

*FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS*

**Modelado tridimensional de la enzima tirosinasa
hipotética de *Pleurotus ostreatus* PC15**

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología
Mención Ambiental**

Autor: Lic. Ianna Yaribet Benavides Oro

Tutor: Dr.C. Humberto J. Morris Quevedo
Dr.C. Teresa Orberá Ratón

Consultante: Dr.Cs. Gustavo Sierra
González

2020



A mi madre, mis abuelos...

Me hubiese gustado que estuvieran aquí...

Listado de acrónimo

BLAST: Herramienta de Alineamiento Básico Local

BmTir: Tirosinasa de *Bacillus megaterium*

CO: Catecol oxidase

EC: Número de Comisión de Enzima

HMM: Modelo oculto de Markov

HHblast: Búsqueda interactiva de secuencia rápida

IbCO: Catecol oxidasa de *Ipomea batatas*

NCBI: Centro Nacional de Investigaciones Biotecnológicas

N-glicosilación: glicosilación de la Asparagina

OST: oligosacariltransferasa

PDB: Base de Datos de Proteínas

PPOs: Polifenoloxidasas

QMEAN: Análisis Cualitativo de la Energía del Modelo

RMN: Resonancia magnética nuclear

ScTir: Tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus*

Tyr: Tirosina

Resumen

La enzima tirosinasa se relaciona con el oscurecimiento enzimático de los hongos, considerándose la causa principal de la disminución de su valor comercial. En el trabajo se obtuvo un modelo por homología de la tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus* PC15. La estructura 4j3p A de *Aspergillus oryzae* fue seleccionada como plantilla y los modelos fueron construidos utilizando los servidores Swiss-model, I-TASSER y Phyre² y validados por medio del diagrama de Ramachandran suministrado por Procheck, los servidores Verify3D y ProSA. Se obtuvieron tres modelos tridimensionales para la enzima tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus* PC15 validados por diferentes estrategias computacionales, El modelo Tyr Swiss resultó el mejor con un 85,5% de los residuos de aminoácidos bajo la región favorecida, y un z-score de -7,15 en Prosa. El valor de Verify 3D de 80.73% indicó que el entorno del perfil del modelo es apropiado. Los modelos obtenidos podrían ser útiles para la búsqueda de nuevos inhibidores de la enzima con aplicaciones industriales.

Palabras clave: homología estructural, diagrama de Ramachandran, oscurecimiento enzimático, *in silico*

Abstract

The enzyme tyrosinase is related to the enzymatic darkening of fungi, and it is considered as the main cause of the decrease in the commercial value. A homology model of the hypothetical tyrosinase from *Pleurotus ostreatus* PC15 was obtained in this work. The 4j3p A structure of *Aspergillus oryzae* was selected as a template and the models were built using the Swiss-model, I-TASSER and Phyre2 servers, and validated by means of the Ramachandran diagram supplied by Procheck, the Verify3D and ProSA servers. Three 3D models were obtained for the hypothetical tyrosinase enzyme of *Pleurotus ostreatus* PC15, validated by different computational strategies, Tyr Swiss was the best model with 85.5% of the amino acid residues under the favored region, and a z-score of -7.15 in Prosa. The Verify 3D value of 80.73%, indicated that the environment of the model profile was appropriated. The obtained models may be useful for discovery new enzyme inhibitors with industrial applications.

Keywords: structural homology, Ramachandran diagram, enzymatic darkening, *in silico*

Índice

Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	4
2.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	4
2.1.1 Clasificación taxonómica	4
2.1.2 Morfología	4
2.1.3 Valor nutricional	4
2.2 Generalidades de la polifenol oxidasa (PPO)	5
2.2.1 Propiedades moleculares de la PPO	6
2.2.2 Características generales de la enzima tirosinasa	6
2.2.3. Tirosinasa: Aplicaciones biotecnológicas	7
2.3 Herramientas bioinformáticas (<i>in silico</i>)	8
2. 3.1 Modelación por homología	8
2. 3.2 Evaluación y validación de los modelos	9
2.3.2.1 Diagramas de Ramachandran	9
2.3.2.2 Análisis Estructural de Proteínas (ProSA)	10
2.3.2.3 Perfil tridimensional del modelo	10
III. Materiales y métodos	12
3. 1. Obtención y análisis de estructura primaria	12
3.2 Búsqueda de plantillas	12
3.3. Predicción de la estructura secundaria de la tirosinasa hipotética de <i>P. ostreatus</i>	12
3.4. Construcción del modelo	13
3.5 Evaluación y validación de la calidad de los modelos	14
3.5.1 Evaluación con el servidor Procheck	14
3.5.2 Evaluación con los servidores ProSA y Verify3D	14
IV. Resultados y discusión	16
4.1 Obtención y análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosinasa hipotética de <i>P.ostreatus</i>	16
4.2 Análisis de la estructura secundaria	18
4.2.1 Identificación de dominios	19
4.3 Selección y análisis de la plantilla	20
4.4 Alineamiento de plantilla y secuencia de tirosinasa hipotética	22
4.5 Análisis y validación de los modelos tridimensionales de la tirosinasa hipotética de <i>P. ostreatus</i>	26

4.5.1 Análisis de ProSA	27
Conclusiones	30
Recomendaciones	31
Referencias Bibliográficas	32

Introducción

Los hongos se distribuyen ampliamente por todo el mundo, existen aproximadamente 10 000 especies, de las cuales solo el 10% es comestible, *Pleurotus* es una de ellas. Dentro de este género se distingue *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kum. *Pleurotus ostreatus*, especie cosmopolita con elevado valor nutricional y propiedades terapéuticas, además de una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Faraco *et al.*, 2009; Karas *et al.*, 2011; Knop *et al.*, 2015).

Pleurotus ostreatus representa un recurso valioso para la biotecnología por su papel en la degradación de residuos lignocelulósicos, al crecer en gran variedad de materiales vegetales y producir cuerpos fructíferos que constituyen un alimento de alta calidad nutricional (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016; Díaz Caballero *et al.*, 2012). También, tienen propiedades medicinales, debido a que producen metabolitos primarios y secundarios con actividad biológica promisorio por ejemplo (*i.e.*: anticancerígena, inmunomoduladora, antioxidante, hipocolesterolemica y antibacteriana (Corrêa *et al.*, 2016; Weijn *et al.*, 2013). Dichas propiedades hacen de este hongo uno de los más cultivados en el mundo y de valor comercial (Cano-Estrada y Romero-Bautista, 2016).

Sin embargo, existen factores que contribuyen a la pérdida de calidad de los hongos y disminuyen su atractivo para el mercado Weijn *et al.* (2013). Uno de ellos es el oscurecimiento que ocurre durante las etapas de recolección, manipulación y almacenamiento (Jolivet *et al.*, 1998). Estas reacciones de oscurecimiento tienen lugar por la oxidación de sustratos fenólicos en quinonas, y rinden como producto final la melanina (Lontie, 2018; Wichers *et al.*, 1995). La melanina es un pigmento ubicuo, de color pardo y alto peso molecular, responsable de la coloración de la piel (Gibbons, 2014; Concepcion Olivares y Solano, 2009) y participa en la protección contra los rayos UV y las radiaciones ionizantes (Concepcion Olivares y Solano, 2009), en la defensa inmunológica (Coates y Nairn, 2014) así como en otras funciones biológicas (Halaouli *et al.*, 2006). Dicho pigmento se produce por la polimerización de dopaquinonas mediante la tirosinasa (TY, EC 1.14.18.1), enzima que cataliza la monooxigenación de la tirosina (Halaouli *et al.*, 2006).

La tirosinasa cataliza la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa/cresolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa/catecolasa). En las plantas, encontramos otras enzimas similares, las catecol oxidasas (CO), que catalizan solo la oxidación de los *o*-difenoles (Fronk *et al.*, 2015; Solem *et al.*, 2016). Las TY y CO, comúnmente conocidas como polifenoloxidasas (PPOs), pertenecen al grupo de proteínas de cobre tipo 3 (Rolff *et al.*, 2011; Weijn *et al.*, 2013); en ambas el centro bicúprico está rodeado por un paquete de cuatro α hélices y coordinado por seis histidinas (Solem *et al.*, 2016). Una estructura similar ha sido reportada en la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba *et al.*, 2006) y en la hemocianina de moluscos y artrópodos (Adman, 1991; Cuff *et al.*, 1998).

El sitio activo de la TY y la CO durante el ciclo catalítico existe en tres estados de oxidación diferentes. La forma met [Cu(II)-Cu(II)] corresponde al estado de reposo de la enzima, donde los iones Cu[II] interactúan con ligandos pequeños como el agua o iones OH⁻. La forma deoxi [Cu(I)-Cu(I)] es una especie reducida que se une al oxígeno y da lugar a la tercera forma, oxi [Cu(II)O₂--Cu(II)]. En este último estado, el oxígeno molecular se une como peróxido en una configuración que desestabiliza y activa el enlace O-O (Fronk *et al.*, 2015; Matoba *et al.*, 2006).

La actividad catecolasa ha sido estudiada en plantas y hongos; sin embargo, la actividad tirosinasa solo ha sido demostrada para un limitado número de estas enzimas (Walker y Ferrar, 1998). Se ha propuesto que todas las COs de plantas y hongos poseen actividad monofenolasa, pero no existe consenso sobre esta opinión (Martínez y Whitaker, 1995). Por esta razón aún no está completamente esclarecido el papel fisiológico de la actividad monofenolasa en estos organismos (Marusek *et al.*, 2006). Recientemente, el grupo Fishman del Instituto de Tecnología de Israel, presentó la estructura cristalina de la tirosinasa de *Bacillus megaterium* con y sin sustratos mono o difenólicos unidos (Goldfeder *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Sendovski *et al.*, 2011). Estos autores sugieren que la discriminación funcional entre la tirosinasa y la catecol oxidasa se debe a una Asparagina que junto con un Glutamato se une y activan una molécula de agua conservada, hacia la desprotonación de mono-fenoles, que se requiere para la actividad tirosinasa (Solem *et al.*, 2016).

Aunque la función de la tirosinasa en la pigmentación de mamíferos ha sido ampliamente estudiada y bien caracterizada (Decker y Tuczec, 2017; Lai *et al.*, 2017; Schallreuter *et al.*, 2011), aún no está dilucidada la función y los mecanismos de activación *in vivo* de las polifenol oxidasas, (Marusek *et al.*, 2006). El oscurecimiento de frutas, vegetales y hongos mediado por las polifenoloxidasas, como resultado de la formación de melanina después de un daño mecánico, sugiere un papel en la defensa contra insectos y patógenos (Jolivet *et al.*, 1998; Urán y Cano, 2011). Estos efectos del oscurecimiento enzimático pueden contrarrestarse con compuestos químicos inhibidores que eviten el contacto del sustrato con el sitio catalítico de la proteína (Ioannou, 2013). Entre los inhibidores de tirosinasa se han reportado algunos triterpenoides y flavonoides presentes en plantas y otros organismos (Masuda *et al.*, 2005).

Al respecto existe información reducida sobre la estructura de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*, así como de las mínimas diferencias estructurales y funcionales entre las tirosinasas y catecol oxidasas (Solomon *et al.*, 1996). En consecuencia, el uso de métodos computacionales para la predicción de estructuras de proteínas, como la modelación por homología, podrían aportar información valiosa sobre dicho tema.

En este sentido la presente investigación abordó como Problema.

La estructura tridimensional de la tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus* PC15 aún no ha sido resuelta. Sin embargo, la disponibilidad de secuencias proteicas y modelos estructurales de enzimas depositados en bases de datos facilitaría la construcción de

modelos tridimensionales de utilidad en la comprensión de su papel fisiológico y aplicaciones biotecnológicas.

De la situación anterior se enuncia como hipótesis:

"Si se exploran las secuencias proteicas homólogas de la enzima tirosinasa de *Pleurotus ostreatus* será posible obtener un modelo tridimensional a partir del método de modelación por homología."

A partir de la hipótesis, el presente trabajo tuvo como objetivo general:

Obtener un modelo *in silico* de la enzima tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus*, por el método de modelado por homología

Objetivos específicos:

1. Modelar la estructura terciaria de la enzima a partir de los servidores Swiss-Model, I-TASSER y Phyre².
2. Evaluar la calidad de las estructuras terciarias predichas utilizando los servidores Procheck, ProSA y Verify 3D.

II. Revisión bibliográfica

2.1 *Pleurotus ostreatus*

La palabra *Pleurotus* deriva del griego "pleura", que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite con respecto al píleo. Son hongos saprófitos, descomponedores, del grupo de la podredumbre blanca, crecen generalmente sobre sustratos lignocelulósicos vivos o muertos, pobres en nutrientes y con bajos niveles de minerales y vitaminas (Morris y Llauradó, 2017).

2.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus ostreatus*

2.1.2 Morfología

Pleurotus ostreatus se caracteriza por desarrollarse en forma escalonada o en aspecto de racimos. El cuerpo del hongo está constituido por el sombrero, el pie y las láminas. El sombrerillo o píleo de esta seta es redondeado con superficie lisa abombada y convexa. Tiene forma de paraguas más o menos circular y se desarrolla en forma de ostra u oreja. Su tamaño depende de la edad y oscila de 5-15 cm de diámetro, aunque pueden encontrarse ejemplares más grandes. En la parte inferior del sombrero hay unas laminillas, dispuestas radialmente hacia el borde. Son anchas, espaciadas unas de otras y decurrentes, blanquecinas o cremas y en ellas se producen las esporas para la reproducción. Estas esporas son oblongas, casi cilíndricas de 8-12 micras, que en gran número forman masas de esporas. Pueden ser blancas, grises y de color café (Chegwin Angarita, 2014). El pie o estípite suele ser corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro que en ocasiones puede ser excéntrico; la carne blanquecina, con sabor y olor agradables (Vital *et al.*, 2015).

