se hizo una búsqueda exhaustiva para identificar a las cepas que contenían al gen que codificara para tirosinas con mejores capacidades. Se caracterizó fenotípica y genotípicamente a las mejores clonas y se obtuvieron valores de velocidad específica de crecimiento y velocidad de formación de producto.

Se obtuvo una biblioteca de mutantes con una tasa de mutación de 2 bases por cada 1000, teniendo una eficiencia de transformación del 60% en células con capacidad de generar  $10^9$  colonias por  $\mu\text{g}$  de DNA.

Las clonas que produjeron melanina fueron las incubadas a 30 °C, ya que ni las que estuvieron a 37 ni a 42 °C lograron hacerlo, por lo que las mutaciones no les confirieron termoestabilidad. Seis de ellas tuvieron únicamente cambios a nivel de secuencia de nucleótidos. Sólo la cepa X*melA1MUT*, que tuvo la tasa de mutación de bases más elevada, tuvo un cambio de aminoácido, de alanina por treonina en el sitio 371.

La tirosinasa silvestre no pudo producir melanina en medios sin glucosa, a diferencia de X*melA1MUT* que sí pudo hacerlo. La velocidad de producción en la mutante fue 50 veces mayor que en la primera en medio LB y su velocidad de crecimiento disminuyó en todas las condiciones de crecimiento, demostrando que la formación de melanina reduce la capacidad biosintética de la bacteria.

Todos estos resultados nos permiten concluir que la tirosinasa *melA1MUT* posee características estructurales y cinéticas que le confieren una mejoría en la velocidad de producción de melanina con tirosina como sustrato.

# I. INTRODUCCIÓN

*Nada en Biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución.*  
Theodosius Dobzhansky

## 1.1 Pigmentos en la naturaleza

Una de las manifestaciones más evidentes de la luz es la formación de colores, que son el resultado de la capacidad de los cuerpos de absorber y reflejar determinadas longitudes de onda. En los organismos son el indicio de diferentes estados fisiológicos o de las condiciones imperantes de su ambiente.

En biología, un pigmento o biocromo es cualquier material que resulta en la coloración de las células y ésta es la misma vista desde cualquier ángulo, mientras que existen colores llamados estructurales, que son el resultado de una reflexión o iridiscencia selectiva debida generalmente a la presencia de estructuras multicapa, por ejemplo de queratina (Britton, 1983).

Por su estructura molecular, los pigmentos están clasificados en carotenoides, flavonoides, antocianinas y betacianinas, quinónicos, indigoides y derivados del indol, pirimidinas y tetrapirroles y porfirinas (Britton, 1983).

Los pigmentos pueden tener también otros importantes papeles funcionales, como ocurre con la clorofila, que es un pigmento encontrado en plantas, bacterias y algas y es gracias a ella que las plantas tienen su distintivo color verde, además, las células que la contienen llevan a cabo la fotosíntesis, cuya función biológica es importantísima; lo mismo ocurre con la hemoglobina o pigmento respiratorio, que da el color rojo a la sangre y adicionalmente efectúa el transporte de oxígeno, otro proceso vital de gran trascendencia; un ejemplo más es la rodopsina o pigmento visual (Dadachova et al., 2007).

Cuando un pigmento absorbe un fotón o cuanto de luz, un electrón de la molécula de pigmento es lanzado a un nivel energético más alto; se dice entonces que está excitado. Este estado de excitación puede mantenerse sólo por periodos muy cortos de tiempo, de aproximadamente una millonésima de segundo o aún menos; la energía de excitación puede disiparse como calor; también, puede reemitirse inmediatamente como energía lumínica de mayor longitud de onda, o puede provocar una reacción química, como sucede en la

fotosíntesis, lo cual depende no sólo de la estructura del pigmento dado, sino también de su relación con las moléculas vecinas (Britton, 1983).

## **1.2 Melanina**

La melanina es un pigmento de alto peso molecular (Dadachova et al., 2007) cuya producción en la naturaleza es una de las más universales y, al mismo tiempo, enigmáticas adaptaciones de los seres vivos a las condiciones cambiantes de la Tierra (Plonka et al., 2006). Encontramos la síntesis constitutiva de varios tipos de melaninas en prácticamente todos los taxa, desde los microorganismos hasta las plantas y los animales incluido el hombre (della-Ciopa et al., 1990). Esto nos sugiere una importancia evolutiva de la melanogénesis; al conformar las melaninas un grupo heterogéneo de biopolímeros, sirven como ejemplo de la convergencia en la evolución dado que su producción se lleva a cabo en varias vías metabólicas incluso dentro de un mismo taxón (Plonka et al., 2006).

El origen del nombre, derivado del griego *melanos* (oscuro), no está muy claro aunque es generalmente atribuido al químico sueco Berzelius en 1840 (Riley, 1997).

La melanina cumple una gran cantidad de funciones biológicas, por ejemplo, se encarga de la pigmentación de piel, cabello y ojos en los mamíferos, plumas y crestas en las aves, escamas en reptiles y peces y superficies de hongos y plantas, cuya importancia radica en la protección a través de la absorción de la radiación ultravioleta (del Marmol y Beermann, 1996) y en su capacidad genoprotectora actuando como fotosensibilizador de las células que han sido expuestas a niveles de radiación suficientes como para provocar daño genético (Riley, 1997); además, la neuromelanina en los primates tiene un rol neuroprotector, ya que disminuye los niveles de dopamina-quinona que se relacionan con el mal de Parkinson, aunque en algunos casos puede aumentar la concentración de especies radicales derivadas de la dopamina, lo que puede resultar perjudicial a las células catecolaminérgicas (Greggio et al., 2005). Por otro lado, las mutaciones que perturban la función de las enzimas relacionadas con la melanización (principalmente la tirosinasa en los primates, como expongo más adelante) provocan un desorden pigmentario (hipopigmentación) oculocutáneo cuando es heredado de manera homóciga, conocido como albinismo (Yamaguchi et al., 2007). En las escamas de los reptiles, la presencia de

melanina es importante debido a que interviene en la termorregulación, al actuar como un dispersor del calor (Riley, 1997).

### **1.2.1 La melanina como filtro solar**

La producción de melanina se lleva a cabo en los melanosomas de los melanocitos y es debido a su distribución y funcionamiento que se determina el fenotipo de coloración desde los hongos hasta los animales. En la piel de los humanos, los melanocitos están en el borde dermis-epidermis con un patrón disperso, conectados con los queratinocitos y fibroblastos, siendo estos tres tipos celulares los que controlan la función y el fenotipo cutáneo (Yamaguchi et al., 2007). La melanina actúa como un filtro óptico que atenúa la radiación, dispersándola; además también es un filtro químico a través de su función como radical libre estable que puede absorber compuestos producidos por la acción fotoquímica, que podrían ser tóxicos o carcinogénicos (Jablonski y Chaplin, 2000).

En los mamíferos, la síntesis de melanina requiere de la tirosinasa (TYR) y dos proteínas relacionadas, Tyrp1 y Dct (dopacromo tautomerasa), que comparten un 40% de identidad; la enzima principal está codificada en el *locus c* (Tyr) del cromosoma 11 en humanos (del Marmol, 1996).

Existe una gran regulación en los patrones de pigmentación en los humanos, pues dependiendo de los antecedentes étnico-raciales de cada individuo puede ir desde tonalidades muy claras hasta las muy oscuras, lo cual depende de la combinación en diferentes proporciones, de los tres tipos de melanina existentes. La densidad de melanocitos es afectada por el ambiente (incluyendo la radiación UV y los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> como reguladores de este efecto melanogénico); gracias a lo anterior existen diferencias en la coloración, una piel y cabello oscuros protegerán mejor contra condiciones ambientales rigurosas como lo demuestra la figura 1 (Yamaguchi et al., 2007).

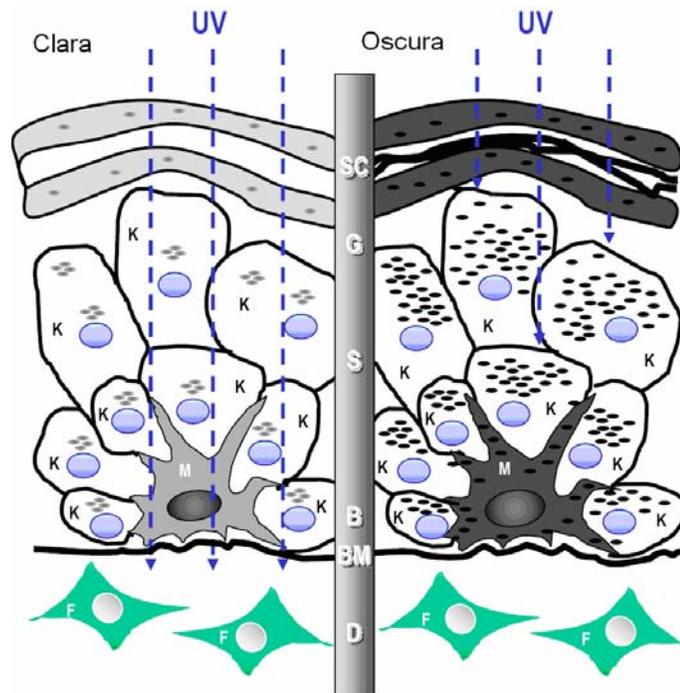


Fig. 1 Arquitectura de los tipos de piel clara y oscura. D=dermis, F=fibroblasto, K=queratinocito, M= melanocito y los óvalos representan gránulos de melanina.

A pesar de esto, se sabe que la sola exposición al sol provoca un incremento en la síntesis de melanina en la piel, dando el efecto llamado bronceado (Jablonski y Chaplin, 2000).

Jablonski y Chaplin (2000) hacen una correlación entre el color de la piel de pueblos con más de 500 años residiendo en la misma área y su exposición a la luz UV; proponen que entre más alejados del ecuador hayan estado los ancestros de una persona, más clara tendrá la piel.

La reflexión de la piel está estrechamente relacionada con la latitud y con los niveles de radiación UV, la máxima correlación se observa a 545 nm, cerca del máximo de absorción para la oxihemoglobina, sugiriendo que la función principal de la melanina es la regulación de los efectos de la luz ultravioleta sobre los contenidos de los vasos sanguíneos de la dermis; la piel melanizada protege contra la fotólisis de ácido fólico inducida por UV, el cual es un metabolito esencial para el buen desarrollo del tubo neural embrionario y de la espermatogénesis (Jablonski y Chaplin, 2000). Estos autores encontraron que en todas las zonas del planeta, las mujeres tienen un color de piel más claro, lo cual atribuyen a que necesitan sintetizar una mayor cantidad de vitamina D<sub>3</sub> durante el embarazo y la lactancia.

En su artículo, sugieren que la doble presión selectiva de fotoprotección y síntesis de vitamina D<sub>3</sub> ha generado dos clinas (cambio gradual, creciente o decreciente, de la frecuencia con la que un rasgo fenotípico se presenta en poblaciones geográficamente conectadas debido a condiciones medioambientales) en la pigmentación de la piel. La primera, del ecuador a los polos, definida por la mayor necesidad de fotoprotección, en particular en el ecuador y en general en los trópicos. La segunda clina se define por la mayor demanda en latitudes altas de síntesis de vitamina. Los humanos que habitan las regiones de intersección de estas clinas tienen el potencial de desarrollar grados variables de pigmentación facultativa.

La coloración de la piel en los humanos es adaptativa y lábil, los niveles de pigmentación han cambiado más de una vez durante la evolución; debido a esto, el color de la piel no puede tener ningún valor en la determinación de las relaciones filogenéticas entre los grupos humanos modernos (Jablonski y Chaplin, 2000).

Cuando los ancestros del hombre moderno se separaron de los simios, estaban cubiertos de pelo; muy poca luz UV llegaba a su piel y como resultado esta era blanca. Con el transcurso de la evolución, el pelo se fue haciendo más fino y delgado, dejando a la piel más expuesta al sol ecuatorial; como una adaptación a esto, los cuerpos produjeron más melanina para protegerlos de la radiación, por tanto la piel se oscureció.

Al tiempo que empezaban las migraciones hacia el norte y hacia el este (Europa y Asia), se expusieron a diferentes cantidades de radiación solar; en general la piel oscura limitaba la absorción de luz solar para generar vitamina D<sub>3</sub>, debido a esto, una de las adaptaciones que surgieron fue la de empezar a producir menos melanina. Sin embargo no todos en el norte adquirieron tonalidades muy claras, en el caso de la etnia de los Inuits (mal llamados esquimales), la obtención de vitamina D no dependió del sol, sino que otra adaptación presentó ventajas para ellos. Obtienen toda la que necesitan a partir de su dieta alta en grasas de peces, las cuales son ricas en vitamina D; esto hizo que no tuvieran la necesidad de disminuir la producción de melanina. Es por esto que a pesar de su clima frío y falta de exposición solar, los Inuits se han mantenido con una coloración típica de latitudes más bajas (Jablonski y Chaplin, 2000).

Las proteínas MATP y P funcionan como bombas/transportadores que regulan el transporte de iones a través de las membranas intracelulares que controlan la liberación de

la tirosinasa a los melanosomas y por tanto la formación de melanina; por otro lado, el receptor 1 de melanocortina (MC1R) acoplado a proteínas G, controla las señales para la formación de eumelanina, feomelanina o alomelanina (tratadas con detenimiento en una sección posterior) dependiendo de los agonistas o antagonistas que se le unan. Se ha demostrado que los polimorfismos poblacionales en los genes de estos componentes determinan el rango de pigmentación (Yamaguchi et al., 2007).

La densidad de melanocitos disminuye aproximadamente 10% cada década y morfológicamente se vuelven más dendríticos y con menor actividad de tirosinasa; esto es más evidente en el encanecimiento del cabello que se debe a una pérdida gradual de las células troncales de melanocitos en los bulbos pilosos (Yamaguchi et al., 2007).

### **1.2.2 Otras funciones de la melanina**

En los invertebrados, la melanina cumple funciones únicas, ya que los insectos por ejemplo, la utilizan como mecanismo de defensa inmune, en la sanación de heridas y en el endurecimiento cuticular o esclerotización (Sugumaran et al., 2002). La generación de ortoquinonas tiene una alta relevancia evolutiva dado que su reactividad, especialmente contra grupos nucleofílicos como tioles y aminos, le confiere propiedades antibióticas útiles en el sistema inmune y en los aerosoles defensivos de los insectos y en la tinta de los cefalópodos (Riley, 1997).

En las plantas el pigmento tiene una participación importante en la regulación del potencial de óxido-reducción y en el sistema de saneamiento de daños físicos superficiales, pues proporcionan rigidez a las frutas cuando éstas adquieren la coloración café típica de las lesiones (Selinheimo et al., 2007); además cumple con un papel estructural por el entrelazamiento de las proteínas que ofrecen protección mecánica y contra la degradación, como ocurre en la melanización de la vaina de las semillas (Riley, 1997).

Otra enorme variedad de roles han sido propuestos para la melanina en prácticamente todos los organismos: camuflaje, ornamentación y exhibición sexual, regulación de la síntesis de vitamina D, regulación de la sensibilidad de la piel a la congelación, comportamiento antioxidante, unión de iones metálicos y drogas, absorción y conversión de energía óptica en energía eléctrica y calor, transducción de la energía

actuando como un semiconductor amorfo, entre otros (Hill et al., 1992 y Kaxiras et al., 2006).

El surgimiento de la melanina como un material bioprotectivo no específico es el resultado de la relativa facilidad con que estas complicadas estructuras aromáticas pueden ser sintetizadas a partir de una gran variedad de precursores (Dadachova et al., 2007).

La melanina también puede tener aspectos negativos, por ejemplo si la cantidad de energía absorbida es demasiado alta, puede generar especies químicas activadas que dañan a las macromoléculas celulares, incluido el DNA, ocasionando muerte celular (Parkinson), mutaciones (degeneración macular relacionada con la edad) y cáncer (melanoma maligno) (Berendschot et al., 2002, Kaxiras et al., 2006, Zucca et al., 2004).

### **1.2.3 Melanina en la microbiota**

Existen una gran cantidad de estudios enfocados en la biología, la genética y las implicaciones médicas de la producción de melanina en los animales y en el hombre (Zecca et al., 2001, Yamaguchi et al., 2007, Halaban et al., 2002, Slominski et al., 2005); sin embargo, en los microorganismos hay muy pocos trabajos al respecto.

Esto ha generado que el papel fisiológico en las bacterias, hongos microscópicos y protistas sea incierto, siendo así que se ha propuesto que la melanina actúa en la formación de estructuras reproductoras, de esporas, como factor de virulencia en los organismos patógenos y en la protección celular después de algún daño (Selinheimo et al., 2007); está relacionada en la respuesta contra el daño que generan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la presencia de compuestos tóxicos en el medio, por ejemplo ácidos fenólicos (Piñero et al., 2007); además les conferiría una ventaja de supervivencia en su medio ambiente, ya que muchas bacterias y hongos melanogénicos habitan sitios impresionantemente extremos como las grandes altitudes y las regiones Ártica y Antártica (Dadachova et al., 2007). No abundaré más respecto a la melanina en las bacterias ya que más adelante dedico una sección específica para ello.

Los hongos como *Cryptococcus neoformans*, que provocan graves infecciones en pacientes con SIDA, tienen capas de melanina en sus membranas; por lo tanto, la infección se puede llevar a cabo dado que la melanina al ser rica en radicales libres tiene la

posibilidad de contrarrestar los ataques que el sistema inmune lanza en contra del organismo invasor, (Casadevall et al., 2007).

El ejemplo más dramático de especies de hongos melanizantes, es el de aquellas que presentan radiotropismo, encontradas colonizando las paredes y los suelos que rodean la Estación de Energía Atómica de Chernobyl, ya que crecen en dirección de las partículas radiactivas (Zhdanova et al., 2004); esto lo que demuestra es que la melanina también brinda protección contra la radiación ionizante, y además de ello Dadachova y colaboradores (2007) proponen que los organismos melanizantes pueden aprovechar la radiación como energía metabólica ya que su crecimiento, en presencia de un flujo de radiación, aumenta. Esto lo que sugiere es que los rayos gama elevan a algunos electrones de la melanina a estados de excitación, iniciando un proceso que culminaría en la producción de energía química. Incluso esto sería similar al modo en que la fotosíntesis provee de energía a las plantas y los autores especulan que la melanina podría obtener energía no sólo de los rayos gama sino también de radiaciones de baja energía como los rayos X y ultravioleta.

El papel de la melanina en microorganismos que viven en condiciones de alto flujo de radiación electromagnética es más dramático cuando se considera al pigmento desde una perspectiva paleobiológica. Muchos fósiles fúngicos están melanizados y sus esporas son comunes en las capas sedimentarias del Cretácico temprano cuando muchas especies de plantas y animales se extinguieron y que coincidió con una de las dos etapas de magnetismo cero en la Tierra, lo que generó la pérdida de su escudo contra la radiación cósmica, sugiriéndose que la radiación que emitió la estrella Némesis al pasar fue una de las causas de los eventos de extinción; también se ha dicho que la proliferación de hongos melanizantes contribuyó a algunas de las extinciones masivas del final del Cretácico, incluida la de los dinosaurios (Dadachova et al., 2007).

En cuanto a las interacciones biológicas, se sabe que en la simbiosis de algunas plantas con hongos melanogénicos, la melanina permite una termotolerancia extrema debido a sus propiedades de disipación del calor (Redman et al., 2002).

Hasta el momento ningún estudio presenta datos que pudieran decirnos que la melanina es esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos que sean capaces de sintetizarla, tampoco hay reportes de que su ausencia sea un factor importante para la

inviabilidad de los individuos; sin embargo, los datos de la literatura sí permiten establecer que su producción aumenta la supervivencia y competitividad de las especies que cuentan con la maquinaria enzimática indispensable para su generación.

### 1.3 Tipos de melanina

Las melaninas son biopolímeros de compuestos fenólicos (della-Cioppa et al., 1998). La clasificación más general de estos, incluyendo todos los tipos en procariontes y eucariontes, comprende tres grupos principales:

Las **eumelaninas** tienen una coloración negra o café y como se esquematiza en la figura 2, se producen por la hidroxilación de la tirosina (compuesto monofenólico) al incorporar un átomo de hidrógeno adyacente a su grupo hidroxilo y pasando a *o*-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) y dopaquinona que no son estables a pH fisiológico, por lo que les ocurre una ciclización del grupo amino de la cadena lateral (ciclodopa) y su inmediata oxidación a dopacromo (compuesto rojo violáceo); el siguiente paso es un rearrreglo y descarboxilación para dar 5,6-dihidroxiindol (DHI) o sin descarboxilación para producir 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) (del Marmol y Beermann, 1996, della Cioppa et al, 1998, Plonka et al., 2006); a partir de ahí son sometidos a una serie de ciclizaciones y reacciones no enzimáticas de óxido-reducción que polimerizan hasta llegar a melanina; el polímero puede estar formado por moléculas de dopaquinona, dopacromo, DHI o DHICA o mezclas variables de ellas (della-Cioppa, 1998, Cabrera-Valladares, 2006). Un rasgo distintivo es que cuando las eumelaninas sufren oxidación por permanganato, producen una pequeña cantidad (1%) de pirrol ácido tricarbóxico (PTCA) (Riley, 1997).

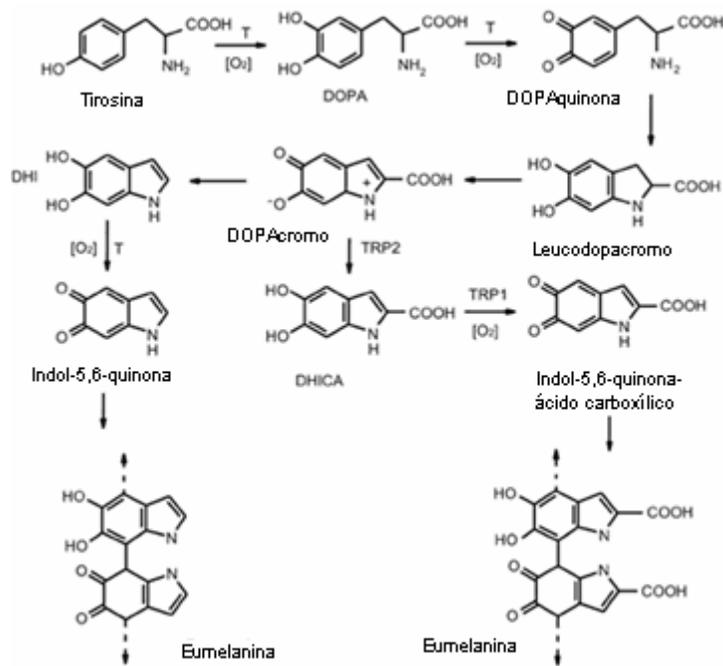


Fig. 2 Vía de producción de eumelanina

Las **feomelaninas** que toman un color que va del amarillo al rojo, son inicialmente sintetizadas igual que las eumelaninas, como lo indica la figura 3, pero la DOPA sufre cisteinilación, directamente o mediada por el glutatión, dando como producto cisteinilDOPA que después polimeriza en varios derivados de benzotiacinas (Kobayashi et al., 1995, Plonka et al., 2006).

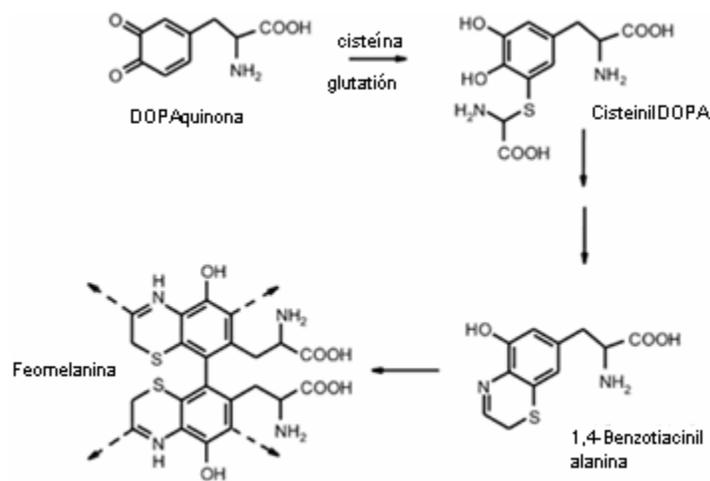


Fig. 3 Síntesis de feomelanina

Las **Alomelaninas** son las menos estudiadas y el grupo más heterogéneo de estos polímeros, han sido identificadas en plantas y microorganismos, surgen a través de la oxidación y polimerización del dihidroxinaftaleno (DHN) o del tetrahidroxinaftaleno por medio de la vía de los pentacétidos a partir de flaviolina hacia varios polímeros coloridos como las melaninas DHN (figura 4 B), el ácido homogentísico (piomelaninas como la de la figura 4 A), el  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxi-benceno, los catecoles, así como el ácido 4-hidroxifenilacético (Coyne et al., 1992, Plonka et al., 2006).

