



Efecto de deleciones secuenciales en los extremos amino y carboxilo sobre la actividad en la enzima tirosinasa MelA de *R. etli*.

Alejandra Mejía, Paul Gaytán, Luz María Martínez, Alfredo Martínez, Guillermo Gosset, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. Avenida Universidad # 2001. Col. Chamilpa, C.P. 62210, alemeja@ibt.unam.mx.

Palabras clave: tirosinasas, ingeniería de proteínas, *Escherichia coli*.

Introducción. Las tirosinasas son proteínas de unión a cobre tipo III, involucradas en la síntesis de melanina, han sido descritas en varios grupos filogenéticos⁽¹⁾, entre ellos se encuentra la bacteria *R. etli*. El gen *melA* de *R. etli* CFN42 se clonó y expresó en *E. coli*, el cual codifica para la proteína MelA de 609 aminoácidos, con actividad de tirosinasa^(2,3). Se encontró una mutante espontánea (MelAc) con una mutación que causa un codón de paro, dando como resultado una proteína 106 aminoácidos más corta que MelA, la cual mantiene su actividad. En un análisis computacional se predijo la presencia de un posible péptido señal de 31 aminoácidos en la mutante MelAc, aunque aún no se ha comprobado su funcionalidad⁽⁴⁾.

En este estudio, se construyó una biblioteca de mutantes con versiones truncadas de la enzima MelAc, con el objetivo de identificar la secuencia mínima que codifique para una proteína con actividad de tirosinasa.

Metodología. La biblioteca se construyó utilizando el método PCR delete-primer⁽⁵⁾, el cual consiste en una mezcla de oligonucleótidos que difieren en tamaño por un codón, por lo que es posible obtener una librería de mutantes con 16 deleciones secuenciales en el extremo amino y carboxilo de la proteína (figura 1). Las primeras deleciones realizadas fueron en la secuencia de 31 aminoácidos predicha como posible péptido señal, posteriormente se deletaron 16 aminoácidos del extremo amino y carboxilo. Se clonaron en la cepa *E. coli* MC1061 y se probaron alrededor de 2000 colonias en el medio de producción de melanina (LB, Tyr 0,4 g/L, CuSO₂ 40 µg/mL). Se seleccionaron 40 clonas al azar para ser secuenciadas. De estas clonas se midió su actividad específica a partir de un extracto celular.

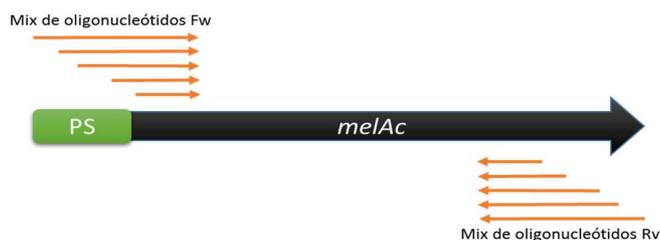


Fig. 1. Estrategia experimental utilizada para la generación de la biblioteca de mutantes del gen *melAc*.

Resultados. De todas las mutantes secuenciadas no se encontró ninguna que aumentara o mantuviera la actividad de la proteína MelAc. Sin embargo, de acuerdo a la actividad observada en el medio sólido de producción y de acuerdo al tiempo necesario de incubación para producir melanina, se clasificaron en cinco grupos:

Tabla 1. Clasificación de las clonas generadas a partir de su actividad en medio sólido de producción.

Grupo	Clonas (deleciones)	Tiempo de incubación (días)
1	MelA, MelAc	2
2	1	3
3	3-15	5
4	15-30	7
5	30-46	ND*

*Con excepción de las clonas MelA30-0, MelA34-0 y MelA34-1, las cuales después de alrededor de 20 días de incubación a 4 °C se observó actividad.

Conclusiones. La proteína MelAc es la versión mínima con actividad para su aplicación biotecnológica. Debido a que la eliminación de la secuencia de 30 aminoácidos, que fue predicha como un posible péptido señal, causó la pérdida de la actividad de la enzima se concluye que esta secuencia no codifica para un péptido señal. La caracterización molecular, bioquímica y funcional obtenida en este trabajo ayudará a aumentar a comprender mejor esta proteína.

Agradecimiento. Agradecemos la ayuda técnica de Mercedes Enzaldo. Este proyecto contó con el financiamiento por parte del CONACyT 177568. Alejandra Mejía contó con una beca de maestría otorgada por el CONACyT, México.

Bibliografía.

1. Garcia-Borrón JC, Solano F. (2002). *Pigment Cell Res.* vol (15): 162-73.
2. Cabrera-Valladares, N, A Martínez, S Pinero, VH Lagunas-Muñoz, R Tinoco, R de Anda, R Vazquez-Duhalt, F Bolívar, G Gosset. (2006). *Enzyme Microb. Technol.* Vol (38): 772-779.
3. Lagunas-Muñoz, VH, N Cabrera-Valladares, F Bolívar, G Gosset, A Martínez. (2006). *J. Appl. Microbiol.* Vol (101):1002-1008.
4. Echeverría, A. (2010). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
5. Gaytan-Colin, Paul. Datos no publicados.