2.1.3 Valor nutricional

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* se encuentran entre los más populares, debido a su alto valor nutricional, sus propiedades organolépticas y medicinales, rápido crecimiento y condiciones de cultivo poco exigentes (Sher *et al.*, 2011). Es el segundo género más cultivado a nivel mundial, representando el 19% de la producción de

hongos. *Pleurotus ostreatus*, la especie más popular del género, se usa comúnmente en la preparación de sopas, en recetas de salteados con salsa de soja o en rellenos (Royse *et al.*, 2017). Su supremacía nutricional en relación con la dieta vegetariana está en virtud de su pared celular rica en quitina que actúa como fuente de fibra dietética, junto con su contenido de vitaminas (incluyendo tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, ergosterina y niacina), minerales (tanto microelementos como macroelementos, por ejemplo fósforo y hierro) y muy bajos niveles de grasa (Corrêa *et al.*, 2016). Además, contiene ácidos grasos como el oleico, palmítico y linoleico. Todas estas propiedades han permitido catalogarlo como la carne vegetal (Torres *et al.*, 2017).

2.2 Generalidades de la polifenol oxidasa (PPO)

Las polifenol oxidasas (PPOs) son una clase importante de proteínas de cobre tipo-3 y se encuentran en plantas, hongos, bacterias y animales. Estas proteínas tipo-3 se clasifican según la nomenclatura de enzimas en: catecol oxidasa (CO, o-difenol: oxígeno, oxidoreductasa, E.C 1.10.3.1), tirosinasas (monofenol, o difenol: oxígeno oxidoreductasa, E.C 1.14.18.1) y aureusidina sintasa (2',4,4',6'tetrahidroxichalcona 4'-o-β-D glucósido: oxígeno oxidoreductasa, E.C 1.21.3.6 (Mayer, 2006).

Las catecol oxidasas (COs) están ampliamente descritas en plantas y también en el hongo *Aspergillus oryzae* (Volbeda y Hol, 1989), mientras que las tirosinasas se encuentran en humanos, plantas, bacterias y hongos (Mayer, 2006). Aureusidina sintasa se ha descrito en los pétalos de la planta conocida como "boca de dragón" (*Antirrhinum majus*) (Nakayama *et al.*, 2000). Muchas PPOs tienen un dominio C-terminal en su estado inicial, sugiriendo que las PPOs se expresan como precursores inactivos (proenzimas o zimógenos). La forma activa de PPO se forma por proteólisis del C-terminal (Fujieda *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2012).

Las PPOs son bastantes distintas dependiendo del organismo de origen. Sin embargo, todas ellas tienen en común una región altamente conservada con motivos de histidina en la zona de los átomos de cobre CuA y CuB (Matoba *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2014); alrededor de los cobres, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos importantes para la unión de los sustratos. El mecanismo de reacción de la PPO (Figura 1), se basa en la catálisis de dos etapas: oxidación de un monofenol a o-difenol y la subsiguiente oxidación de éste a o-quinona, actividad cresolasa y catecolasa respectivamente (Solomon *et al.*, 1996). La polifenol oxidasa es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de oscurecimiento que ocurren en los procesos de pos-recolección y manipulación de frutas, hortalizas y hongos (Jolivet *et al.*, 1998).

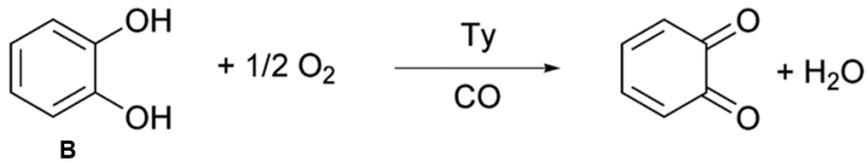
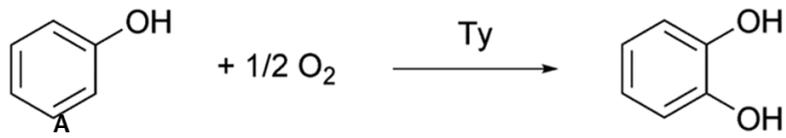


Figura 1. Reacciones catalizadas por tirosinasas (A) y reacciones catalizadas por tirosinasas y catecol oxidasas (B)

2.2.1 Propiedades moleculares de la PPO

El empleo de técnicas de Biología Molecular ha hecho posible que el número de secuencias conocidas de tirosinasa haya aumentado en los últimos años en toda la escala filogenética (Sullivan, 2015; Van Gelder *et al.*, 1997). De la comparación y análisis filogenético de las secuencias de tirosinasas aisladas de diferentes fuentes, se observa un agrupamiento en los géneros de plantas superiores, animales vertebrados, hongos y bacterias. El grado de homología dentro de cada grupo es considerablemente mayor que entre ellos (Torres *et al.*, 2017). Sin embargo, las secuencias responsables de la unión de cobre por tirosinasa se encuentran muy conservadas en todas las especies y son análogas a las descritas para las hemocianinas, enzimas transportadoras de oxígeno de artrópodos y moluscos (Wichers *et al.*, 2003).

De estos estudios y de las cristalizaciones realizadas se deducen tres grandes dominios (Matoba *et al.*, 2006). El dominio central alberga el sitio activo de la enzima, que consiste en un par de iones cobre que se unen a tres residuos de histidina altamente conservados. Este centro bicúprico es el sitio de interacción con el oxígeno molecular y con los sustratos fenólicos (Van Gelder *et al.*, 1997).

Las regiones que rodean al sitio de unión de cobre en tirosinasa son homólogas a la proteína hemocianina y catecol oxidasa. El dominio N-terminal es relevante en PPO de plantas. Estas enzimas se consideran maduras cuando una cadena de aminoácidos de proximadamente 80-90 residuos es cortada de la porción N-terminal. Este péptido se denomina péptido señal (Sommer *et al.*, 1994); pero el mismo no está presente en hongos ni insectos (Van Gelder *et al.*, 1997).

El dominio transmembrana está presente en PPO de plantas superiores, ya que está asociada a la membrana tilacoidal en tejidos no senescentes. La localización de las PPO de hongos no está clara y al parecer es una enzima citoplasmática. En *Agaricus bisporus* y *Neurospora crassa*, al estar presentes en el citosol no hay evidencia de regiones transmembranosas (Mayer, 1986). Sin embargo, en algunos casos se asocia con la pared celular, apareciendo en la matriz celular (Rast *et al.*, 2003).

2.2.2 Características generales de la enzima tirosinasa

Los primeros estudios sobre la tirosinasa se realizaron hace más de un siglo. El primer trabajo sobre la tirosinasa fue publicado por Bertrand hace 118 años (Bertrand, 1896). Posteriormente se han publicado gran cantidad de artículos científicos sobre la enzima, procedimientos para su aislamiento (Keilin y Mann, 1938), estructura y funciones (Mason, 1956; 1966; Matoba *et al.*, 2006; Mayer, 2006; Sendovski *et al.*, 2011; Mauracher *et al.*, 2014a; Zekiri *et al.*, 2014) y mecanismos de actuación (Solomon *et al.*, 2014).

Desde esos momentos la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1) ha estado bajo la atención de la comunidad científica internacional por sus múltiples aplicaciones en los campos de la agricultura, la medicina, los cosméticos y los alimentos. Varios estudios han sido realizados, principalmente enfocados en las características de la enzima. Sin embargo,

a pesar de ello, aún siguen sin conocerse completamente algunos aspectos de su estructura y mecanismo catalítico (García Molina, 2015).

La tirosinasa es una enzima esencial presente en todos los organismos (Claus y Decker, 2006), en los cuales inicia la síntesis de melanina, catalizando la hidroxilación de monofenoles a *orto*-difenoles y la subsecuente oxidación (dos-electrones) a *orto*-quinonas con oxígeno molecular (Decker *et al.*, 2006). Pertenece a la familia de las monofenol oxidasas, en las cuales el centro catalítico está formado por dos átomos de cobre (proteínas cúpricas de *tipo 3*) (Matoba *et al.*, 2006) y cada uno está coordinado con tres residuos de histidina (van Holde *et al.*, 2001).

Sobre la base de datos cinéticos y la existencia de intermediarios de la tirosinasa (*desoxi*, *oxi* y *met*), se han establecido dos ciclos reactivos. A partir de la forma *oxi* de tirosinasa, monofenoles son convertidos a *o*-difenoles (ciclo de monofenolasa); posteriormente, los *o*- difenol (catecol) intermedios son convertidos a *o*-quinonas, reformando el sitio de *desoxi*, que es capaz de unir O₂. Una segunda reactividad del sitio *oxi* es la oxidación de catecoles externos a *o*-quinonas (difenolasa actividad), generando el derivado *met* de la tirosinasa. Este intermediario es a su vez capaz de oxidar dos electrones del catecol de modo que dos moléculas de difenol (catecol) son convertido a *o*-quinona en el curso del ciclo difenolasa (Rolff *et al.*, 2011).

Los experimentos espectroscópicos y mecánicos, han mostrado que el sitio activo de la tirosinasa es muy similar al de la hemocianina de los moluscos (Solomon *et al.*, 1996). Con la comparación espectral, realizada con un complejo correspondiente al modelo de Kitajima *et al.* (1989), se pudo concluir que estas metaloproteínas, en su forma *oxy* enlazan el oxígeno, como peróxido, en una única forma, de puente lateral $\mu - \eta^2 : \eta^2$, como fue confirmado luego por la estructura cristalina de la *oxy* hemocianina de artrópodos y moluscos (Decker *et al.*, 2006; van Holde *et al.*, 2001).

2.2.3. Tirosinasa: Aplicaciones biotecnológicas

Tradicionalmente los estudios con tirosinasa se han llevado a cabo utilizando la enzima comercial de *Agaricus bisporus* como modelo en la investigación sobre la melanogénesis y el pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas (Jolivet *et al.*, 1998). Actualmente, debido al interés industrial de esta enzima, se ha intentado extender su estudio a enzimas de otras fuentes, sobre todo a tirosinasas microbianas (Ren *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2014).

La tirosinasa tiene distintas aplicaciones como en la industria alimentaria y cosmética, su utilización en química orgánica para la síntesis de *o*-difenoles (L-dopa) así como su empleo en la detoxificación de aguas y tierras que contienen fenoles. Destacan sus aplicaciones analíticas en la determinación de tioles (García-Molina *et al.*, 2005; Peñalver *et al.*, 2002) y a través de biosensores de fenoles y *o*-difenoles. Finalmente, su empleo en la fabricación del pigmento melanina, que puede emplearse como protector frente a la radiación, transportador de fármacos, antioxidante y agente antiviral. La enzima bacteriana utilizada fundamentalmente es la tirosinasa

recombinante de *Verrucomicrobium spinosum* expresada en *Escherichia coli* (Ren *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2014).

2.3 Herramientas bioinformáticas (*in silico*)

El estudio de proteínas codificadas a través de genes mediante bioinformática, asocia disciplinas como las matemáticas, biología, bioquímica y el desarrollo de software. Por esta razón, el desarrollo de algoritmos que reduzcan el tiempo de predicción en el software brinda una visión más rápida al comportamiento bioquímico que codifican los genes. Entre las mismas ramas interdisciplinarias facilita lo que se puede considerar como un estudio a profundidad en bioinformática (Martí-Renom *et al.*, 2000).

Uno de los principales objetivos de la bioinformática es la predicción de estructuras, especialmente cuando se trata de la estructura terciaria de una proteína que aún sigue siendo considerada como un paradigma difícil e irresoluto cuando la información disponible no es suficiente para la construcción del modelo en tres dimensiones (3D). Los dos problemas principales son: el cálculo de la energía libre de la proteína y la resolución mínima global de esta energía. Por lo tanto, un método de predicción de estructura debe ser capaz de explorar el espacio posible de las estructuras proteicas, el cual se describe como espacialmente inmenso. Estos problemas pueden simplificarse a través de métodos de modelado por homología y enhebrado de proteínas, los cuales persiguen que el espacio de búsqueda pueda ser asumido por una estructura cercana determinada experimentalmente para otra proteína homóloga (Sáenz-Suárez *et al.*, 2011).

2. 3.1 Modelación por homología

El esclarecimiento de la estructura de una proteína a veces puede ser muy difícil, debido a complicaciones en la obtención de suficiente cantidad de proteína, dificultades asociadas al proceso de cristalización o también de la resolución de la proteína ya cristalizada. En este contexto los métodos que proponen la predicción de la estructura han ganado mucho terreno. El modelado por homología, a veces también denominado “modelado comparado”, es la construcción de un modelo 3D a resolución atómica de una proteína “diana”, utilizando su secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de una proteína homóloga, la “plantilla”. Esta técnica se basa en la identificación de una o más estructuras proteicas conocidas, que probablemente se parecen a la estructura de la secuencia diana (*query*) y la realización de un alineamiento que superponga los residuos de la secuencia diana con los de la plantilla (*template*) (Sáenz-Suárez *et al.*, 2011).

Se ha comprobado que la estructura está más conservada que la secuencia entre proteínas homólogas, aunque cuando la identidad de secuencia cae por debajo del 20 % la estructura puede ser muy diferente (Kabsch y Sander, 1983; Kaczanowski y Zielenkiewicz, 2010). Por tanto, proteínas evolutivamente relacionadas tienen secuencias similares y estructuras similares. También se ha comprobado que la estructura proteica está evolutivamente más conservada de lo que se esperaría basándola solo en la conservación de secuencia. El alineamiento de secuencias y la

estructura de la “plantilla” son entonces usados para generar un modelo estructural de la “diana”(Kaczanowski y Zielenkiewicz, 2010).

La calidad del modelado por homología es dependiente de la calidad del alineamiento de secuencia y de la estructura plantilla. El abordaje puede ser complicado por la presencia de huecos (gaps) en el alineamiento, que indican una región estructural presente en la diana, pero no en la plantilla, también por la existencia de gaps en la plantilla, que provienen de zonas de pobre resolución en el procedimiento experimental para resolver la estructura (generalmente cristalografía por rayos X). Los errores son significativamente más altos para los bucles, donde la secuencia entre la diana y la plantilla podría ser completamente diferente. Al disminuir la identidad, se incrementan los errores en la posición y empaquetamiento de las cadenas laterales en la estructura modelada, cuya variación se sugiere como la principal razón para un modelado de pobre calidad (Chung y Subbiah, 1996). En resumen, los problemas de modelado se reducen en buena medida a encontrar la plantilla adecuada.