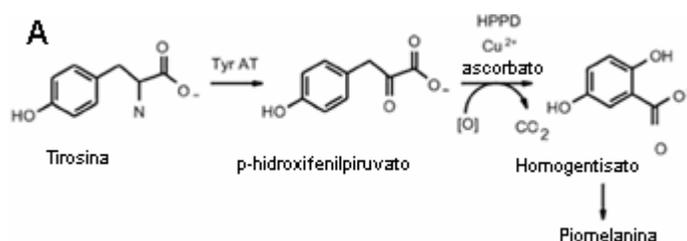


Fig. 4 A Producción de una alomelanina

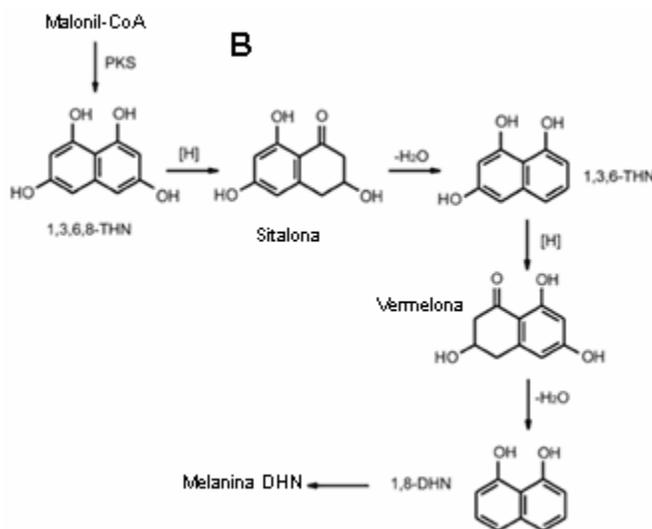


Fig. 4 B Producción de otra alomelanina

Otras diferencias entre los tipos de melaninas, son la presencia de sulfuros generalmente en forma de benzotiazoles en las feomelaninas y la falta de nitrógeno en las alomelaninas, la configuración de los residuos quinona es *orto*- en las eumelaninas y *para*- o *meta*- en las alomelaninas (Plonka et al., 2006, Riley, 1997).

## 1.4 Propiedades de la melanina

Habiendo detallado los tipos de melaninas existentes, cabe mencionar que la unidad estructural básica de todos ellos es generalmente representada por indoles unidos covalentemente como se ve en la figura 5, sin embargo la mayoría de las melaninas parecen ser mezclas de polímeros basados en indoles pero con cantidades variables de otros productos pre-indólicos de la vía de síntesis (Riley, 1997). Los dominios indólicos están empaquetados por medio de interacciones de van der Waal's que generan espaciamientos entre las capas de alrededor de 3.4 Å en la difracción de rayos X, pero el intercalamiento irregular de otros residuos hace que muchas regiones del polímero tengan una configuración amorfa (Thathachari, 1969).

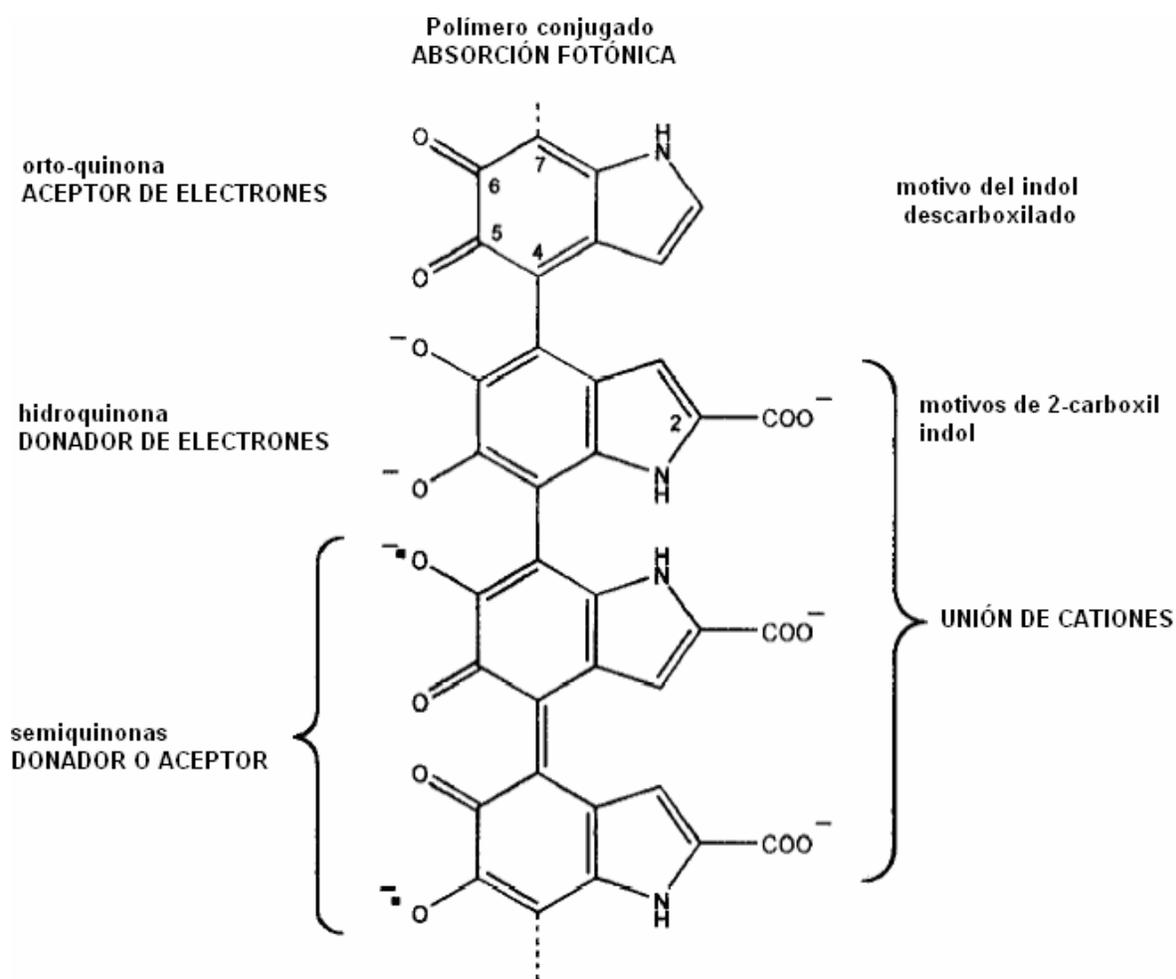


Fig. 5 Estructura general de las melaninas

Recientemente, Kaxiras y colaboradores (2006) establecieron que los oligómeros o protomoléculas de las melaninas están constituidas por cuatro moléculas, indolquinona (IQ), hidroquinona (HQ), metido-quinona (QI1) e imino-quinona (QI2) unidas por enlaces covalentes entre los átomos C2 y C7 exclusivamente, esto genera un anillo interior en donde residen todos los átomos de nitrógeno y dos de hidrógeno, en un arreglo similar al de la porfirina, lo que le confiere la capacidad de unión a iones metálicos; uno de estos oligómeros lo vemos en la figura 6.

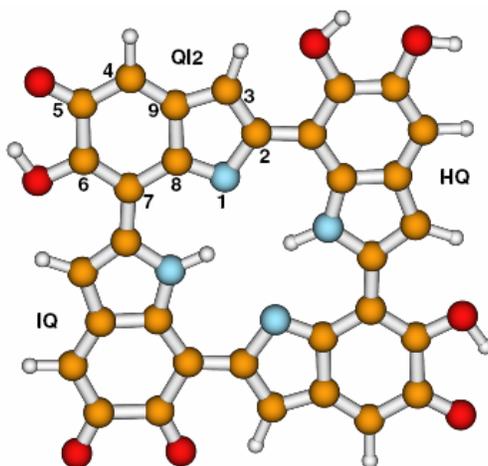


Fig. 6 Oligómero de la melanina. Al centro se muestra un anillo con los átomos nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco, esto permite la unión de iones metálicos.

La unidad mínima que puede ser formada de esta manera son los tetrámeros aunque también existen pentámeros que son menos estables, sin embargo las diferentes combinaciones de estos dos y de tetrámeros con alguna variación estructural y su arreglo bidimensional, dan lugar a la enorme diversidad de coloraciones de la melanina, ya que su rango de absorción varía, siendo la unión de varios tetrámeros “ideales” la que genera el color más oscuro o negro y que corresponde a las eumelaninas con altas concentraciones de DHI (Kaxiras et al., 2006).

Gracias a esta estructura, la melanina cuenta con características físicas y químicas de gran utilidad para las funciones biológicas que cumple en la naturaleza, pero además que han sido de interés en la industria.

Entre ellas, se encuentra por ejemplo su amplio rango de absorción en el espectro debido al alto nivel de conjugación en la molécula, que permite las transiciones energéticas y posibilita la deslocalización electrónica; de hecho, es el que el color de la melanina sea en

muchos casos oscuro en las eumelaninas que tienen mayor proporción de indol quinonas, indica que absorbe la mayor parte del espectro de luz visible, de manera más fuerte en la parte roja, haciéndolo a través de los grupos carbonilo que tienen poca representación en las feomelaninas, explicando con ello sus tonalidades claras; casi toda esta energía es convertida en calor a través del acoplamiento fotón-fotón. Todas las melaninas tienen además la capacidad de absorber en la región ultravioleta (Riley, 1997).

Otra de sus propiedades importantes son las reacciones redox de un electrón y de dos electrones que lleva a cabo; adicionalmente, uno de los efectos de la absorción de luz es la foto-oxidación del pigmento, que al aumentar el contenido de carbonilos, cambia las propiedades de absorción de la melanina en un proceso conocido como reacción inmediata de oscurecimiento del pigmento (IPD), todo lo cual genera radicales superóxido (Riley, 1997).

De mencionarse son también sus poderosas capacidades quelantes en cationes a través de sus grupos carboxilo e hidroxilo desprotonado (Riley, 1997).

## 1.5 Tirosinasa

Las tirosinasas (EC 1.14.18.1) o monofenol mono-oxigenasas, conocidas como proteínas de cobre tipo 3, catalizan la oxidación de monofenoles a *o*-dihidroxifenoles y después a *o*-quinonas; a su capacidad de hidroxilar de L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) se le llama actividad cresolasa y catecolasa a la de oxidar este último en dopacromo; en las reacciones que cataliza, el oxígeno molecular es utilizado como aceptor de electrones y reducido a agua (Selinheimo et al., 2007). Durante la reacción catalítica el centro de cobre tipo 3 de la tirosinasa existe en tres estados redox. La forma *deoxi* [Cu(1)-Cu(1)] es una especie reducida que une oxígeno para dar la forma *oxi* [Cu(II)-O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Cu(II)]; en esta el oxígeno molecular se une como peróxido, lo cual estabiliza y activa el enlace O-O; la forma *met* [Cu(II)-Cu(II)] es una configuración enzimática de reposo, en donde los iones cobre están generalmente enlazados con un ligando pequeño como una molécula de agua o un ion hidróxido (Matoba et al., 2006).

La localización de las cisteínas juega un papel importante en la formación de enlaces disulfuro, lo cual estabiliza la estructura de la proteína; varios inhibidores y activadores modulan la actividad de la enzima al unirse a la única cisteína localizada en el

dominio C-terminal (García-Borrón et al., 2002). Una propiedad característica de la tirosinasa es la presencia de un periodo de inducción o fase de adaptación durante la oxidación de la tirosina; es un mecanismo autocatalítico que depende de la elaboración de L-DOPA (Cooksey et al., 1997), su duración depende de varios factores, entre ellos el pH, la concentración de sustrato y enzima, pero sobre todo de la presencia de un adecuado donador de hidrógeno (Palumbo et al., 1985).

La especificidad de las tirosinasas no es demasiado rigurosa, ya que tiene afinidad por una gran cantidad de sustratos entre los mono, di y trihidroxifenoles aunque su actividad es mayor con algunos, debido principalmente a su acción estereoselectiva (Sirena, 2004).

La regulación química de la melanogénesis es el resultado de la catálisis general ácido-base o catálisis electrostática por nucleófilos y electrófilos inherente al medio de reacción; más decisivos aún son los cambios en la fuerza iónica del medio que determinan el potencial de polaridad de los precursores melanogénicos y sus intermediarios. El medio de reacción causa interacciones soluto-solvente que influyen los dipolos permanentes o inducidos; la regulación se presenta cuando modificaciones en el pH cambian el grado de ionización de los reactantes en el medio. Adicionalmente, las interacciones moleculares como los puentes de hidrógeno, la dimerización o la formación de pares iónicos entre los reactantes o el medio regulan la producción de melanina (della-Cioppa et al., 1998).

### **1.5.1 Estructura de la tirosinasa microbiana**

Aunque los datos estructurales acerca de la enzima en los microorganismos son limitados, la primera estructura tridimensional de alta definición fue presentada por Matoba y colaboradores (2006). Se trata de la proteína de *Streptomyces castaneoglobisporus*; ellos confirman que a pesar de la baja identidad de secuencias, la tirosinasa comparte una estructura similar con la de la catecol oxidasa de plantas (*Ipomoea batatas*) y con la hemocianina de *Octopus dofleini*.

Los autores señalan que la tirosinasa tiene una estructura de  $\alpha$  hélice al igual que el núcleo de la enzima, que está formado por la conjunción de cuatro hélices ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ ) como se observa en la figura 7 A. El centro catalítico con dos núcleos de cobre está localizado entre el conjunto de hélices y cada ion cobre está coordinado por tres residuos

His; Cu<sup>A</sup> es coordinado por His<sup>38</sup>, His<sup>54</sup> e His<sup>63</sup>, estando el primero y el último localizados a la mitad de  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  respectivamente; por su parte, Cu<sup>B</sup> está coordinado por His<sup>190</sup>, His<sup>194</sup> e His<sup>216</sup>, los dos primeros están al inicio y en el centro de  $\alpha 6$ , mientras que el tercero está en la parte media de  $\alpha 7$ . Este centro di-cobre está localizado en el fondo de una gran cavidad como si fuera un contenedor incluido para unir el sustrato, el cual está formado por los residuos hidrofóbicos (figura 7 B). La tirosinasa cuenta además con algunas estructuras  $\beta$  a juzgar por los ángulos de torsión de sus ejes principales, pero sólo las hebras C- y N-terminal forman una estructura  $\beta$  plegada.

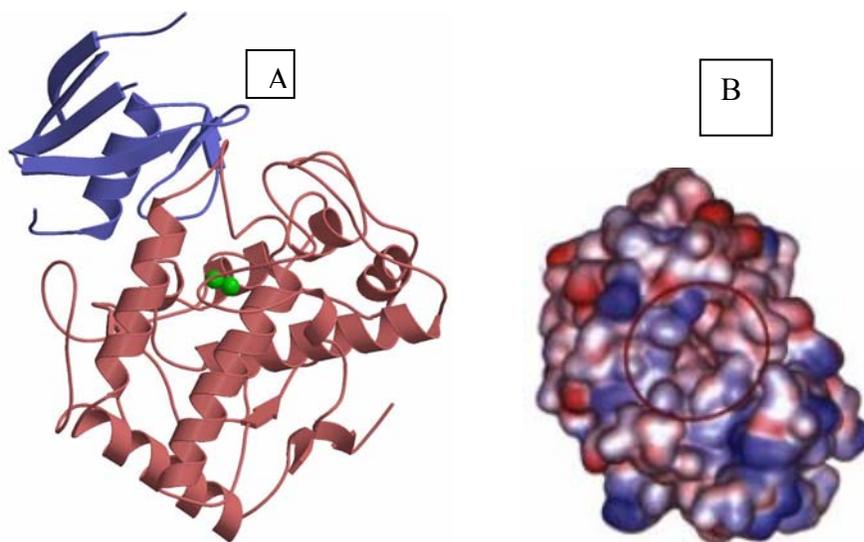


Fig. 7 Estructura de la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus*. A representa la estructura terciaria con su centro dicobre y B es la forma globular que señala la cavidad donde éste se localiza.

El centro di-cobre está muy cerca de la superficie molecular de la tirosinasa, lo que asegura que el sustrato pueda tener fácil acceso al sitio catalítico; adicionalmente, la cavidad de unión a sustrato tiene por encima del centro di-cobre un gran espacio vacío, lo que le permite llevar a cabo su actividad de oxigenasa, a diferencia de las catecol oxidasas. Debido a que el compartimiento de unión a sustrato en la tirosinasa es muy grande, la tirosina puede acomodarse de varias maneras para la unión. En la tirosinasa sin cobre, la cadena lateral de la His<sup>54</sup>, uno de los ligandos de Cu<sup>A</sup>, es flexible como se demuestra por la diferencia en la densidad electrónica a su alrededor y por su estructura desordenada, lo cual es debido a la ausencia de una unión tioéter que sí está presente en las catecol oxidasas y en las hemocianinas; esta cadena lateral se hace rígida cuando se une un ion cobre, lo que se correlaciona con la alta reactividad de la forma *oxi* de la tirosinasa, sin embargo His<sup>54</sup> sigue

teniendo algo de movilidad, por lo que  $\text{Cu}^{\text{A}}$  es más estable que  $\text{Cu}^{\text{B}}$ . Esta flexibilidad es por tanto muy importante ya que de ella depende la especificidad catalítica de la tirosinasa (Matoba et al., 2006).

Con base en la estructura cristalográfica de la tirosinasa que obtuvieron Matoba y colaboradores (2006), proponen un mecanismo catalítico específico para la enzima en el que dicen que la base catalítica es la formación de un puente entre un ion peróxido y dos iones cobre en la forma *oxi* de la tirosinasa; después el oxígeno desprotonado del monofenol se une a  $\text{Cu}^{\text{B}}$  en el sexto sitio de coordinación. La reacción monoxigenasa se acelera por la formación de un intermediario estable por la adición de más oxígenos del monofenol a  $\text{Cu}^{\text{A}}$ , para lo cual  $\text{His}^{54}$  debe cambiar su posición, actuando simultáneamente como base catalítica para la desprotonación del sustrato, lo que dará la formación del estado *deoxi* y la obtención de quinonas; dado que la forma *met* no puede dar lugar a este intermediario, la actividad oxigenasa no se lleva a cabo cuando la tirosinasa se halla en este estado.

### **1.5.2 Perspectiva evolutiva de las tirosinasas**

Las tirosinasas tienen un ancestro común con las proteínas de unión y de transporte de oxígeno; aparecieron en la Tierra como consecuencia del cambio en el carácter químico de la atmósfera de reductor a oxidante, lo cual fue el resultado de la fotosíntesis. Se originaron a partir de las metaloproteínas, que unen dioxígeno a través de su grupo prostético que contiene un catión metálico coordinado y que fueron útiles a los organismos para contender con el  $\text{O}_2$  y sus derivados altamente reactivos, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; éstas fueron principalmente las proteínas con cobre de unión a oxígeno (COPs) que mantenían niveles bajos de dioxígeno libre al cambiar su conformación molecular, pues tomaban un átomo de oxígeno y lo insertaban en un fenol, mientras que al otro lo liberaban en forma de agua. Conforme los organismos se hicieron más grandes y evolucionaron los sistemas circulatorios, las COPs junto con las proteínas con hierro de unión a oxígeno se hicieron transportadoras de oxígeno, almacenando el dioxígeno y llevándolo de lugares de alta concentración a otros de baja concentración dentro del cuerpo; esto refleja que los organismos utilizaron estas proteínas tanto para defenderse del dioxígeno como para aprovechar esta fuente de energía (Decker et al., 2000).

La familia de proteínas de tipo hemocianina incluye a las hemocianinas de moluscos y artrópodos, las hexamerinas de los insectos, las tirosinasas y las fenoloxidasas; todas tienen sitios conservados de residuos histidina coordinados con cobre que forman los dominios CuA y CuB (Plonka et al., 2006). Sólo CuB está conservado en todos los taxones, ya que CuA de la hemocianina de artrópodos difiere mucho de su contraparte en la hemolinfa de los moluscos, que es muy similar al dominio presente en las tirosinasas eucariontes y procariontes, lo cual es consecuencia del paralelismo evolutivo (Plonka et al., 2006). La estructura del dominio CuB es muy antigua y fue establecida muy temprano en la evolución, esto es particularmente característico en las tirosinasas, ya que presenta homología al ser comparado este motivo peptídico en las enzimas procariontes con las eucariontes (Lerch et al., 1988). La diferencia funcional entre las tirosinasas y la hemocianina (la segunda transporta al dioxígeno sin cambiar su estructura, mientras que la primera utiliza uno de sus átomos en una reacción) se atribuye a la diferente accesibilidad de los fenoles a los sitios activos respectivos (García-Borrón et al., 2002). Ambas proteínas comparten propiedades fisicoquímicas que permiten decir que tienen un sitio activo común en el cual el dioxígeno comunica a los dos átomos de cobre, sin embargo la actividad fenoloxidasa en las hemocianinas sólo se consigue activar a través de proteólisis o por mal plegamiento de la proteína (al tratarla con sales o SDS), lo que provoca un agrandamiento de la entrada al sitio activo y por tanto el paso no sólo de dioxígeno, sino también de compuestos fenólicos más grandes (Decker et al., 2000).

Con base en las estructuras disponibles de hemocianinas, hemoglobinas y hemeritinas, probablemente un par de  $\alpha$  hélices antiparalelas proveyeron de las histidinas o cisteínas para unir los iones metálicos, siendo estas las proteínas de unión a oxígeno más primitivas; una duplicación y fusión génicas generaron el empaquetamiento de 4  $\alpha$  hélices y la cavidad donde ocurre la unión del oxígeno; también ocurrió la fusión génica de dos sitios de unión a mono-cobre de evolución independiente en las hemocianinas y en las fenoloxidasas, tal como se esquematiza en la figura 8. En las COP's, cuando el dioxígeno se une al cobre, éste cambia su valencia de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , cambio que es la base química de la actividad de fenoloxidasa (Decker et al., 2000).

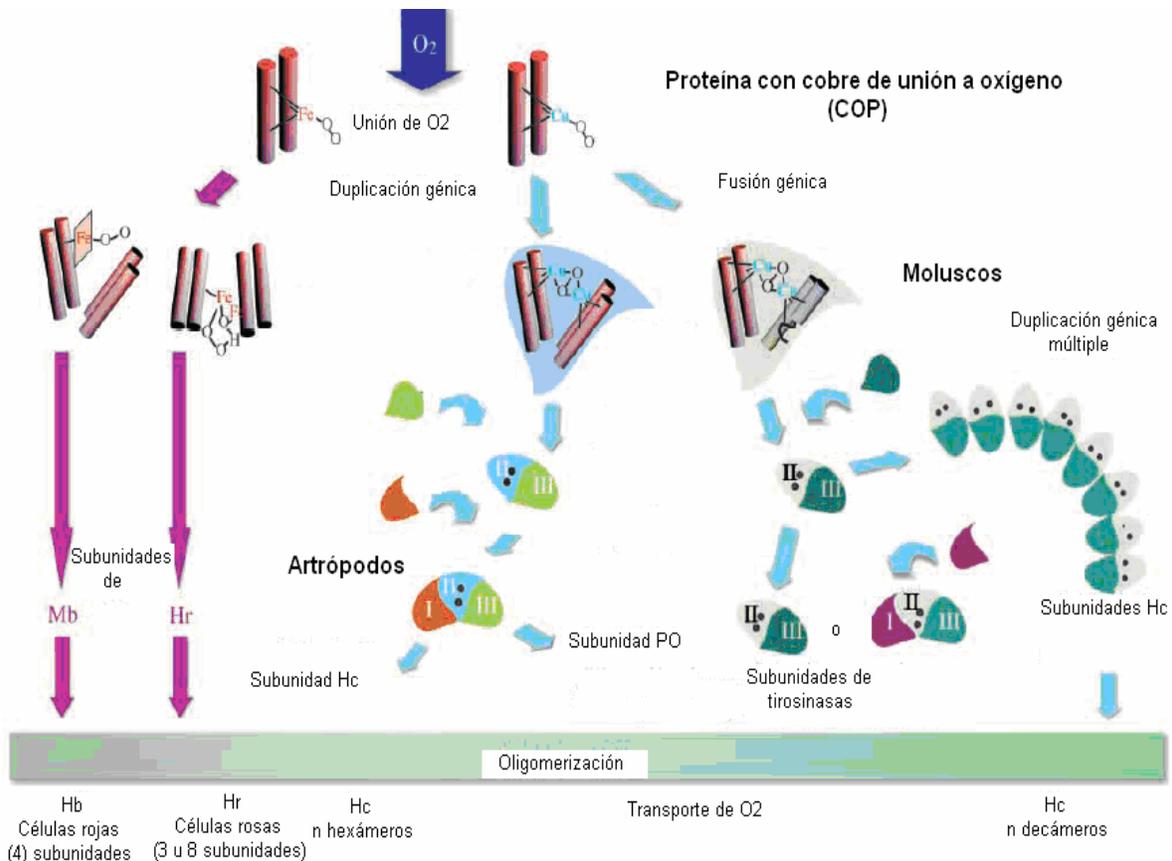


Fig. 8 Relaciones evolutivas entre proteínas de unión a dioxígeno; hierro o cobre se fijaron a sus hélices  $\alpha$ , lo que les permitió unir oxígeno, posteriores duplicaciones y fusiones génicas proveyeron de espacio para la actividad de fenoloxidasas (PO). Hb hemoglobina, Hr hemeritrina, Hc hemocianina.

