



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de mutantes del gen *melA* de *Rhizobium*  
*etli* expresadas en *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALBERTO ECHEVERRÍA SERUR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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  
Echeverría  
Serur  
Alberto  
55 95 70 00  
Unviersidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
301501932
2. Datos del Tutor  
Dr  
Guillermo  
Gosset  
Lagarda
3. Datos del Sinodal 1  
Luis Felipe  
Jiménez  
García
4. Datos del Sinodal 2  
Lorenzo  
Segovia  
Forcella
5. Datos del Sinodal 3  
Dr  
José Adelfo  
Escalante  
Lozada
6. Datos del Sinodal 4  
M en C  
Alfonso  
Vilchis  
Peluyera
7. Datos del Trabajo Escrito  
Generación y caracterización de mutantes del gen *melA* de *Rhizobium etli* expresadas en *Escherichia coli*  
89 p  
2010

A la memoria de mi padre, quien siempre fomentó mi interés por las ciencias y por las humanidades y quien ha sido y será siempre será la mayor inspiración para mi.

A mi mamá, que me hizo darme cuenta de que mi pasión estaba en la biología y quien, con su cariño infinito me ha consentido, enseñado y guiado a lo largo de mi vida.

A Alejandra, quien con paciencia y alegría, me ha acompañado a lo largo del proceso de redacción de esta tesis.

A Carlos, mi hermano, amigo y compañero de alegrías y tristezas en todo momento de la vida.

A Andrés, mi hermano, por su apoyo y por las innumerables conversaciones y discusiones en México y en Berlín.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Guillermo Gosset por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo y por su valiosa asesoría en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Adelfo Escalante Lozada y M. en C. Alfonso Vilchis Peluyera por su apoyo y comentarios.

A Naty, Andrea, Víctor y Ramón, quienes siempre me ayudaron y me aguantaron en el laboratorio.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio Bolívar-Gosset quienes con su buen trabajo y dedicación me facilitaron muchísimo el desarrollo de mis experimentos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su amistad, su compañía y su ayuda.

A Araceli, Aldo, Alejandra, Andrea, Cesar, Eugenio, Juan Carlos, Karina, Karla, Marco, Rocío y Víctor por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A Marel, Gina, Viri, mis amigos del taller y a mis amigos de Cuernavaca por los buenos tiempos que pasamos.

A Gerardo, David, Daniela, Oscar, Tania, Anaïd y a todos mis amigos de la Facultad con los que compartí mi gusto por la biología y por muchas otras cosas.

A nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un reducto de libertad y pluralidad en el pensamiento.

El ojo no ve cosas, sino imágenes de cosas, que significan otras cosas.

*Las Ciudades Invisibles*, Italo Calvino.

# Índice

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
1.1 Tirosinasas.....	2
1.1.1 Estructura y activación.....	8
1.1.2 Origen y Evolución.....	14
1.2 Melanina.....	20
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	20
1.2.2 Síntesis de Melanina.....	22
1.2.3 Estructura.....	26
1.2.4 Funciones biológicas de la melanina.....	30
1.3 <i>Rhizobium</i> .....	54
II. Antecedentes.....	57
2.1 Expresión del gen <i>mela</i> y caracterización de la tirosinasa codificada por el mismo.....	57
2.2 El papel de la tirosinasa de <i>Rhizobium etli</i> en la eficiencia de nodulación y la resistencia al estrés asociado con la simbiosis.....	59
2.3 Evaluación de las condiciones óptimas de producción de melanina utilizando <i>Escherichia coli</i> recombinante.....	62
2.4 Generación y caracterización de mutantes del gen <i>mela</i> .....	64
III. Hipótesis.....	67
IV. Objetivos.....	68
4.1 Objetivos particulares.....	68
V. Metodología.....	69
5.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	69
5.2 Medios de cultivo.....	70
5.3 Desarrollo del inóculo.....	71
5.4 Condiciones de cultivo.....	71
5.5 Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de melanina.....	72
5.6 Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante.....	72
5.6.1 Purificación de DNA.....	72
5.6.2 Transformación bacteriana.....	73
5.7 Selección de mutantes capaces de polimerizar ácido cumárico y ácido hidroxibenzóico.....	73

5.8 Secuenciación de las versiones mutantes del gen <i>mela</i> .....	74
5.9 Evaluación de la actividad del marco abierto de lectura corto del gen <i>mela</i> .....	75
5.9.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	75
5.9.2 Construcción del plásmido pTOPO <i>mela</i> AVC.....	76
5.9.3 Construcción del plásmido pTrc <i>mela</i> AVC.....	77
5.10 Análisis bioinformáticos.....	77
VI. Resultados y Discusión .....	79
VII. Conclusión .....	94
VIII. Una hipótesis final.....	95
IX. Bibliografía .....	97

## Resumen

Las tirosinasas son metaloproteínas que pertenecen a la familia de proteínas de unión a cobre de tipo 3y se encuentran presentes en plantas, animales, hongos y microorganismos. Son enzimas capaces de catalizar dos reacciones diferentes: la hidroxilación de monofenoles y la oxidación de difenoles. Su sitio activo está compuesto por dos átomos de cobre cada uno de ellos es coordinado por tres residuos de histidina. Las tirosinasas pasan por un proceso de activación mediante la remoción de una proteína o dominio que cubre la entrada al sitio activo de la enzima. Su función más documentada es la síntesis de melanina aunque también se han descrito otras como la oxidación de péptidos y la formación de enlaces cruzados entre proteínas.

La melanina es un polímero heterogéneo de alto peso molecular conformado por compuestos fenólicos que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Existen diversos tipos de melanina que varían en las rutas por las que son sintetizadas y en sus propiedades fisicoquímicas. Las principales son la eumelanina, y la feomelanina. Se han descrito diversas funciones de la melanina pero no se ha llegado a un acuerdo de su función principal. Diversas especies del género *Rhizobium* son capaces de producir melanina.

En este trabajo se utilizó un banco de mutantes del gen *mela* de *Rhizobium etli* para seleccionar dos cepas: una capaz de polimerizar al ácido cumárico y la otra, al ácido parahidroxibenzoico. Las cepas con los genes mutantes también muestran una capacidad mejorada de producción de melanina utilizando al sustrato natural de la enzima: la tirosina. La mutación responsable del cambio en la actividad de la enzima se generó en el sitio de unión a cobre CuB y se comparte en ambas mutantes aisladas de forma independiente. Una de las mutantes además posee una mutación que da lugar a un codón de paro que resulta en la expresión de un marco abierto de lectura más corto del gen *mela*. Se subclonó este marco abierto de lectura a partir del gen *mela* y se expresó en el mismo vector en el que había sido clonado originalmente el gen *mela*. La enzima codificada por este marco abierto de lectura mantiene su actividad de tirosinasa y posee ciertas características que indican que se expresa de forma natural en *R. etli*: comparte un péptido señal con sus homólogos de mayor similitud y posee un sitio de unión al ribosoma en la posición correcta. Los resultados indican que la enzima MelA puede ser modificada exitosamente para mejorar sus propiedades en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la síntesis de melaninas y la bioremediación.

## **I. Introducción**

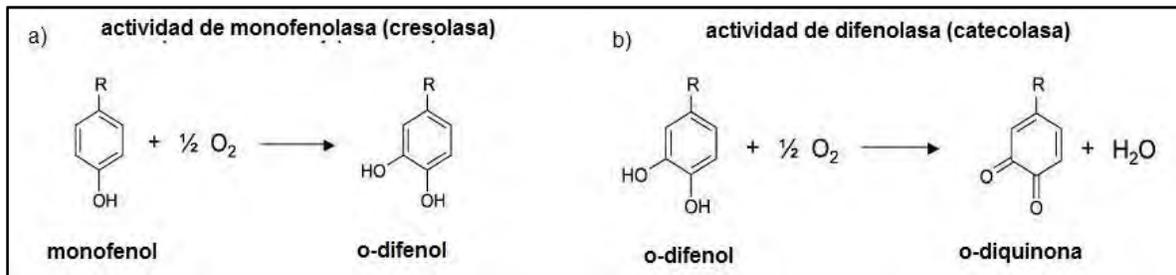
En este trabajo se estudiaron algunos aspectos del gen *melA* de *Rhizobium etli* y de la enzima tirosinasa codificada por ese gen, la cual le provee a esta bacteria de la capacidad de sintetizar melanina. A continuación se describen los principales aspectos de las tirosinasas, la melanina, y las bacterias del género *Rhizobium*.

### **1.1 Tirosinasas**

Las tirosinasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza que se encuentran presentes tanto en procariontes como en eucariontes. En estos últimos se encuentran presentes en los hongos, las plantas y los animales (Selinheimo *et al.*, 2007). Estas enzimas participan en la respuesta inmune de insectos y plantas (Claus & Decker, 2006). Su función más documentada es la síntesis de melanina, aunque también se han descrito otras como oxidar péptidos y formar enlaces cruzados entre proteínas y carbohidratos. Poseen cierta importancia económica dado que son responsables del oscurecimiento de frutas y hongos que genera pérdidas económicas de cierta relevancia (Selinheimo *et al.*, 2007). Han sido utilizadas también para la producción biotecnológica de melanina (Della-Cioppa, *et al.*, 1990; Cabrera-Valladares, *et al.*, 2006; Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006). Por otra parte, tienen el potencial de ser utilizadas para la detección y detoxificación de compuestos fenólicos en aguas y suelos (Durán & Esposito, 2000).

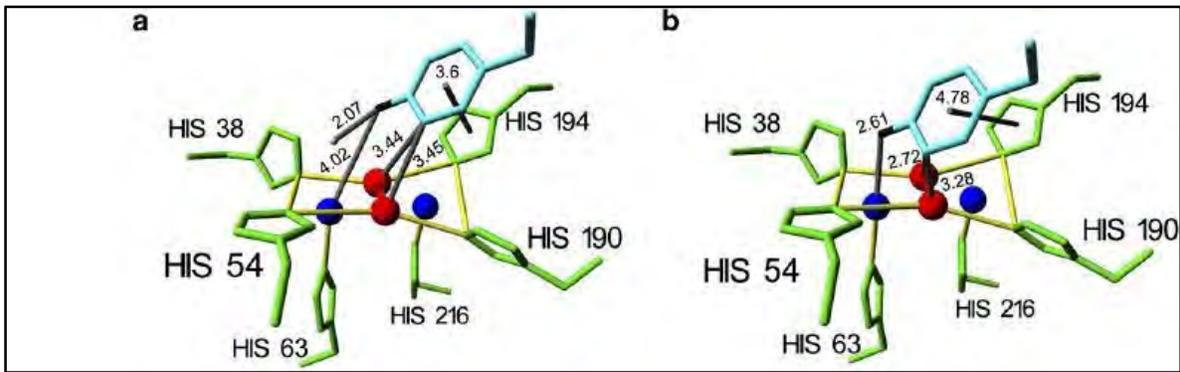
Las tirosinasas (EC 1.14.18.1) son enzimas que utilizan el oxígeno molecular para catalizar dos reacciones enzimáticas diferentes. La primera es la hidroxilación de monofenoles en difenoles, mediante su actividad de monofenolasa o cresolasa (Figura 1a). La segunda es la subsecuente oxidación de los difenoles en quinonas, a través de su actividad de difenolasa o

catecolasa (Figura 1b). Estas quinonas son reactivas y se polimerizan de forma no enzimática dando como resultado la formación de los dos principales tipos de melaninas: la eumelanina y la feomelanina (Figuras 11 y 12) (Claus & Decker, 2006).



**Figura 1.** Reacciones enzimáticas catalizadas por las tirosinasas. a) Mediante su actividad de monofenolasa o cresolasa catalizan la hidroxilación de monofenoles en difenoles. b) A través de su actividad de difenolasa o catecolasa catalizan la oxidación de difenoles en diquinonas (Modificado de Claus & Decker, 2006).

Las tirosinasas en conjunto con las catecol-oxidasas (EC 1.10.3.1), que son enzimas que poseen únicamente actividad de difenolasa o catecolasa (Figura 1b), son denominadas fenoloxidasas. Las fenoloxidasas son metaloproteínas que pertenecen a la familia de proteínas de unión a cobre de tipo 3. Esta familia incluye también a las hemocianinas, que son las principales proteínas encargadas del transporte de oxígeno en la hemolinfa de los moluscos y artrópodos. Todas las proteínas de esta familia poseen un sitio activo común pero difieren en sus funciones: Mientras que las fenoloxidasas son enzimas, las hemocianinas son proteínas acarreadoras de oxígeno (Decker *et al.*, 2007). El elemento que tienen en común estas proteínas es el centro de unión a cobre de tipo 3, en el cual un par de átomos de cobre se mantienen unidos a la proteína, cada uno de los cuales es coordinado a través de tres residuos de histidina conservados que están contenidos dentro de un “paquete” de cuatro alfa hélices (Figuras 2 y 4) (Claus & Decker, 2006).



**Figura 2.** Sitio activo de la tirosinasa de *Streptomyces* en el que se muestra la coordinación del oxígeno y un mecanismo hipotético de unión del sustrato por al mismo. En el panel a) se muestra la configuración inicial cuando el sustrato se aproxima al sitio activo, mientras que en el panel b) se muestra el acercamiento del sustrato hacia el sitio CuA necesario para la reacción. En verde se muestran los residuos de histidina, los iones de cobre en azul, la molécula de oxígeno en rojo y el sustrato en azul claro (Tomado de Decker *et al.*, 2007).

El centro de cobre de tipo 3 es capaz tanto de coordinar el oxígeno molecular como ocurre en las hemocianinas, como de hacerlo reaccionar con compuestos fenólicos como ocurre en las fenoloxidasas (Figura 2). Durante el ciclo catalítico de las tirosinasas, el sitio activo puede adoptar tres formas redox diferentes. El estado *deoxy* [Cu(I)- Cu(I)], que es una especie reducida capaz de unirse al oxígeno para formar el estado *oxy*. El estado *oxy* [Cu(II)- O<sup>2-</sup><sub>2</sub>-Cu(II)], en el cual el oxígeno se une como peróxido de forma tal que el enlace O-O se desestabiliza y es activado. Por último, también puede adquirir el estado *met* [Cu(II) Cu(II)], el cual se considera un estado de reposo en el ciclo catalítico de la enzima, en el que los iones de Cu(II) se encuentran ligados mediante una molécula pequeña tal como agua o un grupo hidróxido (en ausencia de sustrato, el 85% de la enzima se encuentra en el estado *met*) (Claus & Decker, 2006) .

Alineamientos múltiples de las secuencias de tirosinasas tanto procarióticas como eucarióticas han demostrado que las regiones de unión a cobre están altamente conservadas. Estas regiones se denominan CuA y CuB; la región CuA constituye el sitio de unión a cobre más próximo al extremo N-terminal de la proteína, mientras que la región CuB

corresponde al sitio de unión a cobre más cercano al extremo C-terminal de La misma. La “firma” de la región CuA es H-x(n)-H-x(8)-H, mientras que la de la región CuB es H-x(3)-H-x(n)-H, donde  $x$  se refiere a cualquier aminoácido y  $n$  a cualquier numero de residuos (Claus & Decker, 2006) .

Con excepción de estas regiones conservadas, existe una gran variación entre las secuencias de aminoácidos de las tirosinasas (Claus & Decker, 2006). Por otra parte, las catecoloxidasas y las tirosinasas son casi indistinguibles entre sí en base a sus secuencias y propiedades fisicoquímicas exceptuando sus actividades enzimáticas. Al menos dos tipos de fenoloxidasas pueden distinguirse de acuerdo a su estructura general y las características de su sitio activo. El primer tipo está más relacionado con las hemocianinas de moluscos (m-fenoloxidasas), mientras que el segundo posee mayor similitud a las hemocianinas de artrópodos (a-fenoloxidasas) (Decker *et al.*, 2007).

Dependiendo del grupo filogenético, las tirosinasas de los eucariontes pueden encontrarse en diversos estados de agregación (dímeros, tetrámeros o hexámeros), pueden encontrarse también como proteínas solubles o asociadas a membranas, como proteínas citoplásmicas, asociadas a compartimentos celulares específicos o extracelulares (Sugumaran, 2002)Van Gendler, *et al.*, 1997; Sugumaran, 2002).

En los mamíferos, las tirosinasas al igual que el resto de la maquinaria encargada de la melanogénesis, se encuentra localizada únicamente en un compartimento celular específico: el melanosoma. La forma activa de estas enzimas es un dímero que está asociado a la membrana del mismo. En las tirosinasas de mamíferos, existe un péptido señal en la región N-terminal que es necesario para la transferencia de esta proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico y se piensa que está involucrado en la localización de la enzima en el melanosoma (Sugumaran, 2002).

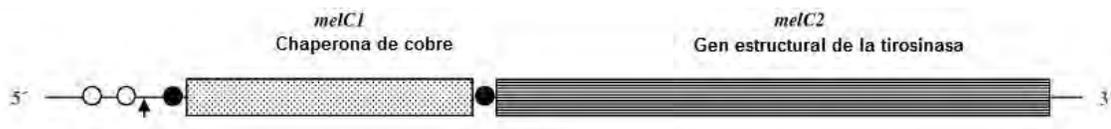
Las fenoloxidasas de artrópodos se encuentran disueltas en su hemolinfa. Son enzimas solubles que carecen de un péptido señal. En estos organismos las fenoloxidasas se asocian en hexámeros cuyas subunidades están compuestas por tres dominios con funciones definidas (Sugumaran, 2002).

Las tirosinasas de las plantas y de hongos están compuestas por tetrámeros donde cada subunidad posee actividad enzimática. Se han descrito tirosinasas de plantas tanto solubles como asociadas a membranas. Se piensa que la enzima se encuentra mayoritariamente asociada a la membrana en tejidos no senescentes, mientras que en los tejidos en senescencia mayor proporción de la enzima se encuentra en estado soluble. En las tirosinasas de las plantas, las enzimas poseen un dominio N-terminal que contiene péptidos de tránsito que dirigen a estas enzimas a la envoltura del cloroplasto donde son procesadas. La tirosinasa del jitomate es transportada al lumen del tilacoide a través de dos pasos. En el primero, una proteína de 67 kDa es transportada al estroma y procesada dando como resultado una proteína de 62 kDa. Esta proteína es subsecuentemente translocada al lumen del tilacoide a través de un mecanismo dependiente de luz y durante su translocación es procesada dando como resultado una proteína soluble de 59 kDa. En el caso de las tirosinasas de hongos, no existe el dominio N terminal que contiene los péptidos de tránsito que se encuentran en las tirosinasas de plantas. Esto concuerda con el hecho de que en *Neurospora crassa* y en *Agaricus bisporus* estas enzimas han sido descritas como solubles y citoplásmicas (Van Gendler, *et al.*, 1997).

Las primeras tirosinasas procarióticas en purificarse, y por lo tanto las más estudiadas, han sido las de las bacterias Gram-positivas del género *Streptomyces*. La forma activa de estas enzimas, a diferencia de las tirosinasas eucarióticas, es un monómero. En estas bacterias se ha reportado la presencia de tirosinasas tanto intracelulares como extracelulares. En el caso

de *S. glaucescens* ambas formas son idénticas en sus masas moleculares, secuencias de la región N-terminal y en el cociente de sus actividades cresolasa/catecolasa (Claus & Decker, 2006).

En *Streptomyces*, además del gen que codifica para la tirosinasa, un segundo gen es necesario para la expresión del fenotipo melanogénico. Las enzimas se encuentran codificadas en operones bicistrónicos (Figura 3). El operón *melC* está compuesto de dos genes que codifican a las proteínas MelC1 y MelC2. La proteína MelC2 corresponde a la tirosinasa, mientras que MelC1 es una proteína encargada de la incorporación de los iones de cobre y de la activación de la tirosinasa. Las dos proteínas forman un complejo estable que puede ser purificado a través de métodos cromatográficos. La adición de cobre a estos complejos conlleva a la incorporación de los iones de cobre en el sitio activo de la tirosinasa y la liberación de la enzima del complejo (Claus & Decker, 2006).



**Figura 3.** Operón bicistrónico de *Streptomyces antibioticus* en el que se encuentran codificados la tirosinasa de *Streptomyces* (*melC2*) y la proteína chaperona de cobre encargada de la incorporación de los iones de cobre a esta proteína (*melC1*), los círculos blancos son las regiones promotoras -10 y -35, los círculos negros los sitios de unión al ribosoma y la flecha indica el inicio de la transcripción (Tomado de Claus & Decker, 2006).

A pesar del hecho de que se encuentran formas tanto intracelulares como extracelulares, las tirosinasas de *Streptomyces* (al igual que el resto de las tirosinasas procarióticas reportadas hasta ahora) no poseen un péptido señal. El péptido señal se encuentra presente en la proteína MelC1 y es eliminado mediante un corte proteolítico después de su secreción. Las mutaciones en el péptido señal de las proteínas MelC1 evitan la secreción tanto de la proteína MelC1 como de la tirosinasa. Estos resultados sugieren que además de la

incorporación de los iones de cobre, la proteína MelC1 también se encarga del transporte de la tirosinasa a través de la membrana plasmática. El péptido señal presente en estas proteínas corresponde a una secuencia señal asociada al sistema de secreción TAT (*Twin-Arginine Translocation*). Este sistema (a diferencia del sistema universal o *Sec* en el que las proteínas son desplegadas durante su transporte), es utilizado en el transporte de proteínas plegadas en su conformación nativa a través de la membrana plasmática. El sistema de secreción TAT es comúnmente utilizado para el transporte de proteínas asociadas a cofactores, como es el caso de las trosinasas (Claus & Decker, 2006).

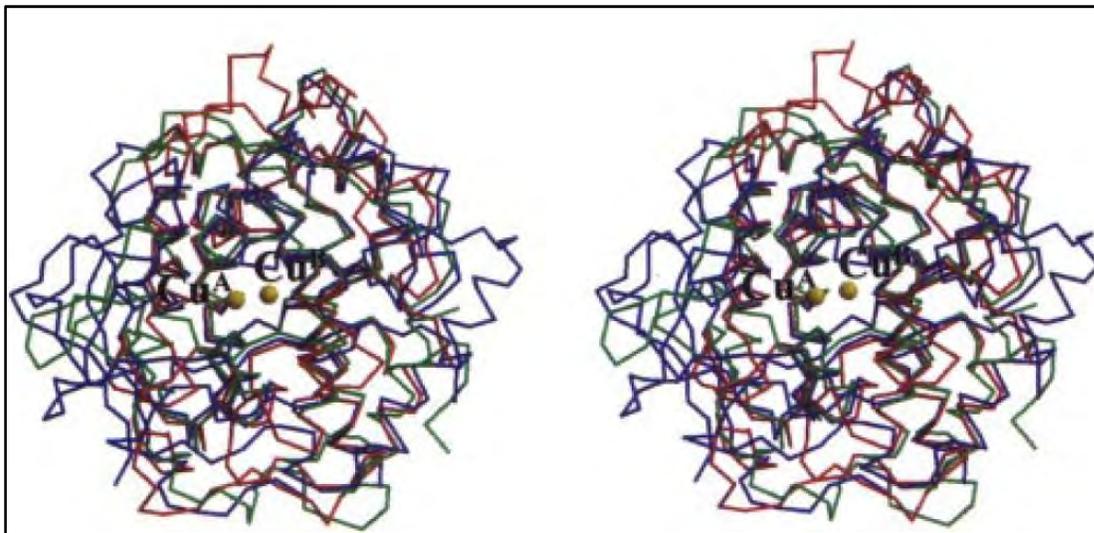
### **1.1.1 Estructura y activación**

Recientemente se ha obtenido la estructura de la primer tirosinasa mediante cristalografía de rayos X: La tirosinasa de *S. castaneoglobisporus*. La estructura de la enzima fue determinada en complejo con una chaperona de cobre, la proteína ORF378 (Matoba *et al.*, 2006).

De esta estructura se pueden hacer diversas observaciones interesantes. Al igual que el resto de las proteínas de unión a cobre de tipo 3, el núcleo de la enzima está compuesto por un paquete de cuatro alfa-hélices dentro de las cuales se encuentra contenido el centro catalítico de cobre dinuclear. El sitio activo se encuentra contenido dentro de una concavidad grande formada por residuos hidrofóbicos que posiblemente funciona como sitio de unión al sustrato (Matoba *et al.*, 2006).

A pesar de que la tirosinasa de *Streptomyces* únicamente comparte 23 y 26 % de similitud en secuencia de aminoácidos con la catecoloxidasa de *Ipomoea batatas* y la hemocianina de *Octopus dofleini*, sus estructuras son en general bastante similares. Por otra parte, el núcleo de la enzima, el paquete de 4 alfa-hélices, muestra un alto grado de conservación estructural

(Figura 4). Las hemocianinas de *Palinurus interruptus* y *Limulus polyphemus* no tienen una similitud significativa en su secuencia de aminoácidos, ni se parecen en sus estructuras a la tirosinasa de *Streptomyces*, pero aun así, sus centros de cobre de tipo 3 pueden ser superpuestos (Matoba *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Estereo-representación de la superposición estructural de la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* con otras proteínas de unión a cobre de tipo 3 en la que se muestra la conservación estructural del paquete de cuatro alfa hélices que contienen al sitio activo. En rojo se muestra la tirosinasa, en azul la catecoloxidasa de *Ipomoea batatas* y en verde la hemocianina de *Octopus dofleini*, las esferas amarillas representan los iones de cobre del sitio activo (Tomado de Matoba *et al* 2006).