Desde que el protocolo básico de este método fue establecido entre las décadas de 1970 y 1980 han surgido varios paquetes de software capaces de realizar modelación por homología; entre los programas más conocidos están Modeller, Swiss-Model, I-TASSER, Phyre², ModSeg/ENCAD23, NEST24 y SCWRL25, los cuales emplean diferentes enfoques a la hora de realizar la alineación y obtener las coordenadas del modelo.

2. 3.2 Evaluación y validación de los modelos

2.3.2.1 Diagramas de Ramachandran

El uso de ángulos de torsión para describir la conformación de polipéptidos y proteínas fue desarrollado por Sasisekharan, 1968 como parte de sus estudios sobre la estructura de las cadenas de colágeno durante su trabajo como estudiante de posgrado en el grupo de investigación de G.N. Ramachandran (Ramachandran y Sasisekharan, 1968).

El llamado diagrama de Ramachandran es un gráfico donde se “plotean” los valores de los ángulos Φ contra Ψ (donde Φ es el ángulo diedro relativo a la torsión ejercida sobre el enlace $C\alpha -NH$, en tanto Ψ es el ángulo diedro relativo a la torsión ejercida sobre el enlace $C\alpha -C=O$) (Figura 2). Esta representación se ha mantenido prácticamente sin cambios en los últimos 50 años y es aún una herramienta muy útil en el estudio de la estructura de proteínas, sobre todo en el análisis de estructuras cristalinas (Carrascoza *et al.*, 2014).

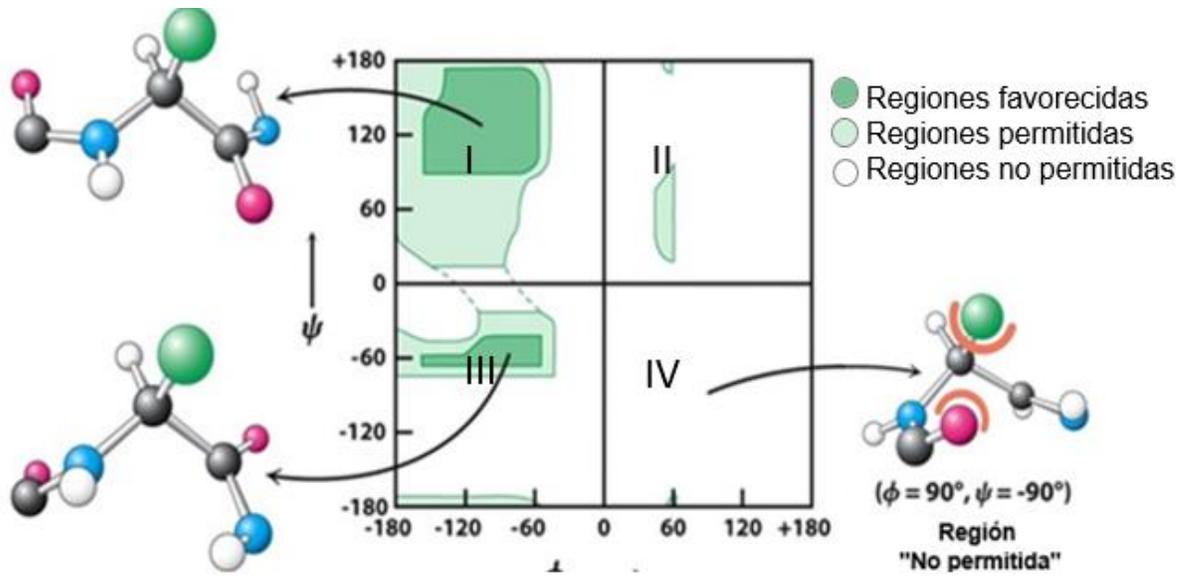


Figura 2. Giros de los ángulos diedros Φ y Ψ . Diagrama clásico de Ramachandran. I, II, III y IV Cuadrantes.

Tomado de: (Hollingsworth y Karplus, 2010)

El método, que supone a los átomos como esferas rígidas, considera que los residuos similares a la Alanina (los residuos que no son glicina ni prolina) pueden ocupar uno de los tres cuadrantes principales "permitidos", de acuerdo a las restricciones sobre las rotaciones de los enlaces antes mencionados debido a las repulsiones estéricas. El primer cuadrante, es la que permite las torsiones que pueden generar hélices- α de rotación hacia la izquierda (poco comunes). En el segundo cuadrante se incluyen conformaciones que dan lugar a hojas- β (fundamentalmente, aunque no de manera exclusiva). El tercer cuadrante comprende las conformaciones permitidas, aquellas que generan hélices- α de rotación a la derecha (principalmente, aunque no de modo exclusivo). Por último, el cuarto cuadrante es una región no permitida, salvo para los residuos aminoácidos de glicina y prolina

Estas regiones están "permitidas" en el sentido de que cuando a los átomos de las cadenas peptídicas se les asignen radios de Van der Waals, no colisionen. La región, a veces llamada la región del puente (porque une los cuadrantes II y III), se permite si los átomos reciben radios más pequeños, que lo que podrían considerarse posibles. Son varios los programas que permiten obtener estos gráficos, sin embargo el programa Procheck es uno de los más empleados (Laskowski *et al.*, 1993).

2.3.2.2 Análisis Estructural de Proteínas (ProSA)

ProSA es una herramienta ampliamente utilizada para verificar los modelos 3D de estructuras de proteínas en busca de posibles errores. Su campo de aplicación incluye el reconocimiento de errores en estructuras determinadas experimentalmente, modelos teóricos e ingeniería de proteínas (Sippl, 1993). Básicamente ProSA calcula el *z-score* indicando la calidad general de un modelo. Este valor se muestra en un gráfico que contiene los *z-score* de todas las cadenas de proteínas determinadas experimentalmente en el repositorio actual del Worldwide Protein Data Bank en función del tamaño de la proteína en términos de la cantidad de residuos aminoácidos). En dicha gráfica, los grupos de estructuras de diferentes fuentes (rayos X, RMN) se distinguen por diferentes colores. Se puede usar para verificar si el valor del *z-score* de la estructura del modelo construido está dentro del intervalo de puntajes encontrados típicamente para proteínas nativas de tamaño similar.

2.3.2.3 Perfil tridimensional del modelo

Una prueba efectiva de la corrección del modelo 3D de una proteína es la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D) asignando una clase estructural basada en su ubicación y entorno y comparando los resultados con estructuras adecuadas. Esta correlación, denominada perfil tridimensional de una estructura proteica, es una tabla calculada a partir de las coordenadas atómicas de la estructura. Los perfiles tridimensionales calculados a partir de estructuras de proteínas correctas coinciden con sus propias secuencias con puntajes altos. Por el contrario, los perfiles tridimensionales calculados a partir de modelos de proteínas que se sabe que son incorrectos tienen una puntuación baja (Lüthy *et al.*, 1992). Así se de esta manera se puede identificar un segmento

incorrectamente modelado en una estructura y evaluar la exactitud de un modelo de proteína, independientemente de si el modelo se ha obtenido mediante rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), microscopía crio-electrónica o procedimientos computacionales. Una de las herramientas más empleadas para el cálculo de los perfiles 3D de un modelo proteínico es Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997). Una alta puntuación del perfil Verify3D indica que la estructura de la proteína modelada es de alta calidad.

III. Materiales y métodos

3. 1. Obtención y análisis de estructura primaria

La secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la proteína tirosinasa de *Pleurotus ostreatus* con número de acceso KIQ24083 se obtuvo del NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que es el Centro Nacional de Investigaciones Biotecnológicas. A partir de la secuencia en formato Fasta, se hizo una evaluación del contenido porcentual para los aminoácidos presentes utilizando la herramienta GPMW Lite (<http://www.alphalyse.com>). El programa permite conocer la composición de residuos de aminoácidos, identifica aminoácidos específicos ácidos o básicos y permite la predicción de modificaciones postraduccionales.

3.2 Búsqueda de plantillas

Para encontrar secuencias plantillas, potencialmente similares a la de interés, se utilizó el algoritmo BLAST (Herramienta de Alineamiento Básico Local), a partir del servidor de la base de datos Protein Data Bank (PDB) <http://www.rcsb.org/pdb>. En este trabajo se comparó la secuencia suministrada de *P. ostreatus* con las secuencias depositadas en PDB para identificar regiones con similitud local. Un elemento clave en la evaluación de la calidad de un alineamiento de un par de secuencia es la matriz de sustitución, la cual asigna una puntuación al alineamiento de cualquier par de residuos posibles. Las matrices de sustitución están diseñadas para detectar similitudes que divergen en cierto grado, no obstante, una sola matriz de sustitución puede razonablemente eficaz en un intervalo evolutivo relativamente amplio de cambio evolutivo (Mount, 2008b). Otro parámetro de gran utilidad es el valor de expectación, el cual indica la significación estadística de un par de secuencias alineadas; un alineamiento de secuencias con valor de expectación de 10^{-6} significa que la similitud entre las secuencias tendrá esa probabilidad de que sea por casualidad (Mount, 2008a). Los parámetros de alineamiento se muestran en la Tabla 1.

Además, para validar los resultados del BLAST, se utilizó el servidor del Swiss Model (Biasini *et al.*, 2014), <https://swissmodel.expasy.org/>) en su opción "buscar plantillas" en la librería. La librería del Swiss Model utiliza tanto BLAST como HHblits (), como buscadores; para identificar las plantillas y obtener los alineamientos entre la proteína a modelar y su plantilla. El uso combinado de estos dos métodos garantiza el alineamiento correcto, incluso cuando no hay alta identidad de secuencia (homología) entre el modelo y su plantilla. A partir de 89 plantillas, se seleccionó la plantilla 4j3p A de *Aspergillus oryzae* con resolución de 2,5 Å fue seleccionada porque es la más alta identidad de secuencia (40.92%) conocida para la enzima tirosinasa.

3.3. Predicción de la estructura secundaria de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*

Basada en la secuencia de aminoácidos, la predicción de las estructuras secundarias se realizó mediante el servidor JPRED 4 (Barton, 2015), (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4>). Este servidor permitió clasificar cada

aminoácido según tres posibles estados de estructura secundaria: α -hélice, hoja β u otro. A la predicción de cada residuo se le asignó un índice de fiabilidad, que varía entre 0 y 9, que se correlaciona con la exactitud de la predicción. Este índice permite identificar las regiones de la proteína que se han predicho con mayor exactitud (Rost, 2001). Posteriormente, se analizaron los dominios de la tirosinasa hipotética a través del servidor Pfam [http:// pfam.sanger.ac.uk/](http://pfam.sanger.ac.uk/).

3.4. Construcción del modelo

A partir de la secuencia KDQ24083 de la tirosinasa se construyeron modelos teóricos a través de Swiss Model (Biasini *et al.*, 2014), <https://swissmodel.expasy.org/>), I-TASSER (Y. Zhang, 2008), [http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ ITASSER](http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ITASSER)) y Phyre² (Kanteev *et al.*, 2015), <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Se utilizaron tres servidores para seleccionar el modelo más preciso según los mejores valores de ajuste. Las tres herramientas construyeron las estructuras terciarias conforme a los parámetros de similitud, identidad y cobertura.

Modelación por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>). Una vez realizado el alineamiento se efectúa un modelo atómico para la proteína (Biasini *et al.*, 2014). En el mismo se generan coordenadas atómicas usando los alineamientos entre el modelo y su plantilla, se reconstruyen las zonas no conservadas entre ambas (mediante la matriz de sustitución BLOSUM62) y se completan las cadenas laterales a partir de una librería de estructuras conocidas (Guex *et al.*, 2009).

Para determinar la veracidad del modelo, se calculan los valores de QMEAN (Análisis Cualitativo de la Energía del Modelo) un método de cálculo compuesto que describe los aspectos geométricos más importantes de las proteínas. El método define algunas características geométricas del modelo, como ángulos de torsión y accesibilidad al solvente, y las compara con distribuciones estadísticas obtenidas a partir de estructuras experimentales. El valor de QMEAN obtenido es indicativo de la confiabilidad del modelo (Biasini *et al.*, 2014).

El modelo se construyó en función de la alineación con la plantilla y la secuencia blanco mediante ProMod3. Las coordenadas entre el objetivo y la plantilla se conservaron y se copiaron de la plantilla al modelo. Luego se reconstruyen las zonas no conservadas entre ambas (mediante la matriz de suplantación BLOSUM62 y las inserciones y deleciones se remodelaron utilizando una biblioteca de fragmentos. Inmediatamente se reconstruyeron las cadenas laterales a partir de una librería de estructuras conocidas (Guex y Peitsch, 1997). Finalmente, la geometría del modelo resultante se regularizó

Tabla 1. Principales parámetros introducidos en BLAST. Los demás parámetros se mantuvieron predeterminados.

Código o secuencia	KDQ24083
Base de datos	Protein Data Bank
Algoritmo	PSI-BLAST
Matriz de valoración	BLOSUM (62, 45) y PAM 200
Longitud de la serie de residuos a comparar	3
Umbral de expectación	1.0×10^{-6}

utilizando un campo de fuerza y el modelado del bucle se construyó con ProMod3 (Guex *et al.*, 2009).

Paralelamente se utilizó el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ITASSER/>). A diferencia de Swiss Model, I-TASSER realiza el modelado estructural por la técnica de enhebrado el cual se basa en la determinación *in silico* de la estructura secundaria de diversos fragmentos obtenidos a partir de la secuencia de la proteína a modelar (Y. Zhang, 2008). Posteriormente, el enhebrado se realiza mediante ajustes interactivos de los fragmentos obtenidos, buscando los mínimos energéticos, para la construcción del modelo final. I-TASSER genera diversas conformaciones estructurales que se denominan "señuelos". Para seleccionar el modelo final utilizó el software SPICKER que agrupa todos los "señuelos" de a pares y los compara en base a la similitud de estructura, generando hasta cinco modelos. La credibilidad de cada modelo es medida usando el valor de *c-score* (un *score* de confianza, el cual se calcula a partir de la significancia de los alineamientos de la plantilla enhebrada y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensamblaje estructural). Su rango numérico es de -5 a 2, donde un valor mayor indica una alta credibilidad del modelo predicho y viceversa (C. Zhang *et al.*, 2017).