Dependiendo de las especies y de las presiones evolutivas, las COP's han sido modificadas de varias formas, lo que explica la baja similitud entre secuencias de fenoloxidasas (Decker et al., 2000). La comparación de las secuencias disponibles en las bases de datos de tirosinasas revela una alta heterogeneidad en cuanto a su extensión e identidad en general; sin embargo, existen regiones altamente conservadas entre todas las tirosinasas en el área de su sitio activo, incluyendo los ligandos de unión a cobre y otros residuos que establecen importantes interacciones para mantener el plegamiento globular (García-Borrón et al., 2002).

Un caso muy interesante de evolución de la vía de síntesis de melanina ocurrió en los peces teleósteos, ya que hace 300 millones de años aproximadamente ocurrió un evento de duplicación del genoma completo en un ancestro, lo cual derivó en que los peces adquirieran dos genes parálogos de los que, en los tetrápodos, tienen que ver con

pigmentación pero con una única copia; esto trajo como consecuencia que los peces fueran el grupo taxonómico con mayor número de genes relacionados con la pigmentación. En el caso de los genes que tienen que ver con producción de melanina, se duplicaron *tyr* y *tyrp1*, mientras que *dct* se mantuvo con una única copia en todos los linajes; con el transcurso de la evolución, la retención de estos genes fue muy variable en los taxones, unos perdieron ambas copias de un gen, otros sólo una, mientras que algunos conservaron las dos; desde el punto de vista funcional, no está claro si existe una correlación entre el exceso de genes que están involucrados en la generación de melanina y la gran diversidad de coloración en los peces. Esto lo que sí nos muestra es que la familia de genes de tirosinasa es un buen ejemplo de resolución divergente, es decir, hay pérdida diferencial de genes duplicados en linajes divergentes, lo cual es un mecanismo que facilita la especiación (Braasch et al., 2007).

## **1.6 Otras enzimas melanogénicas**

### **Lacasas**

Oxidoreductasas *p*-difenol:dioxígeno, EC 1.10.3.2, son también metaloproteínas que contienen de uno a cuatro átomos de cobre en su sitio activo, en donde llevan a cabo la oxidación de DOPA; no se relacionan con las tirosinasas y no son capaces de oxidar tirosina, pertenecen a la familia de oxidasas portadoras de cobre azul, junto con la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. Son un grupo muy diversificado de baja similitud de cuya evolución se conoce muy poco; sin embargo, estas enzimas melanogénicas, al igual que las tirosinasas pueden ser encontradas tanto en procariontes como en eucariontes (principalmente en la pared externa de los hongos), lo que confirma su antiguo origen evolutivo (Valderrama et al., 2003).

### **Poliquetido sintasas**

Las PKS producen melaninas dihidroxinaftaleno (DHN) y pertenecen a una vieja familia de proteínas multidominio; muchos microorganismos las utilizan para producir pigmentos, antibióticos, toxinas y otros productos del metabolismo intermedio. Una de las principales enzimas encargadas de la producción de piomelanina es la *p*-hidroxifenilpiruvato oxidasa (HPPD) que cataliza la formación del ácido homogenístico (alcapción) y pertenece a la vía

de degradación de la tirosina y la fenilalanina, su desregulación provoca la retención del alcapción, potencialmente tóxico, en células y tejidos (Plonka et al., 2006).

## **HPA**

La ácido 4-hidroxifenilacético hidroxilasa pertenece a una familia separada de hidroxilasas. Además de a su principal sustrato, hidroliza otros compuestos aromáticos, lo que resulta en la formación de dibenzoquinona u otros derivados *o*-quinona, que después polimerizan espontáneamente en alomelaninas. La tirosina también es sustrato de la HPA pero a diferencia de la tirosinasa, no contiene cobre y por ende no incrementa su actividad enzimática (Plonka et al., 2006).

### **1.7 Tirosinasa y melanina en los procariontes**

Como ya mencioné en apartados anteriores, las funciones biológicas que cumple la melanina en las bacterias son muy amplias, debido a esto y a que mi trabajo se enfoca en la producción de melanina en una bacteria a partir de un gen bacteriano, dedicaré algunos párrafos a hablar más detenidamente sobre ello.

Las bacterias en las que ha sido descrita la producción de melanina, incluyen especies de los géneros *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Legionella*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Proteus*, *Azospirillum*, *Marinomonas*, *Pseudomonas*, *Hypomonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Shewanella*.

Las bacterias que secretan la tirosinasa provocan la decoloración del medio que las rodea, lo cual se ve acentuado con la adición de tirosina (della-Cioppa et al., 1998). Por el contrario, aquellas que llevan a cabo la reacción enzimática de manera intracelular, sólo liberan precursores de la melanina que polimerizan en el exterior, lo que provoca un oscurecimiento evidente del medio (Plonka et al., 2006). La localización celular de la tirosinasa bacteriana ha sido poco estudiada, sin embargo hay estudios que sugieren que la síntesis de melanina ocurre dentro del citoplasma (García-Borrón et al., 2002).

En el suelo, las melaninas junto con las sustancias húmicas (productos de enzimas contenidas en los secretomas de varios microorganismos) cumplen una importantísima función panambiental (en la mayoría de los ambientes), ya que entre otros aspectos, disminuyen la vulnerabilidad de los microecosistemas del suelo a la irradiación UV y

mantienen un balance adecuado de iones; sin las melaninas bacterianas es difícil imaginar un ecosistema natural que mantenga la existencia de hongos macroscópicos y plantas (Plonka et al., 2006).

Es reconocido que la melanina es un importante factor de virulencia en las bacterias patógenas y su capacidad para producirla es atribuida a los éxitos evolutivos de las bacterias de vida libre. Por ejemplo, cepas de *Vibrio cholerae* de vida libre son amelanóticas, sin embargo cuando son sometidas a estrés hipertérmico, hiperosmótico o por falta de nutrientes, adquieren la capacidad de generar el polímero, tal como lo hacen cepas patógenas de su mismo género, en las cuales es un componente integral de la respuesta virulenta (Coyne et al., 1992).

En el caso de *Burkholderia cepacia* y *Proteus mirabilis*, patógenos que atacan los pulmones y el tracto urinario respectivamente, la melanina elimina las especies reactivas de oxígeno de los fagocitos, que son generadas por la descarga de oxígeno que el hospedero tiene como parte de su respuesta inmunológica; esto les permite a las bacterias ser más resistentes a los aniones superóxido y evitar ser eliminadas por fagocitosis. Para el caso de *B. cepacia*, su tirosinasa tiene una habilidad dosis-dependiente de eliminar el O<sub>2</sub> producido por los leucocitos (Plonka et al., 2006).

Durante la respiración anaerobia, algunas bacterias disimilatorias utilizan a la melanina como aceptor final o como lanzadera en el intercambio de electrones con compuestos insolubles de hierro. *Shewanella algae* produce melanina y la reduce al mismo tiempo, oxidando hidrógeno gaseoso; habiendo aceptado varios electrones, la melanina reducida le sirve a la bacteria como reductor de óxidos férricos (III) insolubles a un estado ferroso (II). *S. algae* habita en depósitos marinos mineralizados en donde la disponibilidad de aceptores de electrones es limitada, por lo cual la producción de melanina es nuevamente una importantísima adaptación evolutiva (Menter et al., 1997, Turick et al., 2002).

En cuanto a la producción de melanina en bacterias fijadoras de nitrógeno, existen dos casos específicos. El primero es el de *Azotobacter chroococcum*, microorganismo de vida libre que aumenta los niveles de melanina en ausencia de fuentes de nitrógeno, por lo que se propone que la melanogénesis intensifica la utilización de oxígeno y mantiene

condiciones reductoras necesarias para el reclutamiento del nitrógeno atmosférico (Shivprasad et al., 1989).

El otro es el del género *Rhizobium* que vive en los nódulos de las plantas *Fabaceae* (*Papilionaceae*) cuyo fruto es una legumbre (leguminosas) (Plonka et al., 2006). Esta simbiosis se desarrolla por un intercambio de señales moleculares, en el cual *Rhizobium* responde a los flavonoides que la planta secreta y sintetiza componentes capaces de inducir la formación del nódulo; después de esto, las bacterias entran a las raíces como si de una infección se tratase y pasan al citoplasma, en donde se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno que proporcionan a la planta nitrógeno incorporado en forma de amonio en compensación por los compuestos carbonados que estas ceden (Piñero et al., 2006).

Las especies de *Rhizobium* que tienen la capacidad de producir melanina son *R. leguminosarum* biovars *viceae*, *trifolii* y *phaseoli*, *R. fredii*, *R. meliloti* y *R. etli*; en todas ellas, los genes relacionados están codificados dentro de un plásmido (Cubo et al., 1988, Mercado-Blanco et al., 1993) siendo el gen de *R. etli* el que codifica para la única tirosinasa rizobial cinéticamente caracterizada hasta el momento (Cabrera-Valladares et al., 2006).

### **1.7.1 Genética molecular de la melanogénesis bacteriana**

En los procariontes el fondo genético de la melanogénesis no tiene un consenso. Se ha descrito sólo para algunos casos; por ejemplo en Streptomycetes, en los que la capacidad de producir pigmento es un importante criterio taxonómico, el operón *melC* de *Streptomyces antibioticus* es el que controla la síntesis de eumelanina, siendo su principal factor de inducción la L-metionina. Consiste en dos genes estructurales extracromosómicos, el primero codifica para la proteína MelC1 y el segundo para una apotirosinasa (Chen et al., 1992). MelC1 forma un heterodímero con la tirosinasa, actuando como su activador *trans*, interacción necesaria para la incorporación de dos iones cobre, cruciales para la actividad enzimática, por lo cual Chen (1993) estableció que tiene una función de tipo chaperona siendo responsable del adecuado plegamiento y secreción de la tirosinasa, ya que contiene el péptido señal para la translocación del complejo a través de la interacción con las proteínas Tat del secretoma de la bacteria. Los genes que controlan la producción o secreción extracelular de la tirosinasa se encuentran en plásmidos en *Streptomyces scabies* y *Rhizobium phaseoli* (della-Cioppa et al., 1998).

*Marinomonas mediterranea* contiene en su genoma al operón bicistrónico *ppoB* como responsable de la melanogénesis, y de manera parecida al caso anterior uno de los genes *ppoB1* codifica para una apotirosinasa y el otro para una chaperona que incorpora iones cobre al sitio activo de la enzima; el primero tiene ortólogos en eucariontes y en otras bacterias, sin embargo PpoB2 no tiene similitud ni con MelC1, que es su homóloga funcional en Streptomycetes, además de no ser secretada (López-Serrano et al., 2004). Esta bacteria también presenta otra enzima melanogénica, una lacasa codificada por el gen *ppoA* regulada por un sistema de dos componentes, lo cual refuerza la importancia evolutiva y el carácter adaptativo de la producción de melanina (Plonka et al., 2006).

En *Shewanella colwelliana*, el operón monocistrónico *mela* de 1.3 kb ha sido identificado como el responsable de la pigmentación; codifica para una proteína de 39.5 kDa y 346 aminoácidos, una hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa (HPPD) presente también en *Vibrio cholerae*, *Hypomonas* y *Pseudomonas* (Fuqua et al., 1991, Plonka et al., 2006).

### **1.7.2 El caso específico de *Rhizobium etli***

Una característica compartida por todos los genomas de los rizobiales es que los genes implicados en procesos de simbiosis están localizados en compartimentos simbióticos específicos del genoma (SGCs), así como en replicones independientes conocidos como plásmidos simbióticos (pSym) o islas simbióticas o regiones dentro del cromosoma.

*Rhizobium etli* es una bacteria Gram-negativa cuyo estilo de vida es en simbiosis con el frijol común *Phaseolus vulgaris*; su genoma está compuesto por un cromosoma y seis plásmidos cuyos tamaños varían entre las 184 y las 600 Kb (González et al., 2003).

En general, las especies rizobiales presentan el gen *mel* para la producción de melanina localizado tanto en plásmidos simbióticos como en no simbióticos, y ya ha sido demostrado que su ausencia no se requiere para la fijación de nitrógeno en la simbiosis. El gen está regulado por el sistema RpoN-NifA, junto con muchos otros genes involucrados en la nodulación y en la fijación de nitrógeno (Cabrera-Valladares et al., 2006).

Como resultado de la secuencia completa del plásmido simbiótico p42d de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli* por parte de González (2003), se identificó la presencia del gen *mela* (1830 pb) y la predicción de su producto proteico mostró similitudes con las secuencias de varias polifenol oxidasas. Anteriormente Cubo (1988) había notado que

cuando se producen daños a la superficie del nódulo, *R. etli* produce un pigmento oscuro, que identificaron como melanina.

Se ha propuesto que el cromosoma de los rizobiales tiene un origen ancestral común y que los otros elementos del genoma (plásmidos) han sido el resultado de eventos subsecuentes de rearrreglos genómicos y transferencia horizontal. Se demostró que existen en los SGCs genes ortólogos que se presentan en regiones de distintos contextos genómicos de las diferentes especies rizobiales; otra característica es que contienen gran cantidad de genes reiterativos, pseudogenes y secuencias de inserción. Todo esto indica que, a pesar de la inexistente sintenia y colinearidad en los compartimentos genómicos de estas especies bacterianas cuando se comparan con *R. etli*, p42d es una estructura en mosaico que ha tomado elementos de distintas regiones del genoma bacteriano por medio de recombinación, transferencia horizontal y transposición (González et al., 2003).

Lo que esto ha originado es que encontremos algunos genes presentes en la mayoría de las especies y otros ausentes en casi todas; el caso específico de *melA* nos demuestra la total distribución que un gen puede tener dentro de un género bacteriano, lo cual inevitablemente nos remarca la importancia evolutiva que la producción de melanina tiene en la naturaleza y nos obliga a poner énfasis en las ventajas adaptativas que les ha generado a los miembros de *Rhizobium*.

El único trabajo que ha reportado la función que cumple el gen *melA* en *R. etli* (Piñero et al., 2006) demostró que tiene un papel importante en la nodulación, pero no así en la fijación de nitrógeno, resultado contrario a lo que podría esperarse dado que comparten la misma regulación. Aunado a esto, demostraron que su presencia confiere una mayor resistencia al peróxido de hidrógeno, mientras que al introducir el gen en una cepa de *Escherichia coli* ésta fue más resistente a la presencia de compuestos fenólicos. Concluyen que la tirosinasa en *R. etli* es necesaria en etapas tempranas de la simbiosis ya que provee de protección contra especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos que son parte de la respuesta de defensa de la planta al momento de la infección simbiótica.

## **1.8 Aplicaciones de la tirosinasa y la melanina**

La producción industrial del pigmento en microorganismos es ahora posible porque las melaninas extracelulares y sus derivados y precursores son fácilmente removibles del medio en donde fueron sintetizados (della-Cioppa et al., 1998).

Las melaninas producidas industrialmente, han sido usadas en la industria cosmética y farmacéutica como componentes de los productos fotoprotectores para la piel contra el cáncer y el fotoenvejecimiento, tal es el caso de los filtros solares y las cremas anti-edad. Del mismo modo, gran cantidad de los cosméticos usados para colorear o aumentar el tono de piel, tienen como ingrediente a la melanina (Yamaguchi et al., 2007) y otros productos la utilizan para corregir defectos provocados por enfermedades dermatológicas como el vitiligo. Debido al modo de acción de la tinta de los cefalópodos, se ha propuesto utilizar a la melanina como un repelente contra tiburones (Riley, 1997).

La melanina ha sido incorporada en la industria de la transformación como un semiconductor amorfo, es decir para conducir la electricidad en algunos procesos que así lo requieran. Otra aplicación muy novedosa es la incorporación de la melanina a materiales plásticos, lo que ha permitido que se produzcan lentes oscuros con la capacidad de bloquear la radiación UV, que es mucho más eficiente en el cuidado de la salud que la sola polarización de las micas. Muy relacionado con este uso, está el recubrimiento interno de las lámparas fluorescentes con melanina, lo cual evita que escape la radiación UV como ocurre en las lámparas normales de este tipo; un uso real de esta tecnología se da en museos y bibliotecas para evitar que los objetos que ahí se conservan puedan sufrir algún daño.

Una aplicación médica de la melanina es en los estudios de rayos X, ya que los pacientes pueden consumirla para generar un medio de contraste en los análisis del sistema digestivo; esto no provoca ningún problema, ya que el pigmento no es digerido ni absorbido por el cuerpo.

Las tirosinasas se han utilizado para la síntesis de reactivos intermediarios a partir de los precursores de la melanina, por ejemplo L-DOPA para el tratamiento del mal de Parkinson (Cabrera-Valladares et al., 2006) y cumestrol por la actividad estrogénica (Sirena, 2004) y para la remoción de compuestos fenólicos de las aguas residuales (Yamada et al., 2005).

En el aspecto médico, el hecho de que los melanomas exhiban un alto grado de pigmentación ha motivado al estudio de la vía melanogénica como un potencial blanco para el tratamiento y diagnóstico de estos tumores (Riley, 1997). Además, se han hecho investigaciones sobre estrategias terapéuticas para controlar desórdenes de pigmentación en piel y cabello en las cuales se transfectan células amelanóticas con el gen de la melanina y con ello se restaura el fenotipo de células pigmentadas (Plonka et al., 2006).

Debido a que es muy sencillo cuantificar la expresión del gen de la tirosinasa, ha sido utilizado en la ingeniería genética, ya que el operón *melC* de *Streptomyces glaucescens* o sus constituyentes fueron parte de varias construcciones genéticas que sirvieron como genes reporteros (Paget et al., 1994, Plonka et al., 2006).

## II. ANTECEDENTES

*Con frecuencia la ignorancia engendra más confianza que el conocimiento:  
Son los que saben poco y no los que saben mucho, los que aseveran positivamente  
que éste o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia*  
Charles Darwin

La producción de melanina puede llevarse a cabo a través de procesos químicos, biológicos o biotecnológicos, dependiendo del uso que quiera dársele al pigmento. En el caso de los procesos químicos y bioquímicos, estos se realizan con precursores químicos de alta pureza que polimerizan gracias a la actividad de las tirosinasas o a la presencia de condiciones químicas particulares, con lo cual se obtiene una melanina con un elevado grado de pureza; por lo mismo su costo es muy alto y sólo se utiliza en estudios analíticos (Bridelli et al., 1998).

Entre los procesos biológicos se encuentran la extracción a partir de materia vegetal con costos bajos, aunque esto resulta en la obtención de una mezcla de melaninas de composición variable. Adicionalmente, los cultivos sumergidos de hongos microscópicos de los géneros *Cladosporium* y *Aureobasidium* producen melaninas, sin embargo resulta técnicamente complicado mantenerlos (Fomina y Gadd, 2003).

Varios trabajos han demostrado que los métodos más eficientes pertenecen al ámbito de la biotecnología, tanto por su eficiencia como por sus costos. Para lograr que la producción de melanina se incremente, se han manipulado los constituyentes del medio de cultivo, atenuado las condiciones de fermentación, modificado genéticamente a los microorganismos o realizando mutagénesis. Este último método se ha llevado a cabo usando radiación o exposición a mutágenos químicos. Además, los vectores que contienen genes que codifican enzimas que catalizan la conversión de los precursores de melanina y un promotor apropiado para su expresión en el hospedero han sido usados para transformar microorganismos que no producen melaninas o que lo hacen en cantidades no satisfactorias desde el punto de vista comercial (della-Cioppa et al., 1998).

De manera natural las cepas de *Escherichia coli* no tienen un gen que codifique para una tirosinasa y por tanto no producen melanina. El primer intento por generar una clona con la capacidad de generar el pigmento fue introduciendo parte del plásmido

pIJ703 que contenía el gen para tirosinasa de *Streptomyces lividans* en el plásmido YEp13 de *E. coli* HB101, sin embargo no se detectó ninguna expresión de tirosinasa ni de melanina (della-Cioppa et al., 1990).

Otros microorganismos han sido sometidos a ingeniería genética para producir melaninas, entre ellos están los géneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Vibrio*. A través del mejoramiento en el proceso de producción en varios de ellos y en los ya mencionados se ha determinado que la producción industrial del pigmento es factible debido a que las melaninas extracelulares, sus derivados y precursores son removidos fácilmente del medio en el que han sido sintetizados (della-Cioppa et al., 1998), por ejemplo Lagunas-Muñoz y colaboradores (2006) lograron extraer el 85% de la melanina producida en sus cultivos.

Uno de los casos más eficientes de producción industrial de melanina se logró en el trabajo de della-Cioppa y colaboradores (Patente EUA, 1998) con cultivos de una cepa recombinante de *Escherichia coli* transformada con plásmidos que expresan el gen *melC1* que codifica para la tirosinasa y *melC2* que es para la chaperona de cobre activadora de la tirosinasa, ambos provenientes de *Streptomyces antibioticus* IMRU 3720, a partir de los cuales se obtuvieron 3 g/L de melanina en fermentador.

Cabrera-Valladares y colaboradores (2006) clonaron el gen *mela* de *Rhizobium etli* y lo introdujeron a una cepa de *E. coli* logrando que cultivos provistos de tirosina y cobre se produjera melanina, con valores óptimos de pH y Km para L-DOPA y L-tirosina en la tirosinasa, similar a otras tirosinasas, lo cual indica que no se requiere la presencia de la chaperona de cobre de *Rhizobium etli* para incorporar este ion a la apotirosinasa.

En un trabajo posterior del mismo grupo (Lagunas-Muñoz et al., 2006) se optimizaron los parámetros del proceso fermentativo para la conversión de tirosina en melanina utilizando la misma cepa de *E. coli*, concluyendo que los factores que afectan mayormente la eficiencia de formación son la temperatura y el pH, además obtuvieron el rendimiento máximo teórico (100%) de transformación de tirosina en eumelanina (tipo de melanina que determinaron se forma bajo las condiciones utilizadas).

### III. JUSTIFICACIÓN

*No trates de encontrar símbolos en todo lo que ves,  
Esto hace la vida imposible.  
Somos nuestro propio demonio y hacemos de este mundo nuestro infierno.*  
Oscar Wilde

En el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBt se desarrollan proyectos enfocados a la obtención de moléculas biológicas de interés industrial. Para ello se pretende optimizar y diversificar las rutas del metabolismo central del carbono, enfocándose una parte en la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos en *Escherichia coli* con la finalidad de mejorar la generación de metabolitos de interés comercial como fenilalanina, catecol y melanina.

Específicamente, el interés por biopolímeros del tipo de la melanina ha aumentado en los últimos años debido a que se le han encontrado muchas propiedades fisicoquímicas relevantes para su aplicación industrial, tanto en procesos utilizados en la industria de la transformación, como en insumos y productos finales que llegan al público usuario, pasando incluso por la remoción de compuestos fenólicos de aguas residuales.