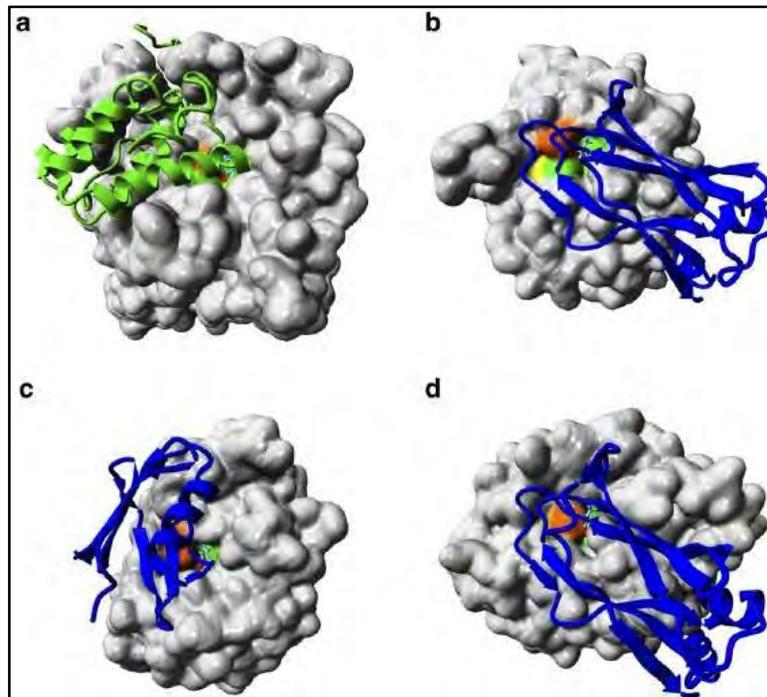
La interacción con la proteína ORF378 parece prevenir la unión del sustrato al sitio activo. Los autores proponen que este complejo es un estado intermedio que precede a la activación de la tirosinasa. La interacción entre estas dos proteínas está mediada por un residuo de tirosina de la proteína ORF378 que sobresale en la superficie de la proteína y se introduce en la concavidad de unión a sustrato de la tirosinasa, actuando como un pseudosustrato que no reacciona con el centro catalítico. El hecho de que el complejo se encuentre unido a través de una superficie molecular relativamente limitada sugiere que la interacción entre ambas proteínas es considerablemente débil (Matoba *et al.*, 2006).

Con el fin de observar el cambio estructural que ocurre en el sitio activo de la tirosinasa durante su ciclo catalítico, los autores de la estructura cristalizaron los diferentes estados redox del sitio activo, así como a la enzima en su forma libre de cobre. La adición de iones de Cu(II) conlleva a la liberación de la proteína ORF378 del complejo en condiciones de solución, pero en el estado cristalino esto no ocurre, posiblemente debido al efecto de empaquetamiento molecular inherente al cristal. Aun así, al añadir iones de Cu (II) se puede observar un ligero movimiento rotacional en la proteína ORF378 que posiblemente está involucrado en la disociación de esta proteína del complejo. En cuanto al cambio estructural que ocurre en el sitio activo durante la transición a través los estados redox, se puede destacar el hecho de que la distancia entre los dos iones de cobre del sitio activo es flexible durante el ciclo catalítico (Matoba *et al.*, 2006).

Los autores también compararon esta estructura con la de otras proteínas de unión a cobre de tipo 3. Como se mencionó anteriormente, las catecoloxidasas y las tirosinasas son casi indistinguibles entre sí en base a sus propiedades fisicoquímicas y su secuencia de aminoácidos, y aún no se entiende la diferencia que conlleva a que las catecoloxidasas sean incapaces de realizar la reacción de monofenolasa. Los autores de la estructura de la tirosinasa llevaron a cabo una comparación de esta con la estructura de la catecoloxidasa de *Ipomoea batatas*. Una de las diferencias más resaltantes que podría estar involucrada en la distinción de las actividades de estas enzimas es la presencia de un espacio libre en la concavidad de unión al sustrato. En el caso de la catecoloxidasa, un residuo de fenilalanina que se encuentra por encima del ion de cobre del sitio CuA podría estar involucrado en impedir de forma parcial la unión del sustrato. Este residuo no se encuentra en la estructura de la tirosinasa, la que por lo tanto posee más espacio libre sobre el sitio activo (Matoba *et al.*, 2006).

A partir de la estructura de la tirosinasa de *S. castaneoglobisorus* se ha generado un modelo de homología del sitio activo de la tirosinasa del ratón. Este modelo es capaz de explicar la pérdida de función que ocurre tanto en las mutaciones naturales asociadas a los casos de albinismo así como en mutaciones generadas a partir de una mutagénesis sitio-dirigida. El modelo provee de una explicación de la necesidad de conservación no solo de las histidinas del sitio activo, sino también de aminoácidos adyacentes en el sitio activo de la tirosinasa. Dada la estrecha relación entre la tirosinasa del ratón con la tirosinasa humana, los autores proponen que las conclusiones extraídas a partir del modelo de la tirosinasa del ratón también deben ser válidas para la tirosinasa humana y de los mamíferos en general (Schweikardt *et al.*, 2007).

En todas las estructuras conocidas de proteínas de unión a cobre de tipo 3 la entrada al sitio activo es bloqueada por un aminoácido que debe ser eliminado para permitir el acceso del sustrato al sitio activo. Este aminoácido se localiza en un dominio “inhibitorio” o “regulatorio” que puede formar parte de la enzima o encontrarse en una proteína asociada con la misma (Figura 5). En el caso de las fenoloxidasas y hemocianinas de artrópodos, el aminoácido que cubre la entrada del sitio activo es un residuo de fenilalanina altamente conservado, mientras que en la tirosinasa de *Streptomyces* éste es un residuo de tirosina que forma parte de una proteína asociada con la enzima. En ambos casos, el aminoácido aromático actúa como un pseudosustrato y se encuentra cerca del oxígeno activado del sitio activo, pero se mantiene a una distancia suficiente para evitar que reaccione (3Å). En el caso de las hemocianinas y fenoloxidasas de los demás organismos, un aminoácido menos conservado pero siempre alifático cubre también la entrada del sitio activo (Decker *et al.*, 2007).

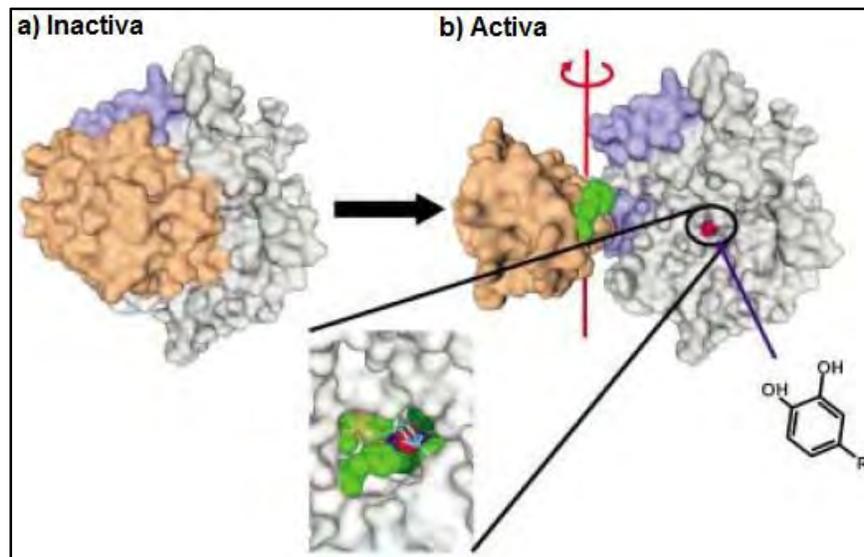


**Figura 5.** Representaciones de listón de los dominios inhibitorios de diferentes proteínas de unión a cobre de tipo 3. En el fondo en gris se muestran los dominios que contienen el sitio activo, mientras que en las representaciones de listones verdes y azules se muestran los dominios inhibitorios de: a) El dominio 1 de la hemocianina de *Limulus polyphemus*, b) La hemocianina de *Octopus dofleini*, c) La proteína MelC1 en complejo con la tirosinasa de *Streptomyces* y d) la catecoloxidasa *Ipomoea batatas*. En anaranjado se muestran los residuos que cubren la entrada al sitio activo. (Tomado de Decker *et al.*, 2007).

Las fenoloxidasas pueden ser activadas a través de cortes proteolíticos llevados a cabo por proteasas específicas o mediante la acción de sustancias lipofílicas (Figura 6). Ambos mecanismos inducen un cambio conformacional en el dominio inhibitorio que permite el acceso del sustrato al sitio activo. Incluso en el caso de la activación por proteólisis parece ser necesario un cambio conformacional después del corte proteolítico. En las fenoloxidasas de *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*, a pesar de que se lleva a cabo un corte proteolítico de un fragmento de 50 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína, este no basta para desbloquear la entrada al sitio activo. Se piensa que este corte induce un cambio conformacional en el dominio inhibitorio que conlleva a la activación de la enzima (Jaenicke & Decker, 2004). En el caso de la tirosinasa de *Streptomyces*, la

activación ocurre mediante la disociación de la chaperona de cobre en la que se encuentra el dominio inhibitorio (Decker *et al.*, 2007).

En el caso de las hemocianinas, es posible inducir un proceso de activación artificial que conlleva a la adquisición de actividad de fenoloxidasa mediante el uso de proteasas o detergentes (Figura 6). La hemocianina de la tarántula *Euryplema* puede ser activada mediante un corte proteolítico en el extremo N-terminal en una posición similar al que se lleva a cabo en las profenoloxidasas de insectos. En contraste, la hemocianina de *Limulus polyphemus* es activada únicamente de forma débil por este método y el tratamiento con detergentes como SDS induce una actividad más fuerte. En la mayor parte de los casos, y especialmente en el de los crustáceos, la actividad de las hemocianinas activadas es bastante débil. En el caso de los quelicerados, se ha conservado una actividad de fenoloxidasa bastante fuerte en sus hemocianinas, que es comparable en especificidad por el sustrato, mecanismo de activación e inhibición con las fenoloxidasas. Este hecho, en conjunto con que no se han encontrado fenoloxidasas en sus hemolinfas ha llevado a pensar que la hemocianina lleva a cabo las funciones de la fenoloxidasa en este linaje (Jaenicke & Decker, 2004).



**Figura 6.** Activación de las fenoloxidasas y hemocianinas mediante la eliminación del dominio que impide el acceso al sitio activo. La forma inactiva a) es activada mediante la remoción o la rotación del dominio N-terminal que cubre el acceso al sitio activo. Al ser activada, b) se permite el acceso de compuestos fenólicos al sitio activo. En la parte ampliada se muestra la entrada al sitio activo con el sustrato de tirosina en turquesa, las histidinas del sitio CuA en verde claro, las histidinas del sitio CuB en verde oscuro los átomos de cobre en azul y el oxígeno unido a estos en rojo (Tomado de Jaenicke & Decker, 2004).

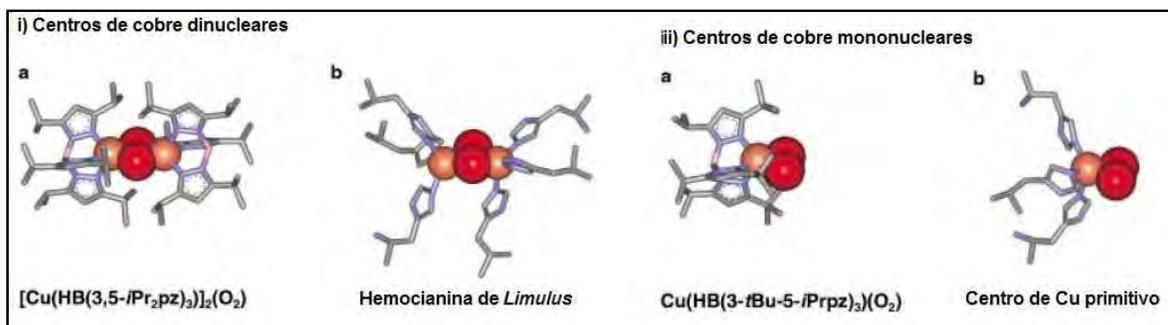
Las fenoloxidasas son capaces de unir oxígeno de forma reversible y se ha demostrado que incluso pueden hacerlo con mayor afinidad que las hemocianinas (Decker & Tucek, 2000; Jaenicke & Decker, 2004). Por otra parte los resultados de los experimentos de activación de las hemocianinas demuestran que estas proteínas aun son capaces de oxidar compuestos fenólicos (Decker & Tucek, 2000; Decker *et al.*, 2007). A partir de la información estructural que se tiene hasta ahora de proteínas de unión a cobre de tipo 3 se ha llegado a la conclusión de que la distinción entre las principales funciones de las proteínas de esta familia, el transporte de oxígeno y la actividad enzimática, se determina por la presencia o ausencia de un dominio que bloquea el acceso al sitio activo (Decker *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Origen y Evolución

Cuando la vida se originó en la Tierra, la atmósfera que prevalecía era de un carácter reductor. Una vez que se desarrolló la fotosíntesis oxigénica, el oxígeno se convirtió en un

componente importante de la atmosfera, cambiando su carácter reductor a uno oxidante. Los organismos tuvieron que desarrollar diversas estrategias para contener con el producto final de la fotosíntesis, el oxígeno ( $O_2$ ) y sus derivados altamente reactivos (aniones supeóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo). Evolucionaron diversas enzimas que reaccionan con el oxígeno dando como resultado productos inofensivos para las células. Entre estas enzimas se encuentran la superoxido dismutasa, las catalasas, las peroxidases, las dioxigenasas y las mono-oxigenasas. La estrategia mediante la que las mono-oxigenasas (grupo al que pertenecen las tirosinasas), mantienen bajas las concentraciones de oxígeno molecular libre es utilizando el  $O_2$  para incorporar uno de sus átomos en un compuesto fenólico y liberando el otro átomo en forma de agua (Decker & Terwilliger, 2000; Jaenicke & Decker, 2004).

Se piensa que la proteína ancestral a partir de la cual evolucionaron todas las proteínas de unión a cobre de tipo 3 poseía un dominio de unión a este metal el cual era capaz de unirse únicamente a un átomo de cobre. Hasta la fecha no se ha encontrado una proteína con un centro de cobre mononuclear, pero estudios realizados con complejos bioinorgánicos sintéticos han demostrado la capacidad de los centros mononucleares de coordinar el oxígeno de forma similar a como lo hacen los centros dinucleares (Figura 7). Este hecho permite suponer que estas proteínas ancestrales funcionaban como proteínas de unión a oxígeno (Jaenicke & Decker, 2004).



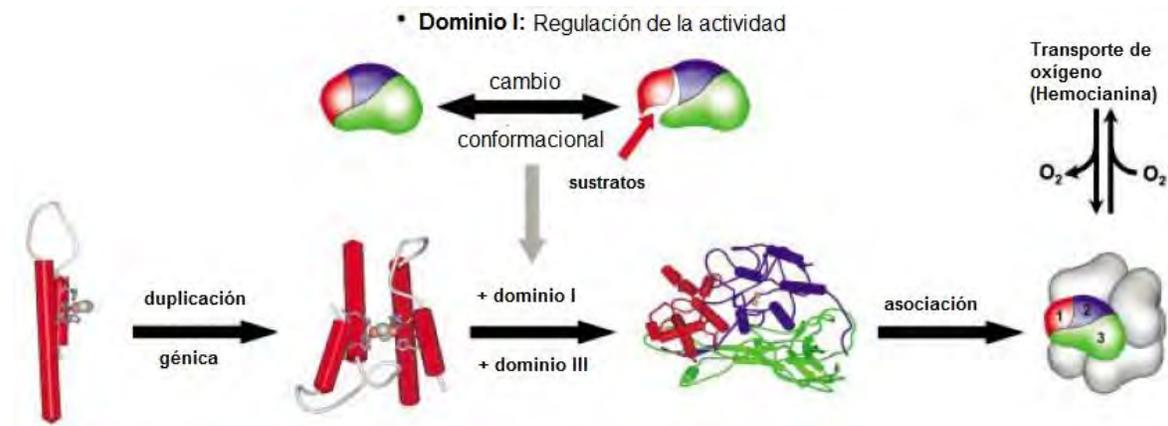
**Figura 7.** Estructura de centros de cobre mono- y dinucleares. i) Coordinación del oxígeno por parte de centros de cobre dinucleares: a) Coordinación del oxígeno por un centro de cobre dinuclear formado por un compuesto bioinorgánico sintético. b) Centro de unión a cobre dinuclear de la hemocianina de *Limulus polyphemus* ii) Coordinación del oxígeno por centros mononucleares. a) Estructura cristalográfica de un compuesto bioinorgánico equivalente a medio sitio activo de la hemocianina de *L. polyphemus* en donde se muestra que incluso un sitio mononuclear de cobre es capaz de coordinar el oxígeno. b) Modelo de un centro de unión a cobre primitivo (Tomado de Jaenicke & Decker, 2004).

Para que fuera posible la transformación de proteínas acarreadoras de oxígeno en proteínas capaces de metabolizar este compuesto fue necesaria la aparición de un centro dinuclear. La coordinación del oxígeno a través de ambos átomos de cobre es esencial para la reacción de las fenoloxidasas, ya que la estrategia que utilizan estas enzimas consiste en separar el oxígeno molecular e incorporar uno de sus átomos en los compuestos fenólicos (Decker & Terwilliger, 2000). El centro dinuclear permite también orientar de forma precisa el oxígeno unido en un compartimento apolar e hidrofóbico de forma tal que se favorece el estado Cu<sup>+</sup> que es esencial en la reacción de las tirosinasas. Por otra parte, la presencia de un centro dinuclear permite un mejor control de la orientación de los compuestos fenólicos por parte de la matriz proteínica que rodea al sitio activo permitiendo la orientación correcta de los sustratos respecto de sí mismos, la cual es crucial para la catálisis enzimática (Jaenicke & Decker, 2004).

Una de las hipótesis más aceptadas respecto a la evolución de los centros dinucleares de cobre es la duplicación de un centro mononuclear para formar una mini-fenoloxidasa (Decker & Terwilliger, 2000). Esta fenoloxidasa ancestral estaba permanentemente activa

detoxificando el oxígeno en la célula y manteniendo las concentraciones de oxígeno bajas (Figura 8) (Jaenicke & Decker, 2004).

Con la aparición de la respiración aerobia dejó de ser necesario detoxificar todo el oxígeno ya que ahora era utilizado para producir grandes cantidades de ATP, de forma que se volvió ventajoso regular la actividad enzimática de las fenoloxidasas. Para poder regular la actividad de estas enzimas fue necesaria la aparición de otro dominio capaz de interactuar con el dominio de fenoloxidasa e impedir el acceso de los compuestos fenólicos al sitio activo: El dominio inhibitorio o regulatorio (Figura 8) (Jaenicke & Decker, 2004).



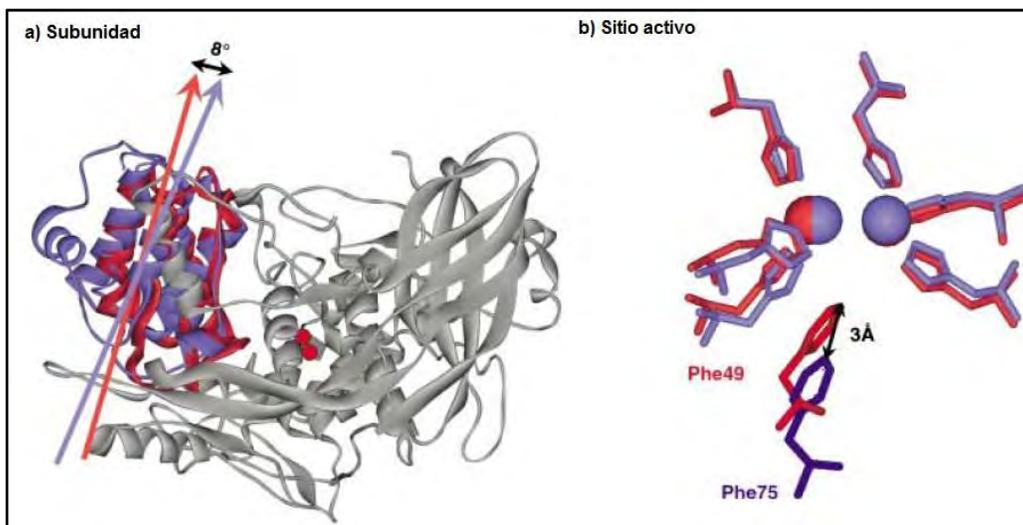
**Figura 8.** Evolución de las proteínas de unión a cobre de tipo 3. Las primeras proteínas de unión a cobre de tipo 3 se originaron mediante la duplicación génica de proteínas con centros mononucleares que ya eran capaces de unirse al oxígeno. Estas “mini-fenoloxidasas” carecían de regulación y funcionaban para detoxificar el oxígeno. En los artrópodos y moluscos ocurrieron dos fusiones génicas subsecuentes, que dieron lugar al dominio I (encargado de la regulación de la fenoloxidasa) y al dominio III (involucrado en el sistema inmune). Posteriormente las fenoloxidasas adquirieron la capacidad de asociarse en hexámeros. A partir de proteínas con esta estructura evolucionaron las hemocianinas de los artrópodos y moluscos (Modificado de Jaenicke & Decker, 2004).

El bloqueo del sitio activo hizo de la fenoloxidasa un candidato ideal para la conversión en una proteína de transporte de oxígeno. Solo ciertos cambios fueron necesarios para la transformación de las fenoloxidasas en hemocianinas. El primero de ellos fue la adquisición de un estado permanentemente inactivo, de manera que únicamente moléculas pequeñas

como el oxígeno fueran capaces de acceder al sitio activo. Para que esto se pudiera llevar a cabo sólo se requirió de cambios sutiles en el dominio inhibitorio. El sitio de corte proteolítico necesario para la activación de la profenoloxidasa debió eliminarse y la interacción entre el dominio inhibitorio y el dominio de fenoloxidasa debió hacerse más estrecha, de manera que se imposibilitara un cambio conformacional que resultara en su activación. A pesar de que las fenoloxidasas son capaces de unirse de forma reversible al oxígeno, fue necesario un cambio en la estructura electrónica del sitio activo para favorecer la unión reversible de este compuesto. Una diferencia entre el sitio activo de las hemocianinas y las fenoloxidasas, es que el de las últimas prevalece la mayor parte del tiempo en el estado *met* que no puede unirse al oxígeno molecular. Aun así, no se entienden por completo las diferencias entre las estructuras electrónicas del sitio activo de estas proteínas que favorecen la prevalencia de un estado u otro (Jaenicke & Decker, 2004).

Por último, para poder llevar a cabo un transporte de oxígeno eficiente y flexible fue necesario que las hemocianinas fueran capaces de unir el oxígeno de forma cooperativa (Jaenicke & Decker, 2004). Una proteína que se une al oxígeno con alta afinidad sería capaz de captarlo de forma eficiente durante el intercambio gaseoso, pero sería incapaz de liberarlo en los tejidos, mientras que una proteína que se une al oxígeno con baja afinidad sería capaz de transportar el oxígeno a los tejidos y liberarlo de forma eficiente pero no de captarlo durante el intercambio gaseoso. La unión cooperativa del oxígeno permite un transporte eficiente porque permite la transición de un estado de baja afinidad por el oxígeno a uno de alta. El principal requisito para que una proteína de unión a oxígeno pueda llevar a cabo una unión cooperativa con el oxígeno es ser una proteína multimérica en la que cada subunidad sea capaz de sufrir un cambio conformacional (Figura 9). De esta forma, cuando una molécula de oxígeno se une a la primer subunidad, induce en esta un

cambio conformacional que se transmite al resto de las subunidades y altera sus afinidades por el oxígeno, causando una transición de afinidad por el oxígeno en la proteína en su totalidad (Nelson & Cox, 2005). En la hemolinfa de los insectos, las fenoloxidasas se encuentran como proteínas hexaméricas, de manera que se piensa que la base estructural para el origen de la cooperatividad en las hemocianinas ya estaba presente en estas enzimas (Figura 8). El único cambio que tuvo que surgir en las subunidades de las fenoloxidasas fue que adquirieran la capacidad de llevar a cabo un cambio conformacional. Al comparar las estructuras del estado desoxigenado y el estado oxigenado de las hemocianinas de artrópodos se puede observar que durante la transición de estos estados ocurre una rotación del primer dominio respecto del segundo, que se piensa que en el complejo hexamérico es responsable de transferir el cambio conformacional al resto de las subunidades, y en última instancia permitir el cambio de afinidad por el oxígeno necesario para el funcionamiento de estas proteínas (Jaenicke & Decker, 2004).



**Figura 9.** Cambio conformacional en las subunidades de las hemocianinas al oxigenarse. El dominio I es rotado por  $8^\circ$  respecto de los dominios II y III. En rojo se muestra el estado *oxy*, mientras que en azul el estado *deoxy*. Este cambio conformacional es necesario para que se lleve a cabo la transición de afinidad por el oxígeno necesaria para el correcto transporte de oxígeno (Modificado de Jaenicke & Decker, 2004).

## **1.2 Melanina**

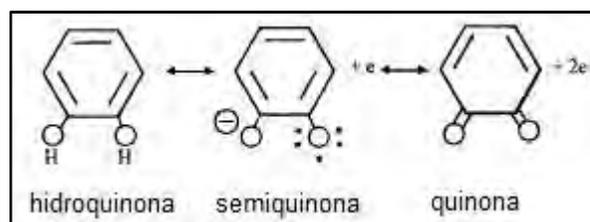
La melanina es un pigmento que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra en algunos organismos de todos los linajes. Es el principal pigmento presente en la piel y el pelo de los mamíferos y uno de los principales encontrados en las plumas de las aves (Slominski *et al.*, 2005; Price, 2006). Su función más aceptada es la protección contra la radiación UV. Es también un componente importante del sistema inmune de los insectos (Sugumaran, 2002). Ha sido relacionada con la patogénesis de hongos y microorganismos (Jacobson, 2000; Plonka & Grabacka, 2006). Es también un componente importante de los ecosistemas del suelo. Tiene cierta importancia económica ya que se ha utilizado industrialmente en la producción de cremas fotoprotectoras y ha recibido atención por su propiedad de semiconductor amorfo (Riley, 1997).