Phyre² (Kelley *et al.*, 2015), <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Predice la estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos y la convierte en un modelo oculto de Markov (HMM). Este HMM luego se escanea utilizando la coincidencia HMM-HMM con una base de datos recopilada de estructura de modelos HMM, conocida como la biblioteca de plegado. Phyre² utiliza HHsearch10, que es uno de los principales métodos de detección de homología. Posteriormente se realizó el modelado del bucle.

3.5 Evaluación y validación de la calidad de los modelos

3.5.1 Evaluación con el servidor Procheck

Se evaluó la calidad de los modelos por medio de Procheck (<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/pdbsum/Generate.html>). Se consideraron las restricciones de los ángulos diedros ϕ y ψ , proporcionadas por el diagrama de Ramachandran (Laskowski *et al.*, 1993). Este diagrama proporciona la distribución de los ángulos de torsión de una estructura proteica y permite pronosticar las regiones favorecidas, permitidas y no permitidas para estos ángulos. Lo cual sirve como indicador de la calidad de los modelos de la estructura tridimensional de una proteína (Ramachandran y Sasisekharan, 1968).

3.5.2 Evaluación con los servidores ProSA y Verify3D

El servidor ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), permitió calcular el *z-score*, el cual indica la calidad general del modelo y la energía en función de la posición de los aminoácidos en la secuencia. La calidad del modelo general se

determinó al comparar el puntaje obtenido con el valor correspondiente de proteínas de tamaño similar cristalizadas por rayos X o NMR. Por otro lado, el análisis energético de las secuencias facilitó la detección de regiones con energía positiva. Este último análisis se realizó por bloques de 10 y 40 aminoácidos para calcular la energía promedio de cada posición en la secuencia.

Se utilizó Verify3D <http://servicesn.mbi.ucla.edu>, para calcular el perfil 3D de la proteína y considerar la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). El modelo debe tener más del 80% de los residuos de aminoácidos con puntaje ≥ 0.2 en el perfil 3D/1D. La figura 3 muestra la Metodología de trabajo seguida en la investigación.

Para visualizar la estructura terciaria se se utilizó el programa UCSF Chimera Versión: 1.13.1., el cual es un programa interactivo que permite visualizar y analizar estructuras moleculares y toda la información relacionada, incluye mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, secuencia de alineaciones, resultados de acoplamiento y trayectorias, conjuntos de información, entre otros datos importantes para estudios bioinformáticos (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

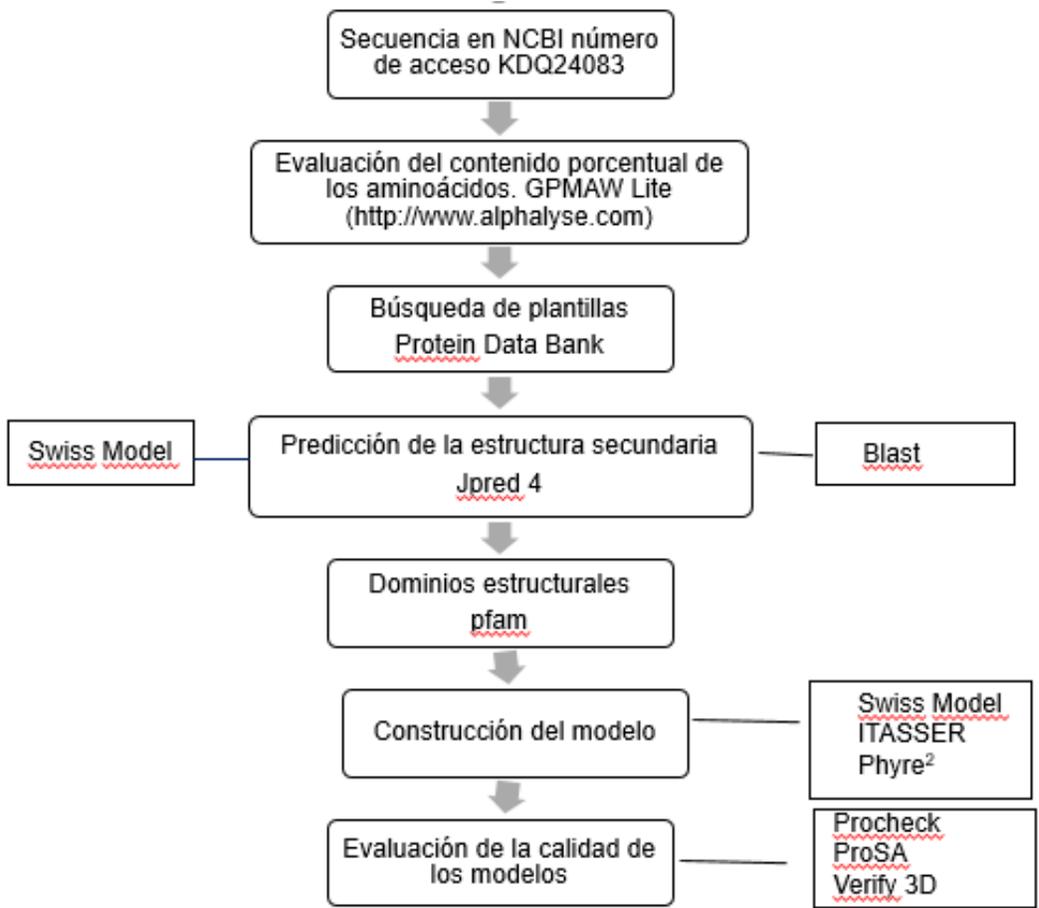


Figura 3. Metodología de trabajo seguida en la investigación

IV. Resultados y discusión

El modelado por homología suele ser el método de elección cuando existe una relación clara de homología entre la secuencia de la proteína diana y la secuencia de estructura conocida (Perumal *et al.*, 2015; Tripathi *et al.*, 2012). Este enfoque daría resultados razonables basados en la hipótesis de que las estructuras terciarias de dos proteínas serán similares si sus secuencias están relacionadas. El modelado por homología es un método que resulta bastante útil cuando las secuencias de las proteínas son similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo (Pratibha *et al.*, 2014).

En bioinformática, el modelado por homología se usa para determinar qué partes de una proteína son importantes en la conformación de sus estructuras tridimensionales, de esta manera se puede predecir la estructura terciaria de una proteína desconocida, mediante la estructura de una ya cristalizada conocida como homóloga (Baker y Sali, 2001; Ginalski, 2006). El principal objetivo del modelado de proteínas es predecir su estructura a partir de su secuencia con una precisión comparable a los mejores resultados obtenidos experimentalmente. Además, el modelado es la única forma de obtener información estructural de la proteína cuando las técnicas experimentales fallan debido a la dificultad de obtener su estructura experimentalmente, como es el caso de proteínas de gran tamaño y proteínas de membrana (Baker y Sali, 2001).

El modelado comparativo, también llamado modelado por homología, se basa en dos importantes observaciones:

- La estructura de una proteína es únicamente determinada por su secuencia aminoacídica (Carrascoza *et al.*, 2014).
- Durante la evolución, la estructura es más estable y cambia mucho más lento que su secuencia asociada, por lo que secuencias similares adoptan estructuras prácticamente idénticas, y secuencias lejanamente relacionadas podrían plegarse en estructuras similares (Sander y Schneider, 1991).

Por lo tanto, un modelo tridimensional de una proteína de interés (objetivo) puede ser construido a partir de una proteína relacionada cuya estructura sea conocida (plantilla o molde) y que estadísticamente comparta significativa similitud de secuencia con la proteína objetivo [85].

4.1 Obtención y análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosinasa hipotética de *P.ostreatus*

Mediante la búsqueda realizada en el NCBI se obtuvo la secuencia de aminoácidos en formato FASTA para la enzima tirosinasa hipotética, formada por 337 residuos de aminoácidos, cuya estructura 3D no ha sido reportada hasta la fecha. Las cuales fueron el punto de partida para la obtención de los diferentes resultados; secuencia FASTA:

```
>tr|A0A067N7R8|A0A067N7R8_PLEOS Uncharacterized protein OS=Pleurotus ostreatus PC15 OX=1137138 GN=PLEOSDRAFT_1048402 PE=4 SV=1
```

```
MITGFLVALLFASAVLATDVTKGPSKRCREVIVRKEWVLSKLAQNKARYIGAVKCLQA  
LPAQTSFTGVRTRFDDFQALHVSLMPEIHLVGGFLPWHRMLQVYEKALREECGYTG  
AQPYWDWTRDVDGASIVAASPVFDPVFGFGGNGIDIPGYAGQFGNMSDIPGWTGGG  
CITDGPFASYNLSIGPGTLVTNHCLTRSFNFAVAFIRSSQVANTTKQPNFERFRIELEG  
TPVTPTLKVHDAGHLSVGGEMNDRWSSPGDPVLYLHHSNLDRIWWEWQSMDLKRRL  
TDISGRTSIDPPVNVTLDFKLMGILADLIPIRDVMDVRASPMCIYIA
```

A partir de las secuencias en formato FASTA se realizó un conteo de residuos presentes en la proteína, su distribución porcentual y la masa promedio mediante el programa GPMaw Lite (<https://www.alphalyse.com/customer-support/gpmaw-lite-bioinformatics-tool/>). Este programa permite conocer la composición de residuos de aminoácidos, identifica aminoácidos específicos en ácidos o básicos y predecir las modificaciones postraduccionales.

GPMaw Lite identificó cinco modificaciones postraduccionales, correspondientes a N glicosilaciones (glicosilación de la Asparagina) (Figura 3). La secuencia consenso más representativa para N-glicosilación es N-X-S/T, donde X se corresponde con los aminoácidos Valina, Leucina, Metionina o Triptófano (Ruddock y Molinari, 2006). Los sitios glicosilados se encuentran ubicados generalmente en zonas de giros y lazos, lo cual pudiera estar relacionado con el acceso para la transferencia del núcleo por parte del complejo oligosacariltransferasa (OST). Este complejo proteico es el encargado de transferir el núcleo desde el precursor lipídico a un residuo de asparagina de la secuencia consenso de la proteína (Ruddock y Molinari, 2006).

Las glicosilaciones son necesarias para el reconocimiento por proteínas chaperonas que contribuyen al plegamiento adecuado de la enzima. Las enzimas melanogénicas se sintetizan en el ribosoma y en el retículo endoplásmico sufren modificaciones postraduccionales, entre las que se encuentran la formación de puentes disulfuro, la N-glicosilación y la oligomerización de proteínas. Posteriormente, las proteínas se transportan al aparato de Golgi, donde vuelven a ocurrir modificaciones adicionales y probablemente adquieren el metal que actúa como cofactor. Si estos procesos no son correctos, la proteína no se trasloca del retículo endoplásmico al Golgi, sino que irá dirigida al citosol donde será degradada por el proteosoma (Molina-Castillo *et al.*, 2019; Molinari y Helenius, 2000).

La importancia del procesamiento postraducciona ha sido demostrada por varias investigaciones. En tirosinasas de mamíferos el plegamiento correcto de la proteína es necesario para el funcionamiento de la tirosinasa (Lai *et al.*, 2018). Por ejemplo, el procesamiento aberrado de la enzima está relacionado con diferentes formas de albinismo en humanos (Halaban *et al.*, 2000). El albinismo oculocutáneo tipo 1 es una enfermedad

001: MITGFLVALL FASAVLATDV TKGPSKRCRE VIVRKEWFLV SKLAQNKARY
051: IGAVKCLQAL PAQTSFTGVR TRFDDFQALH VSLMPEIHLV GQFLPWHRM
101: LQVYEKALRE ECGYTGAQPY WDWTRDVGDA SIVAASPVFD PVFGFGGNGI
151: DIPGYAGQFG NMSDIPGWTG GGCITDGPFA SYNLSIGPGT LVTNHCLTRS
201: FNTFAVAFIR SSQVANTTKQ PNFERFRIEL EGTPVTPTLK VHDAGHLSVG
251: GEMNDRWSSP GDPVFYLLHHS NLDRIWWEWQ SMDLKRRLTD ISGRTSIDPP
301: VNVTLDFKL KMGILADLIP IRDVMDVRAS PMCYIYA

Colorize

-  N-glycosylation
-  Basic (R,K)
-  Acidic (D,E)
-  Aromatic (W,F,Y)
-  Cysteine (C)
-  Methionine (M)
-  Arginine (R)
-  Lysine (K)

Figura 4. Composición aminoacídica y de los sitios de N-glicosilación de la enzima tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*.
Obtenido de: (GPMAWLITE, <https://www.alphalyse.com/customer-support/gpmaw-lite-bioinformatics-tool/>)

autosómica recesiva caracterizada por la ausencia de pigmento en el cabello, la piel y los ojos, con otras características comunes como nistagmo severo, fotofobia y reducción de la agudeza visual, asociadas con mutaciones en el gen *Tir*. Algunas formas de albinismo oculocutáneo tipo 1 son consideradas enfermedades de retención en el retículo endoplasmático y otros síndromes pigmentarios se asocian con defectos en el tránsito/procesamiento de la enzima en el retículo endoplasmático (Lai *et al.*, 2017; TOYOFUKU *et al.*, 2001).

En la Tabla 2 se presenta la composición aminoacídica de la enzima y el porcentaje de masa para cada aminoácido. La masa aproximada de la enzima es 37.520,11 Da y en su composición predominan los aminoácidos neutros (69,76%), seguidos por los aromáticos (10,98%), los básicos (9,79%) y los ácidos (9,47%). Asimismo, la glicina resultó el aminoácido más frecuente (8,61%) y la cisteína el menor frecuencia (1,78%).

4.2 Análisis de la estructura secundaria

Las características 1D de una secuencia son aquellas que pueden ser representadas por un solo valor asociado a cada aminoácido. Entre ellas se incluyen los valores de características físico-químicas de amino-ácidos, o las predicciones de estructura secundaria. Se han desarrollado algoritmos para la detección de patrones específicos bien definidos tales como hélices transmembrana y hélices superenrolladas en las proteínas, o estructuras de microARN en el ARN (Olmea *et al.*, 1999).