En el laboratorio se construyó una cepa de *E. coli* que contiene al gen *melaA* de *Rhizobium etli* que codifica para una tirosinasa; se encontró que esta proteína a diferencia de la de otros organismos, no requiere de una chaperona de cobre para llevar a cabo su actividad enzimática, por lo que representa ventajas muy importantes en lo que a expresión y modificación se refiere.

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se le hicieron a la cepa mostraron que produce los niveles más altos de melanina reportados hasta el momento, teniendo un nivel de conversión de tirosina en eumelanina del 100%.

El aumento en la resistencia a los compuestos fenólicos por parte de *E. coli* es una característica deseable en procesos industriales como la producción de etanol a partir de residuos de lignocelulosa en donde estos compuestos tóxicos para las bacterias son liberados; en el laboratorio sería muy deseable contar con una cepa con esta cualidad debido a que otro proyecto es la construcción de cepas etanológicas a partir de bagazo de caña de azúcar.

Actualmente no se conoce del todo bien la estructura de la tirosinasa y por tanto su funcionamiento no está comprendido por completo; recientemente se hizo una aproximación con la proteína de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006), sin embargo es una bacteria que no está filogenéticamente muy cercana a *R. etli*, por lo que no se puede hacer una generalización. Debido a esto, es necesario un acercamiento más detallado para definir los aminoácidos o zonas clave de esta enzima.

Dada la amplia cantidad de aplicaciones que la melanina y sus intermediarios pueden tener en gran número de procesos y productos biotecnológicos, sería importante contar no sólo con una bacteria productora, sino con una que tuviera una producción mejorada, con parámetros cinéticos altos, tanto de  $V_{max}$  como de  $K_m$ .

La forma en que puede llevarse a cabo es mutando al gen implicado; no puede hacerse de manera dirigida ya que en general los aminoácidos que controlan la función de las proteínas están muy alejados del sitio activo por lo que son muy difíciles de predecir a partir de la estructura. Sin embargo, la mutagénesis aleatoria es una poderosa herramienta para elucidar la relación estructura-función de las proteínas y para modificar las proteínas con el objetivo de mejorar o alterar sus características.

En la medida en que el ambiente pida procesos más limpios y la gente se familiarice con ellos, los productos biotecnológicos irán ocupando cada vez más las preferencias en los productores y los consumidores. No sólo cuentan con la ventaja de no requerir grandes cantidades de insumos químicos muchas veces tóxicos, sino que también son más baratos, más eficientes y amables con el entorno.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

Construir una cepa de *Escherichia coli* que contenga al gen *melA* de *Rhizobium etli* mutado que pueda producir melanina de manera más eficiente que la cepa que porta al gen silvestre, en cuanto a velocidad se refiere.

### Objetivos particulares

1. Producir un banco de mutantes del gen *melA* utilizando la técnica de PCR mutagénica.
2. Caracterizar el banco generado para identificar de manera indirecta (coloración) mutantes con cambios aparentes en la actividad de tirosinasa.
3. Caracterizar en medio rico y mínimo las cepas melanogénicas que presenten, en términos de velocidad, una mejora en su capacidad de síntesis de melanina.
4. Establecer los cambios en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las mejores cepas al comparar mediante alineamientos con el gen o la proteína silvestres respectivamente.
5. Identificar a la mutante que haya mostrado los mejores valores en los parámetros medidos como la cepa de producción mejorada.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

*El deber del ojo derecho es sumergirse en el telescopio,  
mientras que el ojo izquierdo interroga al microscopio.*  
Leonora Carrington

### 5.1 Cepas bacterianas

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* usadas

Cepa	Nombre corto	Características	Fuente
W3110		F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV (rnnD-rnnE) 1, RecA <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup>	Jensen, K., 1993
W3110/pTrcmelA	WmelA	Contiene el plásmido pTrc99A con el gen <i>melA</i> de <i>Rhizobium etli</i>	Cabrera-Valladares, 2006
XL1 Blue		recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene, La Jolla, CA
XL1Blue/pTrcmelA1MUT	XmelA1MUT	Contiene el vector pTrc99A con la versión 1 del gen <i>melA</i> sometido a PCR mutagénica	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA2MUT	XmelA2MUT	Con la versión 2 del gen mutado <i>melA</i>	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA3MUT	XmelA3MUT	Con la versión 3 del gen mutado <i>melA</i>	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA4MUT	XmelA4MUT	Con la versión 4 del gen mutado <i>melA</i>	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA5MUT	XmelA5MUT	Con la versión 5 del gen mutado <i>melA</i>	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA6MUT	XmelA6MUT	Con la versión 6 del gen mutado <i>melA</i>	Este trabajo
XL1Blue/pTrcmelA7MUT	XmelA7MUT	Con la versión 7 del gen	Este trabajo

El plásmido pTrc99A (Amann, et al., 1988) (Pharmacia Biotech) es un derivado del vector pkk23-2 que tiene el promotor fuerte *trc* (ubicado antes de un sitio múltiple de clonación) y el terminador transcripcional *rrnB*.

## **5.2 Generación del banco de mutantes**

### **Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina**

El gen *melA* utilizado en este trabajo se obtuvo a partir del plásmido pTrcmelA generado en el laboratorio, para lo cual se llevó a cabo el procedimiento siguiente, igual que para la mayoría de las ocasiones en que se necesitó purificar DNA plasmídico.

Se preparó medio LB con el marcador de selección apropiado. Se inocularon 3 ml del medio con la cepa y se incubó a 37 °C durante 12 horas a 300 rpm en una incubadora New-Brunswick. Se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 4 minutos a 400 rpm en una centrífuga marca Eppendorf 5415C. Una vez centrifugado se aspiró el sobrenadante.

Se practicó un lavado, usando vortex, con 1 ml de solución I fría (sacarosa 0.6 M, EDTA 0.05 M y pH 8, TRIS-HCl 0.05 M y pH 8). Se centrifugó por 4 minutos a 10000 rpm y se aspiró el sobrenadante.

La pastilla se resuspendió, usando vortex, en 150 µl de solución I fría y se agregaron 5 µl de RNAsa. Se adicionaron 350 µl de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 10 minutos. El SDS utilizado en este paso es un detergente que degrada la estructura de la membrana celular, al emulsionar a los lípidos y proteínas forma complejos con estas moléculas y las precipita.

Se adicionaron 250 µl de solución III fría (acetato de sodio 3 M, pH 4.8). Se incubó en hielo por 30 minutos y después se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm.

El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se desechó la pastilla. Se colocó un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante.

Se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm, esto para eliminar todos los restos de sales en el DNA. Finalmente se secó al vacío durante 20 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua grado biología molecular para su uso inmediato o su almacenaje a -20 °C.

En algunos casos los vectores utilizados fueron purificados, cuando así lo permitía el número de cepas, mediante el uso del kit Miniprep System de la marca Marligen BioScience, Inc.

### Oligonucleótidos

El par de oligos utilizado para la amplificación del gen *mela* fueron los previamente diseñados por Chávez-Béjar (artículo en preparación), MtyrA5 y MtyrA3, cuyas características se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para amplificar el gen *mela* en la PCR mutagénica

Oligo	Secuencia	Tm	pb
MtyrA5 (sentido)	GTA TAA TGT GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC	60.1	30
MtyrA3 (antisentido)	CTG TAT CAG GCT GAA AAT CTT CTC TCA TCC	60.9	30

El sitio del vector pTrcmelA en donde hibridan los oligos se esquematiza en la figura 9.



Fig. 9 Porción del plásmido pTrcmelA a partir de la cual fue amplificado el gen de la tirosinasa, el cual no tiene promotor ni terminador propios

### PCR mutagénica

Este procedimiento se llevó a cabo realizando una combinación de los métodos de Leung, et al. (1988) y Cadwell y Joyce (1994), en el cual se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (New England Biolabs), siendo el volumen final de la reacción 50 µl. Las condiciones se describen en la tabla siguiente.

Tabla 3. Mezcla de la PCR mutagénica

Componente	Concentración inicial
1 µl de DNA templado (pTrcmelA)	50 ng
1 µl de oligo MtyrA5	20 pmol/ µl
1 µl de oligo MtyrA3	20 pmol/ µl
5 µl de dATP y dGTP	2 mM
5 µl de dCTP y dTTP	10 mM
7.5 µl de buffer 10X (0.166 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.67 M Tris-HCl pH 8.8, 61 mM MgCl <sub>2</sub> , 67 µM EDTA pH 8, 1.7 mg/ml BSA)	2 mM
1 µl de Taq DNA polimerasa	2 unidades/ µl
0.5 µl de β-mercaptoetanol	1 M
5 µl de dimetilsulfóxido (DMSO)	0.2 M
5 µl de MnCl <sub>2</sub>	5 mM
H <sub>2</sub> O estéril hasta completar 50 µl	

Todo lo anterior se mantuvo en hielo antes y después de realizar la mezcla para posteriormente iniciar la reacción de tres etapas en un termociclador Perkin Elmer Gradient 96. Las condiciones fueron iniciadas entonces con 1 ciclo de desnaturalización pre-amplificación de 2 minutos a 96 °C; la siguiente fase consistió en 30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, uno de alineamiento a 55 °C por 30 segundos y uno de polimerización a 72°C por 2 minutos. Finalmente se dio un periodo de extensión de 5 minutos a 72 °C para compensar la pérdida de actividad de la Taq DNA polimerasa.

Se prepararon varias reacciones bajo las mismas condiciones con la finalidad de obtener una cantidad suficiente de producto de PCR.

### **Digestiones del producto de PCR y del vector**

El producto de la PCR mutagénica fue digerido usando las enzimas *NcoI* y *HindIII*, para posteriormente ser purificado con el kit PCR purification de la marca Marligen BioScience.

En el caso del vector a utilizar (pTrc99A), lo obtuvimos del mismo plásmido de donde se extrajo el gen, es decir, pTrcmelA. Aquí además de las dos enzimas usadas con el

producto de PCR (para obtener extremos compatibles y llevar a cabo su ligación posterior), se adicionó una más, *BamHI*, con la finalidad de que la actividad enzimática eliminara al gen *melA* ya que había que evitar la presencia del gen silvestre. Para su purificación, se corrió en un gel de agarosa por electroforesis (explicado más adelante) y el DNA de nuestro interés se extrajo utilizando el kit PCR agarose purification de marca Marligen BioScience.

### **Separación de DNA en gel de agarosa por electroforesis**

Para analizar y en ocasiones separar o purificar el DNA de una muestra, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.

Para visualizar el DNA en el gel de agarosa se adicionaron 150 µl de bromuro de etidio a 250 ml de buffer TBE 1X y se colocó en una lámpara de luz UV utilizando el equipo Eagle Eye (Stratagene).

### **Ligación del producto de PCR con el vector**

Para llevar a cabo la reacción de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) que actuó sobre una concentración de DNA con una relación 1:3 entre el inserto (producto digerido de la PCR mutagénica) y el vector (pTrc99A digerido).

## **5.3 Búsqueda de mutantes**

### **Preparación de células electrocompetentes de alta eficiencia**

Dado que necesitábamos hacer la búsqueda de las mutantes mejoradas, debíamos contar con un gran número de células que contuvieran al plásmido y al gen de nuestro interés, para esto requeríamos competentes muy eficientes, intentando llegar a tener  $10^{10}$  transformantes por µg de plásmido; para lograr esto seguimos un protocolo ligeramente distinto al comúnmente utilizado para la generación de células electrocompetentes, mismo que se describe a continuación.

Se inoculó un litro de medio Luria-Bertani (triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 5g y pH 7.5) con 10ml de un cultivo saturado de XL1 Blue que creció toda la noche con  $Tc^{10}$ . Se dejó incubar a 37 °C con agitación constante a 300 rpm y por aproximadamente 4 horas o hasta que llegara a una densidad óptica de 0.6 OD, entonces se dejó en hielo por 30 minutos.

Se centrifugó tres veces durante 10 minutos a 4000 x g y 4 °C, lavando en cada ocasión con glicerol frío al 10% y retirando el sobrenadante para eliminar las sales que interfieren con la eficacia de la electroporación. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de GYT frío (glicerol 10%, extracto de levadura 0.125% y triptona 0.25%), paso importante para conseguir la eficiencia elevada y que difiere del procedimiento típico en el que sólo se resuspenden en glicerol. Se hicieron alícuotas de 40 µl en tubos Eppendorf de 600µl y se almacenaron a -70 °C para tener las células listas para ser transformadas.

### **Transformación de la cepa con el vector de interés**

En condiciones estériles, se descongelaron en hielo las alícuotas de 40µl de células electrocompetentes y se les adicionó 5 µl de DNA plasmídico (del perteneciente al banco de mutantes generado a menos que se indique otra cosa), manteniendo la mezcla en hielo.

Posteriormente fue depositada en medio de los electrodos de la celda de electroporación previamente enfriada en hielo cuidando de no formar burbujas. Se colocó en un electroporador programado con un voltaje de 2500 V y se dieron dos pulsos para generar el choque eléctrico a las células. La muestra se recuperó agregándole 1 ml de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM) adicionado con 10 µl de glucosa y esto se transfirió a tubos de vidrio estériles para ser incubados a 37 °C y 300 rpm por una hora.

### **Comprobación de la eficiencia de las células electrocompetentes**

La eficiencia se define como el número de colonias que se forman por cada µg de DNA transformado. Para establecer la eficiencia de las células que se generaron, se transformaron con 10 µl del plásmido comercial pUC19 (New England Biolabs) que presenta una concentración de 10 pg/µl.

Después de su incubación, se sembraron 10 µl de la muestra en cajas de Petri con medio LB y se mantuvieron a 37 °C por 24 horas. Se hizo un conteo del número de colonias presentes en cada caja y se determinó la eficiencia.

### **Búsqueda de mutantes mejoradas en medio sólido**

De la muestra de células transformadas con el banco de mutantes, se tomaron 20 µl y se sembraron en placas de medio sólido Luria-Bertani (LB), agar 1.5% y ampicilina 100 µg/ml y se incubaron a 37 °C, esto con la finalidad de tomar al azar varias de las colonias y comprobar la presencia del plásmido y del gen por medio de la purificación de DNA plasmídico, su posterior digestión con las enzimas que se han venido ocupando, para así poder liberar el gen, y su visualización por electroforesis en gel de agarosa (todos estos, procedimientos descritos en secciones anteriores).

Adicionalmente se tomó parte de la muestra y se sembró en cajas con LB y con las condiciones necesarias para la producción de melanina establecidas previamente en el laboratorio por Lagunas-Muñoz y colaboradores (2006), las cuales se describen a continuación.

El antibiótico utilizado fue ampicilina a una concentración de 100 µg/ml; de sustrato, tirosina disuelta con una concentración final de 0.4 g/l, CuSO<sub>4</sub> 20 mg/ml como cofactor; IPTG 0.1 mM como inductor; la temperatura de incubación fue de 30 °C que es la óptima para la síntesis de melanina aunque no lo es para el crecimiento celular. Sin embargo, las colonias se sembraron por triplicado en cajas distintas para de este modo poder incubarlo a 37 y a 42 °C con el objeto de identificar mutantes con la capacidad de sintetizar melanina a temperaturas distintas a la reportada como ideal.

Las cajas se mantuvieron en incubación durante varios días y se reportaron los cambios en la coloración de las colonias. Las primeras que tomaron el color típico de la eumelanina fueron resembradas de manera aislada en cajas con las condiciones necesarias para generar el pigmento.

Al mismo tiempo se picaron esas colonias para hacer cultivos en medio líquido y contar con células suficientes para generar un banco en glicerol de las mejores mutantes. Estos se hicieron con una mezcla en partes iguales del cultivo celular en LB con el antibiótico y glicerol al 80%, para después almacenarse a -70 °C.

## 5.4 Caracterización genotípica de las mutantes

### Secuenciación

Con la finalidad de detectar cuál había sido la tasa de mutación que se logró a través de la mutagénesis por PCR sobre el gen de interés, se mandaron secuenciar de manera aleatoria varias clonas de las cuales estábamos seguros que contenían el vector con el gen pero que no habían crecido en un medio de selección propio para la generación de melanina.

Se cuantificó el DNA plasmídico por espectroscopía de UV a 260 nm y se realizó una mezcla con éste y con los oligos MtyrA5 y MtyrA3 usados y descritos con anterioridad, siguiendo las recomendaciones de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología que fue donde se mandaron las muestras para ser secuenciadas.

De manera paralela, se mandaron secuenciar las mutantes que presentaron durante su caracterización los mejores cambios fenotípicos tanto en medio sólido como líquido (explicado más adelante) para de este modo establecer cuáles habían sido los cambios específicos en la secuencia de aminoácidos que les permitieron presentar estas mejoras en la síntesis de melanina.

El procedimiento fue el mismo que para las clonas anteriores, con la diferencia de que se usaron tres oligonucleótidos internos extras (diseñados y proporcionados por Cabrera-Valladares y descritos en la tabla 4) con la finalidad de tener una lectura total de la secuencia al momento de alinear el producto de secuenciación de cada oligo.

Tabla 4. Oligonucleótidos internos usados para secuenciar las mutantes mejoradas

Oligo	Secuencia	Tm	Pb
SEC2melA (sentido)	5' ACG GCA GCG GTG ACG TCG TC 3'	68 °C	20
SEC3melA (antisentido)	5' ATT GTC CTT GCC GTC GGG CG 3'	66 °C	20
SEC4melA (sentido)	5' ATC GGT GGC TGG ATG CCG GA 3'	66 °C	20

Una vez con los resultados de las secuencias, se procedió al análisis de las mismas, para lo cual utilizamos los programas Bioedit Sequence Alignment Editor para realizar los alineamientos múltiples; el Translate tool contenido en el ExPASy Proteomics Server del Swiss Institut of Bioinformatics (acceso no restringido) para cambiar la secuencia de

nucleótidos por una de aminoácidos y el SIM Alignment Tool for Protein Sequences del mismo servidor para alinear las secuencias de aminoácidos.

## **5.5 Caracterización fenotípica de las mutantes mejoradas**

### **Medios de cultivo**

Para analizar el comportamiento de las cepas generadas, se utilizaron medios de cultivo líquidos de 50 ml donde se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento celular y de producción de melanina. Los medios fueron LB, LB con 2 g/L de glucosa y medio mineral M9.

La composición del medio Luria fue: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl (Sambrook et al., 1989). Esta misma mezcla se utilizó adicionándole además 10 ml de solución de glucosa al 20% para obtener medio con 2 g/l de la azúcar en los casos en que así se indique.

La composición del medio M9 (Atlas, 2004) por litro fue: 6g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.5g NaCl; 1 ml de solución  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M; 1 ml de solución  $\text{CaCl}_2$  0.1M; 1 ml de solución tiamina 1mg/ml; 1 ml de ampicilina 100 mg/ml y 10 ml de solución de glucosa 20%, es decir a una concentración final de glucosa de 2 g/l. Una vez disueltas en agua destilada, las primeras cuatro sales se esterilizaron en autoclave, a 121°C por 15 minutos. Las soluciones del resto de las sales se esterilizaron por separado. La tiamina se esterilizó por filtración (0.22  $\mu\text{m}$ ).

A los cultivos definitivos para las cinéticas, se pusieron además los elementos necesarios para la generación de melanina, éstos fueron por litro de medio (LB y M9): 1 ml de IPTG 0.1 mM, 1 ml de solución de  $\text{CuSO}_4$  20 mg/ml (ambas esterilizadas por filtración 0.22  $\mu\text{m}$ ) y 0.4 g de tirosina en polvo sin esterilizar.

### **Condiciones de los cultivos**

Los cultivos, independiente del medio en que fueron evaluados, se iniciaron con un inóculo (pre-inóculo en el caso del M9) en tubos de vidrio estériles con 5 ml de LB y antibiótico en el que se crecieron las cepas a 37 °C y agitación a 300 rpm por 8 horas.

Para los casos de las cinéticas en LB y LB con glucosa, el siguiente paso fue iniciar los cultivos en matraces bafleados de 250 ml adicionando una muestra del inóculo para

empezar a 0.1 DO<sub>600nm</sub>; se pusieron en una incubadora C24KC, New Brunswick Scientific a 30 °C y 300 rpm.

Para las cinéticas en M9, el siguiente paso fue un inóculo iniciado a 0.1 DO<sub>600nm</sub> en 20 ml de medio mineral en matraces bafleados de 125 ml incubado a 37 °C y sin los elementos requeridos para la síntesis de melanina, esto con el objetivo de que las cepas puedan tener una recuperación gradual ante el choque que significa cambiarlas de un medio rico (Luria) a uno mínimo (M9), este inóculo se dejó por aproximadamente 18 horas o hasta antes de alcanzar 2 DO<sub>600nm</sub>. Entonces se iniciaron los cultivos para el análisis de las cinéticas tomando una muestra del inóculo para tener 0.1 DO<sub>600nm</sub> en 50 ml de M9, ahora sí con lo indispensable para generar la melanina, en matraces bafleados de 250 ml incubados a 30 °C y 300 rpm por periodos de hasta 50 horas.

### **Determinación de crecimiento bacteriano**

Para generar las cinéticas de crecimiento bacteriano, se cuantificó en función de la turbidez, midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nanómetros en un espectrofotómetro marca Beckman DU-70.

Durante la fase de crecimiento, se tomaron muestras de 1.5 ml en diferentes etapas del mismo y una vez medida la DO<sub>600nm</sub> de cultivo con células y producto, se centrifugaban a 6000 x g por 3 minutos para eliminar el error de la posible absorbancia a la misma longitud de onda de los productos generados por las bacterias; entonces se medía la densidad óptica del sobrenadante a 600 y 400 nm. En este caso la estimación de masa celular se obtuvo de la sustracción de los dos valores a 600 nm. Dicha absorbancia fue convertida a peso seco mediante la siguiente relación  $1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{l}$  (DCW: peso seco de células; Lagunas-Muñoz et al., 2006).

### **Cuantificación de melanina**

Las cinéticas de producción de melanina fueron obtenidas a partir de la medición de la absorbancia del pigmento a 400 nm. Se tomó la primera muestra al inicio del cultivo y se midió DO<sub>400nm</sub>; después cada vez que se determinaba la densidad celular, se programaba al espectrofotómetro para identificar la presencia de melanina en el sobrenadante libre de

células de las muestras. A cada valor obtenido, se restó el inicial para encontrar la concentración de pigmento.

El dato de absorbancia fue convertido a peso seco usando la siguiente relación:  $1 \text{ DO}_{400} = 0.067 \text{ g/L}$  de eumelanina. Este último valor es el inverso del coeficiente de extinción de la eumelanina procesada.

## VI. RESULTADOS

*¡Qué fugaces son los deseos y esfuerzos del hombre! ¡Qué breve su tiempo!,  
y, por consiguiente, ¡qué pobres serán sus resultados,  
en comparación con los acumulados en la naturaleza durante periodos geológicos enteros!*  
Charles Darwin

### 6.1 Generación de un banco de mutantes

Como un primer paso para obtener una tirosinasa de mejores cualidades en cuanto a la transformación de algún sustrato en melanina, se decidió generar un banco de mutantes del gen *melA* de *Rhizobium etli* que codifica para esta enzima; esto se llevó a cabo mediante mutagénesis aleatoria del gen. Para tal propósito se modificaron las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual al mismo tiempo que introdujo mutaciones, amplificó la secuencia del gen.

Utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa se comprobó que el producto de la PCR era del tamaño previsto, es decir, de aproximadamente 1800 pares de bases (longitud del gen silvestre), por lo que se purificó y se sometió a una reacción de ligación con el plásmido pTrec99A, el cual es un vector de mediano número de copias (30) en el que la expresión de los genes está controlada por el promotor artificial *trc*, es inducible por lactosa o por IPTG, contiene un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección y su tamaño es de 4176 pb.

De manera física, esta ligación consistió en alrededor de 140  $\mu$ l de solución proveniente de la ligación hecha diluida en agua. Se colocó en tubos Eppendorf y se conservó a -20 °C.

Finalmente el producto que se obtuvo de esta primera parte del trabajo fue la generación de un banco de mutantes del gen *melA* contenido en el vector pTrec99A; es decir, se tuvieron ahí varias copias de distintas versiones de un mismo gen, dichas versiones consisten en cambios en la secuencia de bases nitrogenadas e incluso en la secuencia de aminoácidos. La tasa de mutación en nuestro banco de  $1 \times 10^9$  clonas fue de un error por cada 500 pares de bases secuenciadas (descrito más adelante).