### **1.2.1 Propiedades fisicoquímicas.**

La melanina posee diversas propiedades fisicoquímicas interesantes. Es uno de los materiales bioquímicos más estables, insolubles y resistentes (Jacobson, 2000). Su propiedad más sobresaliente es la capacidad de absorber la luz. Dado el alto nivel de conjugación de la molécula, la melanina posee un amplio intervalo de absorción en el espectro electromagnético (de 700nm a 200nm) que incluye el visible y el ultravioleta (Riley, 1997).

La melanina posee también propiedades de óxido-reducción interesantes. Dado que posee radicales libres estabilizados se considera como un aceptor de electrones desapareados potencialmente dañinos. La capacidad de los residuos quinónicos de la melanina de interconvertirse del estado de quinona, al de semiquinona y posteriormente al de

hidroquinona le permiten adquirir múltiples estados de oxidación (Figura 10) (Jacobson, 2000). Esta característica le permite a la melanina participar en la transferencia de uno o dos electrones en reacciones de oxido-reducción, donde es capaz de actuar ya sea como un donador o como un aceptor de electrones (Riley, 1997). La melanina puede ser reducida mediante el uso de Ti(III) y oxidada mediante el uso de Fe(III) u oxígeno. Aunado a esto, se ha demostrado que la melanina es capaz de catalizar la reducción del Fe(III) por parte del NADH, lo que demuestra que puede participar como un mediador en intercambios electrónicos (Jacobson, 2000).



**Figura 10.** Capacidad de los residuos quinónicos de la melanina de interconvertirse entre sus diferentes estados de oxidación: la hidroquinona, el radical libre semiquinona y la quinona (Tomado de Jacobson, 2000).

La melanina es un agente quelante poderoso que posee la capacidad de unirse a diversos iones metálicos (Riley, 1997). Por otra parte, dada su estructura compleja, la melanina es capaz de unirse también a diversos fármacos. Aunque la mayor parte de las interacciones entre fármacos y melanina pueden atribuirse a fuerzas electrostáticas ejercidas por sus residuos, algunas moléculas (denominados falsos precursores), pueden unirse a esta mientras es sintetizada y permanecer incorporados en su estructura (Hill, 1992).

La melanina es capaz de transformar la energía absorbida por la luz y convertirla en energía eléctrica y en calor. También puede almacenar energía eléctrica y convertirla lentamente en calor. Es igualmente capaz de convertir la energía acústica en calor. La melanina actúa como un semiconductor amorfo, es decir, la luz y la energía eléctrica que absorbe es cuantizada. En los semiconductores cristalinos, la energía absorbida por la molécula es fija,

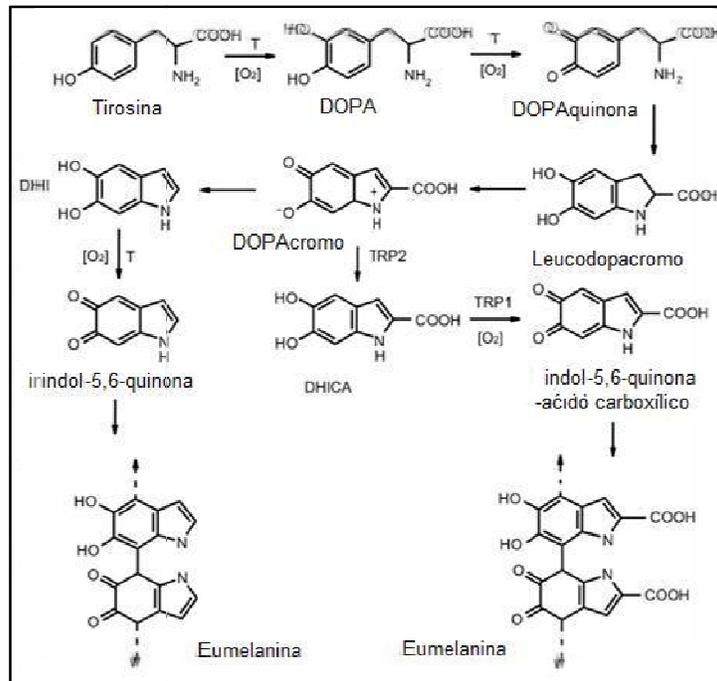
en contraste, los semiconductores amorfos son capaces de absorber distintos cuantos de energía mediante diferentes dominios de la molécula, de forma que la energía de activación no puede ser evaluada. Al igual que el resto de los semiconductores y a diferencia de los metales en los que la conductividad disminuye con el aumento de la temperatura, la melanina posee la propiedad de aumentar su conductividad a medida que su temperatura aumenta. La melanina es un material dieléctrico y por lo tanto puede ser polarizada. Una vez polarizada, su tiempo de relajación es lento, al igual que el resto de los semiconductores (Hill, 1992).

### **1.2.2 Síntesis de Melanina**

Las melaninas son polímeros heterogéneos de alto peso molecular constituidos principalmente por compuestos fenólicos. Se han descrito diversas rutas metabólicas mediante las cuales es posible sintetizar estos pigmentos. Las melaninas resultantes de cada una de estas rutas difieren en su composición, en sus estructuras y en sus propiedades fisicoquímicas. De acuerdo a su composición química y a la ruta por la que son sintetizadas, las melaninas pueden agruparse dentro de la siguiente clasificación (Plonka & Grabacka, 2006):

#### ***Eumelaninas***

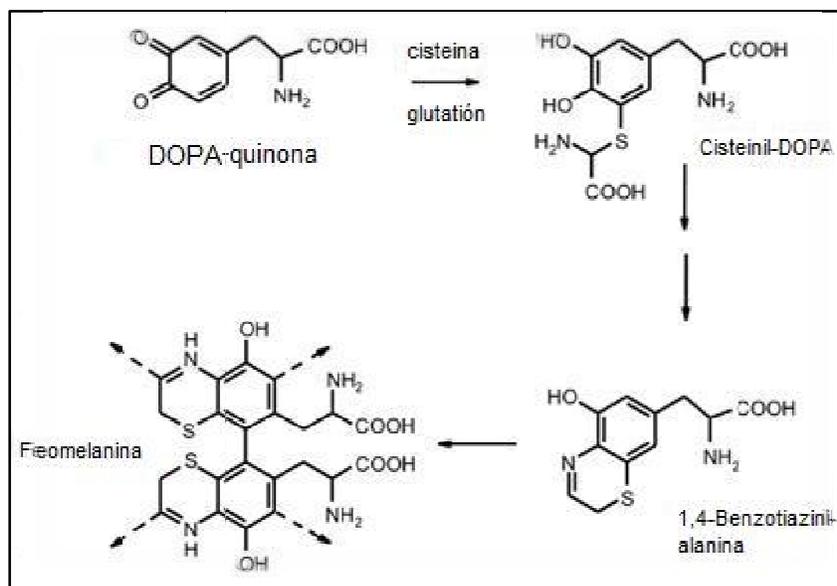
Las eumelaninas varían en su tonalidad desde el negro hasta el café. Se producen por la oxidación de la tirosina en DOPA y posteriormente en dopaquinona catalizadas por la enzima tirosinasa (Figura 11). La dopaquinona se oxida de forma no enzimática formando compuestos tales como el dihidroxi-indol (DHI) o el dihidroxi-indol-ácido carboxílico (DHICA) los cuales se polimerizan para formar la eumelanina (Plonka & Grabacka, 2006).



**Figura 11.** Vía de síntesis de la eumelanina. La T representa a la enzima tirosinasa; TRP1 y TRP2 representan las proteínas relacionadas a la tirosinasa (presentes en los mamíferos); DOPA representa 3,4-dihidroxifenilalanina; DHI representa 5,6-dihidroxiindole; DHICA representa 5,6-dihidroxiindole-2ácido carboxílico (Tomado de Plonka & Grabacka, 2006).

### *Feomelaninas*

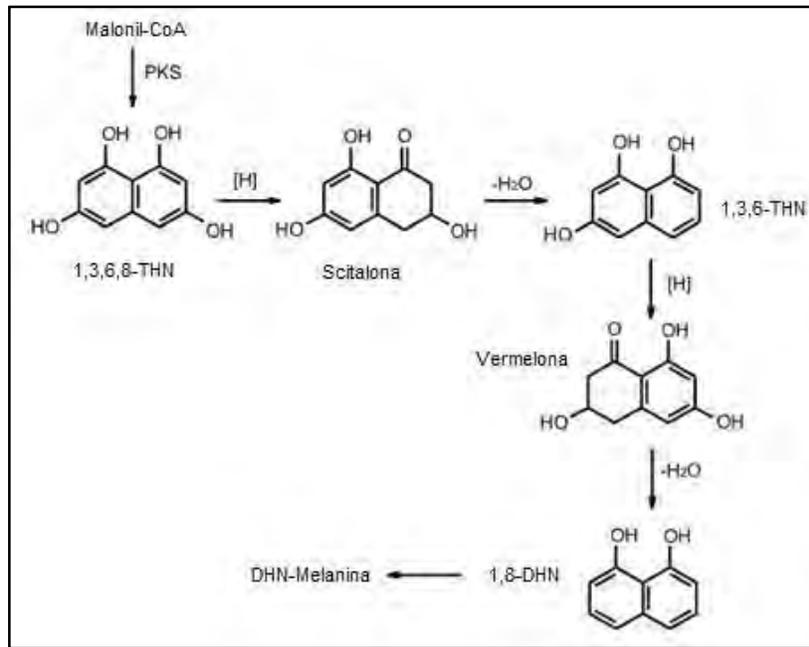
Las feomelaninas pueden ser de color café, amarillo o incluso rojo brillante. Comparten con la eumelanina las reacciones enzimáticas catalizadas por la tirosinasa. Posteriormente, en presencia del aminoácido cisteína, la dopaquinona reacciona con el mismo para formar Cisteinil-DOPA, que posteriormente se polimeriza de forma no enzimática para formar feomelanina a través de diversos derivados de la benzotiazina (Figura 12) (Plonka & Grabacka, 2006).



**Figura 12.** Vía de síntesis de la feomelanina (Tomado de Plonka & Grabacka, 2006).

### *Alomelaninas*

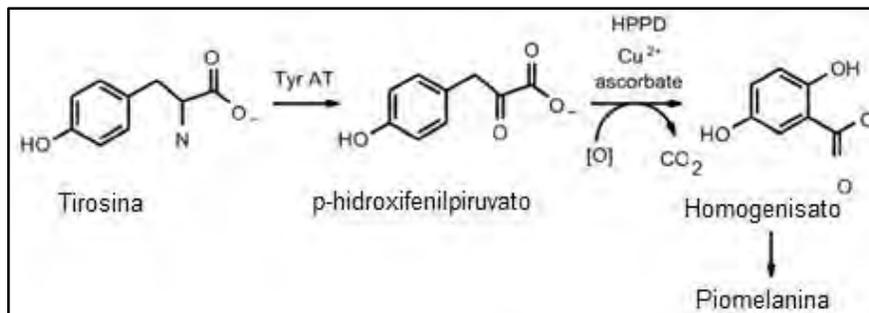
Las alomelaninas son las más heterogéneas y han sido las menos estudiadas (Figura 13). Se obtienen a través de la oxidación del dihidroxinaftaleno (DHN), generado en última instancia a partir de malonil-coenzima A a través de la vía del pentacétido (Plonka & Grabacka, 2006).



**Figura 13.** Vía de síntesis de la melanina derivada del DHN (Tomado de Plonka & Grabacka, 2006).

### *Piomelanina*

La piomelanina consiste en otro tipo de melanina que también se sintetiza a partir de la tirosina. La acción de la enzima tirosil-aminotransferasa convierte a la tirosina en dihidroxifenilpiruvato, el cual a su vez es transformado por la enzima dihidroxifenilpiruvato deshidrogenasa en ácido homogenístico. El ácido homogenisato se polimeriza dando como resultado la formación de piomelanina (Figura 14) (Plonka & Grabacka, 2006).



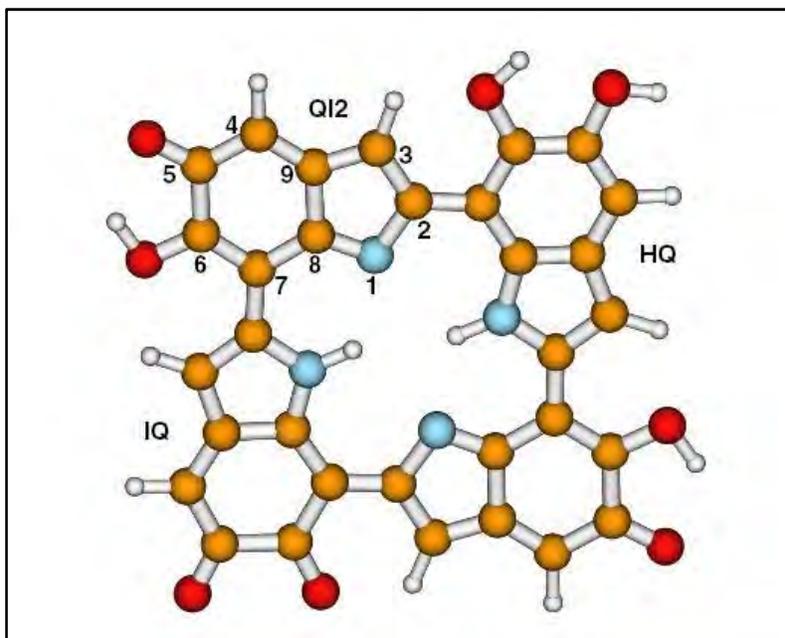
**Figura 14.** Vía de síntesis de la piomelanina (Tomado de Plonka & Grabacka, 2006).

### 1.2.3 Estructura

La estructura de la melanina aun no se conoce. A pesar de que ha sido investigada mediante diversas técnicas como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la resonancia de espín electrónico, no se han podido elucidar los detalles de su estructura. Aun así, se ha llegado al consenso de que las unidades monoméricas que componen a la eumelanina son principalmente el dihidroxi-indol (DHI o HQ), su forma redox indol-quinona (IQ) y sus tautómeros (QI1 y QI2) y el dihidroxi-indol-acido carboxílico (DHICA). La forma en que estos monómeros se unen entre sí para formar los oligómeros o protomoléculas de melanina aun no ha sido establecida. Aunque los estudios llevados a cabo con difracción de rayos X no son capaces de determinar por si mismos la estructura de la molécula, si proveen de ciertas restricciones importantes: El tamaño de las protomoléculas es relativamente pequeño y corresponde ya sea a tetrámeros o pentámeros de las unidades monoméricas. Las protomoléculas parecen estar apiladas en arreglos planos similares al grafito (Kaxiras *et al.*, 2006).

Recientemente se ha propuesto un modelo de la estructura de las protomoléculas de eumelanina que aporta una explicación natural de las principales propiedades fisicoquímicas de la molécula. El modelo es capaz de reproducir su capacidad de unirse a iones metálicos, su amplio espectro de absorción y concuerda con los datos experimentales disponibles a cerca de la estructura de la molécula. Este modelo se basa en la idea de la formación de protomoléculas de melanina compuestas por tetrámeros de compuestos indólicos unidos entre si exclusivamente a través del carbono 2 y el carbono 7 (Figura 15). Este arreglo genera un anillo interior en la protomolécula similar al que se encuentra en la porfirina, en donde los átomos de nitrógeno se encuentran localizados en el interior del

anillo. La unidad más pequeña que puede formarse uniendo los monómeros de esta forma es un tetrámero, ya que un trímero no se podría formar debido a que se generaría un impedimento estérico entre los monómeros que lo componen. Siguiendo esta regla se pueden formar pentámeros, que aunque son menos estables que los tetrámeros no se ven afectados por impedimentos estéricos. Por otra parte, tampoco se pueden formar hexámeros ya que también se generaría un impedimento estérico que los volvería inestables. Este modelo explica porque las protomoléculas más pequeñas consisten de cuatro y las más grandes de cinco monómeros. Por otra parte, dado que los sitios más estables para la formación de dímeros son el carbono 2 y el carbono 7, la ruta mediante la que se forman los tetrámeros también debe ser termodinámicamente favorable (Kaxiras *et al.*, 2006).



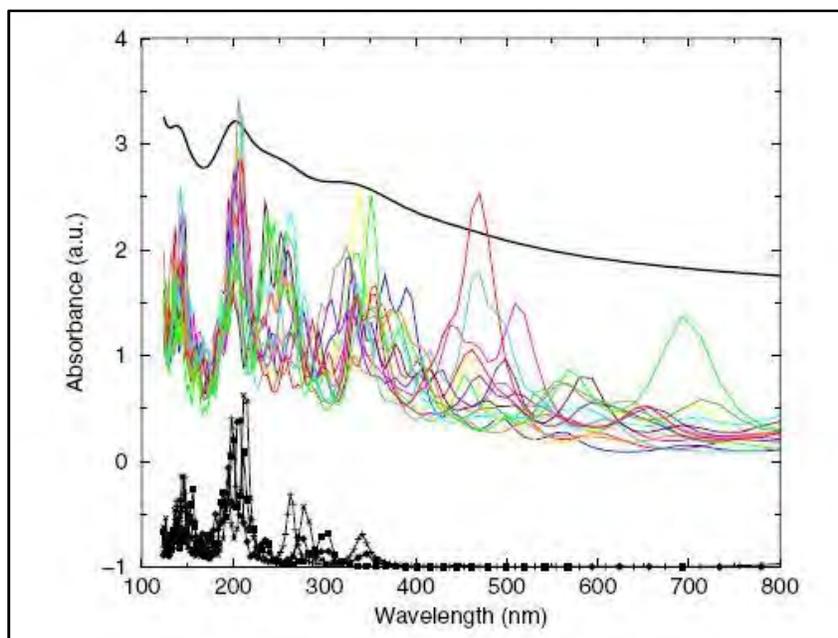
**Figura 15.** Modelo de una protomolécula de melanina conformada por un tetrámero de compuestos indólicos (IQ, Indolequinona; su tautómero QI2; y HQ, dihidroxilindole) unidos exclusivamente por el carbono 2 y el carbono 7. C= dorado, O=rojo, N=azul, y H=blanco (Tomado de Kaxiras *et al.*, 2006).

Existen 21 posibles arreglos de cuatro moléculas individuales en un tetrámero (si se restringe a una sola forma tautomérica del QI). De estos, los 8 que no poseen ninguna QI

tienen una energía negativa de formación alta, los seis que poseen únicamente una QI tienen una energía de formación positiva baja y los ocho que contienen dos o tres QIs tienen una energía de formación positiva alta. Por otra parte, los tetrámeros compuestos únicamente por QIs poseen una energía de formación positiva baja. Este fenómeno se puede explicar por el hecho de que los tetrámeros que no contienen ninguna QI poseen 4 átomos de hidrógeno unidos a los átomos de nitrógeno del anillo interior, lo que produce una fuerte repulsión estérica. Incluso la presencia de 3 átomos de hidrógeno en el anillo interior, como ocurre en los tetrámeros que solo contienen una QI, es desfavorable. Los tetrámeros en los que solo existe uno o dos átomos de hidrógeno en el anillo interior, es decir aquellos que contienen dos o tres QIs, son los tetrámeros más favorecidos o tetrámeros dominantes. Este modelo sugiere que la QI juega un papel importante en la estructura de la eumelanina y en la formación de sus protomoléculas. Cabe mencionar que los autores del modelo enfatizan que si estos monómeros no estuviesen implicados en la formación de las protomoléculas su modelo no sería invalidado, ya que este recae únicamente en el supuesto de que el anillo interior similar a la porfirina contiene como máximo 2 átomos de hidrógeno. De los ocho tetrámeros dominantes, los tres que poseen dos átomos de hidrógeno no adyacentes, tal como ocurre en la porfirina, son los que tienen energías de formación más altas. Dado que la porfirina es capaz de capturar y liberar diversos iones metálicos, estos tetrámeros deben mostrar el mismo comportamiento. De esta forma el modelo provee de una explicación natural de esta propiedad de la melanina concordante con los datos experimentales disponibles que reportan la capacidad de unión de un ión por cada 3 o 4 unidades monoméricas (Kaxiras *et al.*, 2006).

Por último, el modelo es capaz de explicar el espectro de absorción óptico observado experimentalmente (que los autores del modelo consideran la propiedad más difícil de

explicar y una prueba crucial de un modelo a escala atómica) (Figura 16). Los tetrámeros individuales producen características definidas, tal como lo hacen todas las moléculas biológicas con una estructura específica. Sin embargo, una estructura formada uniendo un conjunto azaroso de los tetrámeros dominantes apilados en unidades de tres o cuatro protomoléculas de altura de forma similar al grafito tiende a no mostrar estas características. El promedio de los espectros de 16 tetrámeros dominantes produce un espectro ampliamente carente de características, excepto por dos picos amplios (*broad shoulders*) a los 350 y 240nm que también pueden ser observados en algunos estudios experimentales, principalmente en los que derivan de estructuras de melanina incompletamente oxidada. Los autores predicen que la inclusión de pentámeros y variaciones de la estructura tetramérica básica contribuirán a ampliar aun más el espectro de absorción generado por el modelo. Los autores también construyeron arreglos planos unidos por puentes de hidrógeno, lo que indica que estructuras bidimensionales grandes pueden ser formadas fácilmente a partir de unidades tetraméricas (Kaxiras *et al.*, 2006).



**Figura 16.** Espectro de absorción generado por la apilación de protomoléculas de melanina. La línea negra muestra el espectro de absorción generado a partir de la apilación de los tetrámeros dominantes (aumentado por 1.5 unidades). Las contribuciones individuales al espectro de los tetrámeros se muestran por las líneas delgadas de colores. También se muestran los espectros de absorción de los monómeros (disminuidos por 1 unidad) (Tomado de Kaxiras *et al.*, 2006).

#### 1.2.4 Funciones biológicas de la melanina

El hecho de que la melanogénesis se lleve a cabo tanto en plantas, animales, hongos, y microorganismos sugiere que este fenómeno tiene una importancia evolutiva. Aun así, no se ha llegado a un acuerdo respecto de la función principal de este proceso ni de su producto (Plonka & Grabacka, 2006). Se han descrito numerosas funciones de la melanina, de las cuales su papel como filtro de la radiación electromagnética es la más aceptada. Dada su estabilidad y resistencia también se le ha descrito como un componente estructural. Por su capacidad de unirse a iones metálicos ha sido considerada un agente protector contra metales pesados (Riley, 1997). Dado que la melanina posee radicales libres estabilizados y es capaz de participar en reacciones de oxido-reducción que involucran la transferencia de un electrón, es capaz de aceptar y estabilizar electrones desapareados de diversas moléculas

entre las que se encuentran radicales de oxígeno y nitrógeno y se ha demostrado que es capaz de dismutar el ion superóxido (Jacobson, 2000). Por otra parte, cuando la melanina interactúa con metales también puede participar en reacciones que involucran la transferencia de electrones que favorecen la formación de radicales libres. Su capacidad de unirse a fármacos puede tener un efecto tanto protector como dañino dada su acumulación en tejidos que contienen este pigmento. Por último, también participa en el camuflaje y ornamento de los animales (Hill, 1992). A continuación se describen con más detalle las funciones conocidas de la melanina en distintos organismos.

### ***Animales***

En los mamíferos, la melanina es sintetizada en células especializadas denominadas melanocitos. Dentro de estas, la síntesis ocurre en un organelo particular denominado melanosoma. En los ojos, los melanosomas son retenidos en los melanocitos, mientras que en la piel los melanosomas se secretan a través de sus procesos dendríticos hacia los queratinocitos y folículos pilosos del tejido cutáneo. Existen dos tipos de melanosomas que difieren tanto en su estructura como en el tipo de melanina que producen: Los eumelanosomas son de forma elipsoide y producen eumelanina, mientras que los feomelanosomas son esféricos y se encargan de la producción de feomelanina. A diferencia de las bacterias, en los mamíferos existen otras dos enzimas relacionadas con la síntesis de eumelanina además de la tirosinasa. Estas enzimas son: la dopacromo tautomerasa, que cataliza la isomerización de dopacromo a DHICA; y la DHICA oxidasa que cataliza la oxidación del DHICA (Figura 11). En los eumelanosomas, estas dos enzimas interactúan a través de un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) ubicado en su

extremo C-terminal para formar un complejo melanogénico de alto peso molecular (Sturm *et al.*, 1998).

### Melanosomas

Los melanosomas son organelos relacionados a lisosomas cuyo contenido deriva de las membranas de los endosomas tempranos. Los feomelanosomas han sido poco caracterizados y los estudios de la biogénesis de los melanosomas se han centrado en los eumelanosomas. El estudio de la biogénesis del melanosoma ha servido como un modelo para el entendimiento de la formación de organelos relacionados a lisosomas que son específicos de ciertos tejidos o tipos celulares (Raposo & Marks, 2007).