Las características 2D de las proteínas, por otro lado, corresponden a la descripción de los contactos entre los residuos de la proteína, ya sea a corta o a larga distancia. Se entiende cualquier tipo de enlace entre residuos como puentes de hidrógeno y puentes disulfuros. Los contactos a corta distancia están relacionados con el tipo de estructura secundaria. Los contactos a larga distancia, sin embargo, dan información de la organización de los elementos de estructura secundaria. La predicción de contactos, como herramienta para predecir la estructura terciaria es un campo poco desarrollado hasta el momento (Rost y Sander, 1993).

Existen varios servidores que proporcionan métodos precisos de predicción de estructuras secundarias. Uno de ellos es el servidor JPred, el cual utiliza diferentes métodos de predicción y permite visualizarlos simultáneamente con la alineación. Esto permite una fácil interpretación y análisis de la predicción y alineación de secuencia múltiple. El análisis interactivo y la realineación también se puede llevar a cabo con el visor y editor Java (Martin, 2014), con el cual es posible cambiar el color dentro de la alineación para resaltar residuos importantes y características conservadas (Martin, 2014).

La herramienta Jpred 4 permitió hacer una predicción de la conformación de la estructura secundaria de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*. Esta predicción se interpreta a través de un rango de confiabilidad en relación con la presencia de hélices alfa, laminas beta y lazos. Los posibles plegamientos de la estructura secundaria indican la presencia, en mayor proporción, de estructuras en forma de siete lazos

Tabla 2. Composición porcentual de la enzima tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus*.

Obtenido a partir de: (GPMWLITE, <https://www.alphalyse.com/customer-support/gpmaw-lite-bioinformatics-tool/>).

Aminoácido	Código	Cantidad	Porcentaje	Masa (Da)
Alanina	A	24	7,12	1,705
Cisteína	C	6	1,38	612,82
Acido aspártico	D	21	6,23	2416,86
Acido glutámico	E	11	3,26	1420,27
Fenilalanina	F	19	5,64	2796, 12
Glicina	G	29	2,37	1654,51
Histidina	H	8	8,31	1097,13
Isoleucina	I	19	5,64	2150,3
Lisina	K	12	2,37	1538,09
Leucina	L	28	3,56	3168, 46
Metionina	M	9	8,31	1180, 79
Asparagina	N	11	2,67	1255,14
Prolina	P	20	3,26	1942,33
Glutamina	Q	11	5,93	1256,14
Arginina	R	21	3,26	1409,44
Serina	S	21	6,23	3279,23
Treonina	T	22	6,23	1828,64
Valina	V	27	8,01	2676, 58
Triptófano	W	9	2,67	1675,22
Tirosina	Y	9	2,67	1468,48
Total de residuos		337	100	37.520,11

(78,91%), cuatro hélices α (18,69%) y tres láminas β (2,4%). El extremo C-terminal se presenta en una lámina β mientras que el extremo N-terminal está formado por una α hélice. El predominio de estructuras en forma de lazos, sugiere una estructura secundaria poco definida (Van Gelder *et al.*, 1997; Vivas-Reyes *et al.*, 2010). Resultados similares fueron obtenidos en tirosinasa de hongos, plantas y mamíferos (García Molina, 2015; Van Gelder *et al.*, 1997).

Seguido a esto, para la interpretación de los resultados emitidos de la estructura secundaria de la enzima con Jpred 4 realiza un convenio que se puede elucidar mediante el “nivel de confianza”, en donde nueve (9) es alto y un nivel de baja confianza es cero (0). Las hélices α mostraron porcentajes de confiabilidad mayores que siete (Figura 4). Para el resto de la estructura secundaria, el porcentaje de confiabilidad establecido por el “nivel de confiabilidad” se mantuvo generalmente por encima de cinco. De este modo la estructura obtenida tiene un nivel intermedio de confiabilidad.

4.2.1 Identificación de dominios

Los dominios pueden ser definidos como unidades estructurales y/o funcionales distintas en una proteína. A menudo se observa que la región de una determinada cadena polipeptídica que muestra un plegamiento particular también ejecuta una función específica. Desde el punto de vista de la naturaleza de su secuencia, los dominios se definen como regiones altamente conservadas evolutivamente que adquieren mayor relevancia si son descritos como módulos móviles, es decir, presentes en diferentes familias de proteínas con arquitectura diversa (Marchler-Bauer *et al.*, 2010).

Los dominios conservados contienen patrones de secuencia conservados o motivos, los cuales permiten su detección en la secuencia de polipéptidos. Sin embargo, la distinción entre dominio y motivo no es clara, especialmente en el caso de las unidades repetitivas cortas. Los motivos funcionales también están presentes fuera del alcance de los dominios conservados estructuralmente (Marchler-Bauer *et al.*, 2010).

El análisis realizado mediante la herramienta Pfam reveló el dominio tirosinasa, catalogado como el dominio central de las tirosinasas, familia de proteínas dentro de la cual se encuentran las polifenol oxidasas de plantas. Este dominio está estrechamente relacionado con la hemocianina de moluscos. La región de la tirosinasa hipotética abarca los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 70 y 282, e incluye el centro activo de la tirosinasa. El dominio tirosinasa debe su nombre al hecho de usar la Tirosina como sustrato para producir melanina y otros compuestos polifenólicos (melanogénesis) (Lerch, 1995).

Se puede asumir que el dominio central que comparten todos los miembros de la familia de las tirosinasas (tirosinasas, hemocianinas y polifenoloxidasas) presenta rasgos estructurales y funcionales como la valencia y cambio conformacional comparable durante el proceso de unión del oxígeno, propiedades espectroscópicas comparables, y similitud en la secuencia primaria (Halaouli *et al.*, 2006). Los aminoácidos involucrados en la coordinación con los iones cobre denominados H_{A1}, H_{A2}, H_{A3} para el CuA y H_{B1}, H_{B2}, H_{B3} para el CuB, siguen la regla H_{A1}-x(n)-H_{A2}-x(8)-H_{A3}-H_{B1}-x(3)-H_{B2}-x(n)-H_{B3} (Concepción Olivares *et al.*, 2002).

No se identificó dominio C-terminal ni N-terminal en la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*. El dominio N-terminal es un péptido de tránsito que determina la ubicación final de la enzima y después se lleva a cabo su eliminación proteolítica (Mayer, 2006; Concepción Olivares *et al.*, 2002). Las tirosinasas de hongos son enzimas citoplasmáticas, de manera que no contienen el péptido, aunque en algunos casos están asociadas a la pared celular (Marusek *et al.*, 2006).

Investigaciones realizadas con *Bacillus megaterium* demostraron la ausencia de dominio C-terminal, y al contrario de lo que ocurre con la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus*, el sitio activo está expuesto y la enzima siempre se encuentra en forma activa (Sendovski *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta donde se conoce, existe muy poca información acerca de la estructura de la enzima tirosinasa hipotética, lo cual pudiera estar relacionado con el hecho de que la enzima aún no está caracterizada (Riley *et al.*, 2014).

4.3 Selección y análisis de la plantilla

El concepto de homología, ascendencia evolutiva común, es fundamental para los análisis computacionales de las secuencias de proteínas y ADN, pero el vínculo entre similitud y homología a menudo se malinterpreta. Se infiere homología cuando dos secuencias o estructuras comparten más similitud de lo que cabría esperar por casualidad. Actualmente, muchas implementaciones de los métodos de similitud son de bajo costo computacional, por lo que, la búsqueda en grandes bases de datos puede realizarse rápidamente (Pearson, 2013).

La homología se puede inferir confiablemente a partir de la similitud estadísticamente significativa en una búsqueda BLAST, SSEARCH o HMMER. Sin embargo, inferir que dos proteínas son homólogas no garantiza que cada parte de ambas tenga un homólogo correspondiente. Las herramientas de búsqueda de similitud de secuencia como BLAST, FASTA y HMMER minimizan falsos positivos, pero no generan afirmaciones sobre falsos negativos (Pearson, 2013; Pearson y Lipman, 1988). Una de las herramientas más utilizadas es BLAST, aunque es aconsejable utilizar más de un buscador para obtener resultados confiables (Díaz Caballero *et al.*, 2012).

Según la exploración en PDB, hasta julio del 2019, se habían registrado 35 estructuras tridimensionales homólogas. Dichas estructuras, resueltas por difracción de rayos X, se obtuvieron de 14 especies. Pertenecientes a tirosinasas de *Streptomyces castaneglobisporus*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia thailandensis* y *Agaricus bisporus*

var. bisporus; polifenol oxidasas de *Vitis vinifera*, *Juglans regia*, *Solanum lycopersicum* y *Malus doméstica*; hemocianina de *Rapana venosa*, *Megathura crenulata* y *Enteractopus dofleini*; auresidina sintetasa de *Coreopsis grandiflora* y catecol oxidasa de *Ipomea batatas* y *Aspergillus oryzae*. Por otro lado, no se encontró ninguna estructura tridimensional resuelta perteneciente a *Pleurotus* spp.

Los mayores porcentajes de identidad (36,57%), cobertura (96%) y el valor de error ($E=8 \times 10^{-64}$) más bajo pertenecen a las estructuras 4j3p y 6GSG de *Aspergillus oryzae*. El valor de E representa el número de alineamientos fortuitos que puede esperarse entre la secuencia en estudio y cualquier otra de las existentes en una base de datos. Por lo tanto, entre más cercano a 0 sea el valor de E, más significativo es el alineamiento entre la secuencia que se analiza y la relacionada. Los valores de E y las puntuaciones de bits *score* (bits > 50) son mucho más sensibles y confiables que el porcentaje de identidad para inferir homología cuando la regla general de identidad del 30% es demasiado conservadora (Altschul *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2012).

Una nueva búsqueda en BLAST, a partir de la matriz de sustitución BLOSUM 45, resultó en la obtención de moldes similares, aunque con orden diferente en las estructuras 4j3p A y 6GSG. En la matriz BLOSUM los valores se basan en la frecuencia de sustitución en bloques de alineamientos locales, para proteínas relacionadas evolutivamente, de esta manera se enfoca en regiones conservadas. BLOSUM62 y BLOSUM45 se refieren a alineamientos con un máximo de 62% o 45% de identidad entre las secuencias comparadas (Díaz Caballero *et al.*, 2012).

Es destacable que para la matriz de sustitución PAM 200 el resultado difiere del obtenido en las matrices BLOSUM 62 y BLOSUM 45. Estos resultados resultan lógicos, debido a las diferencias entre las matrices PAM y BLOSUM. Las primeras se basan en un modelo explícito de la evolución y mientras más grande sea el valor de la matriz, la distancia evolutiva es mayor. En la actualidad la más utilizada es la matriz BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, 1994).

Para disminuir los efectos del sesgo en el modelo provocado por la plantilla que se utilice y para corroborar los resultados obtenidos del BLAST, se utilizó el servidor SWISS-MODEL. Si bien este servidor permite generar un modelo por homología de forma automática, en este caso solo se utilizó para identificar las posibles plantillas para construir el modelo.

A través de la búsqueda con el Swiss Model, según BLAST, los mayores valores de cobertura (93%) e identidad (41,8%) correspondieron a la estructura con código 4j3p y resolución de 2,50Å. A continuación, se registró la estructura con código 4j3q A y resolución de 2,90Å, cuya cobertura alcanzó 90% y la identidad, 40,92%. La estructura 4j3p A (Hakulinen *et al.*, 2013) se seleccionó como plantilla para construir el modelo de la tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus*, basado en el porcentaje de similitud entre ambas. El análisis de las similitudes y diferencias en aminoácidos individuales busca inferir relaciones estructurales, funcionales y evolutivas entre las secuencias en estudio (Vivas-Reyes *et al.*, 2010). La similitud entre dos secuencias es una variable continua que mide el nivel de coincidencia. La homología se reserva como una variable

dicotómica, la cual indica si dos secuencias son homólogas o no, en dependencia del grado de similitud y la significación estadística del alineamiento (Vivas-Reyes *et al.*, 2010). Por otro lado, la búsqueda con HHblst arrojó valores inferiores de identidad y similitud.

4.4 Alineamiento de plantilla y secuencia de tirosinasa hipotética

El alineamiento es importante para evidenciar las diferencias estructurales entre la plantilla y la secuencia de interés. El nivel de conservación del alineamiento refleja la conservación de las propiedades fisicoquímicas entre estas dos proteínas. Por tanto, resulta importante estudiar el nivel de conservación de los alineamientos múltiples. Lo anterior facilita la estimación del grado de conservación de las secuencias o características de los aminoácidos dentro de la familia, así como de los residuos importantes de la proteína. Los aminoácidos más conservados de la secuencia en estudio y de la plantilla son parte esencial para la identificación de las regiones biológicamente más conservadas y homólogas en las proteínas (Rivas Romero, 2015).

En la Figura 5 se muestra el alineamiento entre la plantilla de *A. oryzae* y la tirosinasa hipotética. El alineamiento de secuencias mostró un patrón discontinuo con brechas. Se conservan los residuos de Histidina (H) H 80, H 88, H 97, H 242, H 246 y H 269, los cuales probablemente se unen de manera coordinada a dos átomos de cobre CuA y CuB y forman el sitio activo de la tirosinasa (Figura 6A). Este sitio activo es una estructura común al sitio activo de todas los PPO, formado por un centro dinuclear de cobre, cada uno coordinado a tres histidinas. Este centro de cobre tipo 3 se une al oxígeno molecular a modo de unión de puente lateral (Kitajima *et al.*, 1989), así el oxígeno resulta activado (García Molina, 2015; Hakulinen *et al.*, 2013).