## 6.2 Búsqueda de las mutantes obtenidas

Se revisó la eficiencia de las células electrocompetentes que se prepararon, para esto se sembraron células transformadas con el plásmido comercial pUC19 de concentración definida. Se contó el número de colonias formadas e hice los cálculos para establecer cuántas células se tenían por ml de cultivo y cuántas por  $\mu\text{g}$  de DNA (eficiencia). Con esto nos dimos cuenta que habíamos obtenido células con la capacidad de producir  $1 \times 10^9$  clonas por  $\mu\text{g}$  de plásmido transformado, lo cual nos indicó que teníamos un banco de alta eficiencia y que podíamos perfectamente utilizarlo para hacer la búsqueda de mutantes.

Estas células fueron entonces transformadas con una muestra de 5  $\mu\text{l}$  del banco de mutantes y sembradas primero en un medio sin los elementos necesarios para la generación de melanina, sino únicamente con antibiótico; de las colonias que se produjeron se tomaron al azar 24 a las que se les purificó el DNA plasmídico y se verificó su tamaño por electroforesis en gel de agarosa antes y después de ser digeridas con las enzimas *Nco* y *HindIII* para liberar el inserto. De todas ellas el 60% tuvo los fragmentos deseados y el 40% sólo tuvo el fragmento del vector; es decir, les encontramos el plásmido pTrc99A (4 kpb) con el gen *mela* (1.8 kpb) a 14 de las clonas.

Adicionalmente, las transformantes se sembraron en varias placas con LB, sulfato de cobre, IPTG y tirosina a 30, 37 y 42 °C para observar cómo era su comportamiento al estar presentes en un medio propicio para la síntesis de melanina. Después de aproximadamente 18 horas se observaron en promedio en cada una de las cajas 600 colonias bien definidas.

En el transcurso del segundo y el tercer día a partir de ser sembradas, 20 colonias procedentes de todas las cajas a 30 °C tomaron una coloración negra característica de la melanina. Con el transcurso de los días, muchas más colonias fueron tornándose melanogénicas, sin embargo, se asumió que su capacidad de síntesis no era tan buena como la de las primeras que aparecieron melanizantes, por lo cual no fueron tomadas en cuenta para las pruebas posteriores.

En el caso de las otras dos temperaturas, la aparición de las colonias fue mucho más rápida y con poblaciones más numerosas, ya que a las 12 horas ya se tenían en promedio 600 colonias y a las 18 había 900 en cada caja. A pesar de ello y aunque se mantuvieron en incubación por más de seis días, ni una sola de las colonias cambió su coloración, no hubo

alteraciones en la tinción del medio ni en la apariencia de las células; la transformación se repitió un par de veces más con resultados idénticos, por lo que se decidió que para experimentos posteriores se descartarían ambas temperaturas, dando por sentado con ello que en nuestro banco de mutantes no teníamos clonas con tirosinasas que fueran resistentes a temperaturas mayores de 30 °C.

Las 20 colonias iniciales que se presentaron melanizantes a 30 °C fueron recuperadas y aisladas en una sola caja bajo las mismas condiciones (figura 10). Se sembraron dos veces y se siguieron los cambios en la coloración durante tres días, escogiendo finalmente siete colonias como las que mejores resultados presentaban para la producción de melanina. Los criterios a utilizar fueron: el tiempo que tardaron las colonias en cambiar de su color típico a negro y la intensidad de la tinción no sólo de la colonia misma sino también de su medio circundante.

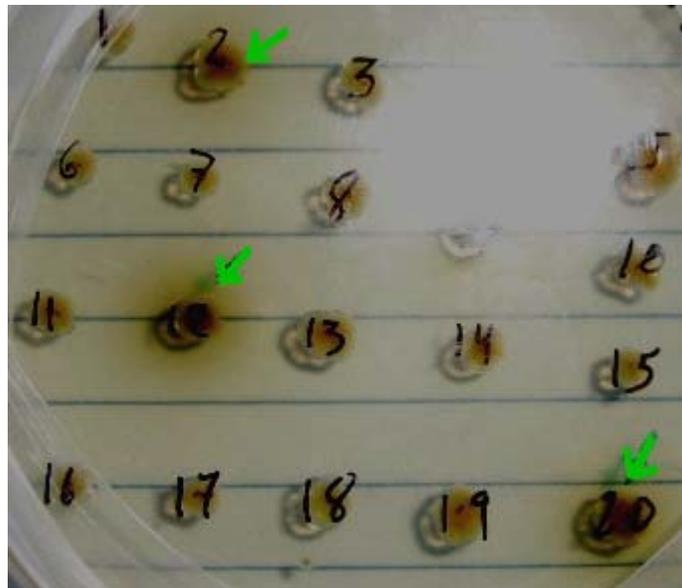


Fig. 10 Primeras tres mutantes que produjeron melanina de entre 20 colonias seleccionadas

En la fotografía se observa una placa con las 20 colonias seleccionadas a las 24 horas aproximadamente, en este instante, sólo tres han empezado a tomar el color típico de la melanina y se puede observar que el medio también está ligeramente teñido de un color pardusco, lo que indica que el pigmento producido por las células poco a poco va difundiendo. Conforme pasa el tiempo, las colonias se hacen cada vez más negras y más clonas van adquiriendo esas tonalidades.

Se hicieron varias pruebas para confirmar que realmente seleccionábamos las mejores mutantes poniéndose en una caja azadas de algunas de estas colonias y de la cepa con el gen silvestre para poder compararlas. Con esto nos dimos cuenta que no sólo existían diferencias entre las colonias que habíamos escogido, sino que su comportamiento era distinto al de la cepa que contenía la tirosinasa sin mutar, teniendo algunas de ellas una coloración más intensa y de aparición previa, tal como se muestra en la figura siguiente.

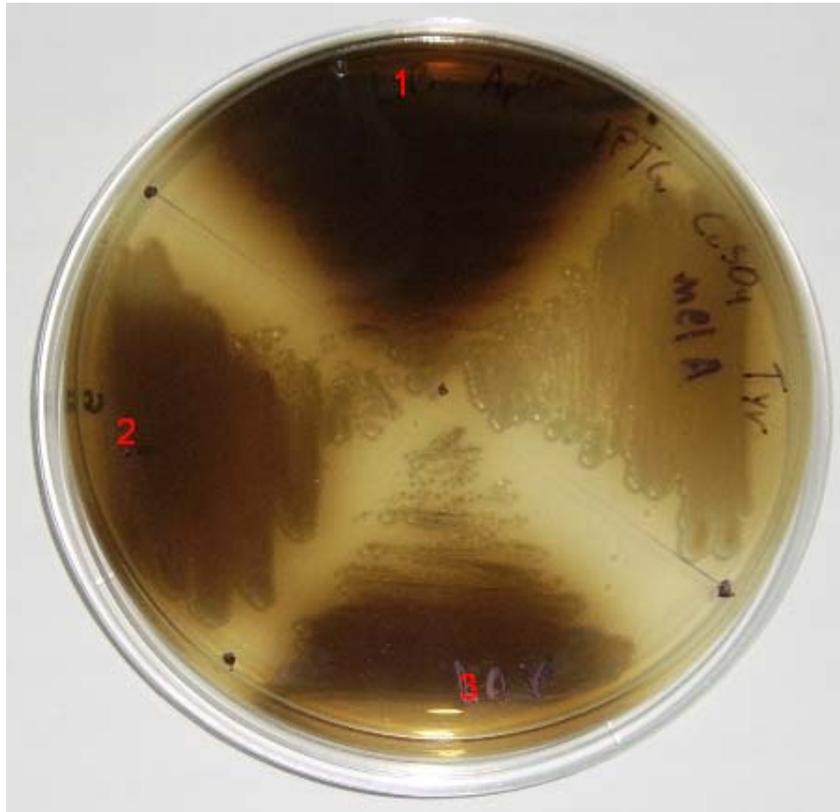


Fig. 11 Mutantes 1, 2 y 3 de la tirosinasa comparadas con la que produce el gen silvestre *melA*

Las mutantes de *melA* escogidas fueron nombradas según el orden en que sufrieron el cambio de coloración, así, la primera de las colonias que se tornó negra fue llamada X*melA*1MUT, a la segunda que a simple vista se notaba que producía melanina se nombró X*melA*2MUT y así sucesivamente hasta la séptima de las mutantes (X*melA*7MUT). Con esto, se procedió a generar un banco de las siete cepas en glicerol, con la finalidad de conservarlas para las pruebas subsiguientes.

### 6.3 Caracterización genotípica

Se escogieron aleatoriamente seis clonas (de 14) a las cuales se les localizó el inserto adecuado al ser sembradas en medio sin selección y se mandaron secuenciar utilizando sólo los oligos sintéticos de los extremos (MtyrA5 y MtyrA3), por lo que de cada lado se leyeron 600 bases aproximadamente; las secuencias obtenidas fueron comparadas a través de alineamientos con el gen silvestre que codifica para la tirosinasa en *R. etli* (*melA*). De 7200 pares de bases que se leyeron, encontramos 13 mutaciones, cambios de bases nitrogenadas. Las seis mutantes que se analizaron presentaron al menos una mutación, lo que nos indica claramente que nuestro método de mutagénesis fue satisfactorio, no quedó ni una clona sin alterar y aunque esto en principio no sea un indicativo de mejora en la eficiencia de síntesis de melanina, sí podemos afirmar que las tirosinasas resultantes tendrán en mayor o menor grado una alteración en su estructura o más importante aún para nuestros fines, en su función.

A partir de estos datos, encontramos que la tasa de mutación promedio para nuestro banco de clonas fue de un cambio cada 500 pares de bases aproximadamente. Cabe remarcar que estos datos no son de las mutantes a las que les encontramos actividad mejorada, sino de una muestra azarosa a partir de colonias producidas en medios sin ningún tipo de selección, es decir, en las placas en las que crecieron no tenían la posibilidad de sintetizar melanina.

Las mutantes que aparentemente tuvieron una mejor actividad de tirosinasa en los experimentos anteriores, también fueron secuenciadas y sometidas a un análisis por alineamientos múltiples. Todas ellas, las siete clonas, tuvieron al menos dos cambios en su secuencia de bases, tal y como se observa en la siguiente figura.

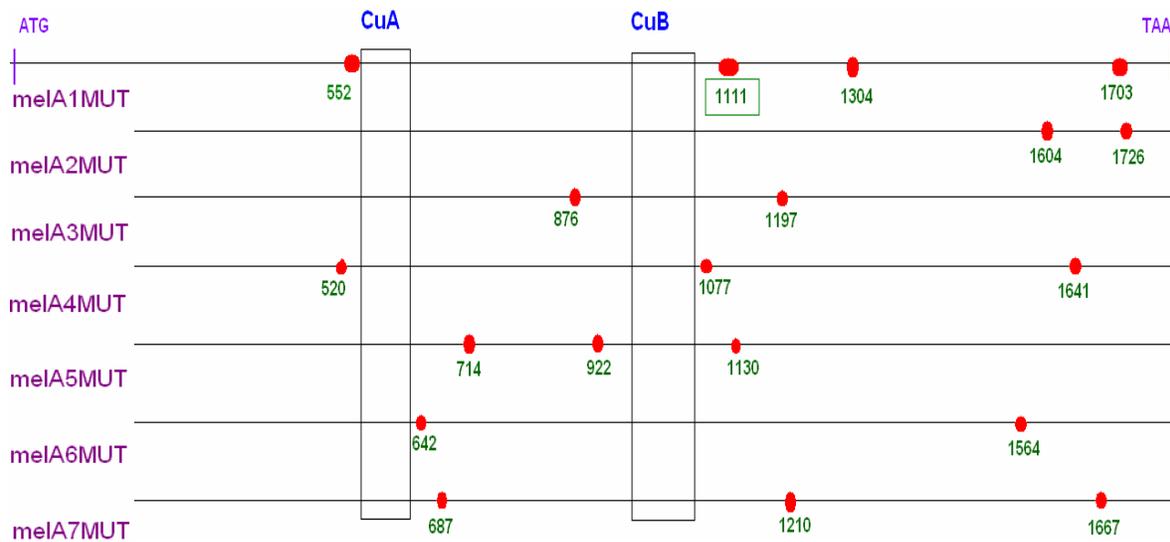


Fig 12. Distribución de los cambios de base en las secuencias mutantes. Las líneas horizontales representan el gen completo; los puntos son mutaciones y el encerrado en un cuadro generó un nuevo aminoácido.

Para el caso de la mejor de las mutantes, melA1MUT, se encontró que a lo largo de sus 1800 pares de bases, la PCR mutagénica logró introducirle cuatro cambios, lo que significa que su tasa de mutación fue de un cambio cada 450 pares de bases, que es ligeramente mayor a la reportada para las clonas secuenciadas al azar y equivale a un aumento del 10% con respecto a este valor. El porcentaje de identidad de este gen con respecto del silvestre es de 99.67%.

Al revisar la secuencia de la mutante melA2MUT, su tasa mutagénica fue de un cambio cada 900 pares de bases, significando un decremento con respecto a las clonas sin selección. Su porcentaje de identidad comparándolo con el gen *melA* sin mutar es de 99.83%; lo mismo pasa con melA3MUT y melA6MUT.

Los genes melA4MUT, melA5MUT y melA7MUT tuvieron una tasa de mutación de un cambio por cada 600 pares de bases polimerizadas durante la PCR, lo que implica que este valor por arriba del de las tres mutantes anteriores pero por debajo de las secuenciadas aleatoriamente y de melA1MUT. Todos estos genes comparten el mismo porcentaje de identidad con el gen parental, de 99.78%.

Obviamente estas mutaciones no fueron iguales, hubo variantes en cuanto al tipo de cambio que se llevó a cabo, datos presentados en la tabla 5.

Tabla 5. Detalles de las mutaciones ocurridas

Mutante	Sitio modificado	Base silvestre / Base nueva	Mutación
melA1MUT	552	A / G	Transición
	1111	G / A	Transición
	1304	C / A	Transversión
	1703	T / C	Transición
melA2MUT	1604	A / G	Transición
	1726	A / G	Transición
melA3MUT	876	C / T	Transición
	1197	A / G	Transición
melA4MUT	520	C / T	Transición
	1077	T / C	Transición
	1641	A / G	Transición
melA5MUT	714	C / T	Transición
	922	A / G	Transición
	1130	A / G	Transición
melA6MUT	642	G / A	Transición
	1564	T / C	Transición
melA7MUT	687	G / A	Transición
	1210	T / G	Transversión
	1667	C / A	Transversión

Debido a que esta parte de la investigación se realizó en paralelo con la caracterización fenotípica en cultivos líquidos (explicado más adelante; ver Materiales y métodos), los análisis a continuación descritos sólo se refieren a la mutante XmelA1MUT debido a que ésta presentó los mejores comportamientos en las cinéticas de crecimiento y de producción de melanina; es decir, desde este momento ya consideraré a esta, la mejor de mis mutantes y por consiguiente es sobre la que me enfoco en el resto del trabajo.

Ya se tenían las secuencias de bases nitrogenadas de las mutantes que nos sirvieron para establecer la tasa de mutación que tenemos en el banco que se generó, sin embargo más importantes aún, son las secuencias de aminoácidos de cada una de ellas, ya que éstas

son las que realmente van a determinar la estructura de la proteína y por consiguiente todas sus actividades enzimáticas (para este caso específico, la de tirosinasa).

Para esto se tradujo la secuencia de ácidos nucleicos a secuencias de aminoácidos tanto de las mutantes generadas como del gen a la proteína silvestre y se llevaron a cabo alineamientos para identificar los cambios que presentaban entre ellas.

En cuanto a la tirosinasa codificada por *melA1MUT*, a pesar de que como ya vimos, presentó 4 mutaciones a lo largo de toda su secuencia de bases, cuando lo pasamos a aminoácidos, solamente uno cambia con respecto a la proteína silvestre. Este cambio ocurrió en el sitio 371; ahí la tirosinasa silvestre presenta una alanina, mientras que la tirosinasa mutante tiene una treonina.

Esto significa que en la secuencia del gen, la base nitrogenada del sitio 1111 (enmarcada en la figura 12) fue la responsable de modificar la secuencia de aminoácidos en la proteína de la mutante.

Con estos resultados, podemos ver que el porcentaje de identidad de la mejor de las mutantes con respecto a la proteína sin mutar es del 99.8% a lo largo de los 580 aminoácidos alineados.

En cuanto a las otras mutantes, al hacer los alineamientos correspondientes, no encontramos ningún cambio de aminoácido, lo cual resulta muy notable dado que todas ellas tuvieron un fenotipo claramente distinguible de la cepa silvestre.

A continuación se analizó si la única mutación de aminoácido había caído dentro de la zona del sitio activo de la tirosinasa, más específicamente en alguna de las regiones de histidinas de unión a cobre, o sea los sitios CuA y CuB. En la figura 13 se presentan las secuencias de ambas zonas y su relación con el aminoácido 371, tanto en la tirosinasa silvestre como en la tirosinasa de la mutante *XmelA1MUT*.

Claramente se ve que estas zonas que son de suma importancia para la actividad enzimática de la proteína, no presentan ninguna modificación en la mutante mejorada, ya que tanto CuA (aminoácidos 185 a 207) como CuB (que ocupa los lugares 320 a 349) son idénticos al hacer el alineamiento, incluidas todas las histidinas que se unen al cofactor; sin embargo, se observa también que sólo 22 aminoácidos río abajo del final de CuB está la posición 371, lugar en el cual la tirosinasa silvestre tiene una alanina y la tirosinasa de *XmelA1MUT* una treonina.

### Sitio CuA

5' 180

VNLSK	I	H	G	S	G	D	V	V	K	Y	C	P	H	G	N	W	Y	F	L	P	W	H	R		A	Y	T	A	M
VNLSK	I	H	G	S	G	D	V	V	K	Y	C	P	H	G	N	W	Y	F	L	P	W	H	R		A	Y	T	A	M

### Sitio CuB

5' 317

LEY	T	P	H	N	Q	V	H	N	N	I	G	G	W	M	P	E	M	S	S	P	R	D	P	I	F	F	M	H	H	C		N	I	D	R	I	W	A	T	W	N	L	R	N	A	N	S	T	D	R	L	W	A	D	M	P	F	T
LEY	T	P	H	N	Q	V	H	N	N	I	G	G	W	M	P	E	M	S	S	P	R	D	P	I	F	F	M	H	H	C		N	I	D	R	I	W	A	T	W	N	L	R	N	A	N	S	T	D	R	L	W	I	D	M	P	F	T

Fig. 13 Alineamiento de los sitios de unión a cobre de dos tirosinasas. La secuencia superior en los dos casos, representa la de la proteína silvestre de *Rhizobium etli*, mientras que la inferior muestra la de la mutante Xme1A1MUT generada en este trabajo. Las cajas indican los sitios CuA y CuB; en rojo están las histidinas de unión a cobre y en verde el aminoácido 371.

## 6.4 Caracterización fenotípica

### 6.4.1 Cinéticas en medio rico Luria-Bertani

Las primeras cinéticas de crecimiento celular y producción de melanina de las siete cepas generadas en esta investigación y de la cepa silvestre, se llevaron a cabo en medio rico LB y están esquematizadas en la figura 14.

Para la generación de biomasa, se tomaron muestras de los cultivos hasta que el valor de lectura del espectrofotómetro se mantuvo constante por al menos tres mediciones, esto ya nos indicaba que las bacterias habían llegado a la fase estacionaria de su crecimiento.

En cuanto a la síntesis de melanina, los matraces permanecieron en la incubadora hasta por cien horas o hasta el momento en que la lectura a 400 nm nos dijera que ya se habían generado 0.4 g/L del pigmento; valores superiores no indicaban mayor concentración de melanina sino mayor grado de polimerización, dando monómeros cada vez más grandes mientras más tiempo transcurría.

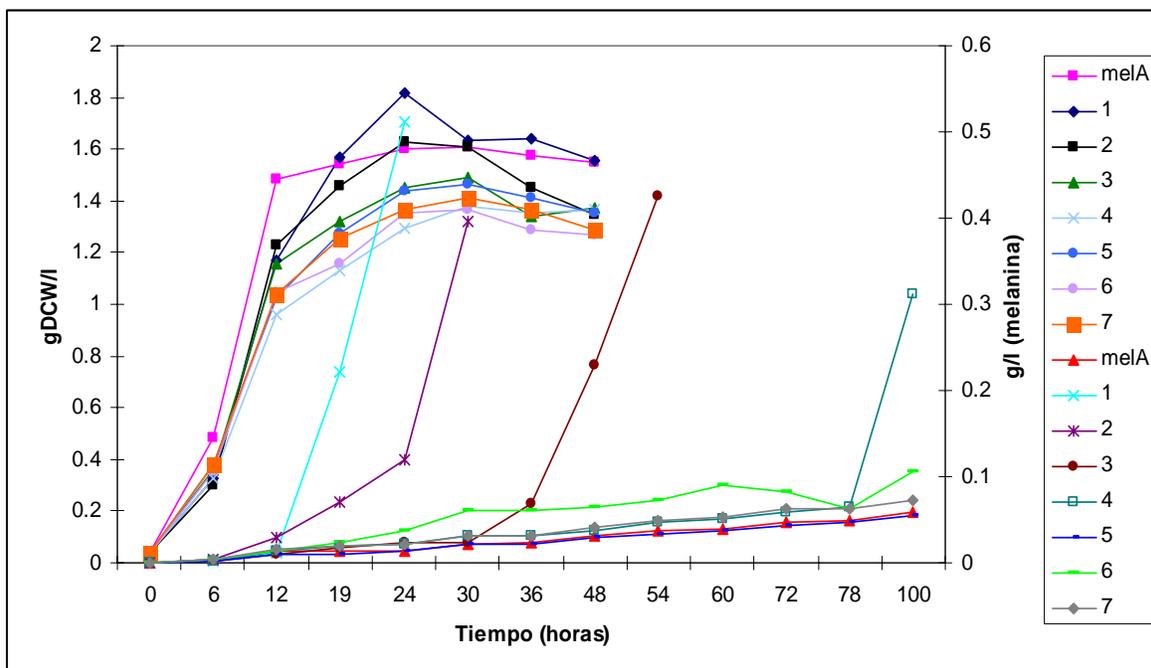


Fig. 14 Cinéticas de crecimiento (biomasa en  $g_{DCW}/L$ ) y producción de melanina (g/L) de la cepa silvestre WmelA y de las 7 cepas con las tirosinasas mutantes (XmelA1MUT – XmelA7MUT) en LB

En la gráfica se observa de manera muy clara cómo es que durante las primeras horas de incubación, las células crecen de manera exponencial hasta que llegan a un punto en que el aumento de la biomasa se estabiliza y permanece constante el resto del cultivo; el comportamiento es prácticamente el mismo en todas las cepas, sin embargo es notorio cómo la cepa que contiene a la tirosinasa silvestre *melA* tiene una velocidad de duplicación mayor que cualquiera de las cepas mutantes y la densidad celular en la cual se estaciona tiene también un valor superior que la mayoría de las mutantes.

Por otro lado, salta a la vista el hecho de que únicamente cuatro de las cepas tienen una producción considerable de melanina, siendo *XmelA1MUT* la que primero alcanza los 0.4 g/L (es decir el rendimiento máximo), seguida de *XmelA2MUT* y *XmelA3MUT* hasta antes de las 50 horas, posteriormente *XmelA4MUT* también logró sintetizar melanina en cantidades apreciables pero esto fue apenas poco antes de que detuvimos el cultivo (100 h). Las demás tirosinasas tienen una actividad apenas perceptible de manera indirecta con el espectrofotómetro.

Pese a presentar en esta gráfica hasta las 100 horas, la parte que consideramos más significativa es hasta las 50 horas. De aquí en adelante, los datos serán presentados hasta ese momento para todas las cinéticas y cultivos.

Un tercer punto que vale la pena mencionar es que la producción de melanina en los cultivos inicia cuando las células llegan a la fase estacionaria, antes no se registra nada con la lectura a 400 nanómetros. Por lo tanto, mientras uno de los parámetros estudiados se estabiliza, el otro es apenas cuando comienza a registrarse y no tiene un comportamiento tan uniforme en todas las cepas como lo tiene el primero.

Para las ocho cepas se calcularon valores tanto de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) como de velocidad de formación de producto ( $\beta$ ) no asociada a crecimiento. El primer parámetro se obtiene utilizando el método de los mínimos cuadrados; cuando las células no están limitadas por sustrato, crecen de manera exponencial y se observa una línea recta cuando la masa celular es graficada en escala logarítmica en función del tiempo de cultivo; de este modo se tiene que

$$\frac{dx}{dt} = x \mu t$$

donde  $X$  es la biomasa ( $\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ),  $t$  es el tiempo en horas y  $\mu$  es una constante de proporcionalidad que representa la velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ); además  $X_0$  sería la biomasa al inicio de la fase de crecimiento exponencial que se incrementa hacia  $X$  en el tiempo.