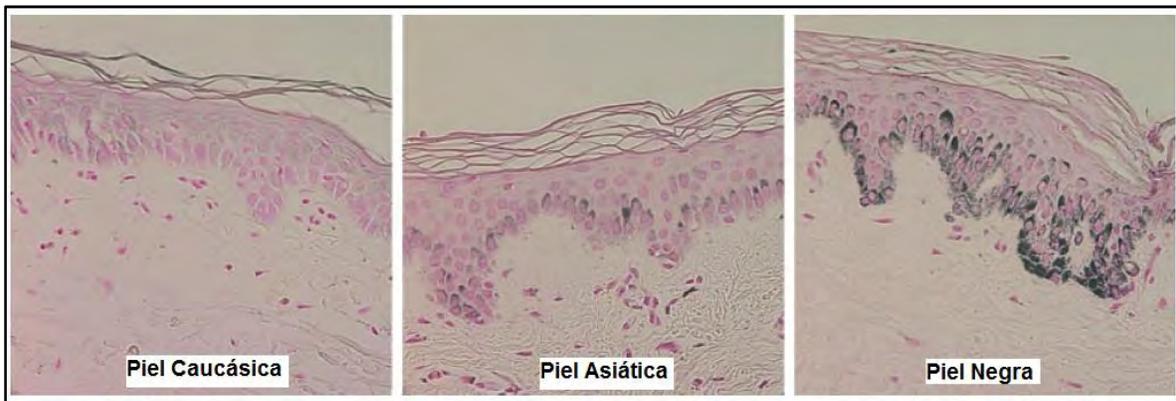
**Figura 17.** Desarrollo de los melanosomas. Los cuatro estadios de desarrollo del melanosoma se muestran en los paneles de arriba. En la parte de abajo se muestra una célula de melanoma humano MNT-1 vista a través de microscopía electrónica en la que se muestran los cuatro estadios del desarrollo del organelo (I-IV); el núcleo (N); y una mitocondria (M). La barra de escala representa 5  $\mu\text{m}$  (Tomado de Raposo & Marks, 2007).

Durante su desarrollo, los eumelanosomas pasan por cuatro estadios morfológicamente distintos (Figura 17). Los primeros dos carecen de pigmento y se caracterizan por la formación de fibrillas proteínicas que comienzan a formarse durante el primer estadio y en el segundo se encuentran completamente formadas. Estas fibrillas están constituidas por la proteína PMEL, y son responsables de dar la estructura elipsoide característica de los eumelanosomas. Para que se lleve a cabo la síntesis de melanina, la maquinaria enzimática debe ser transportada a los melanosomas. La tirosinasa se asocia con las proteínas adaptadoras AP-1 y AP-3 a través de una secuencia señal citoplásmica de tipo dileucina. Estas proteínas se encargan de su tráfico desde los endosomas hasta el melanosoma. En el caso de la proteína TRP1, se piensa que su localización está mediada únicamente por la proteína AP-1, con la cual se colocaliza en los melanocitos. Una vez que ha sido formada la estructura interna del melanosoma, y se encuentra presente la maquinaria enzimática, comienza la síntesis de melanina en el tercer estadio. La melanina comienza a depositarse en las fibrillas proteínicas de forma gradual, dando como resultado el engrosamiento y oscurecimiento del melanosoma. Una vez que la melanina cubre la estructura proteínica interna por completo termina la síntesis de melanina, dando como resultado un melanosoma maduro que corresponde al cuarto estadio de la biogénesis del organelo (Raposo & Marks, 2007).

### **La melanina en la pigmentación de la piel y el pelo**

La melanina es el pigmento principal encontrado en el pelaje de los mamíferos y uno de los principales encontrados en las plumas de las aves (Price, 2006). La inmensa variación de la coloración del pelaje de los mamíferos se debe únicamente a distintas tonalidades de las melaninas (Hill, 1992). En los humanos, la melanina es el único pigmento responsable de las diferencias en la tonalidad de la piel y el pelo. Las diferentes características de

coloración en la piel humana pueden ordenarse a lo largo de un continuo desde aquellos individuos más claros hasta aquellos más oscuros. Al analizar la ultraestructura de la piel, se puede observar diferencias fácilmente reconocibles en las características de los melanosomas. A pesar de que el número de melanocitos se mantiene constante; el número, el tamaño, y la manera en la que los melanosomas se distribuyen en los queratinocitos varía (Figura 18). La piel más pigmentada contiene numerosos melanosomas elipsoides e intensamente melanizados que están distribuidos de manera homogénea en las células, mientras que la piel más clara contiene melanosomas más pequeños y menos densos rodeados por una membrana celular. Los diferentes patrones de organización de los melanosomas están presentes desde el nacimiento y no son determinados por la exposición a la luz solar (Sturm *et al.*, 1998).



**Figura 18.** Contenido de melanina en pieles de distintos orígenes étnicos. A pesar de que el número de melanocitos es similar en las diferentes pieles, el contenido de melanina en las capas basales de la epidermis es substancialmente mayor en la piel negra respecto de la piel asiática y la piel blanca (Tomado de Brenner & Hearing, 2008).

En el caso del pelo, la síntesis de melanina ocurre en melanocitos asociados a los folículos pilosos. A diferencia de la melanogénesis en la pigmentación de la epidermis, que ocurre como un fenómeno continuo, la pigmentación folicular es un proceso de naturaleza cíclica

acoplado al ciclo de crecimiento del pelo. Se ha visto que la melanogénesis se lleva a cabo únicamente durante la etapa de formación del pelo, o anagen, mientras que en las etapas de regresión del folículo piloso y de quiescencia (catagen y telogen) se interrumpe. El aparato responsable de la pigmentación en el folículo piloso es susceptible de envejecimiento. Durante la juventud, un pequeño número de melanocitos es capaz de producir suficiente melanina para pigmentar hasta 1.5 metros de pelo. Alrededor de la cuarta década, la cabellera tiende a volverse gris, y a los cincuenta años el 50% de la gente tiene la cabellera de color gris. Este fenómeno se debe a una reducción de los melanocitos activos en los folículos pilosos que generan pelos grises, los cuales presentan una actividad de tirosinasa reducida pero detectable. Por otra parte, las canas afectan a folículos pilosos individuales, y se manifiestan como una pérdida de pigmentación gradual que puede manifestarse a lo largo de un pelo individual, como una pérdida de pigmento a lo largo de varios ciclos de crecimiento, o como el crecimiento de un pelo completamente despigmentado. En el caso de las canas, los folículos pilosos no presentan actividad de tirosinasa (Slominski *et al.*, 2005).

La pigmentación en el folículo piloso también se ha propuesto como un mecanismo de excreción transcutánea de metales pesados dada la capacidad de la melanina de unirse a diversos iones metálicos (Riley, 1997).

### **La melanina como protector contra la radiación UV en la piel**

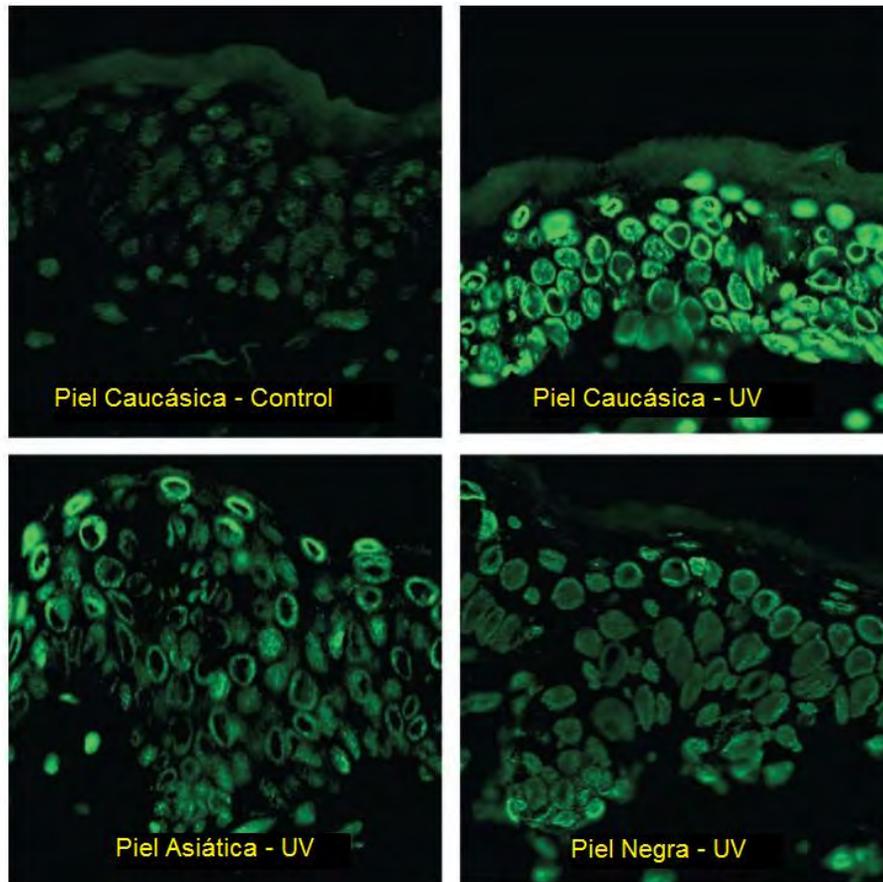
Dado su amplio espectro de absorción, en la piel la melanina funciona como un agente protector contra la radiación UV. La radiación ultravioleta que alcanza a la superficie de la tierra es predominantemente de tipo UVA (320-400nm), mientras que una minoría, alrededor del 5%, es de tipo UVB (280-320nm). La radiación ultravioleta es causante de diversos efectos agudos y crónicos en la piel. Entre los efectos agudos se incluyen el daño

al DNA, erythema (quemaduras de piel), mutaciones, inmunosupresión, mientras que sus efectos crónicos son el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. Mientras que la radiación ultravioleta de tipo UVB es absorbida directamente por el DNA e induce directamente cambios estructurales en la molécula, la radiación de tipo UVA es principalmente responsable de daños indirectos al DNA a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Las lesiones más importantes en el DNA generadas por la radiación ultravioleta son la formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) y de fotoproductos pirimidina-pirimidona (Figura 19). La radiación ultravioleta también tiene propiedades inmunosupresivas locales y sistémicas, y puede reducir la capacidad de vigilancia ante tumores o antígenos virales. Se tiene evidencia de que la inmunosupresión causada por la radiación ultravioleta puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de tumores en la piel (Brenner & Hearing, 2008).

La melanina, y en especial la eumelanina, funciona como un agente fotoprotector debido a su habilidad de actuar como una barrera que dispersa la radiación ultravioleta, y como un filtro que reduce la penetración de la misma a través de las capas epidérmicas. La eumelanina también funciona como un agente protector contra los daños indirectos al DNA causados por la radiación ultravioleta mediante su capacidad de detoxificar las especies reactivas de oxígeno generadas por la misma. En contraste, la feomelanina es potencialmente fototóxica y se ha demostrado que funciona como un fotosensibilizador ante la radiación UVA. Al recibir radiación ultravioleta, la feomelanina produce especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño oxidativo del DNA (Kadekaro *et al.*, 2003).

La piel humana desarrolla dos defensas principales frente a los efectos dañinos de la luz ultravioleta: El engrosamiento de la epidermis, y la síntesis de melanina, que se manifiesta como el bronceado. En relación con la fotoprotección, el aumento en la melanogénesis es

de mayor importancia. Dada esta capacidad de la piel, se ha distinguido entre su coloración constitutiva y su coloración facultativa. La coloración constitutiva de la piel se refiere al nivel de melanina en la piel que está determinado genéticamente y no es influenciado por factores endógenos o exógenos. Por otra parte, la coloración facultativa se refiere a los cambios inducidos en el contenido de melanina de la epidermis resultantes de factores ambientales tales como la radiación solar o de la acción hormonal. El aumento en la pigmentación de la piel en respuesta a la exposición a la radiación ultravioleta ocurre a través de dos pasos. El primero se denomina oscurecimiento inmediato del pigmento (IPD), ocurre después de minutos de exposición a la radiación UV y es causado por la oxidación de moléculas de melanina preexistentes. El segundo, denominado respuesta retardada de bronceado (DTR) se manifiesta dos o tres días después de la exposición a la radiación ultravioleta y es causado por la estimulación de la síntesis de melanina e involucra el aumento en el número de melanocitos funcionales y en la actividad de éstos (Kadekaro *et al.*, 2003; Brenner & Hearing, 2008).



**Figura 19.** Daño al DNA generado por la radiación ultravioleta en pieles de distinto origen étnico: Detección de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) en pieles de distintos orígenes étnicos inmediatamente después de ser expuestas a radiación ultravioleta. En la piel blanca se forma una cantidad considerablemente mayor de CPDs en comparación con la piel asiática y la piel negra (Tomado de Brenner & Hearing, 2008).

El papel fotoprotector de la melanina es apoyado por estudios epidemiológicos en los que se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el nivel de pigmentación de la piel y la incidencia de cáncer inducido por la exposición a la luz solar. Los sujetos con piel clara son aproximadamente 70 veces más propensos a desarrollar cáncer de piel que los sujetos con piel oscura. En la piel oscura los melanosomas son resistentes a la degradación por enzimas lisosómicas y permanecen intactos a lo largo de las capas de la epidermis, mientras que en la piel clara los melanosomas se degradan y en las capas suprabasales únicamente persisten como “polvo de melanina”. Por otra parte, además de que la radiación

ultravioleta induce menor daño en el DNA en la piel oscura que en la clara, se ha demostrado que en la piel oscura la tasa de formación de células apoptóticas es considerablemente mayor. Este hecho sugiere que aparte de estar más protegida contra los efectos de la luz UV, la piel oscura es más eficiente en deshacerse de las células dañadas, reduciendo aun más el riesgo de carcinogénesis (Brenner & Hearing, 2008).

El efecto más drástico de la radiación ultravioleta en los melanocitos es su transformación en melanoma maligno, que es la forma más letal de cáncer de la piel. A diferencia de los otros tipos de cáncer de piel (BCC y SCC) que son resultado de la exposición crónica a la luz del sol, los tumores de melanoma parecen ser el efecto retrasado de exposiciones solares intensas e intermitentes y quemaduras periódicas. El melanoma es principalmente una enfermedad de trabajadores de interiores y es común entre adultos jóvenes y de mediana edad que participan ocasionalmente en actividades en exteriores. Los otros tipos de cáncer de piel están asociados a trabajadores de exteriores durante o después de su quinta década de edad. Se piensa que el riesgo de contraer melanoma ya está determinado a los 20 años de edad y se relaciona directamente con el número de quemaduras sufridas durante los primeros años de vida. Parece que el resultado de la radiación UV en los melanocitos está determinado por la dosis por exposición más que por la suma de las exposiciones individuales a lo largo de los años. La exposición a UVA es un factor de riesgo de melanoma. Dado que la radiación UVA penetra más profundo a través de las capas epidérmicas que la radiación UVB e incluso es capaz de llegar hasta la dermis, puede alcanzar a los melanocitos que se encuentran en la unión entre la dermis y la epidermis. En éstos, probablemente conlleva a daño oxidativo al DNA y mutagénesis. La transformación del melanocito en melanoma maligno ocurre por la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes, que dan como resultado la desregulación del ciclo

celular y la proliferación celular. Esto genera una reparación incompleta del DNA que puede resultar en inestabilidad genómica y mutaciones (Kadekaro *et al.*, 2003).

### **La melanina en el cerebro de los mamíferos: Neuromelanina**

La melanina también se ha encontrado en el cerebro de diversos mamíferos, incluyendo a primates (humanos, chimpancés, gibones, y babuinos), caballos, ovejas, perros, y ratas. En este contexto se le denomina neuromelanina (NM) (Figura 20). En el cerebro humano, las células con mayor pigmentación son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*. En estas células, la melanina se encuentra depositada en gránulos de neuromelanina, que son organelos rodeados por una doble membrana que se encuentran en el pericarion neuronal (Zecca *et al.*, 2001; Zecca *et al.*, 2003).

La forma en que se sintetiza la neuromelanina ha sido discutida por diversos autores. Mientras que algunos atribuyen su síntesis a un proceso de oxidación enzimática, otros proponen que se deriva de la auto-oxidación de la dopamina. El papel que juega la tirosinasa en la síntesis de la neuromelanina aún no está muy claro. Algunos autores han propuesto que esta enzima está relacionada en la síntesis dado el hecho de que tanto la presencia de su mRNA como la actividad de su promotor han sido detectadas en la sustancia nigra. Otros han negado su participación, dado el hecho de que la enzima no ha sido detectada por inmunohistoquímica, y dado que se ha visto que individuos albinos poseen una pigmentación normal en la sustancia nigra (Zecca *et al.*, 2001). Recientemente ha sido posible la formulación de un modelo mediante el cual se puede explicar la síntesis de NM en la sustancia nigra en ausencia de la tirosinasa: Se ha logrado inducir de forma experimental la síntesis de NM en cultivos de neuronas de la sustancia nigra de la rata

expuestos a L-DOPA. Las melaninas resultantes de este proceso reproducen la estructura de la neuromelanina humana dado que el espectro de resonancia de espín electrónico de ambas es idéntico. Por otra parte, observaron que ésta se encuentra formando gránulos de neuromelanina al igual que como ocurre en las neuronas de la sustancia nigra. La formación de NM en cultivo es bloqueada tanto por la quelación del Fe como por la sobreexpresión del transportador vesicular de monoaminas VMAT2, por lo que se piensa que la síntesis de NM se lleva a cabo mediante un exceso de catecolaminas citosólicas y que el  $\text{Fe}^{3+}$  está involucrado. El modelo de síntesis de melanina que hoy prevalece involucra la Tirosina hidrolasa, una enzima encargada de convertir tirosina en L-DOPA. Subsecuentemente la acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos en la conversión de L-DOPA en dopamina. La dopamina generada puede ser transportada a las vesículas a través del transportador VMAT2 y en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  convertida en quinonas y semiquinonas involucradas en la neurodegeneración. En presencia de cisteína, éstos compuestos reaccionan con la misma dando lugar a la cisteinil-dopamina, la cual se polimeriza de forma no enzimática para formar la neuromelanina (Zecca *et al.*, 2003).



**Figura 20.** La neuromelanina en la sustancia nigra del cerebro humano. En el cerebro humano las células con mayor pigmentación son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus. A la izquierda se muestra la pigmentación de un cerebro normal, mientras que a la derecha se muestra la pigmentación en un cerebro de un paciente con enfermedad de Parkinson (Tomado del portal del Grupo de Neuroquímica del Parkinson de la Universidad de Santiago de Compostela).

Se ha propuesto que la neuromelanina actúa como un neuroprotector debido a su capacidad para unirse tanto a una variedad de moléculas orgánicas como a diversos iones metálicos (Zecca *et al.*, 2001; Zecca *et al.*, 2003).. Se ha demostrado que la neuromelanina es capaz de unirse a lípidos, pesticidas y compuestos tóxicos. Entre los compuestos orgánicos que pueden unirse a la melanina se encuentran algunos que han sido asociados con el desarrollo del síndrome de Parkinson, tales como el metabolito tóxico metilfenilpiridina y el herbicida *paraquat*. Los iones metálicos capaces de unirse a la melanina son: Zn, Cu, Cr, Co, Hg, Pb, Cd y principalmente Fe. Dadas estas capacidades se ha propuesto que la neuromelanina puede funcionar como un almacén de alta capacidad para este tipo de compuestos, previniendo así el daño neuronal (Zecca *et al.*, 2003).

La neuromelanina se acumula de forma natural en la sustancia nigra durante el envejecimiento y en el ser humano puede ser detectada por vez primera entre los 2 y 5 años de edad. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida específica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra que contienen la neuromelanina (Figura 20)

(Zecca *et al.*, 2001; Zecca *et al.*, 2003). En pacientes con enfermedad de Parkinson se ha visto que las concentraciones de neuromelanina disminuyen a menos de un 50% de las que se encuentran en individuos de la misma edad que no tienen la enfermedad. Se ha propuesto que la neuromelanina juega un papel como neuroprotector, pero se reconoce también que puede transformarse en una fuente de radicales libres al reaccionar con peróxido de hidrógeno. La neuromelanina se degrada al reaccionar con el peróxido de hidrógeno, lo que podría tener como consecuencia la liberación de metales y compuestos citotóxicos capaces de favorecer la muerte neuronal. Un modelo alternativo que involucra a la neuromelanina en la neurodegeneración se basa en el hecho de que se ha visto que después de muerte neuronal en la sustancia nigra, la neuromelanina se acumula en el espacio extracelular en grandes cantidades y puede prevalecer ahí por largos periodos de tiempo. La neuromelanina en el espacio extraneuronal es fagocitada por las células microgliales y una vez que esto sucede, promueve su activación. Al activarse, estas células generan mediadores neurotóxicos, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y el óxido nítrico (NO). De esta forma, aunque el daño relacionado con la muerte neuronal en la sustancia nigra puede ser causado inicialmente por diferentes mecanismos, tanto genéticos como ambientales; al liberarse la neuromelanina al espacio extraneuronal se induce la producción de factores neurotóxicos por parte de las células microgliales que incrementan la neurodegradación. El entendimiento del papel que juega la neuromelanina tanto en condiciones fisiológicas normales como en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson es crucial para el entendimiento de este trastorno y para la generación de nuevos métodos para prevenirlo y tratarlo (Zecca, *et al.*, 2003).

### **La melanina en los insectos**

En los insectos además de la pigmentación, la melanina está involucrada en tres procesos fisiológicos importantes: Funciona como un mecanismo de defensa en el sistema inmune, participa en la cicatrización de las heridas y en la esclerotización de la cutícula después de la muda (Sugumaran, 2002).

La fenoloxidasa de los insectos es responsable de la iniciación del proceso de esclerotización de la cutícula de los insectos. Participa en la formación de diversos compuestos responsables de interconectar los polímeros de quitina y de esta forma confiere de dureza a la cutícula. La eumelanina y otros pigmentos quinónicos son responsables de la pigmentación de la cutícula, la cual puede ser desde transparente hasta completamente negra dependiendo de la contribución relativa de estos compuestos. Por otra parte, cuando los insectos sufren de una herida, la pro-fenoloxidasa es rápidamente activada y causa la deposición de melanina en la herida, sellándola gradualmente y de esta forma evitando la pérdida de hemolinfa. Dado que los insectos carecen de inmunoglobinas, han desarrollado un mecanismo de defensa que involucra la vía de síntesis de melanina en la defensa contra parásitos y agentes patógenos. A través de una serie de reacciones los patógenos son encapsulados y posteriormente melanizados. Por esta razón la fenoloxidasa de los insectos y la melanina son considerados como componentes esenciales del sistema inmune de los insectos. La fenoloxidasa de los insectos se encuentra presente en la hemolinfa en su estado inactivo de profenoloxidasa. Cuando un objeto extraño se introduce en el cuerpo del insecto, proteínas encargadas de su reconocimiento son activadas y a su vez activan a una serie de proteínas que culminan con la activación de la profenoloxidasa. Al activarse, la profenoloxidasa se convierte en fenoloxidasa, la cual es extremadamente pegajosa y se une

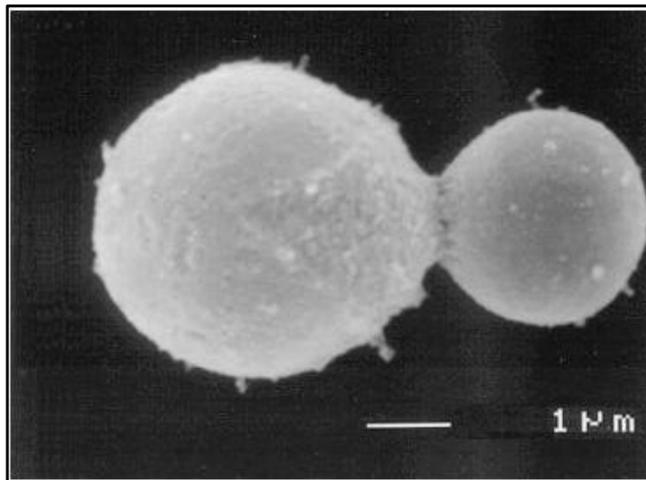
a los objetos extraños, gradualmente encapsulándolos y generando una melanización localizada que recubre al objeto (Sugumaran, 2002).

### ***Hongos y microorganismos***

En los hongos, las diversas propiedades de la melanina tales como su capacidad de unirse a fármacos, iones metálicos, enzimas extracelulares, su capacidad de donar y aceptar electrones y su capacidad de detoxificar especies reactivas de oxígeno, se han relacionado con la patogénesis de diversas especies. En el caso de los hongos patógenos de plantas, también se ha demostrado la importancia de la melanina en la formación del apresorio, una estructura formada por las esporas recién germinadas que está involucrada en la penetración de las células vegetales (Jacobson, 2000).

Se ha demostrado la presencia de melanina en la pared celular de los hongos melanogénicos a través de diversas observaciones. Entre ellas, la más demostrativa es la siguiente: Dado que la melanina es resistente a la hidrólisis celular es posible observar a través de microscopía electrónica “fantasmas de melanina”, que retienen la forma de la pared celular después de hidrolizar el resto de los componentes celulares (Figura 21). Estas estructuras no se observan al hidrolizar células no melanizadas. Dado el hecho de que las células melanizadas de *Wangiella dermatitidis* son más resistentes a la hidrólisis enzimática que células tratadas con inhibidores de la síntesis de melanina, o células mutantes incapaces de sintetizar melanina, se ha relacionado a estas estructuras con la resistencia a la lisis enzimática. Se ha visto que la melanina asociada a la pared celular forma gránulos de dimensiones más o menos homogéneas arreglados de forma concéntrica formando de dos a cinco capas. Se ha demostrado que los “fantasmas” de melanina poseen poros de 1 a 4

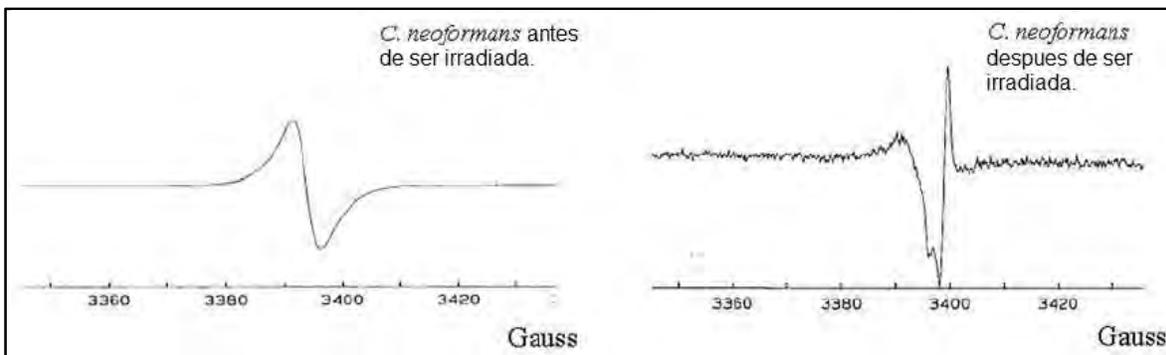
nanómetros de diámetro en la capa más externa, mientras que en las capas internas tienen un número menor de poros de 30nm. Debido a que este arreglo aumenta el número de sitios de unión a fármacos expuestos en el exterior celular, mientras que también es capaz de impedir el paso de moléculas grandes, como los agentes fungicidas amfotericina-B y caspofungina, sin alterar con ello el flujo de moléculas pequeñas, como nutrientes y gases; se piensa que también está relacionado con la resistencia a fármacos y agentes antifúngicos (Jacobson, 2000).