En la secuencia de la tirosinasa hipotética también se encuentran otros residuos de aminoácidos funcionales como parte de motivos conservados en el dominio central (Prolina, Glicina y Fenilalanina). La P y la G forman parte del motivo HCuAGxP, donde se encuentra la primera histidina del sitio de enlace CuA. En la región del CuB, las tres histidinas coordinadas y la cuarta histidina no coordinada forman el motivo HCuBxxxHCuBx(n)FxxHCuBH donde se halla la F. Se identificaron dos residuos de Fenilalanina próximos a cada átomo de CuA, lo que pudiera relacionarse con la pérdida de la actividad monofenol oxidasa o monofenolasa de la catecol oxidasa (García Molina, 2015; Tran *et al.*, 2012).

4.5 Construcción del modelo

Conocer la estructura tridimensional de una proteína es crucial para responder a muchas preguntas biológicas, sin embargo, el rápido crecimiento del número de genes y genomas secuenciados ha superado fuertemente el número de estructuras determinadas experimentalmente. A pesar del considerable progreso en la predicción de estructuras de novo, los métodos de modelamiento comparativo, cuando son aplicables, proveen modelos de proteína más fiables y precisos (Baker y Sali, 2001; Ginalski, 2006).

Target	MITGFLVALLFASAVLATDVTKGPSKRCR-----EVIVRKEWFVLSKLAQNKARYIGAVKCLQA	59
4j3p.1.A	-----TDSVAGGSESKRGGCTLQNLRVRRDWRAFSK--TQKKDYINSVLCLOK	78
Target	LPAQTSF---TGVTRFDDDFQALHVSLMPEIHLVGGFLPWHRRLQVYEKALREECGYTGAQPYW	121
4j3p.1.A	LPSRTPAHLAPGARTRYDDFVATHINQTOI IHYTGTFLAWHRYFIYEFEQALRDECSYTGDPYW	143
Target	DWTRDVDGASIVAASPVFD-PVFGFGNGIDIPGYAG---QFGNMS--DIPGWTGGGCITDGPFA	180
4j3p.1.A	NWGADADN---MEKSQVFDGSETSMSGNGEYIPNOGDIKLLLGNYP AIDLPPGSGGGCVTSGPFK	205
Target	SYNLSIGPGTL-----VTNHCLTRSFNTEFAVAFIRS--SQVANTTKQPNFERFRI	228
4j3p.1.A	DYKLN LGPAA LSLPGGNM TAAANPLTYNPRCMKRS L TTEILQRYNTFPKIVELILDSDDI WDFQM	270
Target	ELEGT PVTPTLKVHDAGHLSVGG E-MNDRWSSPGDPV FYLHHSNLDRIWWEWQSM DLKRRRLTDIS	292
4j3p.1.A	TMQGVPGSGSIGVHGGGHYSMGGDPGRDVYVSPGD TAFWLH HGMIDRVW W I WQNLDLRKRQNAIS	335
Target	GRTSI--DPPVVNVTLD FKLKMGIL-ADLIPIRDVMDVRASPMCYIYA	337
4j3p.1.A	GTGTFMNNPASENTLDTVIDLGYANGGPIAMRDL MSTTAGPFCYVY-	382

Figura 5. Alineamiento entre la secuencia aminoacídica de la tirosinasa de *Pleurotus ostreatus* y la estructura cristalina de *Aspergillus oryzae* (4j3p A). Confeccionado con Swiss model, <https://swissmodel.expasy.org/>.

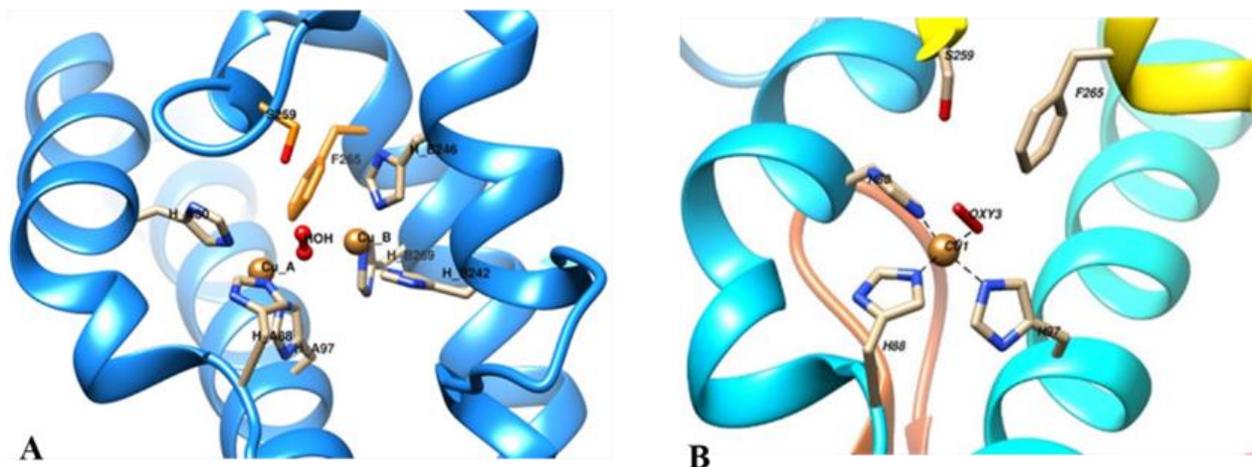


Figura 6. A. Sitio activo de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus* PC15 contenido en cuatro α hélices. B. Residuos de F265 y S259 bloqueando la entrada al sitio activo. Obtenido en UCSF QUIMERA.

Desde que el protocolo básico del método de modelación por homología fue establecido entre las décadas de 1970 y 1980 han surgido varios paquetes de software capaces de realizar modelación por homología. Entre los programas más conocidos están Modeller, Swiss-Model, I-TASSER, ModSeg/ENCAD23y Phyre², los cuales emplean diferentes enfoques a la hora de realizar la alineación y/u obtener las coordenadas del modelo (Contreras-Moreira).

En estudios internacionales de la estructura de la proteína predicha por diferentes métodos de evaluación, se observa que, para la mayoría de los métodos de modelado, no existe diferencia importante en la precisión de estos métodos. En tareas de modelado extremadamente difíciles, en las que la homología remota es incierta y en el que las regiones clave de una secuencia no pueden ser realizada con una estructura conocida, I-TASSER (Yang y Zhang, 2015) ha mostrado mayor eficiencia sobre otros métodos. Sin embargo, la diferencia principal entre servidores no es la precisión del método, sino la facilidad de uso de los métodos bioinformáticos (Kelley *et al.*, 2015).

Dado que no existen reportes de estructuras cristalográficas o por resonancia magnética de la tirosinasa hipotética de *Pleurotus ostreatus*, en nuestro trabajo se elaboraron modelos tridimensionales de dicha proteína. Para esto se utilizaron tres servidores diferentes para construir la estructura 3D. El objetivo de utilizar estos tres servidores fue comparar y seleccionar el modelo más preciso, es decir con mejores valores de ajuste.

El Swiss-Model realiza el modelado por homología, al comparar la estructura en estudio con la de una proteína similar y relacionada evolutivamente. La construcción del modelo con la herramienta SWISS-MODEL permitió obtener una proteína con identidad de secuencia de 41,8%, similitud de 0,41 y cobertura de 0,93. El QMEAN fue -4,59 y el valor normalizado estuvo dentro de los límites de *z-score* menor que 1, lo cual indica la confiabilidad del modelo (Biasini *et al.*, 2014).

I-TASSER realiza el modelado mediante “enhebrado”, basado en el reconocimiento del plegamiento de proteínas. A partir de esto, se obtienen las coordenadas atómicas para realizar el modelado (Yang y Zhang, 2015). A través de I-TASSER se obtuvieron tres modelos potenciales de la estructura terciaria de la tirosinasa. Para seleccionar el mejor modelo se utilizó el puntaje de *c-score*, el cual es un valor de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER, el programa calcula este valor basándose en la importancia de alinear plantillas de subprocesos y parámetros de convergencia de las simulaciones de ensamblaje de las estructuras, este puntaje *c-score* está en un rango de [-5 a 2] en donde un valor más positivo o mayor, significa un modelo con alta confianza y viceversa (Y. Zhang, 2008).

Los valores de *c-score* fueron de -5, -2,95 y 0,85, el modelo 1 resultó el mejor con *c-score* de 0,85. La identidad de la secuencia con la plantilla fue de 40%; 0,99 la cobertura y el TM de $0,83 \pm 0,13$. Con el objetivo de escoger el modelo más estable estereoquímicamente se obtuvieron sus diagramas de Ramachandran con la herramienta Procheck. Los diagramas de Ramachandran muestran las combinaciones posibles de los ángulos diedros en los aminoácidos de la tirosinasa (Figura 7B). En

este caso, se seleccionó el modelo 1 al tener mayor número de residuos en núcleo y regiones permitidas del gráfico de Ramachandran, 95,3%. Además, con el servidor Phyre² se detectó 37% de identidad entre la secuencia y la plantilla, la cobertura fue 98% y 100% de confianza. Siendo esta la mayor cobertura alcanzada en nuestro estudio.

Para los tres servidores, los modelos de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus* PC15 fueron similares a sus proteínas homólogas en hongos, como las catecol oxidasas. Cada modelo es un homodímero, con dos sitios idénticos de unión a metales. Estos centros están compuestos por un átomo de Cu en su forma natural y con algunos residuos conservados. Esta región se asemeja a una esfera hidrofóbica que protege al sitio activo y se pliega en un bulbo de cuatro α hélices, con los sitios de unión al cobre, excepto la histidina (H) H88 (Figura 6A). El ion CuA es coordinado por H 80, H 88, H 97; mientras el ion CuB por H 242, H 246 y H 269.

El sitio activo se encuentra protegido por dos residuos de aminoácidos, Fenilalanina F 265 y Serina S 259. El residuo voluminoso de Fenilalanina se ubica sobre el centro activo, específicamente sobre el CuA. Este residuo funciona como puerta al bloquear el acceso al sustrato (Figura 6B). El bloqueo del sitio A por la Fenilalanina, se relaciona con la pérdida de actividad monofenolasa de las catecol oxidasa. La función del residuo de S 259 aún no está clara, pero pudiera relacionarse con la activación del sustrato. Dicho residuo de F265 pudiera ser una explicación a las diferencias entre catecol oxidasas y tirosinasas (Decker *et al.*, 2006; Rolff *et al.*, 2011).

En la catecol oxidasa de *Ipomea batatas*, fue descubierta una restricción estructural de la actividad monofenolasa, un residuo voluminoso de F261, que no está presente en tirosinasas. En el caso de las enzimas tirosinasas, estaría sustituido por uno menos voluminoso correspondiente a Ala o Val. La presencia de la F261 impide la rotación del sustrato durante la reacción, necesaria para la actividad monofenolasa, ocurriendo una reorientación del sustrato hacia el CuB (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2013; Ramsden y Riley, 2014). Esto fue demostrado por Matoba *et al.* (2006) al obtener la primera estructura cristalina de una tirosinasa bacteriana de *Streptomyces castaneoglobisporus* (ScTir) (PDB: 2AHK). Estos autores determinaron la estructura cristalina de tirosinasa formando un complejo con la proteína llamada ORF378, también designada como proteína "caddie" y demostraron que existía un espacio vacío por encima del sitio activo. Este espacio vacío está ocupado por Fenilalanina en la catecol oxidasa de *Ipomea batatas* en el sitio activo, dicho sitio está formado por tres histidinas y una molécula de agua.

4.6 Diferencias catalíticas entre las tirosinasas y catecol oxidasas

El mecanismo de catálisis de la tirosinasa ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a la complejidad de las particularidades de la enzima. Entre sus particularidades se encuentran la existencia de dos actividades catalíticas en el mismo sitio activo y un período de retraso mostrado por la actividad difenolasa que depende de la presencia de catecol, el producto de esta reacción y sustrato de la actividad oxidasa (Riley *et al.*, 2014). El mecanismo de reacción propuesto mejora ligeramente los modelos

anteriores, y describe un sitio catalítico común para las dos actividades con tres formas diferentes de la enzima, llamadas met, oxi y desoxi, según la ausencia/presencia de oxígeno y el estado de oxidación de los iones de cobre [Cu (II)/Cu (I)] (Lerch, 1995).

La evidencia aportada por la estructura determinada de ScTir (Matoba *et al.*, 2006), ha permitido explicar dos mecanismos posibles de hidroxilación propuestos por Decker *et al.* (2006) y Matoba *et al.* (2006). Decker *et al.* (2006) sugirió que en la hidroxilación el sustrato monofenólico es orientado hacia CuA a través de interacciones hidrófobas con la His194 (His208 en TirBm), en analogía con la orientación de Tir98 (en TirSc) (Decker *et al.*, 2006). La hidroxilación ocurre por un mecanismo de sustitución electrofílica, mientras que el sustrato es situado en posición trans para la His63 (His69 en TirBm).

La Tirosina 98 de ScTir, ha proporcionado elementos importantes con respecto a la orientación del sustrato y el ciclo catalítico. En la configuración inicial del sustrato, el grupo hidroxilo apunta al sexto sitio de coordinación vacío del CuA, proponiendo que el sustrato se desliza más en esta dirección. Por lo tanto, el oxígeno del grupo hidroxilo se une a CuA (Decker *et al.*, 2006). Posteriormente, el peróxido gira entre los átomos de cobre de tal manera que se produce un ataque electrofílico al anillo fenólico en posición *orto*, ello también ha sido propuesto por Nagai y Suzuki (2001).

Concepción Olivares *et al.* (2002) y Concepcion Olivares y Solano (2009), basado en mutaciones sitio específicas realizadas en la tirosinasa de *Rattus* sp., propusieron también que los monofenoles atacan al CuA pero *o*-difenoles atacan al CuB, sugiriendo un mecanismo similar. También se ha sugerido que este residuo parece estar involucrado en la desprotonación de los sustratos monofenólicos. En catecol oxidasa este mecanismo no es posible por la conformación fija correspondiente a la His (Itoh y Fukuzumi, 2007).

Investigaciones realizadas con la tirosinasa de *Bacillus megaterium* con sustratos fenólicos unidos indican que tanto monofenoles como difenoles, se unen de manera idéntica hacia el CuA en el sitio activo. Sin embargo, solo los monofenoles rotan durante la reacción (Dietrich, 2003; Goldfeder *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Matoba *et al.*, 2006). Este hecho permite diferenciar entre enzimas con ambas actividades monofenolasa-difenolasa y las enzimas con actividad estrictamente difenolasa (Goldfeder *et al.*, 2014).