Para la velocidad de formación de producto se usó la ecuación siguiente:

$$\beta \text{ (g}_{\text{Producto}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h)} = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \beta$$

En la cual  $X$  es la concentración de células promedio en la fase estacionaria,  $P$  es la cantidad de producto (g) generado durante el tiempo de cultivo ( $t$ ) y  $\beta$  es una constante de proporcionalidad no asociada a crecimiento.

Los datos para las ocho cepas estudiadas aquí, se resumen en la tabla que sigue.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y velocidad de formación de producto ( $\beta$ ) de la cepa silvestre y de las siete cepas que contienen tirosinasas mutantes en medio LB

Cepa	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{mg}_{\text{EuMel}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$ )
WmelA	0.308	0.66
XmelA1MUT	<b>0.288</b>	<b>31.45</b>
XmelA2MUT	0.292	17.71
XmelA3MUT	0.287	7.51
XmelA4MUT	0.271	4.50
XmelA5MUT	0.277	0.38
XmelA6MUT	0.278	0.80
XmelA7MUT	0.278	0.53

Los datos ponen de manifiesto el hecho de que todas las mutantes generadas en la investigación tienen una velocidad de crecimiento menor que la que presentó la silvestre, esto representa una disminución del 6.5% cuando se compara con XmelA2MUT que es la cepa mutante con el valor más alto de  $\mu$  y del 12% con la cepa más lenta, XmelA4MUT.

En cuanto a los datos de velocidad de formación de melanina, las diferencias son aún más evidentes aunque en sentido inverso, ya que la cepa silvestre tiene un valor mayor sólo con respecto a dos de las mutantes; en cambio cuando se le compara con las restantes

hay un aumento muy importante en los valores de éstas, siendo de apenas 21% en la cepa XmelA6MUT, hasta llegar a ser casi de 50 veces en el caso de XmelA1MUT.

Con la finalidad de mostrar de manera más clara las diferencias entre las cepas estudiadas, en la figura 15 se indican únicamente los comportamientos de WmelA y XmelA1MUT; aquí el único cambio metodológico fue la toma de muestras, la cual fue mucho más fina que para la serie de experimentos que incluyeron todas las cepas, es decir, los intervalos entre mediciones fueron menores.

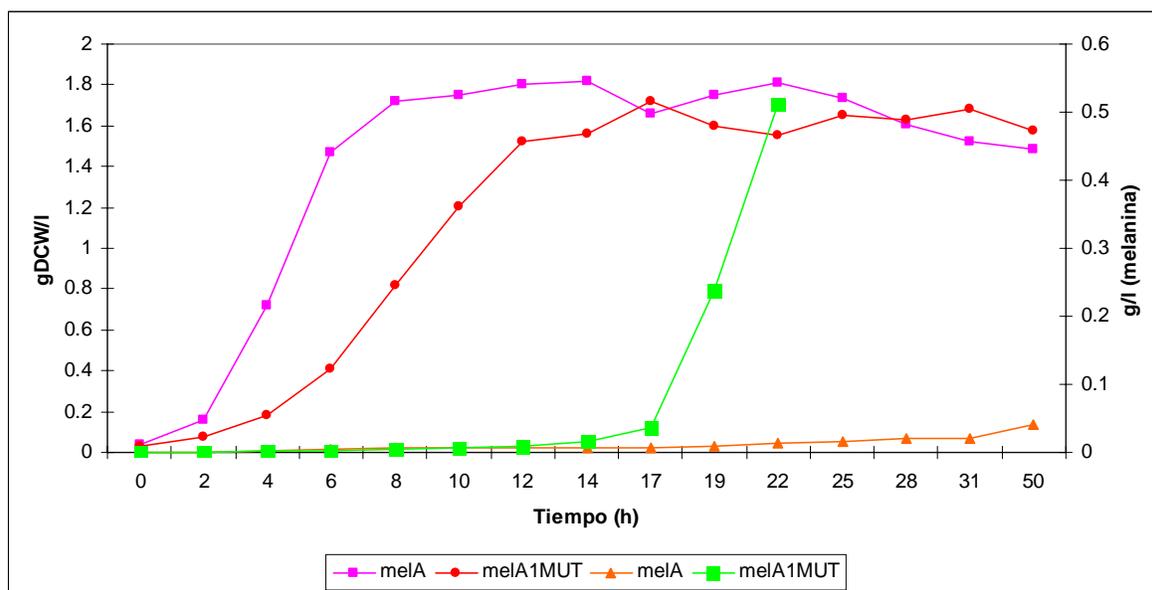


Fig. 15 Cinéticas de crecimiento (biomasa en g<sub>DCW</sub>/l) y producción de melanina (g/l) para las cepas WmelA y XmelA1MUT

La decisión de incluir en éstas cinéticas únicamente a la mutante XmelA1MUT, fue debido a que tanto en la caracterización en medio sólido, como en medio líquido, fue la que mejor comportamiento tuvo en cuanto a la síntesis de melanina; aunado a esto, se encuentra el hecho ya mencionado en el apartado anterior de que es la única de las mutantes mejoradas que encontramos con un cambio en su secuencia de aminoácidos.

En la figura 16 A se ven 3 matraces después de 24 horas de cultivo, momento en el cual la cepa XmelA1MUT ha alcanzado el rendimiento máximo (0.4 g/l), mientras que la mutante XmelA2MUT, apenas ha logrado producir 1.12 g/l de melanina y la bacteria con la tirosinasa silvestre apenas 0.014 gramos del pigmento por litro. Esto se ve reflejado en la distinta coloración que presenta cada uno de los cultivos, ya que mientras XmelA1MUT

está totalmente negro, la mutante 2 se ve de una tonalidad café y la silvestre está prácticamente del color típico del medio rico con una alta densidad celular, es decir, la presencia del biopolímero en el medio es mínima.

En tanto, en la figura 16 B hay tubos eppendorf conteniendo el medio de cultivo sin células, otra vez las diferencias en la coloración delatan la cantidad de melanina sintetizada por la cepa que estuvo creciendo ahí, además este color es mucho más fiel ya que no existe la interferencia de las bacterias.

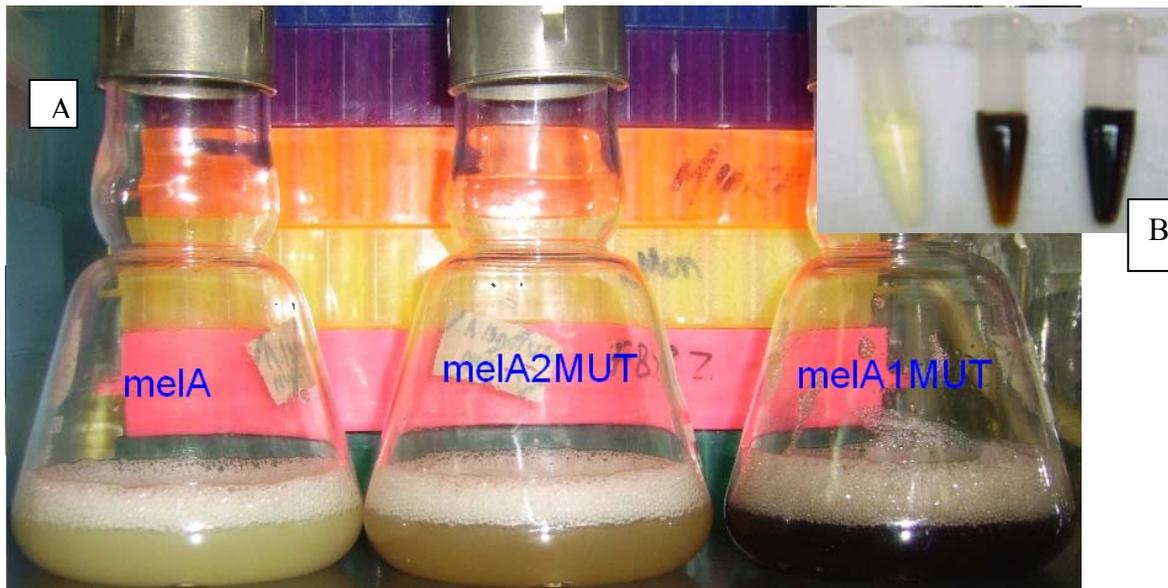


Fig. 16 A Cultivos (de izquierda a derecha) de las cepas WmelA, XmelA2MUT y XmelA1MUT a las 24 horas de incubación. B medio sin células de las mismas cepas en idéntico orden.

Esto sin duda alguna, nos llevó a determinar que la tirosinasa de XmelA1MUT es la mejor de las mutantes del banco generado, al menos lo es en su capacidad de transformación de tirosina en melanina cuando crece en un medio rico con cobre como cofactor y en presencia de un inductor sintético (IPTG).

#### 6.4.2 Cinéticas en medio rico LB adicionados con glucosa

El procedimiento que se siguió para llevar a cabo estos cultivos, fue idéntico al que utilizamos para las cinéticas anteriores, con la única diferencia de que a estos matraces se les agregó una solución de glucosa para obtener una concentración final de 2 g/L. La figura

17 muestra el comportamiento de generación de biomasa y de melanina de las siete cepas mutantes y la silvestre.

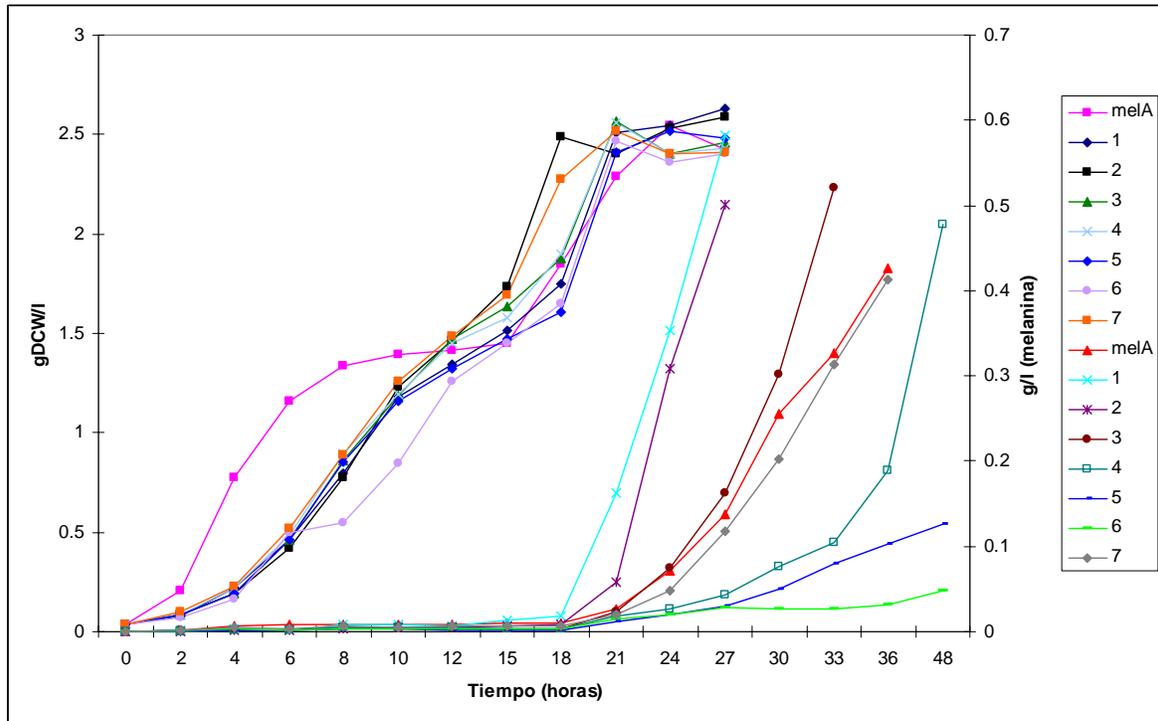


Fig. 17 Cinéticas de crecimiento (biomasa en  $g_{DCW}/L$ ) y producción de melanina (g/L) en medio LB con glucosa de la cepa WmelA silvestre y las 7 mutantes (XmelA1MUT – XmelA7MUT).

En la gráfica es muy notorio que el crecimiento de las bacterias difiere considerablemente del presentado en medio LB sin glucosa, ya que aquí se ve cómo existe diauxia, es decir, se presentan dos fases estacionarias a lo largo del cultivo; esto provoca que la concentración celular al final del segundo periodo estacionario sea mayor que la concentración promedio en la fase estacionaria de las cinéticas anteriores.

Nuevamente puede notarse que la cepa silvestre crece a una velocidad mayor que cualquiera de las mutantes, tal como sucedía en medio LB sin glucosa.

Por otra parte, el número de mutantes que produjeron melanina se incrementó de 4 (en LB) a 5 en medio LB con glucosa y a diferencia de los cultivos anteriores, la cepa con el gen silvestre también logró sintetizar el pigmento en forma significativa; el tiempo de generación de estas seis cepas productoras hasta llegar a conseguir un rendimiento máximo fue de 50 horas o menos.

El inicio de producción de melanina se localiza en el momento en que empieza la segunda fase de crecimiento, aproximadamente a las 18 horas en casi todas las cepas.

Para estos cultivos también se calcularon los dos mismos parámetros que para los anteriores. En el caso de la velocidad específica de crecimiento, se obtuvieron dos valores, uno para cada una de las etapas en que hubo aumento de biomasa y se hizo un promedio.

En cuanto a la velocidad de formación de producto, se tomó el promedio de células en la segunda fase estacionaria, es decir, en el momento de mayor densidad bacteriana de los cultivos; los demás elementos necesarios para el cálculo de este parámetro fueron los mismos que los ya especificados en la sección anterior. Todos estos datos se encuentran en la tabla siguiente.

Tabla 7. Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y velocidad de formación de producto ( $\beta$ ) de la cepa silvestre y de las siete cepas que contienen tirosinasas mutantes en medio LB con glucosa.

Cepa	$\mu_1$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_2$ ( $h^{-1}$ )	$\beta$ ( $mg_{EuMel}/g_{DCW} h$ )
WmelA	0.4486	0.0623	9.19
XmelA1MUT	0.3460	0.0574	17.72
XmelA2MUT	0.3065	0.0601	17.36
XmelA3MUT	0.3069	0.0755	10.76
XmelA4MUT	0.3057	0.0801	5.41
XmelA5MUT	0.3446	0.134	1.70
XmelA6MUT	0.2937	0.0885	0.66
XmelA7MUT	0.3077	0.0665	9.09

Al igual que en el caso de los cultivos sin glucosa, en estas cinéticas observamos que la cepa con mejor velocidad de crecimiento es la silvestre, al menos esto ocurre en la primera fase de aumento de biomasa, en donde aventaja sobre las otras entre un 23 y un 34%; para la segunda etapa de crecimiento, ocurrió que la  $\mu$  de la silvestre es mayor únicamente que la de las mutantes 1 y 2, es decir, las que mejores resultados presentan en su producción de melanina, ya que todas las demás incrementan su velocidad, incluso en el caso de XmelA5MUT se duplica su valor comparado con la cepa que expresa el gen *mela* sin mutar.

Hablando de la velocidad de formación de melanina, no hay diferencias tan dramáticas como en los experimentos anteriores, aunque nuevamente la que mejor valor obtiene es la mutante XmelA1MUT, mientras que la cepa con la tirosinasa silvestre presenta sólo el 50% de esa velocidad.

Una vez más, con objeto de apreciar mejor las diferencias entre la mejor de las mutantes y la silvestre, la figura 18 presenta los datos sólo de estas dos cepas.

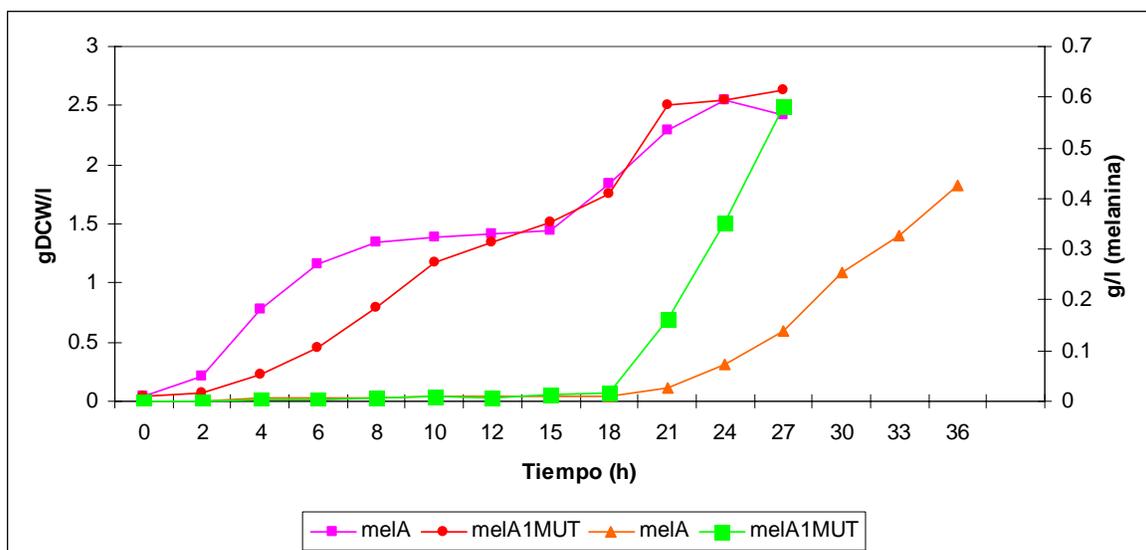


Fig 18. Cinéticas de crecimiento (biomasa en  $g_{DCW}/L$ ) y producción de melanina ( $g/L$ ) para las cepas WmelA y XmelA1MUT

### 6.4.3 Cinéticas en medio mínimo M9

La metodología usada es exactamente igual que en los dos grupos de cinéticas anteriores, con la única diferencia de que este se trata de un medio mineral mínimo suplementado con glucosa por lo que deben adaptarse las células antes de iniciar el cultivo. La toma de muestras a lo largo de todo el periodo de incubación arrojó los resultados mostrados en la figura 19.

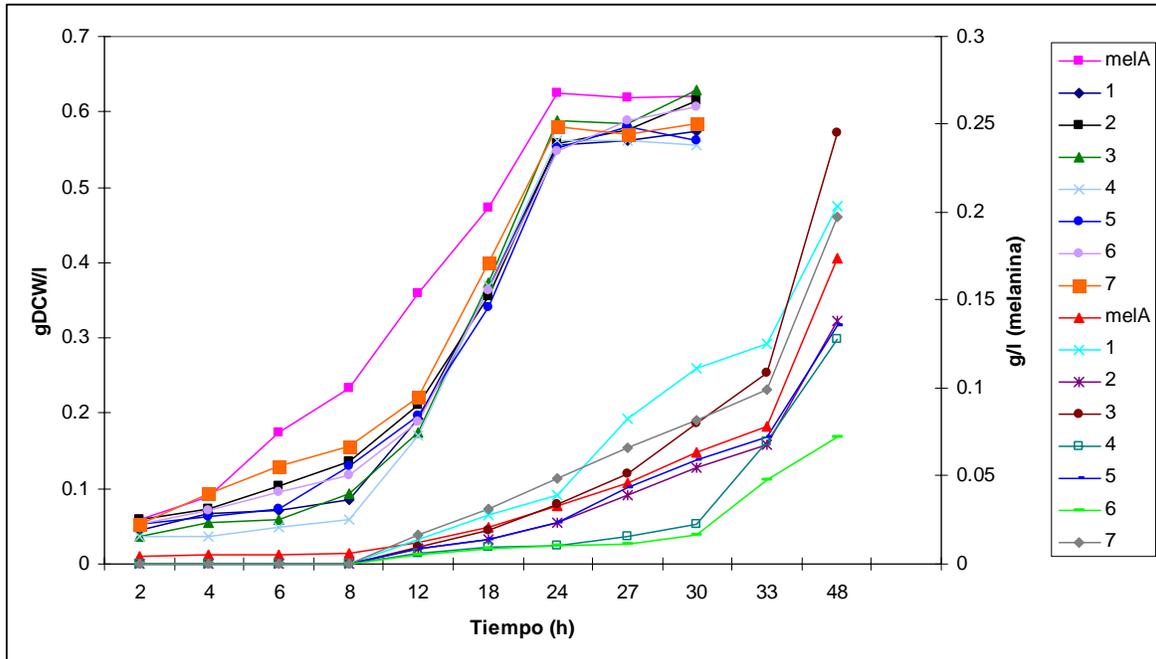


Fig. 19 Cinéticas de crecimiento (biomasa en  $g_{DCW}/L$ ) y producción de melanina ( $g/L$ ) en medio M9 de la cepa WmelA silvestre y las 7 mutantes (XmelA1MUT – XmelA7MUT).

De esta gráfica puede decirse que las velocidades de generación de biomasa son muy similares en todas las mutantes, e igual que en las cinéticas anteriores, son menores que la de la cepa con la tirosinasa silvestre. Los valores alcanzados en peso seco son mucho menores que los registrados en los experimentos anteriores, esto es debido a que el medio mínimo utilizado en esta sección no tiene la capacidad de soportar una densidad celular tan elevada.

Se observa además que todas las cepas, incluida la que expresa melA, tuvieron en diferente medida una fase inicial de crecimiento en que la duplicación celular es aparentemente baja, como si se tratara de una etapa de adaptación al medio mínimo en el que las pusimos a crecer. El cálculo de la velocidad específica de crecimiento se realizó tomando en cuenta únicamente la fase de crecimiento exponencial.

Para el caso de la producción de melanina, después de 50 horas, que es el tiempo estándar que se usó en las cinéticas previas, ninguna de las cepas logró llegar al rendimiento máximo de  $0.4 g/l$ , siendo el valor más alto de  $0.245 g/L$  para la mutante melA3MUT. A pesar de esto se ve que existen dos diferentes velocidades en todas las cepas, por lo cual se calcularon dos  $\beta$  para cada una.

Los valores de los parámetros se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 8. Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y velocidad de formación de producto ( $\beta$ ) de la cepa silvestre y de las siete cepas que contienen tirosinasas mutantes en medio mínimo M9.

Cepa	$\mu_2$ ( $h^{-1}$ )	$\beta_1$ ( $mg_{EuMel}/g_{DCW} h$ )	$\beta_2$ ( $mg_{EuMel}/g_{DCW} h$ )
WmelA	0.1178	4.95	10.39
XmelA1MUT	0.0882	8.87	9.22
XmelA2MUT	0.0811	4.65	7.99
XmelA3MUT	0.1015	7.18	15.19
XmelA4MUT	0.0996	1.58	10.51
XmelA5MUT	0.0861	5.09	7.43
XmelA6MUT	0.0887	1.1	5.33
XmelA7MUT	0.0801	6.84	11.28

Al igual que en las cinéticas en LB y en LB con glucosa, la cepa que presenta la mejor velocidad de crecimiento en medio mineral, es la que expresa la versión silvestre de melA, todas las demás crecen entre un 14 y un 32% más lentamente.

En cuanto a la velocidad de formación de producto, el primer valor nos dice que la cepa XmelA1MUT es la que más rápidamente produce melanina aunque no se aleja mucho de la mayoría de las otras cepas. Si vemos el segundo valor, existen mayores diferencias entre todas ellas y no tienen relación con los datos del primer valor, ya que aquí la más rápida es XmelA3MUT y en el caso de XmelA1MUT, su velocidad está por debajo de la que tiene la enzima silvestre.

Una vez más, muestro una gráfica en la que se comparan WmelA con XmelA1MUT.