**Figura 21.** La melanina en la pared celular de los hongos melanogénicos. Micrografía electrónica de “fantasmas de melanina” generados por la hidrólisis de células de *Cryptococcus neoformans* en donde se mantiene la forma original de las células hidrolizadas (Tomado de Jacobson, 2000).

Se ha reportado que diversas especies de hongos melanogénicos son capaces de colonizar las paredes del reactor de Chernobyl y los suelos que se encuentran a sus alrededores. En el caso del hongo *Cladosporium cladosporioides*, que se ha convertido en uno de los hongos más abundantes en los alrededores de Chernobyl desde el accidente nuclear en 1986, se ha demostrado la presencia de radiotropismo tanto en el laboratorio como en estudios de campo. Recientemente se ha estudiado el efecto que tiene la radiación sobre las propiedades electrónicas de la melanina, el metabolismo y el crecimiento de los hongos melanogénicos (Dadachova *et al.*, 2007).

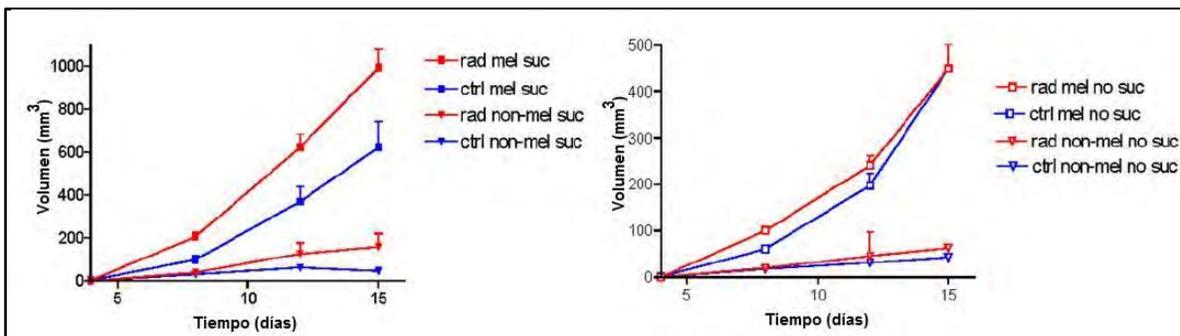
En este estudio Dadachova *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la radiación en las propiedades electrónicas de la melanina, mediante la determinación del espín de resonancia electrónica generado por “fantasmas” de melanina irradiados y no irradiados, obtenidos a partir de la hidrólisis de células de *Cryptococcus neoformans*. Encontraron que la señal del espín de resonancia electrónica de la melanina cambia drásticamente cuando los “fantasmas” secos son expuestos a la radiación y posteriormente resuspendidos en agua (Figura 22). En experimentos posteriores evaluaron el efecto de la radiación en las propiedades de transferencia de electrones de la melanina. Utilizando un sistema en el que la melanina actúa como un agente capaz de transferir electrones mediante la oxidación del NADH acoplada a la reducción de la ferricianida, evaluaron el efecto de diversos tipos de radiación electromagnética. Al irradiar la melanina durante 20 minutos, la velocidad de la reacción aumentó 3 veces en comparación con muestras de melanina no irradiadas, mientras que al ser irradiada por cuarenta minutos, la velocidad aumentó 4 veces. Al evaluar el efecto de otros tipos de radiación no ionizante a lo largo del espectro electromagnético, tales como la luz visible, la luz ultravioleta y el calor (infrarojo), encontraron que todos estos tipos de radiación aumentaron las propiedades de transferencia de electrones de la melanina de forma similar (Dadachova *et al.*, 2007).



**Figura 22.** Efecto de la radiación ionizante sobre las propiedades electrónicas de la melanina. A la izquierda se muestra el espín de resonancia electrónica de “fantasmas” de melanina” de *Cryptococcus neoformans* antes de ser irradiados. A la derecha se muestra el espín de resonancia electrónica de los “fantasmas de melanina” de *Cryptococcus neoformans* después de ser irradiados (Tomado de Dadachova *et al.*, 2007).

Los autores también determinaron la influencia que tiene la radiación en el metabolismo y el crecimiento de los hongos melanógenos, decidieron hacer otra serie de experimentos evaluando la relación de esta con el crecimiento y la incorporación de acetato en células de *C. neoformans* tanto silvestres como mutantes carentes de lacasa (*Lac-*) que son incapaces de sintetizar melanina suplementadas con L-DOPA. Encontraron un aumento significativo en el crecimiento de las células melanizadas irradiadas en comparación con células melanizadas no irradiadas y con las mutantes incapaces de sintetizar melanina (*Lac-*). En los experimentos en los que evaluaron la incorporación de acetato marcado con carbono 14 encontraron también que fue significativamente mayor en células melanizadas que fueron expuestas a la radiación en comparación con células melanizadas no expuestas a la radiación y células mutantes incapaces de sintetizar melanina (*Lac-*). Los autores también ampliaron sus observaciones a otras especies de hongos, como el hongo *Cladosporium sphaerospermum*, que es una de las especies dominantes que habitan el reactor de Chernobyl. Evaluaron el crecimiento midiendo el diámetro de las colonias durante un plazo de 15 días, tanto en medio mínimo como en medio mínimo suplementado con cantidades

limitadas de sacarosa, en condiciones de exposición constante a 0.0001% de la dosis fungicida de radiación. Observaron que este hongo produce melanina incluso cuando los nutrientes y fuentes de energía son limitados o están ausentes. Para evaluar la participación de la melanina en el aumento del crecimiento generado por la radiación, cultivaron el hongo en presencia de triciclazol, un inhibidor de la síntesis de melanina. En todas las condiciones que evaluaron las células melanizadas irradiadas crecieron significativamente más y a una velocidad mayor que las células melanizadas no irradiadas, y que las células crecidas en presencia del inhibidor de la síntesis de melanina. De estos experimentos concluyeron que el hongo produce melanina tanto cuando hay fuentes de nutrientes y energía en el medio como cuando existe una carencia de nutrientes en éste, y en ambas condiciones su crecimiento se ve favorecido por la exposición a la radiación (Figura 23) (Dadachova *et al.*, 2007).



**Figura 23.** Efecto de la radiación ionizante en el crecimiento de los hongos melanogénicos. A la izquierda se muestra el crecimiento de colonias del hongo *C. sphaerospermum* tanto melanizado (cuadros), como deficiente en la producción de melanina (triángulos) al ser expuesto a la radiación gamma (líneas rojas) al igual que en ausencia de la fuente de radiación (líneas azules) en medio con sacarosa. A la derecha se muestra el crecimiento de colonias del hongo *C. sphaerospermum* tanto melanizado (cuadros), como deficiente en la producción de melanina (triángulos) al ser expuesto a la radiación gamma (líneas rojas) al igual que en ausencia de la fuente de radiación (líneas azules) en un medio sin sacarosa (Tomado de Dadachova *et al.*, 2007).

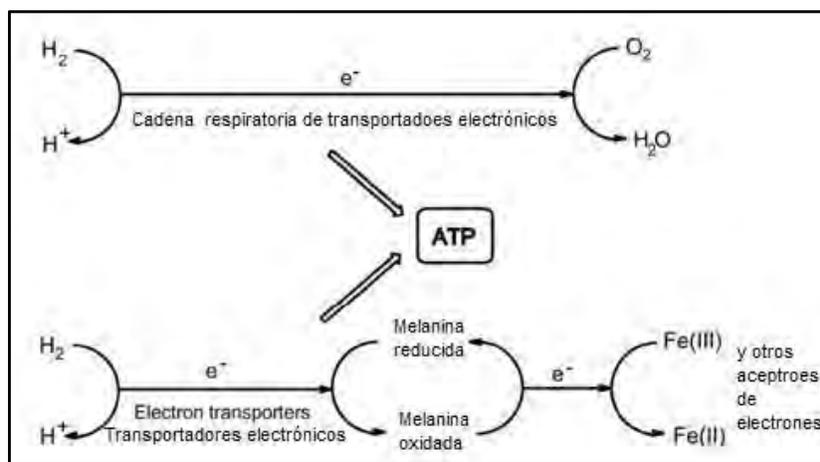
En base a los resultados obtenidos en estos experimentos los autores proponen que en estos organismos la presencia de melanina les permite transformar la energía de la radiación en

energía disponible para el uso metabólico. Esta energía puede ser utilizada directamente para el crecimiento celular. Los autores proponen que este fenómeno ocurre por la capacidad de la melanina de capturar un amplio espectro de radiación electromagnética, en conjunto con sus propiedades de óxido-reducción (Dadachova *et al.*, 2007). Este mecanismo, que podría denominarse “foto/radio-síntesis”, es similar a la fotosíntesis dado que utiliza un pigmento para transformar la energía electromagnética en energía metabólica y sus detalles aún están por descubrirse.

Al igual que en los hongos, la producción de melanina se ha asociado a la patogénesis en ciertas especies de bacterias. En algunos géneros que contienen tanto bacterias parásitas como de vida libre, se ha reportado la síntesis tanto de eumelanina y de piomelanina, las cuales incluso pueden estar simultáneamente activas en el mismo organismo. En el patógeno *Burkholderia cepacia*, una bacteria que produce infecciones pulmonares peligrosas, se ha relacionado la presencia de melanina con la resistencia a especies reactivas de oxígeno producidas durante la respuesta inmune del hospedero. Dada esta capacidad, *B. cepacia* puede sobrevivir a la fagocitosis y proliferar dentro de las células del sistema inmune (macrófagos). Este fenómeno causa la destrucción del macrófago y la liberación del microorganismo, el cual subsecuentemente es fagocitado e induce la destrucción de más macrófagos. En bacterias del género *Vibrio*, se ha visto que los genes involucrados en la producción de melanina están regulados de forma similar a sus demás factores de virulencia, lo que sugiere la participación de este proceso en su patogénesis (Plonka & Grabacka, 2006).

Se ha propuesto que en la bacteria Gram-negativa *Shewanella algae* la melanina puede funcionar como aceptor de electrones que suplantando el oxígeno molecular en el último paso de la cadena de transporte de electrones (Figura 24). Por el hecho de que la melanina posee

numerosos grupos químicos capaces de donar y aceptar electrones, puede funcionar como un aceptor final, o como un *shuttle* en el intercambio de electrones con compuestos insolubles de hierro (Fe). *S. algae* es una bacteria facultativamente anaerobia. Se ha visto que esta bacteria produce melanina y la reduce de manera simultánea mediante la oxidación del hidrógeno gaseoso. Una vez que ha aceptado un gran número de electrones, la melanina le sirve a la bacteria como un reductor de óxidos férricos (III) a su estado ferroso (II). La producción de melanina le provee de una ventaja adaptativa a este organismo dada su incapacidad de llevar a cabo la fermentación y el hecho de que en su ambiente natural (los depósitos mineralizados marinos), la disponibilidad de oxígeno y de aceptores de electrones es limitada (Turick *et al.*, 2002; Plonka & Grabacka, 2006).



**Figura 24.** Función de la melanina como un aceptor de electrones en la cadena respiratoria de la bacteria marina *Shewanella algae* en comparación con la variante aeróbica del proceso (Tomado de Plonka & Grabacka, 2006).

En el caso de la bacteria Gram-negativa *Azotobacter chroococcum*, un organismo capaz de fijar nitrógeno en vida libre, se ha propuesto un modelo según el cual el proceso de melanogénesis puede estar involucrado en la fijación de nitrógeno en condiciones aeróbicas mediante el aumento en la utilización de oxígeno y la protección contra sus

especies reactivas. Cuando se hace crecer a esta bacteria en condiciones de fijación de nitrógeno y aereación relativamente alta, produce catecol y subsecuentemente melanina derivada del mismo. La mayor cantidad de melanina es producida en condiciones relativamente altas de aereación, mientras que esta no se observa bajo condiciones de limitación de oxígeno. Por otra parte, en presencia de  $\text{NH}_4^+$  (cuando la nitrogenasa es reprimida), la producción de catecol y melanina también son reprimidas. Los autores proponen que el proceso de formación de catecol y de melanización podría ser un sistema de protección contra el oxígeno importante durante la fijación de nitrógeno en condiciones aeróbicas. Por otra parte, dado que las bacterias del género *Azotobacter* poseen normalmente una tasa respiratoria alta, se espera que consecuentemente produzcan más especies reactivas de oxígeno y los autores proponen que la melanina podría estar también involucrada en la detoxificación de estas especies reactivas (Shivprasad & Page, 1989; Plonka & Grabacka, 2006).

### ***La importancia de la melanina en el proceso evolutivo***

Al ser el principal pigmento presente en el pelo y la piel de los mamíferos y uno de los dos principales de las plumas de las aves, la melanina participa en fenómenos importantes desde el punto de vista evolutivo. El camuflaje y el ornamento del animal son los principales (Hill, 1992). En el caso de los mamíferos y las aves, se aplica generalmente la “regla de Gloger”, según la cual los organismos que viven en ambientes húmedos son por lo general más oscuros mientras que aquellos que viven en zonas desérticas son de colores más claros y en las zonas árticas de colores cercanos al blanco (Cesarini, 1996; Price, 2006). En el caso de las aves de Norteamérica se ha encontrado que esta “regla” está fuertemente respaldada, ya que en un sondeo se encontró que se cumple en 50 de 52 casos

evaluados. Por otra parte, en las aves existen patrones de melanina que están generalmente asociados a interacciones sociales: la condición o estatus de dominancia del individuo está relacionado con el tamaño del parche de melanina. En el caso del gorrión común *Passer domesticus*, que posee un parche de melanina en el pecho, se ha visto que los individuos que se involucran en mayor número de interacciones agresivas entre sí desarrollan un “parche” de melanina de mayor tamaño. Por otra parte también se ha visto que gorriones inyectados con testosterona también desarrollan un parche de mayor tamaño, por lo que se ha propuesto que existe una relación directa entre el número de interacciones agresivas, los niveles de testosterona y el tamaño del parche de melanina. Existen muchos otros ejemplos de este fenómeno en otras especies. En experimentos de en los que se han pintado experimentalmente los parches de melanina y modificado su tamaño se ha visto que esto conlleva a una alteración de la dominancia del macho dentro del grupo (Price, 2006).

En el caso de algunos anfibios y reptiles, el arreglo de los melanosomas puede ser modificado mediante un control hormonal. Los melanosomas presentes en células análogas a los melanocitos denominadas melanóforos pueden agregarse para generar una coloración clara del animal, mientras que también pueden dispersarse, volviéndolo más oscuro (Hill, 1992; Césarini, 1996).

En los calamares (*Sepia officinalis*), la “tinta” que liberan cuando se encuentran en condiciones de estrés es casi completamente eumelanina. En este organismo la producción de melanina está relacionada con el camuflaje, el animal libera la tinta al medio como un mecanismo de escapatoria ante sus depredadores por lo que la producción de melanina le provee de una ventaja adaptativa en el medio marino (Hill, 1992).

La melanogénesis ha sido estudiada principalmente en los animales y en el ser humano, y aun se sabe poco sobre este proceso y sus funciones en los microorganismos. El

entendimiento de las funciones biológicas relacionadas con la producción de melanina en las bacterias probablemente ayudara a elucidar el contexto evolutivo en el que se originó este proceso (Plonka & Grabacka, 2006). Aun así, se ha propuesto que la feomelanina apareció primero que la eumelanina, durante las primeras etapas de la vida sobre la tierra. Posteriormente con el aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera y el origen de las tirosinasas se originó la síntesis de eumelanina (Cesarini, 1996).

### **1.3 *Rhizobium***

La capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4$ ) está restringida a los procariontes y puede encontrarse tanto en *Archeobacteria* como en *Eubacteria*. Dentro de las Eubacterias pueden encontrarse organismos que llevan a cabo esta reacción en vida libre (por ejemplo *Klebsiela*, *Azotobacter* y *Rhodobacter*), al igual que otros que la realizan a través de una asociación estrecha con las plantas (por ejemplo *Azospirillum* spp), o mediante una simbiosis intracelular altamente regulada (por ejemplo *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) (Fischer, 1994). La maquinaria enzimática encargada de la fijación de nitrógeno, en específico la enzima nitrogenasa, es sensible al oxígeno y por lo tanto la reacción no se puede llevar a cabo en condiciones aeróbicas (Prescot, *et al.*, 1999)

Las bacterias del género *Rhizobium* establecen una relación simbiótica con plantas de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) e inducen la formación de nódulos en sus raíces. En estos nódulos la planta expresa una proteína muy similar a la hemoglobina de los mamíferos, denominada Leghemoglobina. Esta proteína es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno y es utilizada por la planta para crear un ambiente libre de oxígeno en los nódulos, permitiendo así la fijación de nitrógeno. La bacteria se beneficia teniendo un lugar donde vivir y obteniendo nutrientes de la planta, mientras que la planta se beneficia

de los compuestos nitrogenados sintetizados por la bacteria (Prescot *et al.*, 1999; Nelson & Cox, 2005). En *Rhizobium* los genes involucrados en la fijación de nitrógeno generalmente se encuentran codificados en plásmidos o islas simbióticas dentro del cromosoma (González *et al.*, 2003).

La capacidad de producir melanina ha sido reportada en varias especies de *Rhizobium*. Cubo *et al.*, (1988) realizaron un estudio preliminar en el que evaluaron la capacidad de producir melanina de diferentes especies de *Rhizobium* crecidas en medio rico (TY) con tirosina y CuSO<sub>4</sub>. Encontraron que *R. leguminosarum* biovars *viceae*, *trifolii*, y *phaseoli*, al igual que *R. meliloti* GR105, y *R. fredii* USDA205 son capaces de producir melanina en este medio. Más adelante, en estudios posteriores, se reportó la capacidad de producir melanina de *R. meliloti* GR4 y de *R. etli* CFN42 (Mercado-Blanco, *et al.*, 1993; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006).

En el género *Rhizobium* las tirosinasas se encuentran codificadas en plásmidos. Un aspecto interesante que puede derivarse de estos estudios es el hecho de que las tirosinasas en *Rhizobium* pueden estar codificadas tanto en plásmidos simbióticos como en plásmidos no simbióticos. En el caso de *R. leguminosarum* biovars *viceae*, *trifolii* y *phaseoli*; *R. meliloti* GR105; y *R. etli* CFN42, los genes relacionados con la producción de melanina se encuentran en sus respectivos plásmidos simbióticos (Cubo, *et al.*, 1988). Por otra parte tanto en *R. fredii* como en *R. meliloti* GR4, los genes encargados de la producción de melanina se encuentran en plásmidos no simbióticos, (Mercado-Blanco, *et al.*, 1993; Cubo, *et al.*, 1988).

En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* se sabe que el gen *mela* está regulado por el factor de transcripción NifA. Las mutantes en *nifA* son incapaces de producir melanina a pesar de tener un gen que codifica para la tirosinasa intacto. En un estudio en el que se utilizaron

cepas de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* mutantes en *nifA* y las transformaron con un plásmido en el que estaba contenido el gen *nifA* de *Klebsiella pneumoniae*, encontraron que el fenotipo melanogénico se restauraba en las cepas transformadas. El hecho de que el gen *melA* esté regulado por NifA sugiere que la producción de melanina está relacionada de alguna forma con la fijación de nitrógeno. Por otra parte, se sabe que las cepas *melA*<sup>-</sup> son capaces de tanto de fijar nitrógeno como de inducir la formación de nódulos normales en *Phaseolus* (Borthakur *et al.*, 1987; Hawkins & Johnston, 1988).

## II. Antecedentes

Durante la secuenciación del plásmido p42d de *Rhizobium etli* CFN42 se reveló la presencia de una posible fenoloxidasas codificada por el gen *mela* (González *et al.*, 2003). En el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM se han llevado a cabo una serie de estudios relacionados con el gen *mela* de *Rhizobium etli*.

### 2.1 Expresión del gen *mela* y caracterización de la tirosinasa codificada por el mismo

Cabrera Valladares *et al.*, (2006) amplificaron mediante PCR el gen *mela* a partir del DNA total de *Rhizobium etli* y lo expresaron en *Escherichia coli* bajo el control del promotor fuerte inducible *trc*, contenido en el vector de expresión pTrc99A. Después de 24 horas de cultivo, observaron un pigmento oscuro y capaz de difundirse en el medio en las células que habían sido cultivadas a 30 °C, mientras que en aquellas cultivadas a 37°C se detectó únicamente una pequeña cantidad de pigmento al cabo de 48 horas. Para caracterizar el pigmento producido por la cepa recombinante, pusieron a crecer a la cepa en medio mineral líquido y lo aislaron de la misma. Determinaron el espectro de absorción en el intervalo de 200 a 800nm y al compararlo con el espectro obtenido a partir de un estándar de eumelanina (Sigma, St. Louis) encontraron que era casi idéntico. Llegaron a la conclusión de que el pigmento producido era eumelanina, y por lo tanto, de que la enzima codificada por el gen *mela* es una tirosinasa.

Posteriormente purificaron la enzima para evaluar algunas de sus propiedades bioquímicas. Evaluaron el efecto del pH y la temperatura en la actividad de L-dopa oxidasa de la proteína. Llegaron a la conclusión de que el intervalo de pH en el que la enzima tiene

mayor actividad es cerca de la neutralidad, entre 6.5 y 7.5. En el caso de la temperatura, la tirosinasa de *Rhizobium* tiene su mayor actividad relativa a 50°C, al igual que la del humano, y similar a la de las acículas de pino (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006) .

También evaluaron la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas. Demostraron que a temperaturas mayores a 30°C la estabilidad es significativamente menor. La enzima es estable al menos 24 horas a 30°C, mientras que a 37°C su vida media es de 3.9 horas. A 50°C, la temperatura en la que la tirosinasa tiene mayor actividad relativa, su vida media es únicamente de 1.87 horas. Esto provee una explicación parcial de la incapacidad de sintetizar melanina en los cultivos tanto sólidos como líquidos a 37°C (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006) .

En cuanto a la afinidad y especificidad por el sustrato, encontraron que la tirosinasa Mela tiene una cinética enzimática de tipo Michaelis-Menten al utilizar tanto tirosina como L-dopa como sustratos. Tiene un valor de Km similar al de otras tirosinasas de microorganismos que han sido caracterizadas tanto para L-dopa como para tirosina. Probaron la capacidad de oxidar diversos compuestos fenólicos (monohidrofenoles, dihidrofenoles y trihidrofenoles). De estos, encontraron que la tirosinasa es capaz de oxidar L-tirosina, L-tirosina etil éster, N-acteil-tirosina, L-DOPA, ácido caffeico y catecol. Encontraron también que además de estos sustratos la tirosinasa de *Rhizobium* es capaz de oxidar otros compuestos celulares tales como el piruvato, el acetato, el lactato, la glicina y la acetamina, formando compuestos de colores amarillo de distintas intensidades, al igual que el fenol y el hidroxamato, a partir de los cuales se forman pigmentos de colores rosados (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006).

Otra de las conclusiones que derivaron de este trabajo es el hecho de que durante el plegamiento y la incorporación de los dos átomos de cobre al sitio activo de la proteína no

se requiere de una chaperona. Al crecer a las células en medio sin sulfato de cobre y posteriormente romper las células cultivadas, observaron que el extracto celular carecía de actividad de tirosinasa. Determinaron también la actividad del extracto al añadir sulfato de cobre e incubarlo por una hora a 30°C. Este había recuperado el 8% de la actividad de tirosinasa con respecto a la actividad determinada a partir de un extracto de células crecidas en presencia de cobre. Por lo tanto, se demostraron que a diferencia de otras tirosinasas en las que es esencial una chaperona para la incorporación de cobre al sitio activo, como la de *Streptomyces* o la humana, la tirosinasa de *Rhizobium* es capaz de incorporar por si misma los átomos de cobre. Por otra parte, el hecho de que no se haya logrado recobrar por completo la actividad sugiere que la mayor parte de incorporación de cobre ocurre durante su síntesis (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006).

## **2.2 El papel de la tirosinasa de *Rhizobium etli* en la eficiencia de nodulación y la resistencia al estrés asociado con la simbiosis**

En otro trabajo, Piñero *et al.*, (2007) evaluaron el papel de *mela* en el establecimiento de la simbiosis entre *R. etli* y *Phaseolus vulgaris* al igual que su relación con los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno en este microorganismo. Generaron una cepa mutante *mela*- de *R. etli* en la que se interrumpió el gen *mela* a través de la inserción de un gen de resistencia a antibiótico. También se generaron otra cepa en la que se complementó a la cepa mutante con el gen *mela* (Piñero *et al.*, 2007).