Otra explicación para las diferencias catalíticas entre las tirosinasas y catecol oxidasa es la presencia de un enlace tioéter en las catecol oxidasa, el cual limita la flexibilidad de la H e impide la rotación del sustrato durante la reacción (Decker y Tuczec, 2017; Dietrich, 2003). Sin embargo, la catecol oxidasa de *Aspergillus oryzae*, no posee este enlace tioéter y tampoco es capaz de hidroxilar a la tirosina (Hakulinen *et al.*, 2013). Todas las formas de PPOs eucarióticas excepto las catecol oxidasa de *A. oryzae* y tirosinasa de *Manduca sexta* poseen el enlace tioéter en el sitio activo, mientras que a los procariontes les falta esta modificación postransduccional (García Molina, 2015).

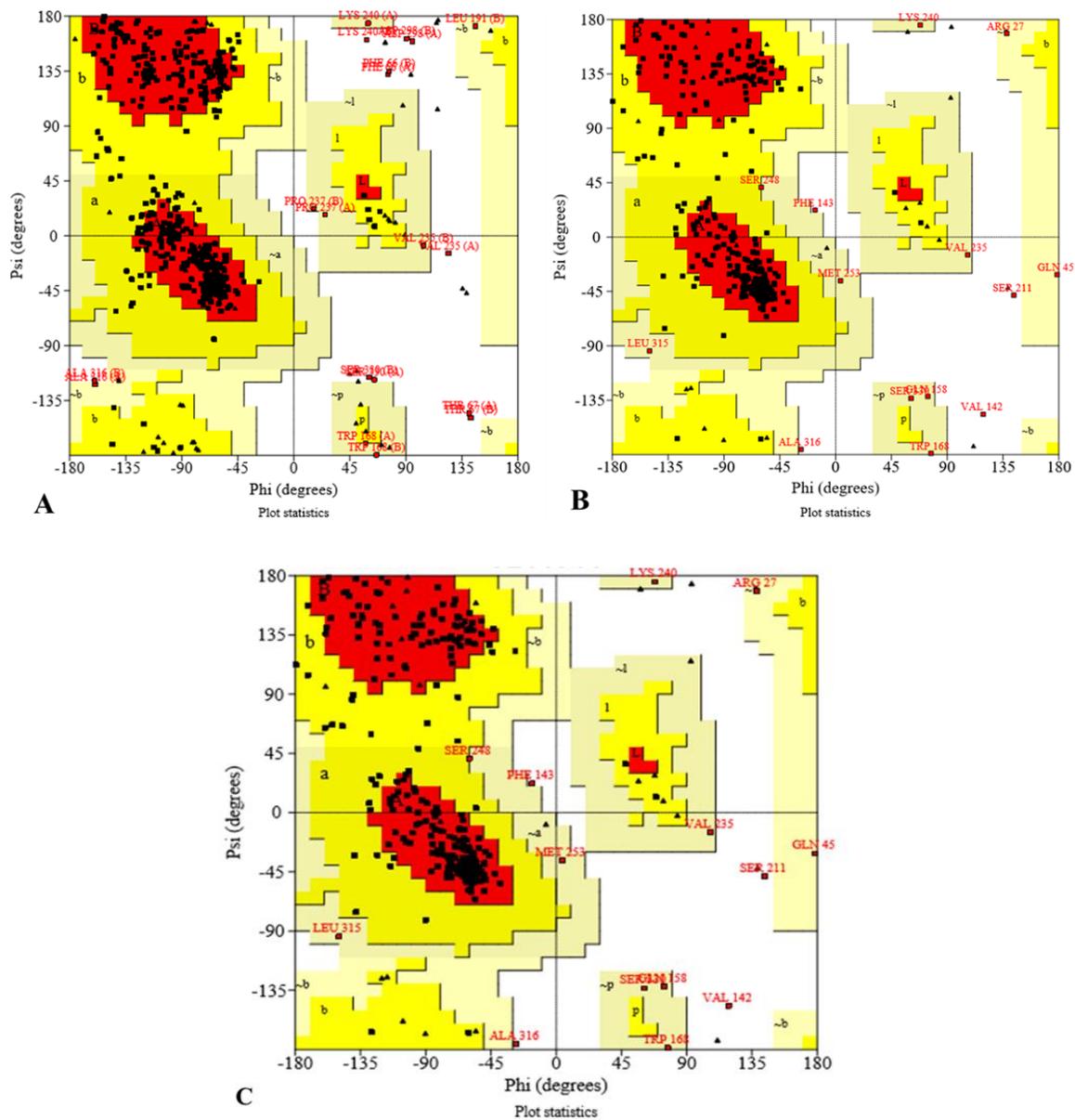


Figura 7. A. modelo Tyr Swis, **B** modelo Tyr Tass y **C** modelo Tyr Phy². Diagramas de Ramachandran del homodímero del modelo de la proteína tirosinasa de *Pleurotus ostreatus*, obtenidos con Procheck <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/pdbsum/generate.html>.

Por otro lado, una simulación de dinámica molecular de polifenoloxidasas latentes de *Vitis vinifera* VvPPOr (Naresh *et al.*, 2015) reveló que el anillo aromático de Fenilalanina funciona potencialmente como un residuo de puerta que gira para proporcionar acceso libre del sustrato a CuA (Fronk *et al.*, 2015). Ello demuestra que la discriminación funcional entre tirosinasas y las catecol oxidasas se pueden remontar exclusivamente a la presencia de una asparagina que junto con un glutamato se une a un agua conservada. Como resultado, esta molécula de agua conservada se torna lo suficientemente básica como para unir el protón liberado por sustratos fenólicos tras la coordinación al sitio activo (Solem *et al.*, 2016). Este resultado, es soportado por la primera estructura cristalina de una tirosinasa de la planta *Juglans regia* (Bijelic *et al.*, 2015; Solem *et al.*, 2016); proporcionando una coherente comprensión de las reactividades de sistemas de cobre tipo 3 a nivel molecular, así como importantes conocimientos estructurales para modificar o inhibir estas enzimas y su aplicación en biotecnología (Fairhead y Thöny-Meyer, 2012).

Otro asunto muy discutido en la literatura referente al ciclo catalítico de la tirosinasa ha sido la desprotonación del sustrato que entra, el cual es el paso inicial de la reacción (Rolff *et al.*, 2011). La desprotonación del sustrato que entra, se ha sugerido que está involucrada en la inhibición del sustrato fenólico o inactivación suicida (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2013). La inactivación suicida es supuestamente facilitada por la incorrecta transferencia del protón para el peróxido del sitio activo en lugar de para una base adyacente (García Molina, 2015).

La función de tirosinasa en plantas y hongos es confusa y objeto de controversia (Mayer, 2006; Seo *et al.*, 2003), debido a características propias del sistema enzimático, como su doble actividad y la complejidad de extracción y purificación (Lontie, 2018; Nagai y Suzuki, 2001). A pesar de ello, se le atribuyen funciones diversas como la biosíntesis de lignina, esclerotización de la cutícula de artrópodos y la biosíntesis de melanina (Weijn *et al.*, 2013). En las frutas, hortalizas y hongos, las melaninas son responsables del oscurecimiento que aparece en tejidos que han sufrido algún tipo de daño, corte o infección, expuesto al aire y que ocurre fundamentalmente en el almacenamiento post cosecha (Halaouli *et al.*, 2006; Mayer, 2006). En los hongos, se ha establecido que las melaninas están conectadas con la formación de órganos reproductores y esporas y la virulencia de hongos patógenos (Nosanchuk y Casadevall, 2003). Según la clasificación de la Comisión Enzimática el modelo predicho de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus* pertenece a las proteínas Oxido-Reductasa (EC. 1.10.3.1), la cual mediante reacciones de tipo redox oxida *o*-difenoles a los respectivos compuestos *o*-quinonas, responsables de los pigmentos oscuros en los hongos y plantas.

4.5 Análisis y validación de los modelos tridimensionales de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*

La evaluación de la calidad del modelo es de los aspectos más importantes en la predicción de estructuras tridimensionales. Este proceso permite evitar errores en la conformación obtenida debido a alineamientos incorrectos, dificultad en el modelado de regiones de bucles, así como también en el proceso de refinamiento utilizado. La

calidad estereoquímica del modelo puede ser evaluada mediante los diagramas de Ramachandran (Ramachandran y Sasisekharan, 1968). En ellos se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros ψ contra ϕ en los aminoácidos que constituyen la estructura de dicha proteína; por lo tanto, nos permite aproximar la ubicación de los ángulos y de las torsiones fuera de lugar en el modelo. La utilización de esta herramienta posibilita, en consecuencia, conocer de manera confiable y temprana cuál será la estructura secundaria del péptido.

Al analizar los gráficos de Ramachandran, el punto más importante a considerar para la selección del mejor modelo es la cantidad de aminoácidos ubicados en zonas favorables, dado que sus átomos se encuentran formando ángulos no favorables, tensionando así la estructura de la proteína en la zona en la que se encuentran. Por esta razón, es deseable no tener aminoácidos formando este tipo de ángulos, o bien tener la menor cantidad posible, en comparación con el cristal que se tiene como referencia.

Los valores de los parámetros de calidad obtenidos indican que las estructuras 3D calculadas fueron adecuadas, con indicadores muy similares a aquellos obtenidos para la estructura del cristal de partida 4j3p.1.A (Tabla 3). Se alcanzaron valores cercanos al 90% para las regiones más favorecidas en el mapa de Ramachandran. Los valores de las regiones favorecidas (núcleo y permitida) para los tres modelos (Tabla 3) fueron mayores a 90%, lo cual pone de manifiesto la calidad de los mismos.

El modelo Tyr Swiss resultó ser el mejor al presentar un mayor número de residuos en núcleo y regiones permitidas del gráfico de Ramachandran, con un 96,6%. Por su parte Tyr Tass y Tyr Phy² mostraron porcentajes similares de aminoácidos en regiones más favorecidas, con 95,3 % y 94,4%, respectivamente. En la Figura 7 se muestran los gráficos de Ramachandran obtenidos para los modelos.

4.5.1 Análisis de ProSA

Por medio del servidor ProSA-web se evaluaron las estructuras obtenidas utilizando los puntajes Z (*z-score*), que indican la calidad del modelo y mide la desviación de la energía de la estructura y la compara con la distribución de energía de estructuras nativas depositadas en Protein Data Bank (PDB), cuyas estructuras fueron obtenidas experimentalmente por rayos X y/o resonancia magnética nuclear (RMN) (Eisenberg *et al.*, 1997).

Los modelos de la tirosinasa de *Pleurotus ostreatus* construidos desde los tres servidores obtuvieron puntuaciones globales de -7,15, -6,06 y -5,91, respectivamente. Estos valores se ubican dentro del rango de los valores normales de Z calculados para las proteínas nativas incorporadas en el PDB. De ello se asume que los modelos fueron fiables con respecto a sus plantillas. En la Figura 8 (A, C y E) se muestran “ploteados” los *z-score* de todas las cadenas de proteínas determinadas experimentalmente en el repositorio actual del Worldwide Protein Data Bank en función del tamaño de la proteína.

Estos resultados en el gráfico de Ramachandran, pudieran estar relacionados con el hecho, de que el modelo construido con el servidor Swiss-Model presentó mayor similitud de secuencia con la plantilla, obteniéndose una estructura tridimensional con superior exactitud. En consecuencia, la metodología usada para el modelo Tyr Swiss resulta la más aconsejable para la construcción de la estructura de la tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*.

Mediante ProSA (Sippl, 1993) también se evaluó la calidad local de la estructura. Según la longitud de la secuencia, el análisis del perfil energético con bloques de 10 resultó el más efectivo puesto que separa mejor las regiones problemáticas. Los perfiles energéticos de los tres modelos mostraron zonas con energía positiva (Figura 8 B, D y F). Este patrón pudiera relacionarse con la presencia de un lazo más extenso en esa zona de la estructura. Un diseño con estas características aseguraría mayor movilidad a la región e incrementaría su energía. Alternativamente, la energía positiva puede relacionarse con la energía presente en el cristal de la plantilla, tratándose entonces de un comportamiento heredado de la plantilla. No obstante, el modelo Tyr Swiss resultó más estable energéticamente (Figura 8 A y B).

4.5.2 Perfil tridimensional del model Verify3D

Una prueba efectiva de la corrección del modelo 3D de una proteína es la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su secuencia de aminoácidos. De esta manera se asigna una clase estructural basada en su ubicación y entorno. Esta correlación, denominada perfil tridimensional de una estructura proteica, es una tabla calculada a partir de sus coordenadas atómicas. Los perfiles tridimensionales calculados coinciden con sus propias secuencias con puntajes altos. Por el contrario, los perfiles tridimensionales calculados a partir de modelos de proteínas que se sabe que son incorrectos tienen una puntuación baja (Lüthy *et al.*, 1992).

Luego de seleccionado el Modelo Tyr Swiss como el mejor modelo y el más estable, se procedió a realizar los análisis de la distribución del perfil 3D por residuo (Figura 9). Para considerar que la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D), el modelo debe tener más del 80% de los residuos de aminoácidos con un puntaje $\geq 0,2$ en el perfil 3D/1D. Como se aprecia el 80,73% de los Como se aprecia el 80,73% de los residuos han alcanzado en promedio ese valor, por lo que se puede considerar que el modelo es compatible con su secuencia de aminoácidos.

Se observó que existen diferencias entre los resultados obtenidos por cada servidor de evaluación de los modelos construidos por homología. Estas diferencias conducen a escoger con qué servidor de modelado trabajar para obtener buenos modelos de proteínas. Por último, la calidad de los modelos por homología de proteínas solo puede

Tabla 3. Resumen de los gráficos de Ramachandran. Porcentajes de residuos ubicados en núcleo y permitidas, permitidas generosamente y no permitidas.