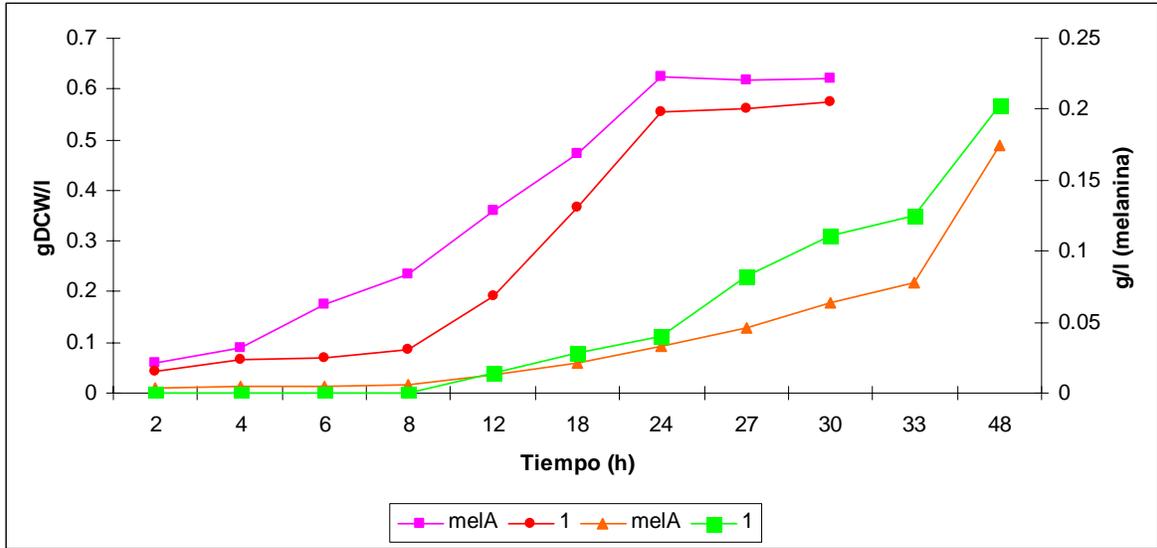


Fig 20. Cinéticas de crecimiento (biomasa en  $g_{DCW}/L$ ) y producción de melanina ( $g/L$ ) para las cepas WmelA y XmelA1MUT

## VII. DISCUSIÓN

*Lo contrario de la realidad, es la realidad.  
Si no le creemos al razonar (que busca y alcanza SU verdad, no siempre la nuestra),  
la piel lleva a creerla, a aceptar su confusa y continua aseveración.*

Julio Cortázar

La mutagénesis *in vitro* es una herramienta muy poderosa para elucidar la relación estructura-función de proteínas y de elementos regulatorios del DNA (Leung et al., 1988). Los métodos que actualmente se utilizan para la mutagénesis sitio-dirigida son altamente eficientes cuando se tiene una idea de dónde hacer las mutaciones específicas (Cha y Thilly, 1993).

Sin embargo, en los casos en los que la estructura y la función de la proteína de interés no están bien definidos, es generalmente difícil predecir que mutaciones hacer para generar un cambio deseado. La mutagénesis aleatoria de la región de interés del DNA acoplada con un buen sistema de búsqueda para aislar individuos que exhiban una propiedad particular, es entonces la mejor opción para el estudio del gen y sus secuencias regulatorias (Leung et al., 1988).

Se han desarrollado varios métodos para la mutagénesis aleatoria del DNA, entre ellos se incluyen el uso de un grupo de oligodeoxinucleótidos, la utilización de varios compuestos químicos mutagénicos y la mala incorporación base-específica usando una reverso transcriptasa (Leung et al., 1988).

En este trabajo, ante la falta de información acerca de la estructura de la tirosinasa, se llevó a la práctica un método bastante sencillo para generar las mutaciones aleatorias en la secuencia del gen *melA* de *R. etli* utilizando un protocolo modificado de PCR (Leung et al., 1988 y Cadwell y Joyce, 1992). Únicamente se requirió un paso de clonación para obtener una biblioteca de mutantes del gen mutado amplificado enzimáticamente.

Para lograr esto, confluyen una serie de elementos determinantes para la disminución de la fidelidad de la síntesis de DNA.

El primer factor, es el uso de la *Taq* DNA polimerasa, la cual tiene la tasa de error más elevada entre las DNA polimerasas termoestables conocidas, en el rango de un cambio por cada 10000 a uno por cada 2000 bases sintetizadas por ciclo de la polimerasa,

dependiendo de las condiciones de la reacción, lo que ayuda en nuestro propósito. En el transcurso de la PCR, en que la enzima hace un promedio de 20 a 25 ciclos, la tasa del error acumulativo es de aproximadamente un cambio cada 1000 nucleótidos. En la mayoría de los casos esto es insuficiente para generar una biblioteca diversa de secuencias variantes.

Debido a ello es que adicionalmente se introdujo el desbalance de los deoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) que es crucial para el protocolo, ya que la polimerasa encuentra sus sustratos en proporciones distintas, siendo la de dGTP y dATP menores a las de dCTP y dTTP. Esto obviamente significa que la polimerasa tendrá mayores probabilidades de incorporar en la secuencia uno de los que están en mayor cantidad, porque la concentración de los otros los hace limitantes. Además es importante señalar que la frecuencia de mutaciones se incrementa si la concentración de dATP disminuye, más que si lo hacen los otros deoxinucleósidos (Leung et al., 1988) Por otro lado, si la concentración de dCTP y dTTP se incrementa, se promueve la mala incorporación de nucleótidos (Cadwell y Joyce, 1992).

La adición a la reacción de metales de transición como el manganeso también logra la generación de errores durante la amplificación, esto debido a que actúa reduciendo la fidelidad de la DNA polimerasa, en otras palabras, disminuye su especificidad por el molde; incluso se sabe que algunos de estos metales como el cobre o el zinc, inhiben totalmente la actividad de la enzima. Del mismo modo, el uso de dimetil sulfóxido (DMSO) ayuda para este objetivo.

Finalmente, el incremento en la concentración del  $MgCl_2$  en el buffer de la polimerasa con respecto a una PCR típica (que es de 1.5 a 3 mM), ayuda a estabilizar las parejas de bases no complementarias (Cadwell y Joyce, 1994).

Con todos estos elementos juntos en la reacción, a cada paso de la polimerasa durante la PCR se incrementa la posibilidad de introducir mutaciones, por lo tanto, los errores acumulativos serán sustanciales. A pesar de esto, existe una posibilidad muy baja de que dos moléculas aisladas de la población final lleven la misma mutación como consecuencia de haberse derivado de un ancestro común, incluso si la mutación se generó en el primer paso de la polimerasa y pasa a lo largo de todas las moléculas descendientes.

Todo lo anterior nos hace pensar que el método utilizado en esta investigación para generar una biblioteca de mutantes del gen *melA* fue el apropiado, no sólo porque presenta

mejores ventajas respecto de la mutagénesis química en cuanto a mayores niveles y más diversos de mutación (Fromant et al., 1995), sino también porque es metodológicamente sencillo y nos permite tener un amplísimo espectro de posibilidades en las cuales buscar una modificación en las propiedades de las proteínas. Esto sin duda alguna se asemejaría a toda la enorme gama variaciones que la naturaleza puede ir generando a lo largo de la evolución, gracias a lo cual aquellos cambios que resulten benéficos para una proteína o para un organismo en términos de adecuación, se fijarán en una población a través de varias generaciones.

Es decir, se busca obtener el mayor número de cambios posibles para escoger de ahí por ensayo y error, como trabaja la naturaleza, aquella enzima que posea las características específicas que permitan a un individuo adaptarse a un entorno siempre cambiante. El proceso de evolución de manera natural tarda millones de años, con el experimento llevado a cabo aquí, obtenemos miles de mutantes en tan solo unas horas.

Debido a que el gen *mela* es relativamente grande (1800 pb) comparado con los tamaños de fragmentos mutados reportados en la literatura a través de PCR mutagénica (que van de las 250 a las 1200 pb), se probaron varios protocolos antes de obtener una tasa de mutación lo suficientemente alta como para considerarla efectiva; debido a que ni los kits comerciales Diversify PCR Random Mutagenesis (Clontech Laboratories, Inc.) y GeneMorph Random Mutagenesis (Statagene, Inc.) ni los métodos por separado de Leung et al. (1988) y Cadwell y Joyce (1994) nos dieron los resultados esperados en cuanto a diversidad de mutantes, se decidió combinar las dos últimas metodologías, con lo cual sí se logró una biblioteca de la amplitud deseada.

Un punto aparte pero definitivamente relacionado con la generación de la biblioteca de mutantes, es el hecho de contar con células lo suficientemente eficientes para transformar material genético exógeno, dado que nuestra biblioteca está formada por un grupo de plásmidos con el gen inserto. Estas células no sólo nos sirven para propagar el vector, sino también para que el gen cuente con la maquinaria necesaria para sintetizar la proteína de nuestro interés.

Las bacterias electrocompetentes que se prepararon aquí, dieron una eficiencia de  $1 \times 10^9$  colonias por  $\mu\text{g}$  de plásmido transformado (comparadas con  $1 \times 10^6$  que surgen con el método “convencional” de preparación de células competentes), es decir, contamos con

células lo bastante buenas como para generar un banco de las mutantes muy amplio en el cual pudimos hacer una búsqueda exhaustiva. Esto resulta de suma importancia debido a que a pesar de tener una biblioteca genómica muy completa obtenida con la PCR mutagénica, si no tuviéramos células con el potencial de incorporar la mayor cantidad de este DNA, no hubiéramos tenido la posibilidad de rastrear a las mutantes por su fenotipo y nuestra búsqueda habría sido sesgada.

El porcentaje de incorporación del plásmido fue de 60%, lo cual es una cifra alta considerando que se hicieron varias transformaciones independientes del banco de genes mutantes, lo cual nos permitió vislumbrar si no es que todo, sí la mayor parte del espectro de secuencias que se generaron en la PCR.

La primera aproximación que se hizo para definir de entre todas las mutantes del banco cuáles eran las que tenían tirosinasas que produjeran más melanina y más rápido, fue una búsqueda en la que se buscaron y eligieron aquellas colonias bacterianas que en el medio adecuado produjeron una coloración típica de la melanina, es decir, que después de algunos días de incubación tanto las células, como el medio que las rodeaba adoptaran un color oscuro, desde tonalidades cafés hasta el negro.

De aquí fueron tomadas como las mejores tirosinasas las que primero lograron ponerse oscuras y las que tenían tonalidades más cercanas al negro (Lagunas-Muñoz et al., 2006 establecieron que el tipo de melanina producido por la tirosinasa de *R. etli* es eumelanina y se sabe que el color de ésta es el negro), asumiendo que o la enzima llevaba a cabo su actividad más rápido o bien su eficiencia de conversión del sustrato en producto era mayor que en el resto de las clonas.

Esta búsqueda y selección se realizó en tres diferentes temperaturas, 30, 37 y 42 °C, la primera es a la que se sabe que se genera el pigmento, mientras que en las otras no se ha observado en cultivos con la tirosinasa silvestre. A 30 °C la formación de colonias fue más lenta y se produjeron menos en comparación con las temperaturas más elevadas, indicándonos que éstas se encuentran en el rango óptimo para el crecimiento bacteriano. Por el contrario, sólo se encontraron colonias melanogénicas en la temperatura más baja, mientras que después de diez días de incubación las otras no presentaron ningún cambio en su coloración.

Por tanto, se asumió que a los 37 y 42 °C la tirosinasa no era capaz de transformar la tirosina en melanina, es decir, ninguna de las mutantes logró revertir con los cambios generados en su secuencia la termosensibilidad que caracteriza a esta enzima. Lo que se puede deducir a partir de estas observaciones y de los datos presentados por Cabrera-Valladares y colaboradores (2006) es que la proteína tiene una estabilidad distinta dependiendo de la temperatura a la que se encuentre, mientras más alta sea, menos estable será la enzima; sin embargo en este trabajo se demuestra que la actividad óptima de la proteína purificada es a 50 °C.

Se sabe que la temperatura es una causal muy importante de la desestabilización e incluso desnaturalización de las proteínas, siendo responsable de la ruptura de enlaces tanto covalentes como no covalentes, de la pérdida de los patrones de repetición como las hélices  $\alpha$  y del cambio en general de la posición espacial de todos sus dominios (Nelson y Cox, 2005).

Como ya se dijo, en la tirosinasa es muy importante la presencia de la cavidad en donde se aloja el sitio activo, además de su accesibilidad por parte del sustrato, ya que dependiendo del acomodo de algunas de las histidinas de los sitios de unión a cobre, es que la proteína puede llevar a cabo o no su actividad enzimática (Matoba et al., 2006).

Se han hecho estudios acerca de tirosinasa aisladas de microorganismos termófilos y se encontró que tienen ventajas sobre las enzimas mesófilas gracias a su resistencia térmica y tolerancia a los agentes desnaturalizantes comunes (Bell y Wheeler, 1986).

Por los motivos descritos, proponemos que la tirosinasa de *R. etli* disminuye su actividad enzimática a temperaturas mayores a los 37 °C debido a que sufre una desnaturalización parcial que impide que la tirosina llegue al sitio activo o que éste pueda transformarla en L-DOPA dado que ya no cuenta con el arreglo necesario para la transferencia de grupos.

Con lo anterior se deduce que las mutantes generadas no son termoestables, al igual que no lo es la tirosinasa silvestre, sin embargo dado que existen organismos que cuentan con esta enzima resistente a temperatura, creemos que no sería imposible generar una mutante a partir del gen de *R. etli* que codificara para una proteína de características similares, únicamente habría que repetir la PCR mutagénica e incluso hacer otra PCR teniendo como templados a los productos de la primera. Se comprueba además el

principio que enuncia que la estructura tridimensional específica de una proteína resulta crítica para su función.

Cuando se crecieron varias mutantes junto con la silvestre para comparar su producción de melanina en medio sólido, observamos que sí existían diferencias notorias en cuanto a la cantidad (intensidad de la tinción) y velocidad en que lo hacían, ya que pasaban varios días para que la tirosinasa silvestre llegara a la coloración negra, mientras que la mutante XmelA1MUT desde el segundo día ya se oscurecía totalmente y las otras mutantes en el transcurso de los dos días posteriores.

Desde aquí estos resultados ya nos hacían pensar que la cepa XmelA1MUT era la que contenía a la tirosinasa con las mejores cualidades estructurales para permitirle sintetizar melanina de manera más eficiente que las demás y de forma significativa con respecto a la proteína silvestre.

Al hacer el análisis de las secuencias de las mutantes alineándolas contra la de la silvestre, nos dimos cuenta que todas tenían al menos una mutación, incluso aquellas colonias que no fueron seleccionadas en la búsqueda sino que se tomaron al azar, esto es un resultado excelente debido a que nos dice que la proporción de secuencias del gen *melA* silvestre al final de la PCR fue muy baja y que la mayoría de las secuencias generadas mutaron al menos en algún sitio. Los beneficios que lo asentado representa para la búsqueda son muchos.

Entre ellos están que se redujo el riesgo de seleccionar colonias silvestres que complicarían los análisis hasta que no se estableciera su secuencia; además se contó con un número mucho mayor de posibilidades de dónde explorar para características mejoradas en la enzima, es decir, se maximizaron las probabilidades de error en la secuencia y con ello aumentamos la cantidad de fenotipos generados.

Encontramos que el número de cambios de base en las mutantes seleccionadas varió respecto a la tasa de mutación en las secuencias tomadas aleatoriamente. La cepa XmelA1MUT que presentó los mejores parámetros cinéticos, tuvo la tasa más alta de todas.

Lo anterior no significa que a mayor número de cambios, mayor será la mejoría de la actividad enzimática con respecto a la proteína silvestre, ya que las otras mutantes a pesar de tener menos mutaciones, tuvieron un fenotipo distinto del de la cepa silvestre. De hecho, es casi seguro que aquellas secuencias que tuvieron muchas más mutaciones, ni

siquiera llegaron a conformar una proteína viable. Lo que sí nos puede decir, es que mientras más cambios se generen en el gen, es más factible que alguno de ellos se de en una zona de importancia para la actividad enzimática.

Cuando pasamos de la secuencia de bases a una de aminoácidos, nos percatamos que en el caso de XmeIA1MUT, a pesar de haber tenido cuatro cambios en la primera, únicamente tuvo uno en la segunda, es decir, todo el fenotipo resultante se debió exclusivamente a que uno de los 580 aminoácidos de la proteína silvestre fue reemplazado por otro.

Lo anterior de ningún modo es una desventaja, ya que como lo señalan Vartanian y colaboradores (1996), para facilitar el análisis de las relaciones estructura-función de las proteínas, la frecuencia de mutación deseada es de un cambio de aminoácido (1 o 2 cambios de nucleótidos) por gen.

Lo que podemos ver aquí es que independientemente del número de mutaciones que sufra la secuencia nucleotídica, lo que es de verdad importante es si esos cambios codifican para un cambio de aminoácido. Como se sabe, el código genético es degenerado (Nelson y Cox, 2005), lo que significa que un mismo aminoácido puede estar determinado por más de un codón; es así, que a pesar de existir únicamente 20 aminoácidos hay 64 codones distintos. Debido a ello, podemos tener un cambio de base, pero si resulta que se forma un triplete que genera el mismo aminoácido que el original, la proteína no cambiará en lo más mínimo.

A través del análisis de los alineamientos, se encontró que en nuestra mutante, el cambio que se produjo, tal como se muestra en la sección de resultados, fue en el aminoácido 371 donde había una alanina en la cepa silvestre y en XmeIA1MUT hay una treonina. Esto se derivó del cambio en la secuencia de nucleótidos del gen, ya que mientras para el silvestre existe el triplete GCC, en el mutante éste cambia por ACC. Es decir, la transición se dio únicamente por el hecho de la introducción de una adenina en la PCR mutagénica.

La *Taq* DNA polimerasa favorece las transiciones sobre las transversiones con un radio mayor a 0.5 (Daugherty et al., 2000), es decir, promueve mayormente cambios de una base púrica por otra o de una pirimidina por otra. Adicionalmente, la relación AT →

GC/GC →AT de esta enzima es de 1.9, tendiendo a reemplazar As o Ts con Gs o Cs (You et al., 1996).

En nuestro ensayo, la PCR mutagénica produjo en el codón correspondiente al aminoácido 371 una transición, lo cual concuerda con lo datos de la literatura, sin embargo el cambio de purinas no fue en el sentido en el que es más favorecido por la enzima, ya que se pasó de una guanina a una adenina y no al contrario.

La explicación de esto es que los datos reportados en ambos casos son para condiciones de una PCR típica, por lo que las alteraciones que nosotros hicimos sobre todo en cuanto al desbalanceo de nucleótidos, influyeron de manera directa en el comportamiento de la polimerasa.

Por otro lado, un resultado muy llamativo fue el hecho de que ninguna de las otras seis mutantes hubiera presentado cambios de aminoácido y sin embargo, su capacidad de síntesis de melanina sí mejoró al compararla con la de la cepa silvestre, tanto en cultivos sólidos como líquidos.

Las únicas diferencias observables en estas mutantes fueron los cambios en las secuencias de pares de bases del gen *melA* que contienen. Esto nos habla de que la mejoría en la actividad de tirosinasa no fue controlada directamente por la proteína, sino que tal vez exista una regulación pretranscripcional o postranscripcional, en la que los RNAs que se generan adquieren alguna conformación específica, algún plegado que les confiere una mejor estabilidad o les permite llevar a cabo de manera más eficiente todas sus funciones.

Un estudio más detallado sobre la estructura de estos transcritos permitirá entender este fenómeno. Podría hacerse con programas que determinaran el plegamiento de los RNA, debido a que ya sabemos el sitio exacto en que cayeron las mutaciones (figura 12), se pueden manipular y comparar, llegando incluso a decir si es que ciertas zonas del RNA son más susceptibles de sufrir estas modificaciones o si hay zonas que con el cambio modifiquen más la estabilidad del transcrito con la consiguiente mejoría en su capacidad de síntesis de melanina.

Con los datos que aquí se obtuvieron, es evidente que hubo tres zonas con alta incidencia de mutaciones en la mayoría de las clonas: la primera se localiza entre las regiones CuA y CuB, la segunda inmediatamente río abajo del sitio CuB (aquí fue donde sucedió la mutación en la secuencia *melAIMUT* que originó el único cambio de

aminoácido) y la última la ubicamos hacia el extremo 5' del gen; sin embargo dos mutaciones ocurrieron fuera de estos sitios, las dos río arriba de la región CuA, una exactamente una base antes del inicio de esta zona de unión a cobre. Teniendo en cuenta esto, los esfuerzos del análisis *in silico* podrían focalizarse en cualquiera de estas zonas para modificar ahí el plegamiento del RNA y evaluar su estabilidad.

Acerca de la injerencia que el cambio de aminoácido de la mutante XmelA1MUT tiene sobre la mejoría en la síntesis de melanina por parte de la tirosinasa, planteamos que se debe a las propiedades del nuevo aminoácido. En el caso de la alanina, se encuentra dentro del grupo de los aminoácidos apolares alifáticos, lo que significa que es hidrofóbica, sus cadenas laterales junto con las de la valina, la leucina y la isoleucina tienden a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras proteicas a través de interacciones hidrofóbicas.

Por otro lado, la treonina pertenece al grupo de los polares sin carga, que son más hidrofílicos que los aminoácidos del grupo de la alanina, aunque no tanto como otros grupos; forma puentes de hidrógeno gracias a su grupo hidroxilo, igual que lo hace la serina.

Esto nos habla de un rearrreglo estructural en la tirosinasa codificada por el gen XmelA1MUT, lo cual podría permitirle adquirir una conformación más estable para llevar a cabo su actividad enzimática. El plegamiento que tiene cada proteína influye de manera decisiva en la eficiencia en que lleva a cabo sus funciones, incluso cuando es únicamente un cambio el que se observa en la secuencia, las interacciones no covalentes que se generan o eliminan respecto de la silvestre son muy importantes, ya que la enzima podría perder, disminuir o mejorar su actividad.

El nuevo aminoácido no sólo estaría afectando la estructura primaria de la proteína, sino que también la secundaria y la terciaria, con lo que la arquitectura en general sufriría alteraciones; probablemente éstas no sean muy drásticas, ya que de otro modo la molécula no sería viable, pero sí son de importancia capital para permitir que se amolde mejor a sus sustratos y lograr que la función catalítica se lleve a cabo en mejores condiciones.

La treonina es uno de los cuatro aminoácidos promotores de la formación de giros en las cadenas polipeptídicas durante el plegamiento, siendo su localización dentro de la proteína la que determina la dirección y el ángulo de los mismos. Esto nos hace pensar que

la transición realmente tuvo consecuencias estructurales de importancia para nuestro propósito.

La mutación se produjo apenas a unos sitios de distancia del sitio activo, 22 aminoácidos la separan de la región B de unión a cobre, lo que contrasta un poco con los datos que afirman que para que tengan una influencia en la actividad, las mutaciones deben estar alejadas del sitio catalítico.

Las histidinas que se encuentran en el sitio activo son esenciales para permitir un acomodo tal de la proteína que su sustrato penetre sin problemas a la cavidad en la que se aloja y poder realizar ahí la transferencia de grupos, mediada también en parte por las histidinas (Matoba et al., 2006). Esto nos hace pensar que el cambio sufrido por nuestra enzima mutante provocó que el acceso de la tirosina al sitio activo fuera mucho mejor que en la silvestre. Incluso podría ser que el giro intrínseco que la treonina genera sea en parte el causante de esta mejoría.

El ácido para-cumárico es un compuesto fenólico altamente tóxico para las bacterias debido a su gran potencial antioxidante (Pereira et al., 2007); sin embargo, cuando se realizó un análisis del banco de mutantes generado en este trabajo, bajo las condiciones necesarias para la síntesis de melanina, pero teniendo como sustrato al ácido cumárico y no a la tirosina, las bacterias no sólo lograron crecer, sino que hubo varias clonas que produjeron melanina de manera evidente tanto en medio sólido como líquido (Echeverría, A., Vargas, D. y Gosset, G.; comunicación personal), lo que nos indica que diferentes cambios producirán diferencias en la actividad enzimática y esto traerá como consecuencia el surgimiento de adaptaciones a las condiciones en que crezcan los organismos, incluso si éstas son de estrés elevado.

Las tirosinasas de varios organismos son capaces de utilizar mono-, di- y trihidroxifenoles como sustratos aunque presentan diferente actividad por cada uno de ellos; adicionalmente se ha reportado que varias de ellas tienen una acción estereoselectiva sobre estos sustratos quirales (Zinder y Harris, 1991 y Zhang et al., 1999). Este punto en específico refuerza nuestra hipótesis acerca de la accesibilidad del sustrato al sitio activo, ya que el arreglo que pudiera estar confiriendo el nuevo aminoácido hace que se reduzca el impedimento estérico (por más pequeño que parezca) que representa para la tirosinasa silvestre la unión de los sustratos, incluida la tirosina misma.