Inocularon a plantas de manera separada con la cepa silvestre, la cepa mutante en *mela* y la cepa complementada y determinaron la cinética de nodulación durante un periodo de 23 días. Encontraron que a los nueve días después de la inoculación, cuando los nódulos comienzan a ser visibles, las plantas inoculadas con la cepa silvestre habían producido 10

nódulos, mientras que las que habían sido inoculadas con la cepa mutante únicamente habían producido 1.5 nódulos. La tasa de nodulación de la cepa mutante es inferior a la silvestre, mientras que la de la cepa complementada es similar a la silvestre. Por otra parte, las plantas inoculadas con la cepa mutante no alcanzaron el mismo número de nódulos que las que habían sido inoculadas con la cepa silvestre (Piñero *et al.*, 2007).

Posteriormente realizaron un ensayo para evaluar si la tirosinasa le provee de una ventaja competitiva en el proceso de establecimiento en los nódulos de *Phaseolus*. Inocularon a plantas de manera simultánea con la cepa silvestre y la cepa mutante y a los quince días recolectaron los nódulos, los trituraron, y los plaquearon en cajas de medio PY. Cuantificaron las colonias y calcularon la proporción de los nódulos que ocupaban las dos cepas. Encontraron que la mayor proporción de los nódulos eran ocupados por la cepa silvestre (45%), mientras que una menor proporción de los nódulos era ocupada por la cepa mutante (28%), y otra fracción era ocupada por una mezcla de ambas cepas (27%) (Piñero *et al.*, 2007).

Evaluaron también la relación que juega *melA* en el proceso de fijación de nitrógeno en los nódulos de *P. vulgaris*. Inocularon a plantas de *P. vulgaris* con las tres cepas, y a los 32 días recuperaron las raíces y les determinaron la actividad de reducción de acetileno. Encontraron que las plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas eran indistinguibles en su capacidad de reducir el acetileno. Por esto concluyeron que la actividad de tirosinasa no es esencial en el proceso de fijación de nitrógeno, lo cual concuerda con estudios realizados anteriormente en *R. leguminosarum*, donde encontraron que las cepas *mel-* son capaces de fijar nitrógeno (Piñero *et al.*, 2007).

Más adelante, generaron la hipótesis de que la producción de melanina en la interacción *Rhizobium-Phaseolus* podría servir como un sistema de protección para el microsimbionte

ante la respuesta oxidativa de la planta, dado que este compuesto es capaz de “secuestrar” especies reactivas de oxígeno. Para evaluar esta hipótesis realizaron un ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno en las tres cepas. Utilizaron discos de papel filtro saturados con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los colocaron en el centro de cajas petri previamente inoculadas con cada una de las cepas con la misma concentración de células. Midieron los halos de inhibición generados alrededor del disco con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las tres cepas a las 48 horas de incubación a 30°C. Se dieron cuenta que la zona de inhibición que se formaba en las cajas inoculadas con la cepa mutante *melA*<sup>-</sup> era mayor a la que se formaba tanto en las cajas que habían sido inoculadas con la cepa silvestre, como en las que habían sido inoculadas con la cepa complementada. Por lo tanto propusieron que durante la respuesta oxidativa de la planta, la formación de melanina le provee a la bacteria de un sistema de protección ante especies reactivas de oxígeno. Esto probablemente ocurre en conjunto con otros sistemas, ya que la cepa con el gen de la tirosinasa interrumpido solo es ligeramente afectada y es capaz de formar nódulos normales (Piñero *et al.*, 2007).

Por último, evaluaron si la expresión heteróloga de la tirosinasa de *Rhizobium* en *E. coli* le confería resistencia a ácidos fenólicos a los cuales normalmente es sensible. Para esto, utilizaron cuatro ácidos que se encuentran comúnmente en el suelo (ácido p-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido vanílico y ácido siríngico). Evaluaron la inhibición del crecimiento de *E. coli* generada por diferentes concentraciones de estos ácidos en el medio a las 24 horas de cultivo, en relación con su crecimiento en ausencia de ácidos fenólicos. Utilizaron células de *E. coli* expresando el gen *melA* a través del vector de expresión pTrc*melA* y lo compararon con bacterias que contenían el vector de expresión sin el gen *melA* (pTrc99A). Observaron que la cepa de *E. coli* que contenía el vector de expresión sin el gen es sensible a todos los ácidos probados mientras que en la cepa con el

mismo vector con el gen *melA* de *R. etli* el crecimiento se recupera casi por completo con todos los ácidos probados excepto con el ácido ferúlico (Piñero *et al.*, 2007).

Concluyeron que la tirosinasa codificada por el gen *melA* de *R. etli* es importante durante el establecimiento de la simbiosis con *P. vulgaris*. Por otra parte, también demostraron que no es necesaria para la fijación de nitrógeno en este microorganismo. Los autores proponen que esta enzima actúa protegiendo a *R. etli* de las respuestas de defensa de la planta, lo que es respaldado por la sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrada por la cepa *melA*<sup>-</sup> y el hecho de que la presencia de esta enzima le confiere resistencia a ácidos fenólicos a *E. coli* recombinante (Piñero *et al.*, 2007).

### **2.3 Evaluación de las condiciones óptimas de producción de melanina utilizando *Escherichia coli* recombinante**

Posteriormente, Lagunas-Muñoz, *et al.*, (2006) realizaron un estudio en el que evaluaron los factores que influyen en la producción de melanina por *Escherichia coli* recombinante y determinaron las condiciones óptimas para la conversión de tirosina en melanina en ésta bacteria. Los factores que evaluaron fueron: la temperatura, el pH durante la fase estacionaria, la concentración de antibiótico (ampicilina) y la concentración del inductor (IPTG).

Encontraron que la temperatura es un factor que afecta la producción de melanina considerablemente en esta bacteria. Realizaron cultivos en intervalos de temperatura entre 25°C y 35°C. Encontraron que la producción de melanina era mayor a 30°C que en el resto de las condiciones. Por otra parte, a 35°C la tasa de producción de melanina, al igual que el total de melanina producida se reducen drásticamente. El pH en la fase estacionaria también es un factor que influye en la síntesis de melanina. Para evaluar su efecto, los

autores realizaron un cultivo que fue fraccionado durante el inicio de la fase estacionaria y posteriormente el pH fue ajustado a distintos valores en las diferentes fracciones del cultivo. Encontraron que la síntesis de melanina se ve favorecida en el intervalo de pH entre 7.0 y 8.0 mientras que su síntesis disminuye drásticamente en valores de pH menores a 7 o mayores de 8 (Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006).

Los autores realizaron también cultivos con dos diferentes concentraciones de antibiótico (ampicilina) con el fin de evaluar el efecto de las concentraciones del mismo en la producción de melanina. Encontraron que de las dos concentraciones probadas (100 y 200ug/ml), la producción de melanina era mayor a 200ug/mL. Para evaluar el efecto de la concentración del inductor los autores realizaron cultivos con distintas concentraciones de IPTG (0.001, 0.1 y 1 mmol). Encontraron que la producción de melanina fue mayor cuando el inductor estaba presente en una concentración de 0.1 mmol respecto del resto de las concentraciones (Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006).

Los autores también observaron que a pesar de que la tirosinasa es producida durante la fase de crecimiento y los iones de cobre se encuentran presentes desde el inicio del cultivo, la síntesis de melanina se lleva a cabo únicamente durante la fase estacionaria del cultivo. Los autores proponen que este fenómeno podría ser resultado de una represión catabólica en el importe de tirosina (Lagunas-Muñoz, Cabrera-Valladares, *et al.*, 2006).

Utilizando las condiciones óptimas de las variables evaluadas en los experimentos previamente descritos, los autores diseñaron un método para producir melanina en esta bacteria con la finalidad de probar su desempeño en la producción de grandes cantidades de melanina. El método consiste en la adición de un “pulso” de melanina al inicio de la fase estacionaria. Dado que no encontraron una disminución en la tasa de síntesis de melanina,

los autores sugieren que adiciones posteriores de tirosina continuarían siendo transformadas en melanina (Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006).

La evaluación de las condiciones óptimas de cultivo para la producción de melanina en esta bacteria, al igual que el uso de experimentos de pulso les permitió obtener un valor dos veces mayor del máximo de producción de melanina reportado hasta el momento, utilizando un método sencillo y de bajo costo (Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006).

## **2.4 Generación y caracterización de mutantes del gen *mela***

El estudio más reciente realizado en el laboratorio y que sienta las bases de este trabajo fue realizado por Robledo-Arratia (2008), en su tesis de licenciatura. En este trabajo se llevó a cabo una mutagénesis al azar del gen *mela* mediante el uso de una metodología modificada de reacción en cadena de polimerasa (PCR). En esta metodología se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa, que es la DNA polimerasa termoestable con la mayor tasa de error que se conoce. Para incrementar aún más la tasa de mutaciones de la reacción, utilizó concentraciones distintas de los deoxinucleósidos fosfatados (dNTPs): utilizó dATP y dGTP en una menor proporción que dCTP y dTTP. Una baja concentración de dATP aumenta la tasa de mutaciones, mientras que el desbalance de los dNTPs aumenta aun más la probabilidad de la polimersa de cometer errores durante la polimerización. A la reacción también se añadieron compuestos que reducen la fidelidad de la DNA polimerasa al disminuir su especificidad por la cadena molde, como el dimetil sulfóxido (DMSO) y el cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ). Se utilizó también cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) en una proporción mayor de la que se emplea en una PCR típica, dado que a concentraciones elevadas permite la estabilización de pares de bases no complementarias. El resultado fue la

generación de un banco de versiones mutantes del gen *melA* donde cada molécula resultante posee al menos un cambio en su secuencia nucleotídica.

Utilizó el banco generado para buscar mutantes que comenzaran a sintetizar melanina antes y que produjeran más que la cepa con el gen silvestre. Dado que en estudios anteriores se había observado que la producción de melanina se ve afectada a temperaturas mayores de 30°C, realizó la búsqueda de mutantes a tres temperaturas diferentes: 30, 37 y 42 °C con la finalidad de encontrar mutantes capaces de producir melanina a estas temperaturas. Al igual que ocurre con la enzima silvestre, ninguna de las cepas con enzimas mutantes fue capaz de producir melanina a temperaturas mayores de 30°C. Seleccionó una serie de mutantes por su capacidad de producir melanina antes que la cepa con el gen silvestre y por su capacidad de adquirir tonalidades más oscuras en medio sólido a 30°C. Las mutantes también fueron caracterizadas en distintos medios líquidos. Una de las mutantes, MutX*melA*, fue más eficaz en la producción de melanina que la cepa con la tirosinasa silvestre de *Rhizobium etli* en todos los medios analizados (Robledo-Arratia, 2008).

Los genes mutantes fueron secuenciados para analizar los cambios que contenían. En la mutante MutX*melA* se produjo un cambio que conlleva a la sustitución de la alanina 372 por una treonina. Este cambio se encuentra cerca del sitio de unión a cobre CuB, por lo que el autor propone que probablemente ejerce su efecto modificando la estructura del mismo. Un resultado interesante fue el hecho de que a pesar de tener una capacidad mejorada de síntesis de melanina, al analizar sus secuencias nucleotídicas algunas mutantes no tenían cambios que tuvieran como consecuencia un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Este hecho muestra que estos cambios en la actividad de la tirosinasa podrían estar relacionados con la estabilidad de los transcritos del gen. Por otra parte, la eficiencia de la mutagénesis llevada a cabo en este estudio se comprobó por el hecho de que tanto las

cepas con enzimas mutantes que fueron seleccionadas por su capacidad mejorada de producción de melanina como colonias tomadas al azar presentan cambios en su secuencia de DNA (Robledo-Arratia, 2008).

A partir de este trabajo se obtuvo un banco de mutantes del gen *melA* que puede ser utilizado para buscar diversos fenotipos mutantes de la enzima, para estudiar el gen *melA*, al igual que para el estudio de las relaciones estructura-función de la enzima MelA. Por otra parte, también se obtuvo una enzima mutante de la tirosinasa de *R. etli*, que dada su capacidad mejorada de producción de melanina tiene el potencial de ser utilizada con fines de producción biotecnológica de este compuesto (Robledo-Arratia, 2008).

### **III. Hipótesis**

Dentro del banco de mutantes del gen *mela*, existirán algunas versiones mutantes del gen que codifiquen tirosinasas capaces de polimerizar sustratos distintos a la tirosina.

Dados los resultados obtenidos al evaluar la primera hipótesis, surgió una segunda hipótesis:

Un marco abierto de lectura más corto del gen *mela* produce una proteína que mantiene su actividad de tirosinasa.

## IV. Objetivos

- Obtener mutantes del gen *mela* que codifiquen tirosinasas capaces de polimerizar sustratos diferentes de la tirosina.
- Expresar el marco abierto de lectura corto hipotético del gen *mela* y verificar la actividad de la proteína codificada por el mismo.

### 4.1 Objetivos particulares

- Utilizar el banco de mutantes del gen *mela* para seleccionar cepas con tirosinasas mutantes capaces de polimerizar ácido cumárico.
- Utilizar el banco de mutantes del gen *mela* para seleccionar cepas con tirosinasas mutantes capaces de polimerizar ácido parahidroxibenzóico.
- Caracterizar las cepas seleccionadas tanto fenotípica- como genotípicamente.
- Subclonar el marco abierto de lectura corto hipotético del gen *mela*.
- Evaluar si la enzima codificada por el marco abierto de lectura corto hipotético del gen *mela* posee actividad de tirosinasa.

## V. Metodología

### 5.1 Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio al igual que los plásmidos utilizados y contruidos se muestran en la tabla A.

**Tabla A.** Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Descripción	Fuente
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> W3110	F-, λ-, INV ( <i>rnnD-rnnE</i> ) 1, RecA+, Trp+, Lac+	Jensen, 1993

Plásmido	Características	Referencia
pTrc99A	Amp <sup>R</sup> , Vector de mediano número de copias, tiene el origen de replicación del vector pBR322 (ColE1). Permite expresar genes bajo el control del promotor fuerte <i>trc</i> inducible por IPTG.	Ammann <i>et al.</i> , 1988
pTrcmelA	Derivado del pTrc99A, posee el gen <i>mela</i> silvestre en el sitio de clonación	Cabrera-Valladares <i>et al.</i> , 2006

	múltiple.
pTrcMut <i>melA</i>	Derivado del pTrc99A, posee una Cabrera-Valladares, versión mutante del gen <i>melA</i> en el <i>et al.</i> , 2006 sitio de clonación múltiple.
pTrc <i>melA</i> MutX	Derivado del pTrc99A, posee una Robledo-Arratia, versión mutante del gen <i>melA</i> en el 2008 sitio de clonación múltiple.
ptrc <i>melA</i> MutPCA	Derivado del pTrc99A, posee una Este trabajo versión mutante del gen <i>melA</i> en el sitio de clonación múltiple.
ptrc <i>melA</i> MutPHB	Derivado del pTrc99A, posee una Este trabajo versión mutante del gen <i>melA</i> en el sitio de clonación múltiple.
pTOPO <i>melA</i> VC	Derivado del pCR-Blunt II-TOPO, Este trabajo posee el marco abierto de lectura del gen <i>melA</i> .
ptrc <i>melA</i> VC	Derivado del pTrc99A, posee el Este trabajo marco abierto de lectura más corto del gen <i>melA</i> en el sitio de clonación múltiple.

## 5.2 Medios de cultivo

En este estudio se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio enriquecido Luria Bertani (LB): 10 g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl.

Medio mineral M9: 6g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g/L de NaCl, 3g/L deKH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 246.5mg/L de MgSO<sub>4</sub>, 14.7mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 10ug/mL de vitamina B1 y 2g/L de glucosa al 20%.

Medio SOC: 20g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5g/L de MgSO<sub>4</sub>, 2g/L de MgCl<sub>2</sub>, 0.58g/L de NaC y 93.18mg/L de KCl.

### **5.3 Desarrollo del inóculo**

Los cultivos celulares se iniciaron con un pre-inóculo en tubos de vidrio estériles con 5mL de medio LB suplementado con ampicilina a 37°C con agitación de 300rpm durante ocho horas. Posteriormente se tomó una muestra del pre-inóculo para iniciar el cultivo del inóculo a 0.1 DO<sub>600nm</sub> en matraces bafleados de 125mL con 20mL de medio mineral M9 adicionado con ampicilina a 37°C por 18 horas o hasta que los cultivos alcanzaran 2 DO a DO<sub>600nm</sub>. Se utilizó una muestra de este inóculo para iniciar los cultivos a 0.1 DO DO<sub>600nm</sub>.

### **5.4 Condiciones de cultivo**

Los cultivos celulares utilizados para la determinación de la cinética de crecimiento y producción de melanina se realizaron en una incubadora C24KC (New Brunswick Scientific, Nueva Jersey) a 30°C y con una agitación de 300 rpm. Independientemente del sustrato de la tirosinasa usado, los cultivos celulares se realizaron en matraces bafleados de 250mL con 50mL de medio mineral M9 suplementados con 0.2 g/L de glucosa, 40μg/mL de sulfato de cobre, 200 μg/mL ampicilina y 0.1 mmol de IPTG. Los cultivos se iniciaron a 0.1 DO<sub>600nm</sub>.

En el caso de los cultivos realizados utilizando tirosina como sustrato de la tirosinasa se utilizó una concentración de 0.4g/L de tirosina, mientras que en los cultivos realizados con

ácido cumárico y ácido para-hidroxibenzóico como sustratos los cultivos se realizaron a una concentración de 0.2 g/L de estos compuestos.

## **5.5 Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de melanina**

El crecimiento bacteriano se determinó en función de la turbidez, midiendo la  $DO_{600nm}$  utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-70. Al comenzar la síntesis de melanina, el pigmento empieza a interferir con la determinación del crecimiento bacteriano a 600nm. Por esta razón, el valor de la  $DO_{600nm}$  se determinó restando el valor de  $DO_{600nm}$  del sobrenadante libre de células a la absorbancia a 600nm de la muestra del cultivo con células.

La determinación de la síntesis de melanina se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 400nm de los sobrenadantes libres de células de muestras del cultivo. En el caso de la eumelanina, los valores de absorbancia a 400nm fueron transformados a peso seco de eumelanina utilizando la siguiente relación  $1 DO_{400nm} = 0.0676 \text{ g/L de eumelanina}$ . Este valor es el inverso del coeficiente de extinción de la eumelanina ( $14.8 \text{ cm}^{-1} \text{ g/L}^{-1}$ ) (Lagunas-Muñoz, *et al.*, 2006).

## **5.6 Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante**

### **5.6.1 Purificación de DNA**

El DNA plasmídico se extrajo utilizando la técnica de lisis alcalina según lo descrito por Sambrook, *et al.* (1989), o mediante la utilización del kit Miniprep (Invitrogen, Carlsbad) como lo describen sus fabricantes. La purificación de productos de PCR se llevó a cabo utilizando el kit PCR Purification (Marligen Bioscience, Rockville).

### 5.6.2 Transformación bacteriana

El DNA se incorporó a *E. coli* por medio de la técnica de electroporación utilizando un electroporador marca Eppendorf modelo 2510 a 2,500 volts (Eppendorf, Hamburgo). Las células se recuperaron en medio SOC a 37°C por aproximadamente 2 horas.

### 5.7 Selección de mutantes capaces de polimerizar ácido cumárico y ácido hidroxibenzóico

Con el fin de obtener tirosinasas mutantes capaces de polimerizar sustratos distintos a la tirosina se utilizó una muestra del banco de mutantes del gen *melA* previamente generado por Robledo-Arratia (2008), para electroporar a la cepa *E. coli* XL1-Blue. Las transformantes fueron sembradas en placas de petri con medio selectivo sólido LB suplementado con 0.4g/L de ácido cumárico, 200 µg/mL ampicilina, 40mg/ml de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mM IPTG. Las placas se incubaron a 30°C. En base a la coloración más oscura de algunas colonias respecto del resto, se seleccionaron diez colonias. El mismo procedimiento se utilizó para seleccionar diez colonias en placas de petri con medio selectivo sólido LB suplementado con 0.4g/L de ácido parahidroxibenzóico, 200 µg/mL ampicilina, 40mg/ml de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mM IPTG. De las diez colonias seleccionadas en cada sustrato, se seleccionaron dos por presentar un fenotipo más oscuro que el resto. Se realizó una cinética de crecimiento y producción de melanina de las dos cepas escogidas para cada sustrato con el fin de escoger una mutante final para cada uno de ellos (datos no mostrados). A la mutante final seleccionada en ácido cumárico se le denominó *E.coli* XL1 Blue *ptrcmelAMutPCA*, mientras que a la mutante final seleccionada en ácido parahidroxibenzóico se le denominó *E. coli* XL1 Blue *ptrcmelAMutPHB*.

Con el fin de expresar los genes mutantes en el mismo contexto genético que las cepas *E. coli* W3110 *ptrcmelA* y *E. coli* W3110 *ptrcMutmelA* y que los resultados de las cinéticas de

crecimiento y producción de melanina fueran comparables con estas, se extrajo el plásmido de las cepas seleccionadas, al igual que el de la cepa *E. coli* XL1Blue ptrcMutXmelA previamente seleccionada por Robledo-Arratia (2008). Estos plásmidos se utilizaron para transformar a la cepa *E. coli* W3110, obteniendo las siguientes cepas: *E. coli* W3110 ptrcmelAMutPCA, *E. coli* W3110 ptrcmelAMutPHB y *E. coli* W3110 ptrcMutXmelA.

### 5.8 Secuenciación de las versiones mutantes del gen *mela*

Las versiones mutantes del gen *mela* seleccionadas fueron secuenciadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método de secuenciación *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing* utilizando un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. La secuenciación se llevo a cabo utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla B exceptuando el oligonucleótido melA5corta.

**Tabla B. Oligonucleótidos utilizados en este estudio y sus secuencias nucleotídicas.**

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
3melA	5' CCG GAG <u>CCC GGG</u> TGT TAG GCG GAC AC 3'
SEC2melA	5' ACG GCA GCG GTG ACG TCG TC 3'
SEC3melA	5' ATT GTC CTT GCC GTC GGG CG 3'
SEC4melA	5' ATC GGT GGC TGG ATG CCG GA 3'
5melA	5' CCG AAC GTC CAT GGC GTG GCT GGT CGG C 3'

melA5corta	5' GGA GAG TAC <b>CAT GGC</b> TAT CAC ACG CAG ACA 3'
MtyrA3	5' CTG TAT CAG GCT GAA AAT CTT CTC TCA TCC 3'
MtyrA5	5' GTA TAA TGT GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC 3'

---

El sitio de restricción de la enzima *SmaI* se muestra subrayado y en negritas se muestran los sitios de restricción de la enzima *NcoI*.

## 5.9 Evaluación de la actividad del marco abierto de lectura corto del gen *melA*

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

Para amplificar el marco abierto de lectura más corto del gen *melA* por medio de una reacción en cadena de polimerasa (PCR), se diseñó el oligonucleótido melA5corta en el que se incluyó un sitio de restricción para la enzima *NcoI* en el codón de inicio hipotético de este marco abierto de lectura. Además de éste oligonucleótido, se utilizó otro denominado 3melA, previamente sintetizado en el laboratorio durante la clonación del marco abierto de lectura largo de *melA* y en el que está contenido el sitio de restricción para la enzima *SmaI*. Como cadena molde para la amplificación del gen *melA* se utilizó el plásmido pmelA en el que se encuentra contenido el gen.

La PCR se llevo a cabo utilizando el kit Elongase Enzyme Mix de la (Invitrogen, Carlsbad), en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla). La reacción en cadena de la polimerasa se llevo a cabo utilizando las siguientes condiciones. Primero se llevo a cabo un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C. Este fue seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento de los oligonucleótidos a

55°C por un minuto y polimerización a 68°C por 3 minutos. Al final se llevo a cabo un ciclo de extensión a 68 °C por 10 minutos.

Como control se llevó a cabo la misma reacción pero con el oligonucleótido 5melA para amplificar el marco abierto de lectura originalmente clonado de *mela*. Los productos fueron purificados utilizando el kit PCR Purification de invitrogen y analizados mediante un gel de agarosa. Se comprobó que el producto de la PCR correspondiente al marco abierto de lectura corto de *mela* era aproximadamente 300 pares de bases más corto que el producto generado con la PCR de llevada a cabo con el oligo 5melA, correspondiendo con el tamaño esperado de aproximadamente de 1500 pares de bases.

#### **5.9.2 Construcción del plásmido pTOPO*mela*AVC**

Con el fin de eliminar los extremos cohesivos del producto de PCR y poderlo incorporar al vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad), se incubó al producto de PCR con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas, Burlington) por 30 minutos a 72°C.

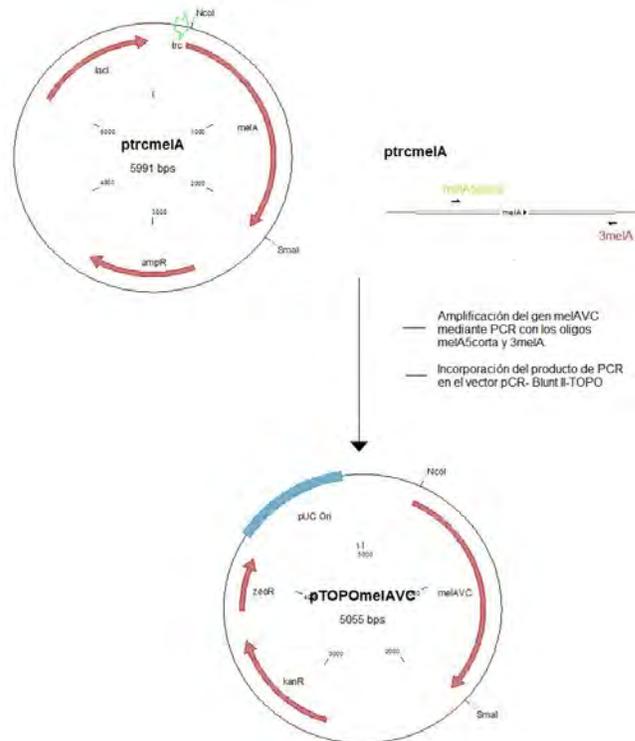
El producto obtenido de esta reacción fue purificado utilizando el kit PCR Purification (Invitrogen) y se utilizó para incorporarlo en el vector pCR-Blunt II-TOPO como lo indican sus fabricantes. Este vector posee la enzima DNA Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* unida covalentemente, de manera que es capaz de incorporar DNA. Por otra parte, también posee un mecanismo de selección de bacterias recombinantes en el que las células que no incorporan el inserto mueren. Al plásmido resultante de la reacción de ligación se le denominó pTOPO*mela*AVC (Figura 25). Este plásmido se utilizó para electroporar células de *E. coli*. Se seleccionaron 20 colonias y se escogieron 10 para analizarlas por digestión y electroforesis y así comprobar que tuvieran el inserto. Se seleccionó una cepa, a la cual se denominó *E. coli* pTOPO*mela*AVC, para utilizar posteriormente en la subclonación del gen.

### **5.9.3 Construcción del plásmido pTrc*melA*VC**

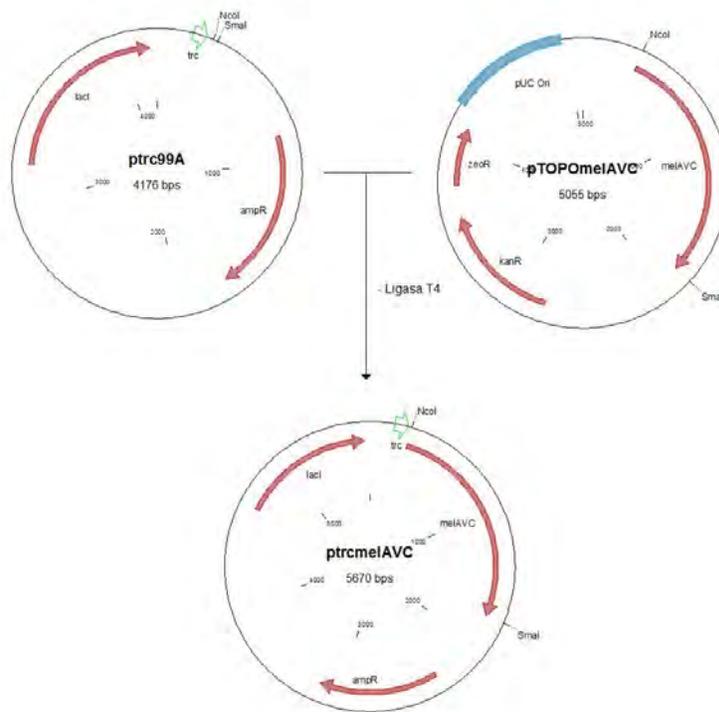
Se purificaron tanto el vector de la cepa *E. coli* pTOPO*melA*VC como el vector pTrc99A de la cepa *E. coli* W3110. La subclonación del gen *melA* se llevó a cabo mediante la digestión de ambos vectores con las enzimas *NcoI* (New England BioLabs, Ipswich) y *SmaI* (Fermentas, Burlington) como lo indican sus fabricantes. Los fragmentos se ligaron utilizando la enzima T4 DNA (Fermentas, Burlington) (Figura 26). Una alícuota de la reacción de ligación se utilizó para electroporar a *E. coli* XL1Blue. Las células fueron plaqueadas directamente en placas de LB con 0.4 g/L de tirosina, 200µg/ml de ampicilina, y 40mg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol de IPTG.

### **5.10 Análisis bioinformáticos**

Los análisis del contexto genético del gen *melA* se realizaron utilizando la herramienta *GeneCont* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las predicciones de péptidos señal se llevaron a cabo utilizando los programas *Signal P 3.0* y *tatP 1.0* del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas de la Universidad Técnica de Dinamarca (Bendtsen, *et al.*, 2004; Bendtsen, *et al.*, 2005). El modelo de la estructura tridimensional de la enzima MelA se produjo utilizando la herramienta *Swiss Model Workspace* de Expasy (Schwede, *et al.*, 2003). El diseño del oligonucleótido *melA5corta* se llevó a cabo utilizando el programa *Clone Manager*. Para visualizar, analizar y llevar a cabo alineamientos múltiples de las secuencias de proteínas y DNA se utilizó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.



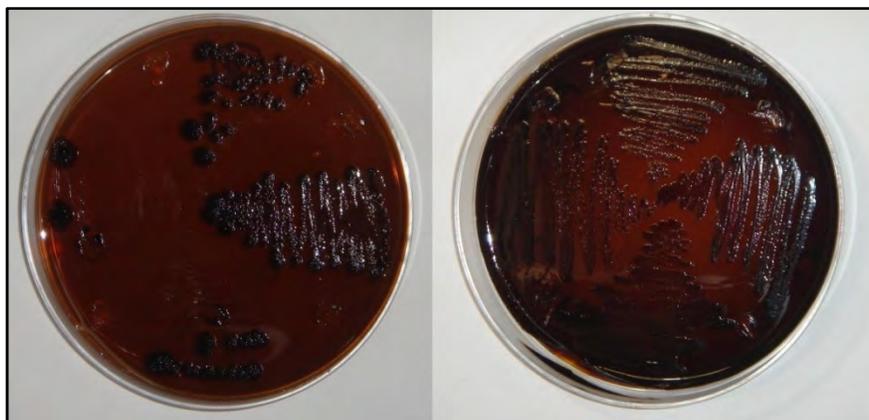
**Figura 25.** Construcción del plásmido pTOPOmelaVC. El marco abieto de lectura corto del gen *mela* (*melAVC*) fue amplificado a partir del vector *ptrcmela* utilizando los oligos *mela5corta* y *3meIA*. El producto de PCR fue incorporado en el vector pCR-BluntII-TOPO generando el vector pTOPOmelaVC.



**Figura 26.** Construcción del plásmido *ptrcmelaVC*. El vector pTOPOmelaVC y el vector *ptrc99A* fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *SmaI*. Posteriormente los fragmentos obtenidos fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa para generar el vector *ptrcmelaVC*.

## VI. Resultados y Discusión

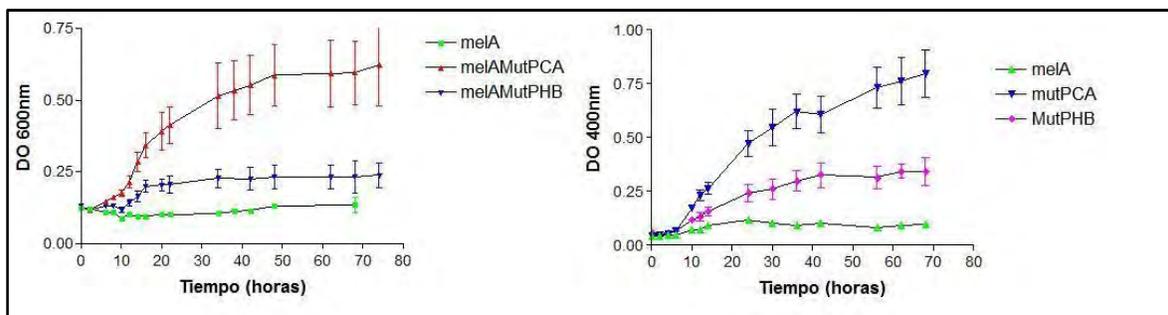
A partir del banco de mutantes del gen *mela* generado previamente en el laboratorio, se obtuvieron dos cepas de *Escherichia coli* con versiones mutantes de la tirosinasa de *R. etli* que son capaces de polimerizar sustratos distintos a la tirosina para generar melaninas. Estas cepas, que fueron nombradas *E.coli* W3110 *pTrcmelAMutPCA* y *E coli* w3110 *pTrcmelAMutPHB*, contienen versiones mutantes MelA que pueden utilizar como sustratos el ácido cumárico y el ácido para-hidroxibenzóico respectivamente (Figura 27). Estos compuestos son naturalmente encontrados en las plantas y también forman parte de los compuestos tóxicos generados en los desechos agroindustriales.



**Figura 27.** A la izquierda se muestra la cepa *E. coli* W3110 *pTrcmelAMutPHB* en medio LB sólido suplementado con 0.4 g/L de ácido parahidroxibenzóico 0.2g/L de glucosa, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG. A la derecha se muestra la cepa *E.coli* W3110 *pTrcmelAMutPCA* en medio LB sólido suplementado con 0.4g/L de ácido cumárico, 0.2g/L de glucosa, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG.

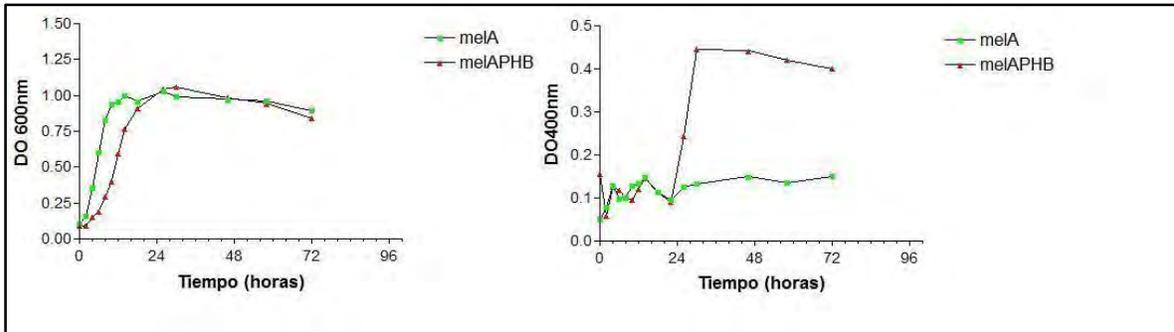
Para caracterizar estas cepas, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento y de producción de melanina utilizando los sustratos con los que fueron seleccionadas las cepas. En el caso de la cepa *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutPCA* las cinéticas se realizaron en medio mínimo con 0.2 g/L de ácido cumárico, mientras que en el caso de *E. coli* W3110

*ptrcmelAMutPHB*, se llevaron a cabo en medio mínimo con 0.2 g/L de ácido parahidroxibenzóico.



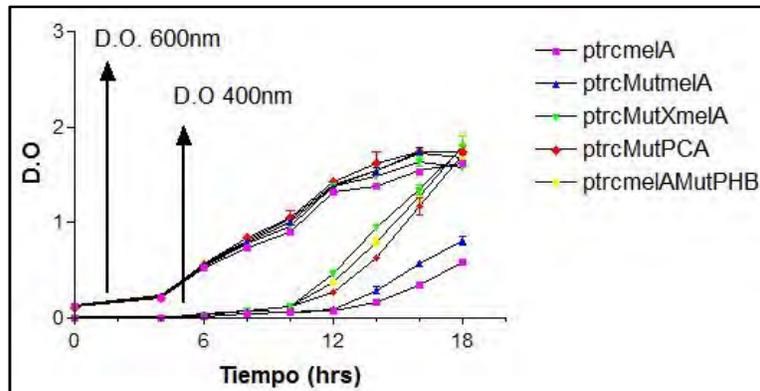
**Figura 28.** Cinética de crecimiento y producción de melanina para comparar a las cepas *E. coli* W3110 *ptrcmelA* y *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutPCA*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo M9 con 0.2g/L de glucosa, 0.2g/L de ácido cumárico, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG.

En los cultivos realizados utilizando ácido cumárico la cepa silvestre fue incapaz de crecer, mientras que la cepas *E.coli* W3110 *ptrcmelAMutPCA* y *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutPHB* mostraron un crecimiento deficiente pero fueron capaces de polimerizar este sustrato en melanina (Figura 28). Por otra parte, en los cultivos realizados con ácido parahidroxibenzóico como sustrato de la tirosinasa, el crecimiento de la cepa con el gen silvestre y de la cepa *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutPHB* se vio afectado de igual manera. A pesar de esto, se puede observar que a diferencia de la cepa con el gen silvestre, la cepa con el gen mutante fue capaz de polimerizar su sustrato en melanina (Figura 29).



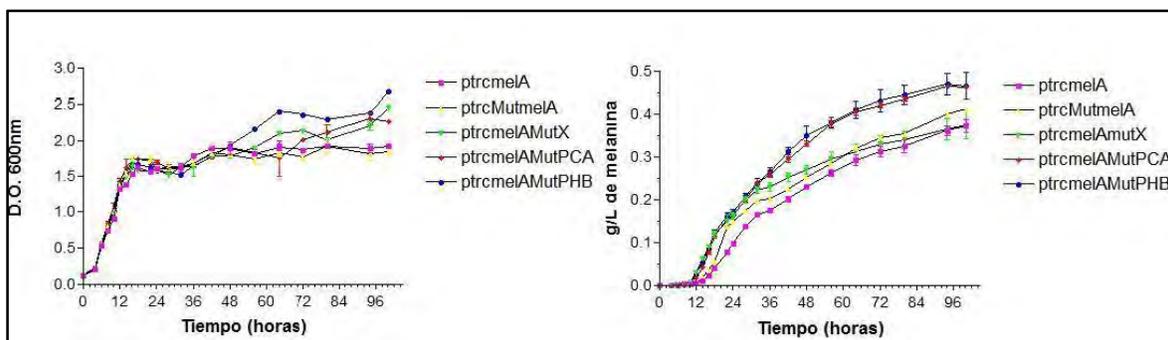
**Figura 29.** Cinética de crecimiento y producción de melanina para comparar a las cepas *E. coli* W3110 *ptrcmelA* y *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutPHB*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo M9 con 0.2g/L de glucosa, 0.2g/L de ácido parahidroxibenzoico, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG.

Se caracterizó a las cepas utilizando el sustrato natural de la tirosinasa, la tirosina. En este caso los cultivos fueron realizados utilizando 0.4 g/L de tirosina. En estos cultivos también se encontraron diferencias en la producción de melanina de las cepas mutantes respecto a la cepa con el gen silvestre y otras mutantes previamente obtenidas en el laboratorio. Se realizó una cinética de crecimiento y producción de melanina para comparar el crecimiento y la producción de melanina en la cepa con el gen silvestre, una mutante espontánea seleccionada por producir melanina antes que *melA* (*E. coli* W3110 *ptrcMutmelA*), una mutante previamente seleccionada por Robledo-Arratia (2008), en su tesis de licenciatura (*E. coli* W3110 *ptrcmelAMutX*) y las dos mutantes seleccionadas en este estudio. Se puede observar en las primeras horas de cultivo que aunque todas las cepas crecen de manera similar, las cepas *E. coli* W3110 *ptrcmelAPCA*, *E. coli* W3110 *ptrcmelAPHB* y *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutX* comienzan a producir melanina de manera simultánea a las 10 horas de cultivo, antes que *E. coli* W3110 *ptrcmelAMutMela* y *E. coli* W3110 *ptrcmelA*, las cuales comienzan a las 12 y 14 horas de cultivo (Figura 30).



**Figura 30.** Primeras 18 horas de una cinética de crecimiento y producción de melanina para comparar las cepas *E.coli* W3110 ptrcmelA, *E.coli* W3110 ptrcMutmelA, *E.coli* W3110 ptrcmelAMutX, *E.coli* W3110 ptrcmelAMutPCA, *E.coli* W3110 ptrcmelAMutPHB. Los cultivos se realizaron en medio mínimo M9 con 0.2 g/L de glucosa, 0.4g/L de tirosina, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG. Se puede observar que aunque el crecimiento es homogéneo en todas las cepas, las cepas con las tirosinasas mutantes ptrcmelAMutX, ptrcmelAMutPCA y ptrcmelAMutPHB comienzan a sintetizar melanina antes que el la cepa con el gen silvestre (melA) y una mutante aislada por su capacidad de sintetizar melanina antes que el gen silvestre (MutmelA).

Al evaluar el crecimiento y la producción de melanina en un cultivo de 100 horas se puede observar que todas las cepas crecen de forma similar, pero difieren en la cantidad de melanina producida. A pesar de que *E.coli* W3110 ptrcmelAPCA, *E.coli* W3110 ptrcmelAPHB y *E.coli* W3110 ptrcmelAMutX comienzan a producir melanina al mismo tiempo, las mutantes *E.coli* W3110 ptrcmelAPCA y *E.coli* W3110 ptrcmelAPHB producen los 0.41g por litro de melanina esperados a partir de 0.4 gramos por litro de tirosina antes que las demás cepas, alrededor de las 60 horas de cultivo (Figura 31).



**Figura 31.** Cinética de crecimiento y producción de melanina para comparar las cepas *E.coli* W3110 *ptrcmelA*, *E.coli* W3110 *ptrcMutmelA*, *E.coli* W3110 *ptrcmelAMutX*, *E.coli* W3110 *ptrcmelAMutPCA* y *E.coli* W3110 *ptrcmelAMutPHB*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo M9 con 0.2 g/L de glucosa, 0.4g/L de tirosina, 40 µg/mL de CuSO<sub>4</sub> y 0.1 mmol/L de IPTG. Se puede observar que las mutantes *ptrcmelAMutPCA* y *ptrcmelAMutPHB* alcanzan los 0.41g/L esperados significativamente antes que el resto de las cepas.

Para continuar con la caracterización de las cepas, se secuenciaron los dos genes mutantes *melAMutPHB* y *melAMutPCA*. Se encontró que ambas mutantes tenían varias mutaciones a lo largo de la secuencia de DNA, pero solo algunas de ellas daban como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La mutante *melAMutPHB* tiene un solo cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Este consiste en la sustitución de un residuo de glutamato por uno de glicina en la posición 335 (E335G), dentro de la región CuB. La mutante *melAMutPCA* comparte con la mutante *melAMutPHB* el cambio E335G. Además de este cambio, en la mutante *melAMutPCA* se encontró una mutación que causa un codón de paro, el cual da como resultado un nuevo inicio de la traducción, a 318 pares de bases del comienzo reportado del gen *mela*, que da como resultado una proteína de 106 aminoácidos menos que MelA.

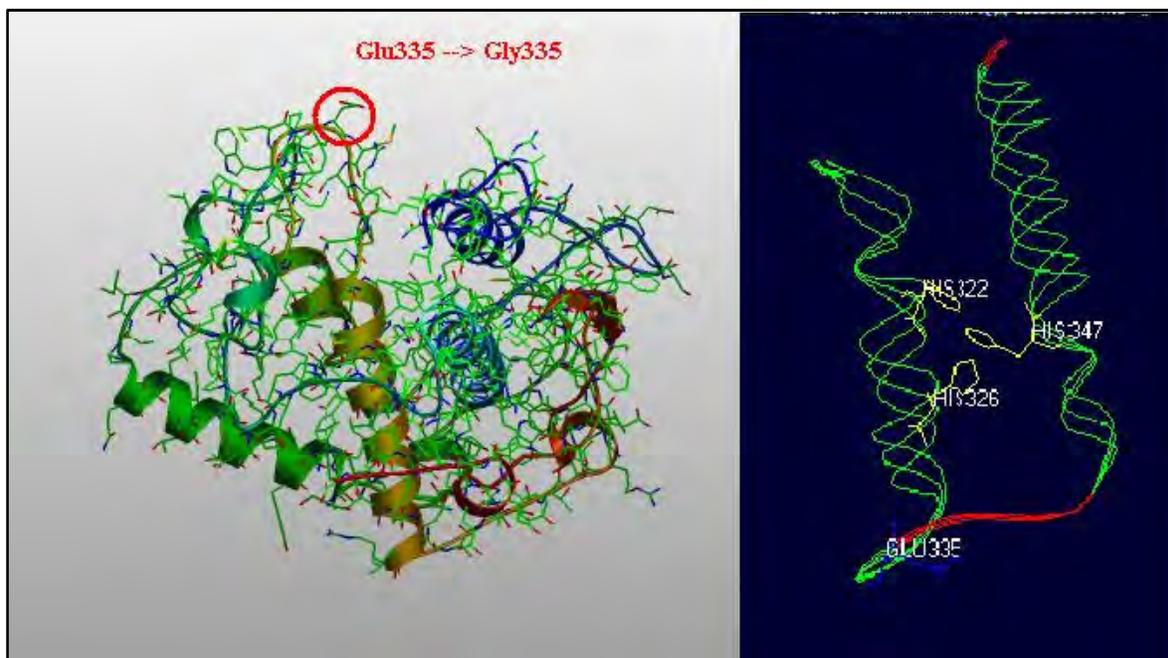
El hecho de que el cambio causante del relajamiento de la especificidad de sustrato haya sido encontrado en ambas mutantes, seleccionadas de manera independiente del banco de mutantes del gen *mela*, demuestra que la mutación E335G de MelA da como resultado la formación de una proteína con propiedades catalíticas diferentes de las de la proteína MelA

silvestre. Esta diferencia en las propiedades catalíticas de la tirosinasa se puede observar también en las cinéticas realizadas utilizando tirosina como sustrato. Las mutantes que comparten este cambio aumentaron su eficiencia en la conversión de tirosina en eumelanina.

El residuo de glicina, siendo el aminoácido más pequeño, puede participar en muchas conformaciones que son estéricamente restringidas para el resto de los aminoácidos. Este residuo suele formar parte de los giros- $\beta$ , y en el caso de los giros- $\beta$  de tipo II un residuo de glicina siempre se encuentra en la tercera posición (Nelson & Cox, 2005). El hecho de que en las cepas mutantes el cambio E335G podría deberse a que este residuo le permite a la proteína mutante adquirir una conformación del sitio activo que en la proteína silvestre es impedida por la presencia de un residuo de glutamato.

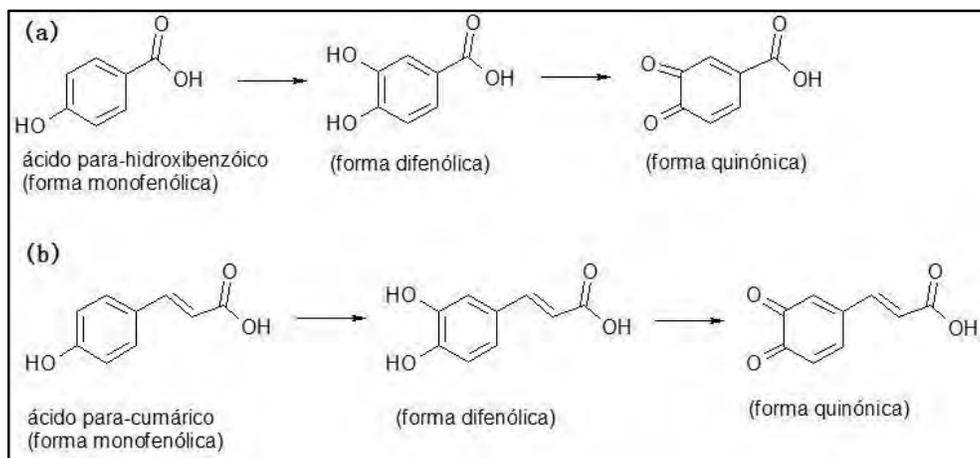
Con el propósito de tener una idea general de la estructura de la enzima, y del sitio que fue afectado por la mutación que comparten ambas cepas mutantes se realizó un modelo de la enzima MelA de *R. etli* utilizando el programa *Swiss Model* (Schwede, et al., 2003) (Figura 32). Este programa se utiliza para el modelamiento de estructuras de proteínas en base a su homología con proteínas de estructuras conocidas. En este caso, el modelo se llevo a cabo en base a la fenoloxidasa de *Ipomoea batatas*. Según el modelo que se generó de la estructura de MelA (y los alineamientos realizados para generarlo), la mutación ocurrió en un sitio que se encuentra dentro de un giro que conecta las dos alfa hélices en las que se encuentran los 3 residuos de histidina que forman el sitio CuB. Esto nos permite suponer que la mutación causó un cambio en la actividad de la proteína a través de la modificación de la forma en que se orientan entre sí las alfa hélices que contienen el sitio CuB. Incluso es posible suponer que la mutación causó la formación de un giro- $\beta$  de tipo II en esta

región, modificando así la forma en que se orientan entre sí las dos alfa hélices del sitio CuB .



**Figura 32.** Modelo de la estructura de MelA. A la izquierda se muestra el modelo de MelA generado a través del programa Swiss Model utilizando como base la estructura de la fenoloxidasa de *Ipomoea batatas*. Se muestra el cambio ocurrido en las mutantes obtenidas en este estudio. A la derecha se muestra un acercamiento al sitio mutado en las enzimas MelAMutPCA y MelAMutPHB en el que se muestra su relación con el sitio de unión a cobre CuB de la tirosinasa.

A partir de las reacciones que cataliza la enzima de forma natural puede obtenerse una hipótesis de las reacciones catalizadas por la tirosinasa con sus sustratos no naturales. Es probable que ambos sustratos sean convertidos a sus formas difenólicas, y posteriormente a sus formas quinónicas (Figura 33). La ruta que siguen durante su polimerización no enzimática y la estructura de las melaninas resultantes son temas que sobrepasan los alcances de este trabajo, y serán un tema de investigación interesante para futuros estudios.