Anfinsen demostró en 1950 con un experimento de desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa que la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de cualquier proteína contiene toda la información necesaria para el plegamiento en su estructura tridimensional nativa (Anfinsen, 1973); en términos de la presente investigación esto viene a corroborar el hecho de que la mutación de un aminoácido en la tirosinasa provocó una alteración en su acomodo espacial.

A pesar de su cercanía con el sitio CuB, la mutación no cayó dentro de la zona del sitio catalítico; si hubiera sido así, probablemente la proteína habría perdido su actividad de tirosinasa, esta conservación se pone en evidencia cuando se alinean las secuencias de tirosinasas de varios organismos; es decir, filogenéticamente estas enzimas son muy parecidas, más aún cuando se comparan sólo los sitios de unión a cobre (Sirena, 2004).

Toda esta información nos reafirma el hecho de que hay sitios en las proteínas que son invariables, se mantienen intactas a lo largo de la evolución para conservar su actividad original, de no ser así lo que se promueve es una pérdida o cambio de función que si resultara benéfica para el organismo se podría fijar en la descendencia.

Por otro lado, hay secuencias proteicas que son más flexibles en cuanto a los cambios generados por mutaciones, lo que sucede es que la misma función proteica permanece en los individuos, lo que se modifica son los niveles de su actividad y dependiendo de cuáles sean las condiciones ambientales en las que el individuo se desarrolla, la selección natural actuará sobre aquellos cambios que representen ventajas adaptativas a la especie.

No sabemos si el cambio observado en nuestra mutante hubiera sido de utilidad para *R. etli* en la naturaleza, ya que si bien es cierto que se ha demostrado el papel de la tirosinasa para producir melanina y contender contra especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos (Piñero et al., 2006) en su simbiosis con el frijol, no podemos asegurar que la nueva enzima representaría ventajas adaptativas a la bacteria o si el hecho de contar con más melanina no traería consecuencias negativas para éstas o para la planta. Tampoco sabemos que pasaría si en los nódulos o en el suelo hubiera ácido p-cumárico, si es que aparecerían mutaciones para contender con este estrés y si esto ayudaría a sobrevivir a la bacteria. Investigaciones más específicas se necesitan para poder emitir un juicio acerca de estos puntos.

Lo que sí es cierto es que esta mutación pudo haberse generado por azar en condiciones naturales dentro de la bacteria debido a la maquinaria de replicación, la cual introduce errores de manera esporádica (fundamento de nuestra técnica de PCR mutagénica) y que constituyen la materia prima de la evolución.

En cuanto a los resultados obtenidos en las cinéticas en diferentes medios de cultivo, pudimos darnos cuenta que en los tres utilizados, la cepa mutante XmelA1MUT creció a una velocidad menor que la cepa con la tirosinasa nativa de *R. etli*; estos son datos muy interesantes debido a que nos dicen que la bacteria está cediendo parte de su maquinaria biosintética a la producción de tirosinasa; probablemente la inversión energética que se requiere para ello es lo suficientemente elevada como para disminuir la rapidez con que la biomasa celular se forma. Esto no quiere decir que las cepas no crezcan, sino que al estar trabajando en la síntesis y plegamiento de la enzima, su focalización en la duplicación no es la misma que cuando está la proteína silvestre, ya que como se discutió anteriormente, el arreglo espacial en la mutante es un poco más complejo.

Cuando XmelA1MUT creció en medio LB, presentó un comportamiento típico de crecimiento bacteriano, en el cual se observa una fase exponencial y una estacionaria. Para el caso de LB con glucosa, los cultivos incrementaron su biomasa de manera diáuxica, lo cual se explica debido a la presencia de una segunda fuente de carbono, por lo que al disminuir los nutrientes presentes en el LB entra a una pequeña fase estacionaria, pero después de recuperarse de esta privación sigue utilizando la glucosa que todavía está en el medio debido a que se puso una cantidad extra, en ese momento se observa un segundo aumento celular para finalmente volver a estabilizar el número de bacterias presentes.

En ninguno de los casos anteriores hubo una etapa de acondicionamiento (lag) ya que el medio en el que crecieron las bacterias fue uno rico, que contiene fuentes de carbono, nitrógeno, aminoácidos y demás nutrientes necesarios. Por el contrario, cuando la cepa se analizó en medio mineral, tuvo una fase de adaptación bastante larga, de alrededor de ocho horas, mayor que la de la cepa melA (4 horas). Esto puede explicarse en ambas debido a que es un medio mínimo que no cuenta con todo lo indispensable para el óptimo crecimiento celular; las bacterias debieron acostumbrarse a estas condiciones estresantes antes de entrar a la parte de crecimiento exponencial. Sin embargo, la diferencia entre las

cepas no está del todo clara aunque podría especularse que se debe a la misma razón por la cual la mutante tiene un valor de  $\mu$  menor a la otra.

Se sabe que la transcripción de los genes que están bajo el control de *trc* en el vector pTrc99A ocurre durante la fase de crecimiento (Amann et al., 1988); asimismo, se ha determinado que la formación de la enzima se presenta en esta etapa, mientras que la producción de melanina se inicia hasta entrar en la fase estacionaria, especulándose que es debido a que en presencia de tirosina, las permeasas de tirosina de *E. coli* se inactivan y es sólo en estacionaria cuando aparecen mecanismos para combatir el estrés, incluyendo pequeños rearrreglos en la membrana, por lo que el aminoácido puede entrar en contacto con el sitio activo de la enzima; esto mismo hace que el transporte aumente y cuando la tirosinasa actúa sobre la tirosina, sus intermediarios pueden ser exportados para polimerizar en el medio como melanina (Lagunas-Muñoz et al., 2006).

Precisamente esto se confirmó en todas las cinéticas que se hicieron, nunca pudimos ver melanina claramente antes de que las cepas llegaran a fase estacionaria; en el caso de LB con glucosa, ésta apareció en la diauxia y no hasta alcanzar la estacionaria más alta.

Se ha visto que la producción de melanina es reprimida por una gran variedad de fuentes de carbono, dependiendo del organismo de que se trate (Nurudeen et al., 1979); en el caso específico de *Streptomyces lividans*, la síntesis se incrementa si la glucosa es eliminada del medio en el que crece, por lo que della-Cioppa y colaboradores (1988, US Patent) proponen que la glucosa es un inhibidor metabólico de la tirosinasa.

En este trabajo no ocurrió tal, ya que en el caso de medio Luria sin glucosa produjeron melanina de forma significativa únicamente 3 cepas mutantes después de 50 horas, mientras que en LB con glucosa y en medio M9 (que también está adicionado con glucosa) el número se incrementó a 5 mutantes además de la cepa con la tirosinasa silvestre, *melA*.

Proponemos que esto se debe en primer lugar a que los trabajos realizados en este sentido utilizaron organismos que de manera natural producen melanina por tener en su genoma al gen que codifica para la tirosinasa, por lo que la respuesta a la glucosa será distinta a la de nuestros organismos con DNA exógeno; además, en *E. coli* el gen *melA* es transcrito a partir del promotor sintético pTrc, lo que le confiere ventajas.

También sugerimos que en *E. coli* a diferencia de otras bacterias y hongos, la glucosa no es un represor del gen, sino que por el contrario, actúa reduciendo la actividad proteolítica permitiendo que la enzima no sea degradada y por tanto sintetice melanina.

Cabe señalar que la tirosinasa nativa de *R. etli* solamente produjo pigmento cuando hubo glucosa en el medio, es decir, cuando estuvo protegida de la actividad proteolítica, a diferencia de la mutante XmelA1MUT que tuvo un valor muy alto en la velocidad de síntesis del producto en la condición sin glucosa. Esto nos hace pensar que el cambio de aminoácido sufrido por esta proteína, incluso pudo en parte haberle ayudado en su capacidad de contención contra el ataque de las proteasas y no directamente en su actividad enzimática, sin embargo los alcances de este estudio no permiten definir esta cuestión.

Los valores de la velocidad de formación de melanina ( $\beta$ ) son distintos debido a la diferente estabilidad de la tirosinasa en cada una de las condiciones en que crecieron las bacterias, por lo que los rangos de datos en los tres medios difieren considerablemente.

El que en medio mínimo no se alcance el rendimiento máximo teórico después de 50 horas puede deberse a la fase lag por la que pasaron las bacterias, ya que haciendo cálculos a partir de las  $\beta$  de cada una de las 5 mejores cepas se prevé que alcanzarán los 0.4 g de melanina por litro entre las 20 y 40 horas siguientes.

Algo que sí resulta muy evidente en los datos de este parámetro medido es el hecho de que al comparar el valor de WmelA con el de XmelA1MUT, el de la segunda es mayor en los tres medios de cultivo, siendo especialmente importante esa diferencia en LB sin glucosa en el cual aumenta 50 veces. Esto nos indica que la eficiencia con la que trabaja la proteína mutante es mucho mayor que la de la silvestre, por lo tanto consideramos que los datos obtenidos permiten establecer a esta como una tirosinasa mejorada en la síntesis de melanina a partir de tirosina como sustrato.

El hecho de contar con una enzima de estas características representa ventajas muy importantes en el ámbito industrial, ya que al ser un producto biotecnológico le confiere al proceso menores costos, además de que se agilizaría la obtención de melanina incluso a velocidades mayores que las aquí reportadas, pero para llegar a esa conclusión tendría que escalarse el proceso y calcular los parámetros cinéticos necesarios.

Un proceso más eficiente podría generarse a partir de la tirosinasa creada en esta investigación, con beneficios que van desde la reducción en el costo de los productos para el consumidor final, hasta la implementación de tecnologías limpias en la industria.

A pesar de que se han publicado varios artículos que usan cepas con tirosinasas de varios organismos, esta es la primera vez que se caracteriza a una tirosinasa mutante.

Adicionalmente, este trabajo deja la puerta abierta a una gran cantidad de preguntas desde el punto de vista de la ciencia básica, lo que nos habla del potencial de este proyecto.

## VIII. CONCLUSIONES

*No hay nada más peligroso que una visión dogmática del mundo,  
nada más forzado, más cerrado a la innovación,  
más destructivo de la apertura a la novedad*  
Stephen Jay Gould

1. Con el uso de un método modificado de PCR se logró generar una biblioteca de mutantes del gen *melA* de *Rhizobium etli* clonado en el vector pTrc99A. El análisis de las secuencias reveló una tasa de mutación promedio de 2 bases por cada 1000. Esto significa que la mayoría de las secuencias generadas tuvieron al menos un cambio de nucleótido.
2. Se transformó la biblioteca de mutantes del gen *melA* a una cepa de *Escherichia coli* con una eficiencia alta de  $1 \times 10^9$  colonias por  $\mu\text{g}$  de DNA y un 60% de incorporación del plásmido.
3. Se aislaron 7 mutantes con capacidad mejorada de producción de melanina a 30 °C.
4. Ninguna de las mutantes logró producir melanina a 37 ni a 42 °C, por lo que las mutaciones no les confirieron termoestabilidad.
5. La tasa de mutación del gen de la cepa X*melA*1MUT fue de 1 error por cada 450 pares de bases, lo cual fue mayor que la del promedio del banco; esto significa un solo cambio en la secuencia de aminoácidos, de la alanina 371 en la silvestre a treonina en la mutante. Este sitio se encuentra abajo de la región CuB por lo que la mutación no afectó el sitio activo de la enzima.
6. La tirosinasa silvestre no fue capaz de sintetizar melanina cuando no había glucosa pero sí lo hizo cuando esta fuente de carbono estuvo disponible. Por otro lado, la tirosinasa mutante *melA*1MUT produjo el polímero en ambas condiciones

7. La velocidad de producción de melanina en medio LB fue 50 veces mayor en la cepa XmelA1MUT que en la silvestre y 2 veces mayor en medio LB y en medio mínimo suplementados con glucosa; por otro lado, su velocidad de crecimiento disminuyó en todos los medios, por lo que la formación de tirosinasa afecta el metabolismo celular, reduciendo la capacidad biosintética de la bacteria.
  
8. La tirosinasa melA1MUT posee características estructurales y cinéticas que le confieren una mejoría en la velocidad de producción de melanina con tirosina como sustrato.

## IX. PERSPECTIVAS

*Todo puede cambiar en cualquier momento, de repente y para siempre.*  
Paul Auster

- Realizar nuevas búsquedas en la biblioteca de mutantes utilizando sustratos distintos a la tirosina.
- Hacer un análisis bioinformático sobre la estabilidad estructural y plegamiento de los RNAs de las cepas mutantes que no modificaron su secuencia de aminoácidos para saber si se encuentra allí la respuesta a su actividad mejorada.
- Contrastar los resultados de ensayos de Northern blot y de Western blot en la enzima mutante y en la silvestre.
- Hacer modelaje *in silico* del plegamiento tridimensional de la nueva proteína y compararlo con la tirosinasa silvestre.
- Insertar el gen melA1MUT a *R. etli* para evaluar su actividad y posibles beneficios cuando la bacteria se encuentra en simbiosis con el frijol.
- Llevar a cabo cinéticas en medios de cultivo con fuentes alternativas de carbono (sacarosa, fructosa, manitol, glicerol, etc) para definir si son inhibitorias de la actividad de tirosinasa o limitan la acción de las proteasas.
- Generar ensayos de actividad enzimática para establecer numéricamente si hubo una mejoría en la  $K_m$  o en la  $V_{max}$  de la tirosinasa mutante con respecto a la nativa.

## X. REFERENCIAS

1. Amann, E., B. Ochs y K. Abel. 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* (69), 301 – 315.
2. Anfinsen C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* (181), 223 - 230.
3. Atlas, R. 2004. *Handbook of microbiological media*. CRC, Boca Raton. 12051 pp.
4. Bell, A. y M. Wheeler. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* (24), 411 – 451.
5. Bentley, K. 1960. *The natural pigments*. Interscience, Nueva York. 360 pp.
6. Berendschot, T., J. Willemse-Assink, M. Bastiaanse, P. de Jong y D. van Norren. 2002. Macular pigment and melanin in age-related maculopathy in a general population. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (43), 1928 - 1932.
7. Braasch, I., M. Scharl y J. N. Volff. 2007. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology* (74), 1 – 18.
8. Bridelli, M. 1998. Self-assembly of melanin studied by laser light scattering. *Biophysical Chemistry* (73), 227 - 239.
9. Britton, G. 1983. *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge University Press, Cambridge. 366 pp.
10. Cabrera-Valladares N., A. Martínez, S. Piñero, V. H. Lagunas-Muñoz, R. Tinoco, R. de Anda, R. Vázquez-Duhalt, F. Bolívar y G. Gosset. 2006. Expression of the *melaA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology* (38), 772 – 779.
11. Cadwell R. C. y G. F. Joyce. 1994. Mutagenic PCR. *PCR Methods and Applications* (6), S136 – S140.
12. Casadevall A y L. Pirofski. 2006. The weapon potential of human pathogenic fungi. *Medical Mycology* (44), 689 - 696.
13. Cha R. y W. Thilly. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods and Applications* (3), 18-29.
14. Chen, L., M. Leu, K. Wang y Y. Wu Lee. 1992. Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between

- apotyrosinase and its trans-activator MelC 1. *The Journal of Biological Chemistry* (267), 20100 – 20107.
15. Chen LY., M. Chen, W. Leu, T. Tsai, Y. Lee. 1993. Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *Journal of Biological Chemistry* (268), 18710 - 18716.
  16. Cooksey, C. P. Garratt, E. Land, S. Pavel, C. Ramsden, P. Riley y N. Smit. 1997. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry* (42), 26226–26235.
  17. Coyne V. Y L. al-Harthi. 1992. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* (58), 2861 – 2865.
  18. Cubo, T., A. Buendia-Claveria, J. Beringer y J. Ruiz-Sainz. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* (7), 1812-1817.
  19. Dadachova E., R. Bryan, X. Huang, T. Moadel, A. Schweitzer, P. Aisen, J. Nosanchuk y A. Casadevall. 2007. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* (5), e457.
  20. Daugherty, P., G. Chen, B. Iverson y G. Georgiou. 2000. Quantitative analysis of the frequency on the affinity maturation single chain Fv antibodies. *Proceedures of National Academy of Sciences* (97), 2029 – 2034.
  21. Decker H. y N. Terwilliger. 2000. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology* (203), 1777–1782.
  22. del Marmol, V. y F. Beermann. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *Federation of European Biochemical Societies Letters* (381), 165-168.
  23. della-Cioppa, G., S. Garger, G. Sverlow, T. H. Turpen y L. Grill. 1990. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology* (8), 634 – 638.
  24. della-Cioppa, G., S. Garger, G. Sverlow, T. H. Turpen, L. Grill y M. Chedekal. 1998. Melanin production from transformed *E. coli*. Biosource Technologies Inc. E.U.A. Patente número 5,837,505.
  25. Fling, M., N. Horowitz y S. Heinemann. 1963. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. *The Journal of Biological Chemistry* (238), 2045 – 2053.
  26. Fomina, M. y G. Gad. 2003. Metal sorption by biomass of melanin-producing fungi grown in clay-containing medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (78), 23 – 34.

27. Frackman, S., G. Kobs, D. Simpson y D. Storts. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega Notes* (65), 27–30.
28. Fromant M., S. Blanquet, P. Plateau. 1995. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* (224), 347 - 353.
29. Fuqua W., V. Coyne, D. Stein, C. Lin y R. Weiner. 1991. Characterization of melA: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. *Gene* (109), 131 - 136.
30. García-Borrón, J. y F. Solano. 2002. Molecular Anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Resum* (15), 162 – 173.
31. González, V., P. Bustos, M. Ramírez-Romero, A. Medrano-Soto, H. Salgado, I. Hernández-González, J. Hernández-Celis, V. Quintero, G. Moreno-Hagelsieb, L. Girard, O. Rodríguez, M. Flores, M. A. Cevallos, J. Collado-Vides, D. Romero and G. Dávila. 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology* (4), R36.
32. Greggio, E., E. Bergantino, D. Carter, R. Ahmad, G. Costin, V. Hearing, J. Clarimon, A. Singleton, J. Eerola, O. Hellström, P. Tienari, D. Miller, A. Beilina, L. Bubacco y M. Cookson. 2005. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* (93), 246 – 256.
33. Halaban R. 2002. Pigmentation in melanomas: changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. *Oncology Research* (13), 3 - 8.
34. Hill, H. Z. 1992. The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioesays* (14), 49 ' 56.
35. Jablonski, N. y G. Chaplin. 2000. The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution* (39), 57 – 106.
36. Jensen, K. F. 1993. The Escherichia coli K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology* (175), 3401 – 3407.
37. Kawamura-Konishi, Y., M. Tsuji, S. Hatana, M. Asanuma, D. Kakuta, T. Kawano, E. Mukouyama, H. Goto y H. Suzuki. 2007. Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (71), 1752 – 1760.
38. Kaxiras, E., A. Tsolakidis, G. Zonios, y S. Meng. 2006. Structural model of eumelanin. *Physical Review Letters* (97), 218102.

39. Kobayashi T., W. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa y V. Hearing. 1995. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *Journal of Cell Science* (108), 2301-2309.
40. Lagunas-Muñoz, V. H., N. Cabrera-Valladares, F. Bolívar, G. Gosset y A. Martínez. 2006. Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* (101), 1002 – 1008.
41. Lerch K. y U. Germann. 1988. Evolutionary relationships among copper proteins containing coupled binuclear copper sites. *Progress in Clinical and Biological Research* (274), 331 - 348.
42. Leung, D. W., E. Chen y D. Goeddel. 1988. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *PCR Methods and Applications* (28), 266 – 275.
43. López-Serrano D., F. Solano, A. Sanchez-Amat. 2004. Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene* (342), 179 - 187.
44. Matoba, Y., T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, and M. Sugiyama. 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* (281), 8981 – 8990,
45. Menter J., I. Willis. 1997. Electron transfer and photoprotective properties of melanins in solution. *Pigment Cell Research* (10), 214 - 217.
46. Mercado-Blanco, J., F. Garcia, M. Fernandez-Lopez y J. Olivares. 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene mepA. *Journal of Bacteriology* (17), 5403 - 5410.
47. Nelson, D. L. y M. Cox. 2005. *Lehninger, principles of biochemistry*. Worth, Nueva York. 1119 pp.
48. Nurudeen T. A. y D. Ahearn. 1979. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinic Microbioly* (10), 724 - 729.
49. Paget, M. S., G. Hintermann y C. Smith. 1994. Construction and application of streptomycete promoter probe vectors which employ the *Streptomyces glaucescens* tyrosinase-encoding gene as reporter. *Gene* (146), 105 – 110.
50. Palumbo, A., G. Misuraca, T. D'ischiat y G. Protat. 1985. Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochemical Journal* (228), 647–651.
51. Pereira J., I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P. Andrade, I. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra y L. Estevinho. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic

- compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology* (45), 2287 - 2295.
52. Piñero S., J. Rivera, D. Romero, M. A. Cevallos, A. Martínez, F. Bolívar y G. Gosset. 2007. Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (13), 35 – 44.
  53. Plonka, P. y M. Grabacka. 2006. Melanin synthesis in microorganisms, biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica* (3), 429 – 443.
  54. Redman R., K. Sheehan, R. Stout, R. Rodriguez y J. Henson. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* (298), 1581 - 1585.
  55. Riley, P. A. 1997. Melanin. *Introductory Journal of Biochemistry and Cell Biology* (11), 1235-1239.
  56. Sambrook, J. y D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. 2100 pp.
  57. Sánchez-Ferrer, A., J. Rodríguez-López, F. García-Cánovas y F. García-Carmona. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanisms. *Biochemistry and Biophysics Acta* (1247), 1 – 11.
  58. Selinheimo E., D. NiEidhin, C. Steffensen, J. Nielsen, A. Lomascolo, S. Halaouli, E. Record, D. O’Beirne, J. Buchert, K. Kruus. 2007. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology* (130), 471 – 480.
  59. Shivprasad, S. y W. J. Page. 1989. Catechol formation and melanization by Na<sup>+</sup>-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation. *Applied and Environmental Microbiology* (7), 1811-1817.
  60. Sirena, N. 2004. Caracterización de la proteína codificada por el gen *melaA* de *Rhizobium etli*. Facultad de Ciencias, UNAM. Tesis de Licenciatura.
  61. Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ. 2005. Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology* (124), 13 - 21.
  62. Sugumaran, M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Resume* (15), 2-9.
  63. Thathachari, Y. y M. Blois. 1969. Physical studies on melanins. *Biophysical Journal* (9), 77–89.
  64. Turick, T., L. Tisa y F. Caccavo. 2002. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe (III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied and Environmental Microbiology* (68), 2436–2444.

65. Valderrama B., P. Oliver, A. Medrano-Soto, R. Vazquez-Duhalt. 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie Van Leeuwenhoek* (84), 289 - 299.
66. Valero, E., I. Lozano, R. Varón y F. García-Carmona. 2003. Enzymatic síntesis of 3'-hydroxyacetaminophen catalyzed by tyrosinase. *Biotechnology Progress* (19), 1632 - 1638.
67. Vartanian, J., M. Henry y S. Wain-Hobson. 1996. Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Research* (14), 2627-2631.
68. Zinder, A. y H. Harris. 1991. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry* (198), 317 - 326.
69. Yamada, K., Y. Akiba, T. Shibuya, A. Kashiwada, K. Matsuda y M. Hirata. 2005. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. *Biotechnology Progress* (21), 823 - 829.
70. Yamaguchi, Y., M. Brenner y V. Hearing. 2007. The regulation of skin pigmentation. *Journal of Biological Chemistry* (10), 1 - 11.
71. Zecca L., D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. Fariello y D. Sulzer. 2001. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behavior. *Molecular Pathology* (54), 414 - 418.
72. Zhang X., J. van Leeuwen, H. Wichers, W. Flurkey. 1999. Characterization of tyrosinase from the cap flesh of portabella mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (47), 374 - 378.
73. Zhao, P., J. Li, Y. Wang, H. Jiang. 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (37), 952-959.
74. Zhdanova N., T. Tugay, J. Dighton, V. Zheltonozhsky y P. McDermott. 2004. Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycological Research* (108), 1089 - 1096.
75. Zucca, F., G. Giaveri, M. Gallorini, A. Albertini, M. Toscani, G. Pezzoli, R. Lucius, H. Wilms, D. Sulzer, S. Ito, K. Wakamatsu y L. Zecca. 2004. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Research* (17), 610 - 617.
76. Zuckerkandl, E. y L. Pauling. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* (8), 357 - 366.