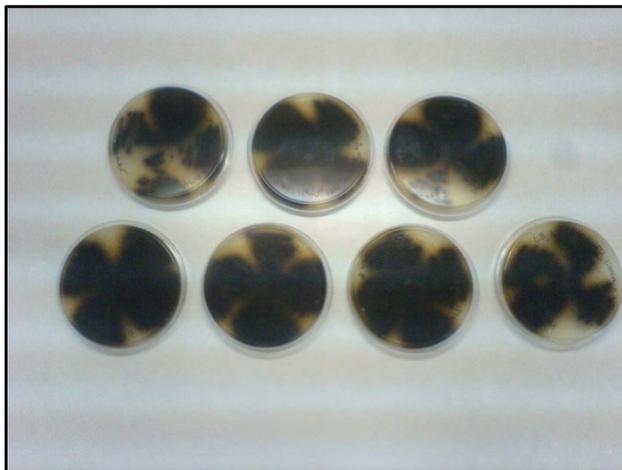


**Figura 33.** Hipótesis sobre las reacciones catalizadas por las tirosinasas mutantes en sus sustratos. (a) Reacción catalizada por la enzima MelAMutPHB en el ácido para-hidroxibenzóico. (b) Reacción catalizada por la enzima MelAMutPCA en el ácido para-cumárico.

Se pueden pensar en diversas aplicaciones de estas enzimas mutantes. El hecho de que las cepas de *E. coli* W3110 con las tirosinasas mutantes comiencen a producir melanina antes y sean más eficientes en la conversión de tirosina en melanina que las cepas que contienen el gen silvestre o cepas con mutantes del gen previamente aisladas, nos permite pensar que estas cepas pueden ser más eficientes para los fines biotecnológicos de producción de melanina. Por otra parte, las tirosinasas se han usado previamente para la detoxificación de compuestos fenólicos del agua. El hecho de que estas enzimas sean capaces de polimerizar el ácido cumárico y el ácido parahidroxibenzóico, que son compuestos relativamente tóxicos frecuentemente encontrados en desechos agroindustriales, nos permite suponer que el uso de estas enzimas purificadas pueda servir con fines de bioremediación a través de la detoxificación de aguas contaminadas con estos compuestos fenólicos.

Para comprobar que el marco abierto de lectura más corto del gen *mela* encontrado en la mutante *E. coli* w3110 *ptrcmelAMutPCA* es suficiente para producir una tirosinasa activa, y que el hecho de que esta cepa presente un fenotipo melanogénico no sea el resultado de una supresión o algún fenómeno alternativo, decidimos subclonar el marco abierto de

lectura más corto y expresarlo en el mismo contexto en el que se había expresado inicialmente el gen *mela*. Se obtuvo la cepa *E. coli* W3110 *ptrcmela-VC*. Esta cepa es positiva en su actividad de tirosinasa. Por esto concluimos que el marco abierto de lectura más corto del gen también codifica para una proteína funcional.



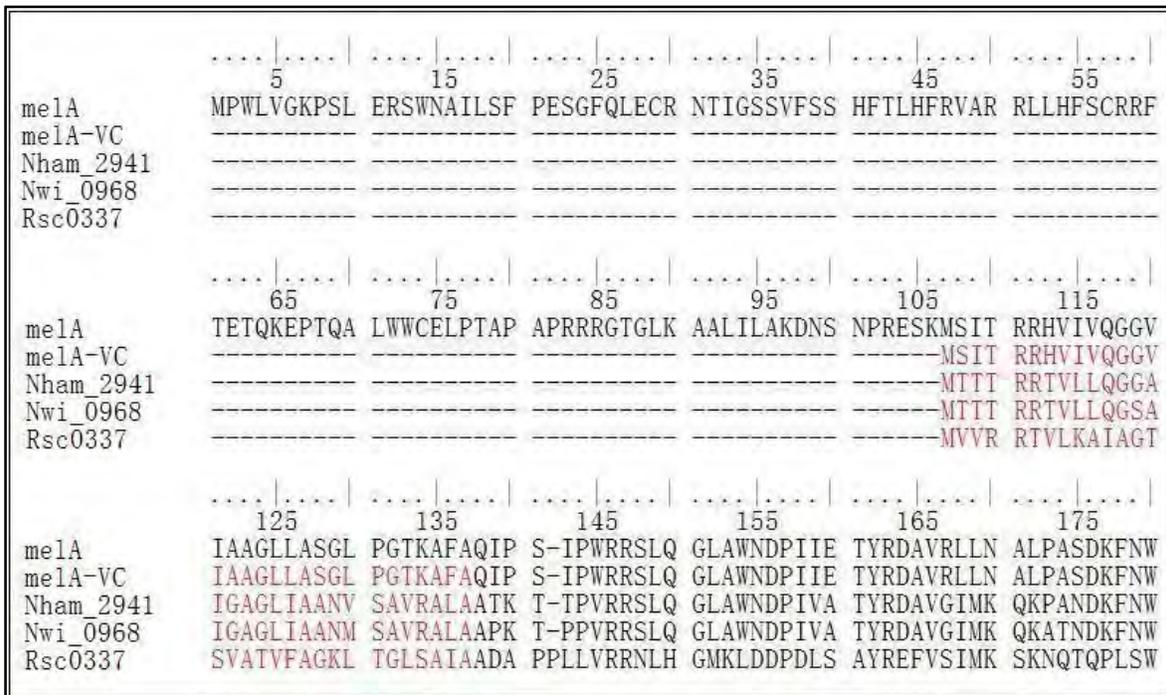
**Figura 34.** Cepas con el marco abierto de lectura corto del gen *mela* (*E.coli* W3110 *ptrcmelaVC*) en medio LB sólido suplementado con 0.2g/L de glucosa, 0.4g/L de tirosina, 40  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{CuSO}_4$  y 0.1 mmol/L de IPTG

Se llevaron a cabo algunas predicciones bioinformáticas para el nuevo inicio del gen *mela*. A través del programa *SignalP 3.0* se realizó un análisis de la posible presencia de un péptido señal en la región N-terminal de la proteína (Bendtsen, *et al.*, 2004). Se encontró que mientras que en la versión reportada del gen *mela* la probabilidad de presencia de un péptido señal es nula (0.00), en el marco abierto de lectura corto del gen ésta probabilidad es muy alta (0.994). El programa predice que el péptido señal es eliminado a partir de un corte proteolítico entre los residuos 31 y el 32 de la proteína.

Además se llevó a cabo una predicción con el programa *tatP 1.0* el cual puede discernir entre ambos sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas, el sistema *Sec*, y el sistema *tat* (Bendtsen, *et al.*, 2005). Este programa predijo que la proteína codificada por el

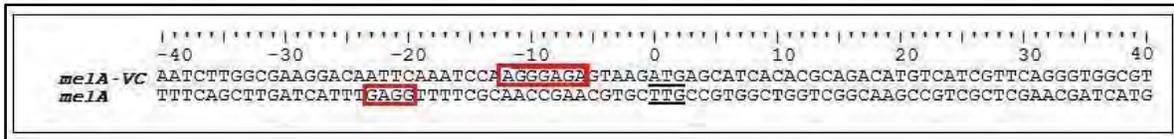
marco abierto de lectura corto del gen se secreta a través del sistema *tat*. El sistema de secreción *tat* se encarga del transporte de proteínas plegadas a través de la membrana interna hacia el periplasma, mientras que las proteínas transportadas a través del sistema *Sec* se despliegan durante su transporte, y vuelven a adquirir su conformación nativa en el periplasma. Diversas proteínas, entre las que se incluyen las tirosinasas de *Streptomyces* y otras proteínas con cofactores son secretadas a través de este sistema. Si es que efectivamente la tirosinasa de *R. etli* se secreta a través del sistema *tat*, su plegamiento y la incorporación de los iones de cobre tendrían lugar en el citoplasma, y una vez adquirida su conformación nativa, sería transportada al periplasma.

Al realizar un alineamiento múltiple de la secuencia de MelA y las tres proteínas con las que comparte un mayor número de identidades en su secuencia de aminoácidos en *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi* y *Ralstonia solanacearum* se pueden observar ciertos hechos interesantes. La proteína codificada por *melA-VC* comparte con éstas tanto el sitio de inicio del gen como la presencia del péptido señal. Este hecho sugiere que la proteína codificada por el marco abierto de lectura más corto del gen *melA* probablemente se expresa de forma natural en *R. etli* y no es un artificio generado en el laboratorio.



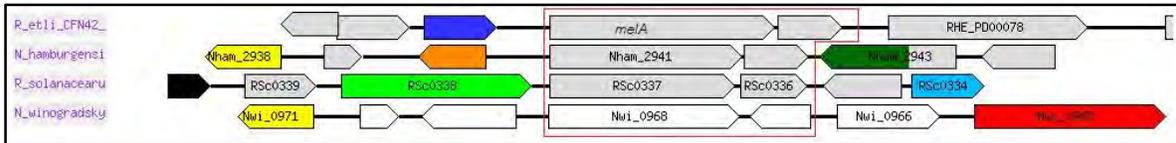
**Figura 35.** Alineamiento múltiple del extremo N- terminal de las proteínas MelA, MelAVC, y sus homólogos en *Nitrobacter hamburgensis* (Nham\_2941), *N. winogradskyi* (Nwi\_0968) y *Ralstonia solanacearum* (Rsc0337), en el que se muestra que la proteína MelAVC comparte con estas proteínas tanto el inicio de la proteína como la presencia de un péptido señal (en rojo).

Se realizó un análisis de la posible presencia de un sitio de unión al ribosoma asociado al marco abierto de lectura más corto del gen *mela*. Se encontró que este posee un posible sitio de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno), el cual se encuentra situado seis nucleótidos antes del comienzo del gen. En el caso de *mela*, el posible sitio de unión al ribosoma se encuentra a 19 nucleótidos del comienzo del gen. El sitio Shine-Dalgarno se encuentra generalmente entre 6 o 7 nucleótidos antes del comienzo del gen. Este hecho también sugiere que *mela-VC* se expresa de forma natural en *R. etli* e incluso pone en duda que el marco abierto de lectura inicialmente reportado para el gen *mela* se exprese en absoluto en este microorganismo.



**Figura 36.** Comparación de la ubicación del sitio de unión al ribosoma (*Shine-Dalgarno*) respecto al codón de inicio de la traducción en los dos posibles marcos abiertos de lectura del gen *melA*. Se observa que el sitio se encuentra en la posición correcta en el marco abierto de lectura corto del gen *melA* (*melAVC*).

También se llevó a cabo un análisis del contexto del gen *melA*. De los resultados del mismo se puede destacar el hecho de que, además de compartir un alto número de identidades en la secuencia de la proteína con *N. hamburgensis* y *R. solanacearum*, también comparte el hecho de estar codificado en conjunto con otro gen, RHE\_PD00077, formando lo que parece ser un operón bicistrónico. Los genes que se encuentra codificados en conjunto con *melA* (RHE\_PD00077) y sus homólogos (Rsc0336 en *R. solanacearum* y Nham\_2942 en *N. hamburgensis*) son relativamente pequeños y codifican para proteínas hipotéticas de alrededor de 150 aminoácidos. Al comparar la secuencia de la proteína codificada por el gen RHE\_PD00077 de *R. etli* con la proteína codificada por el gen Nham\_2942 de *N. hamburgensis* se puede observar que comparten 46 % de similitud en su secuencia de aminoácidos. Cabe destacar el hecho de que en *N. winogradskyi* también se encuentra un gen de tamaño similar pero codificado en dirección opuesta al sentido en que está codificada la tirosinasa. Este gen comparte un 77% de similitud en su secuencia de nucleótidos con el de *N. hamburgensis*. Al analizar la posible presencia de un péptido señal en la proteína codificada por estos genes se encontró que tanto la proteína codificada por el gen RHE\_PD00077, como las proteínas codificadas por los genes Nham2942 Y Rsc003353 presentan una alta probabilidad de secretarse.



**Figura 37.** Resultados del análisis del contexto genético del gen *melA*. Marcado en rojo se muestra el posible operador bicistrónico encontrado en *Rhizobium etli*, *Ralstonia solanacearum* y *Nitrobacter winogradsky*.

Nuestros resultados comprueban que tanto el marco abierto de lectura reportado inicialmente, como el marco abierto de lectura más corto reportado en este estudio codifican para proteínas capaces de llevar a cabo su función bioquímica. Existen dos posibilidades de explicación de la naturaleza de este hecho.

Una de ellas es que en *R. etli* naturalmente se expresen dos proteínas distintas a partir del mismo gen. La primera proteína, formada a partir del marco abierto de lectura largo del gen, ejercería su función en el citoplasma, mientras que la segunda, formada a partir del marco abierto de lectura más corto del gen sería una versión secretoria de la proteína que ejercería su función en el periplasma.

La segunda posibilidad consistiría en que, en *R. etli* solo una de estas dos proteínas se exprese de manera natural. En ese caso, alguna de las dos versiones del gen, ya sea la larga o la corta, es un artificio generado en el laboratorio.

En caso de que el marco abierto de lectura corto del gen fuese la única proteína expresada de manera natural en *R. etli*, *melA* sería un gen sintético generado en el laboratorio en el cual el péptido señal ha sido enmascarado, generando exitosamente una proteína no secretoria capaz de llevar a cabo su función bioquímica sin una disminución en su actividad.

En caso de que *melA*, el gen reportado como silvestre, fuese la única proteína expresada en *R. etli*, la versión corta sería una proteína sintética generada en el laboratorio. En este caso

la proteína codificada por el marco abierto de lectura corto sería una proteína sintética que mantiene su actividad bioquímica y ha adquirido la propiedad de ser secretoria. Dados la presencia del péptido señal, el hecho de que lo comparte con sus homólogos de mayor similitud y el hecho de que posee un sitio Shine-Dalgarno, es poco probable que la proteína codificada por el marco abierto de lectura corto sea un artificio generado en el laboratorio. Sería difícil pensar que todas estas características hayan sido generadas de forma azarosa y abrupta por una mutación puntual. Por otra parte, no puede excluirse la posibilidad de que durante la evolución del gen *mela*, naturalmente se hayan enmascarado estas características para generar una proteína citoplásmica, aunque aún quedaría la incógnita planteada por la localización incorrecta del sitio Shine-Dalgarno en *mela*. En fin, dado el hecho de que ambas proteínas son activas, será necesario realizar estudios en *R. etli* para determinar si se expresa solo uno de estos dos marcos de lectura o si ambos se expresan para llevar a cabo funciones diferentes en la fisiología de *R. etli*.

En cuanto a la naturaleza del gen codificado en conjunto con la tirosinasa de *R. etli* y de sus homólogos existen diversas posibilidades. El hecho de que posea un péptido señal, sugiere que esta proteína de hecho interactúa con MelA en el periplasma de *R. etli*. En *Streptomyces*, las tirosinasas suelen estar codificadas en operones bicistrónicos. En estas bacterias, la proteína codificada en conjunto con la tirosinasa funciona como una chaperona de cobre necesaria para la correcta incorporación de los iones de cobre al sitio activo. En el caso de la tirosinasa de *R. etli*, se ha demostrado que no se requiere de una chaperona de cobre para la correcta incorporación de los iones de cobre en el sitio activo, por lo que podríamos excluir esta posibilidad. Otra función que ha sido asignada a la chaperona codificada en conjunto con la tirosinasa de *Streptomyces* es la de participar en la secreción de ambas proteínas a través de un mecanismo de *hitchhiking*; en el que las dos proteínas se

asocian en el citoplasma y se secretan en conjunto por la acción de un péptido señal encontrado en la chaperona. Este mecanismo también puede ser excluido dado el hecho de que el péptido señal se encuentra tanto en la proteína codificada en conjunto con la tirosinasa, como en la tirosinasa codificada por el marco abierto de lectura corto.

La mayor parte de los componentes celulares están regulados por diversos mecanismos que actúan a distintos niveles (transcripcional, traduccional y posttraduccional). El hecho de que la tirosinasa de *R. etli* se encuentre constitutivamente activa cuando es expresada en *E. coli* permite sugerir que puede haber un mecanismo de regulación a nivel de proteína. Hasta ahora, se sabe que la expresión de *melA* debe estar regulada a nivel genético; se infiere que *melA* está regulado por el factor de transcripción NifA, como se ha demostrado en *R. leguminosarum* (Hawkins & Johnston, 1988). Dado el hecho de que en general se considera que una tirosinasa carente de un mecanismo de regulación es un estado ancestral en la evolución de estas proteínas, una hipótesis es que esta segunda proteína actúa en la regulación de la tirosinasa, encubriendo el acceso a su sitio activo, como ocurre con las chaperonas de cobre codificadas en conjunto con las tirosinasas de *Streptomyces*.

La organización genética que se encuentra en el posible operón bicistrónico de *R. etli*, *N. hamburgensis* y *R. solanacearum* puede ser similar a la que se encontraba en las fenoloxidasas de los artrópodos antes de que el gen que contenía el dominio inhibitorio se fusionara con el gen de la tirosinasa.

## VII. Conclusión

En conjunto, nuestros resultados demuestran dos hechos:

La mutación en el gen *melA* que causa un cambio de un residuo de glutamato por uno de glicina en la posición 335 da como resultado una enzima capaz de polimerizar ácido cumárico y ácido parahidroxibenzóico en melanina. Las enzimas con esta mutación, al expresarse en *E. coli* recombinante también muestran una mayor eficiencia catalítica en la conversión de tirosina en eumelanina.

Un marco abierto de lectura más corto del gen *melA* codifica para una proteína que posee actividad de tirosinasa. Además de codificar para una proteína activa, ésta versión más corta posee algunas otras características que sugieren que se expresa de forma natural en *Rhizobium*: Comparte el inicio del gen con sus tres homólogos de mayor identidad. Comparte un posible péptido señal con los mismos. Por último, posee un sitio de unión al ribosoma en la posición correcta.

Estos resultados en conjunto indican que la enzima MelA puede ser modificada exitosamente para mejorar sus propiedades en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la síntesis de melaninas y la bioremediación

## VIII. Una hipótesis final

En el laboratorio se ha demostrado que la tirosinasa codificada por *R. etli* está involucrada en la resistencia al estrés asociado con el proceso simbiótico durante la formación de los nódulos en *P. vulgaris*. Por otra parte, se sabe poco del proceso de fijación de nitrógeno en vida libre por parte de *Rhizobium*, aunque existen algunos estudios en los que se ha reportado la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre en condiciones de laboratorio. En base a las propiedades conocidas de la tirosinasa de *R. etli*, de la melanina, y del proceso de melanización en otros microorganismos, me gustaría proponer la siguiente hipótesis respecto a la posible participación de este proceso en la fijación de nitrógeno en vida libre en este microorganismo:

La tirosinasa y el proceso de melanización podrían estar involucrados en la protección de la nitrogenasa de *R. etli* durante la fijación de nitrógeno en vida libre en condiciones aeróbicas o microaerófilas. Este fenómeno ocurriría mediante un aumento en la utilización del oxígeno, como se ha propuesto en *Azotobacter chroococcum*. Cuando se oxida la tirosina, una molécula de oxígeno es incorporada en este aminoácido, y posteriormente, mediante una serie de reacciones no enzimáticas en las que también se consume oxígeno, la melanina se polimeriza. Por otra parte, durante la caracterización de la tirosinasa de *R. etli*, se demostró que esta enzima no sólo puede utilizar la tirosina como sustrato sino que también es capaz de oxidar otros compuestos celulares, lo que contribuiría aun más a la maximización de la utilización del oxígeno y la protección de la nitrogenasa. La melanina es capaz de detoxificar especies reactivas de oxígeno, lo cual contribuiría a aumentar la protección por parte del sistema tirosinasa-melanina. La melanina podría funcionar también para suplantar al oxígeno molecular en el último paso de la cadena respiratoria (como se ha

demostrado que ocurre en *Shewanella algae*), permitiéndole a *R. etli* llevar a cabo un metabolismo aeróbico en las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno intracelular necesarias para el correcto funcionamiento de la nitrogenasa.

## IX. Bibliografía

- Amman E, Ochs B, Abel KJ. (1988). **Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*.** *Gene*. 69: 301-315
- Borthakur, D., Lamb, J. W., Johnston, A. W. (1987). **Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other.** *Molecular and General Genetics*. 207: 155-160.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., & Brunak, S. (2005). **Prediction of twin-arginine signal peptides.** *BMC bioinformatics*. (6).
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.** *Journal of Molecular Biology*. (4): 783-795.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). **The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin.** *Photochemistry and Photobiology*. 84: 539-549.
- Cabrera-Valladares, N., Martínez, A., Piñero, S., Lagunas-Muñoz, V. H., Tinoco, R., de Anda, R., Vazquez Duhalt, R., Bolivar, F., Gosset, G. (2006). **Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase.** *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 772-779.
- Claus, H., & Decker, H. (2006). **Bacterial tyrosinases.** *Applied Microbiology*. 29: 3-14.
- Cubo, M. T., Buendia-Claveria, A. M., Beringer, J. E., & Ruiz-Sainz, J. E. (1988). **Melanin production by *Rhizobium* strains.** *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (7): 1812-1817.
- Césarini, J. P. (1996). **Melanins and their possible roles through biological evolution.** *Advanced Space Research*. 18 (12): 1235-1240
- Dadachova, E., Bryan, R. a., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A. (2007). **Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi.** *PloS one*. (5): e457.
- Decker, H., & Terwilliger, N. (2000). COPs and Robbers: **Putative evolution of copper oxygen binding proteins.** *Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- Decker, H., & Tuczek, F. (2000). **Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism.** *Trends in Biochemical Sciences*. 25 (8): 392-397.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., Tuczek, F. (2007). **Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases.** *Gene*. 398: 183 – 191
- Della-Cioppa, G., Garger, S. J., Sverlow, G. G., Turpen, T. H., & Grill, L. K. (1990). **Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene.** *Nature Biotechnology*. 8: 634-638

- Durán, N., & Esposito, E. (2000). **Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A Review.** Applied Catalysis. 28: 83-99
- Fischer, H. (1994). **Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia.** Microbiological Reviews. 58 (3): 352-386
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M. A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J. C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodríguez, O., Flores, M., Cevallos, M. A. Collado-Vides, J., Romero, D., Dávila, G. (2003). **The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments.** Genome Biology, 4.
- Hawkins, F. K., & Johnston, A. W. (1988). **Transcription of a *Rhizobium ieguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*.** Molecular Microbiology. 2: 331-337.
- Hill, H. Z. (1992). **The function of melanin or six blind people examine an elephant.** Bioessays. 14: 49-56
- Jacobson, E. S. (2000). **Pathogenic roles for fungal melanins.** Clinical Microbiological Reviews. 13: 708-717
- Jaenicke, E., & Decker, H. (2004). **Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution.** Chembiochem. 5: 163-169
- Jensen, K. F. (1993). **The *Escherichia coli* K12 “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
- Kadarkar, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., Abdel-Malek, Z. A. (2003). **Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round?** Pigment Cell Research. 16: 434-447
- Kaxiras, E., Tsolakidis, A., Zonios, G., & Meng, S. (2006). **Structural model of eumelanin.** Materials Science. 97: 1-4
- Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., & Martínez, a. (2006). **Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*.** Journal of Applied Microbiology. 101 (5): 1002-1008.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006). **Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis.** The Journal of Biological Chemistry. 281 (13): 8981-8990
- Mercado-blanco, J., Garcia, F., Fernandez-lopez, M., & Olivares, J. (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. 175 (17): 5403-5410

- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). **Lehninger Principles of biochemistry**. W. H. Freeman and Company. Cuarta edición. Nueva York. pp. 123-124, 834-837
- Piñero, S., Rivera, J., Romero, D., Cevallos, M. A., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2007). **Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance**. Journal of molecular microbiology and biotechnology. 13: 35-44
- Plonka, P. M., & Grabačka, M. (2006). **Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical applications**. Acta Biochimica Polonica. 53 (3): 429-443.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999). **Microbiología**. Mc-Graw-Hill Interamericana. Cuarta edición. Madrid. pp. 205-206, 928-932.
- Price, T. D. (2006). **Phenotypic plasticity, sexual selection and the evolution of colour patterns**. Journal of Experimental Biology. 209: 2368-2376
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). **Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport**. Nature. 8: 786-797
- Riley, P. A. (1997). **Melanin**. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 11 (29): 1235-1239
- Robledo-Arratia, L. (2008). **Generación y caracterización de una mutante de la tirosinasa de *Rhizobium etli***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Distrito Federal, México.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, USA.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Pietsch, M. C. (2003). **SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server**. Nucleic Acids Research. 31 (13): 3381-3385
- Schweikardt, T., Olivares, C., Solano, F., Jaenicke, E., Garcia-Borrón, J. C., Decker, H. (2007). **A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations**. Pigment Cell Research. 20: 394-401
- Selinheimo, E., Nieidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O'Beirne D., Buchert, J., Kruus, K. (2007). **Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases**. Journal of Biotechnology. (130); 471-480.
- Shivprasad, S., & Page, W. J. (1989). **Catechol formation and melanization by Na-Dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation?** Applied and Environmental Microbiology. 55 (7); 1811-1817
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P. M., Schallreuter, K. U., Paus, R., Tobin, D. J. (2005). **Hair follicle pigmentation**. The Journal of investigative dermatology. 124 (1): 13-21.
- Sturm, R. a., Box, N. F., & Ramsay, M. (1998). **Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep**. BioEssays. 20 (9): 712-721.

Sugumaran, M. (2002). **Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoxidase and melanin in insects.**Cell Research. 15: 2-9

Turick, C. E., Tisa, L. S., & Caccavo, F. (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 (5): 2436-2444

Van Gendler, C. W., Flurkey, W. H., & Wichers, H. J. (1997). **Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases.**Phytochemistry. 45 (7): 1309-1323

Zecca, L., Tampellini, D., Gerlach, M., Riederer, P., Fariello, R. G., Sulzer, D. (2001).**Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour.**Molecular Pathology.54 (6): 414-418

Zecca, L., Zucca, F. a., Wilms, H., & Sulzer, D. (2003).**Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics.** Trends in Neurosciences.26 (11): 578-580