Criterio	Parámetros (%)	4j3p.1.A	Tyr Swiss	Tyr Tass	Tyr Phy²
Procheck	Residuos en núcleo y permitidas	99,0	96,6	95,3	94,4
		0,0	1,1	2,2	3,5
	Permitidas generosamente				
	No permitidas	0,3	2,1	2,5	1,4

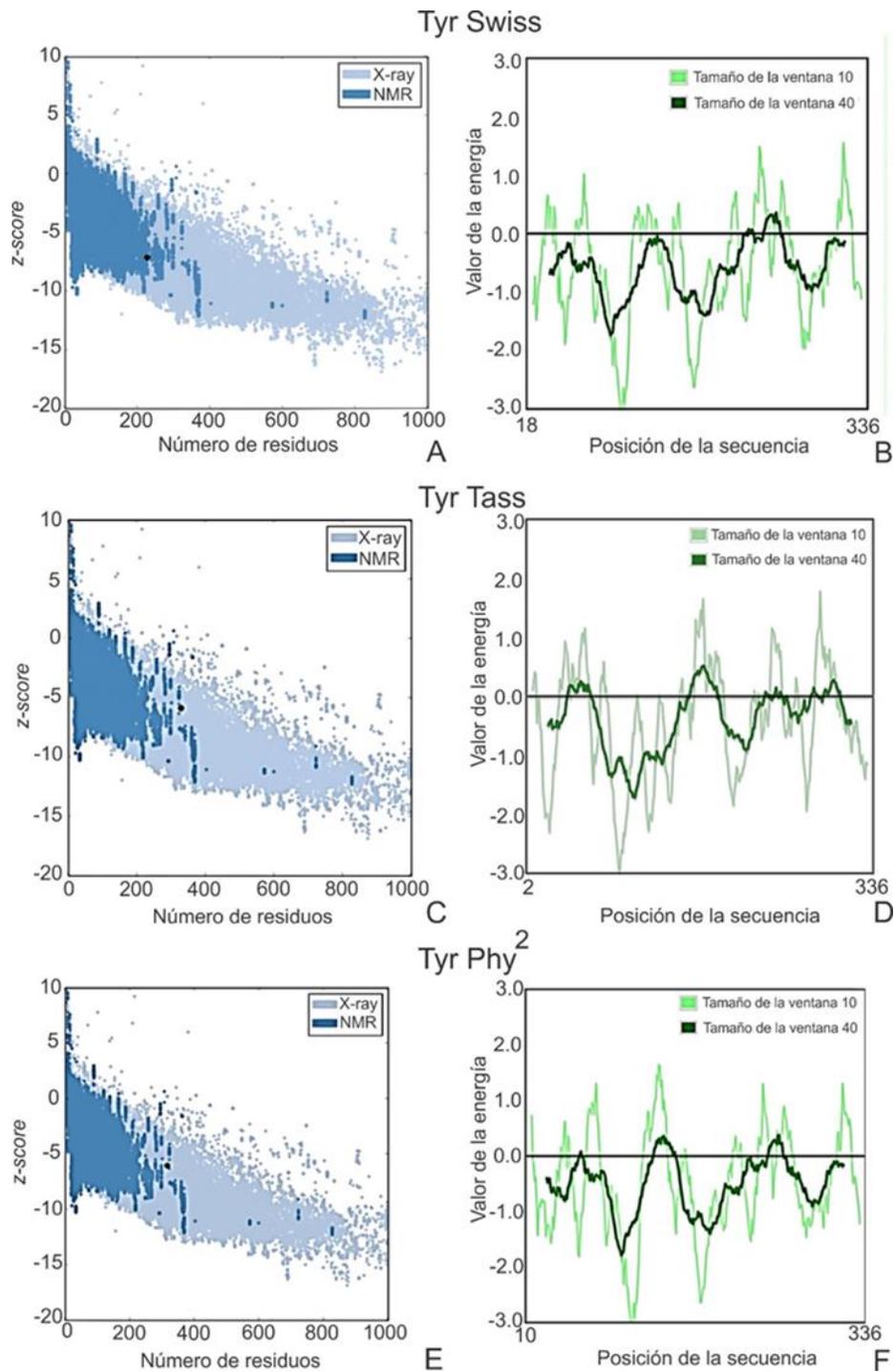


Figura 8. Evaluación de la calidad de los modelos Tyr Swiss, Tyr Tass y Tyr Phy² con Prosa <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>. (A, C, E) Evaluación global y (B, D, F) evaluación local. residuos han alcanzado en promedio ese valor, por lo que se puede considerar que el modelo es compatible con su secuencia de aminoácidos.

evaluarse *a posteriori* porque, a diferencia de las técnicas experimentales, normalmente no intervienen en su construcción datos obtenidos en el laboratorio que sirvan de control.

La modelación por homología es un modo eficiente de obtener información acerca de una proteína de interés. Hasta donde se conoce, los modelos obtenidos, constituyen el primer reporte sobre un modelo por homología de la enzima tirosinasa hipotética de *P. ostreatus* PC15. Este modelo puede ser útil para diseñar mutantes en pruebas de hipótesis sobre la función proteica, identificar el sitio activo y sitios de unión, identificar, diseñar y desarrollar ligandos a un sitio de unión determinado, modelar la especificidad de un sustrato, simular docking proteína-proteína, inferir función a partir de potenciales electrostáticos calculados, examinar y desarrollar alineamientos de estructuras y secuencias y confirmar relaciones estructurales remotas. El modelo validado Tyr Swiss, se puede proponer como una herramienta importante para el estudio estructural y funcional de la enzima y para el diseño de nuevos inhibidores naturales de la enzima, que permitan frenar el pardeamiento enzimático, lo que reviste importancia para la industria alimentaria.

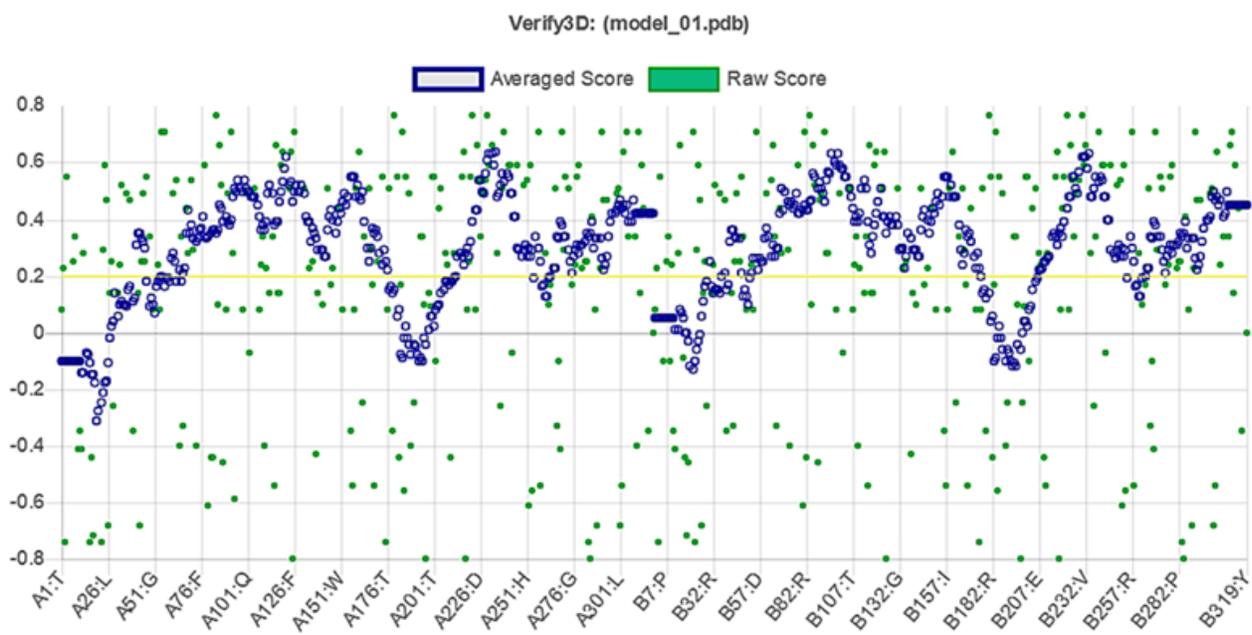


Figura 9. Perfil 3D/1D para el modelo Tyr Swiss calculado en Verify3D.

Conclusiones

1. Se construyeron tres modelos tridimensionales de la enzima tirosinasa hipotética de *P. ostreatus* PC15 utilizando el enfoque bioinformático de modelación por homología a partir de la plantilla 4j3p, a través de los servidores Swiss Model, ITASSER Y Phyre².
2. La calidad de las estructuras tridimensionales predichas de la proteína fue evaluada de satisfactoria mediante los servidores de evaluación de proteínas: Procheck, ProSA y Verify 3D.
3. El modelo Tyr Swiss fue el más estable desde el punto de vista estereoquímico, por lo que puede ser usado como referencia estructural en el campo de las investigaciones biotecnológicas.

Recomendaciones

1. Refinar el modelo estructural obtenido para la enzima tirosinasa hipotética de *P. ostreatus*, de modo que pueda ser empleado en estudios de acoplamiento molecular, en aras de diseñar nuevos inhibidores de la enzima con aplicaciones biotecnológicas.
2. Extender el método a otras potenciales enzimas dianas, cuyas estructuras tridimensionales no hayan sido resueltas aún, y que sean de interés para las investigaciones que desarrolla el Grupo del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

Referencias Bibliográficas

- Adman, E. T. (1991). Copper protein structures *Advances in protein chemistry* (Vol. 42, pp. 145-197): Elsevier.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402
- Baker, D., y Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294(5540), 93-96
- Barton, A. D. C. C. J. P. G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server *Nucleic acids research*, 43, W389–W394
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., *et al.* (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252-W258
- Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F., y Rompel, A. (2015). Kristallstruktur einer pflanzlichen Tyrosinase aus Walnussblättern: die Bedeutung “substratlenkender Aminosäurereste” für die Enzymspezifität. *Angewandte Chemie*, 127(49), 14889-14893
- Cano-Estrada, A., y Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75-80
- Carrascoza, F., Zaric, S., y Silaghi-Dumitrescu, R. (2014). Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 50, 125-133
- Chegwin Angarita, C. (2014). *Incidencia del medio y de las condiciones de cultivo en el potencial como nutraceutico de tres especies del genero Pleurotus*. Universidad Nacional de Colombia.
- Chung, S. Y., y Subbiah, S. (1996). A structural explanation for the twilight zone of protein sequence homology. *Structure*, 4(10), 1123-1127
- Claus, H., y Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and applied microbiology*, 29(1), 3-14
- Coates, C. J., y Nairn, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1), 43-55
- Contreras-Moreira, B. Modelado comparativo de proteínas Homology modelling.
- Corrêa, R. C. G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R. M., y Ferreira, I. C. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp.(Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 103-117
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., y Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(10), 892-893
- Decker, H., Schweikardt, T., y Tucek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angewandte Chemie International Edition*, 45(28), 4546-4550

- Decker, H., y Tuczec, F. (2017). The Recent Crystal Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 (HsTYRP1) Solves an Old Problem and Poses a New One. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(46), 14352-14354
- Díaz Caballero, A., Martínez Serrano, E., Vivas Reyes, R., Puerta Llerena, L., Méndez Cuadro, D., Cabrales Salgado, R., *et al.* (2012). Modelación por homología de la proteína Luxs de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(3), 105-113
- Dietrich, A. (2003). Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T. N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*, 278(48), 47842-47852
- Eisenberg, D., Luthy, R., y Bowie, J. (1997). VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles, vol. 277 of *Methods in Enzymology*: San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Fairhead, M., y Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New biotechnology*, 29(2), 183-191
- Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., y Sannia, G. (2009). Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation*, 20(2), 209-220
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., *et al.* (2015). Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food chemistry*, 183, 49-57
- Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., *et al.* (2013). Crystal Structures of Copper-depleted and Copper-bound Fungal Pro-tyrosinase INSIGHTS INTO ENDOGENOUS CYSTEINE-DEPENDENT COPPER INCORPORATION. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22128-22140
- García-Molina, F., Hiner, A. N., Fenoll, L. G., Rodríguez-Lopez, J. N., García-Ruiz, P. A., García-Cánovas, F., *et al.* (2005). Mushroom tyrosinase: catalase activity, inhibition, and suicide inactivation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3702-3709
- García Molina, M. d. M. (2015). Nuevos aspectos en las actividades catalíticas de tirosinasa. *Proyecto de investigación*:
- Gibbons, A. (2014). Shedding light on skin color. *Science*, 346(6212), 934-936
- Ginalski, K. (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 16(2), 172-177
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., y Fishman, A. (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature communications*, 5, 4505
- Guex, N., y Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *electrophoresis*, 18(15), 2714-2723
- Guex, N., Peitsch, M. C., y Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(S1), S162-S173
- Hakulinen, N., Gasparetti, C., Kaljunen, H., Kruus, K., y Rouvinen, J. (2013). The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus

- Aspergillus oryzae*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8), 917-929
- Halaban, R., Svedine, S., Cheng, E., Smicun, Y., Aron, R., y Hebert, D. N. (2000). Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5889-5894
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., y Lomascolo, A. (2006). Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 219-232
- Henikoff, S., y Henikoff, J. G. (1994). Position-based sequence weights. *Journal of Molecular Biology*, 243(4), 574-578
- Hollingsworth, S., y Karplus, P. (2010). A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. *Biomolecular Concepts*, 1, 271-283
- Ioannou, I. (2013). Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. *European Scientific Journal*, 9(30)
- Itoh, S., y Fukuzumi, S. (2007). Monooxygenase activity of type 3 copper proteins. *Accounts of chemical research*, 40(7), 592-600
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J., y Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycological Research*, 102(12), 1459-1483
- Kabsch, W., y Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 22(12), 2577-2637
- Kaczanowski, S., y Zielenkiewicz, P. (2010). Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? *Theoretical Chemistry Accounts*, 125(3-6), 643-650
- Kanteev, M., Goldfeder, M., y Fishman, A. (2015). Structure–function correlations in tyrosinases. *Protein Science*, 24(9), 1360-1369
- Karas, P. A., Perruchon, C., Exarhou, K., Ehaliotis, C., y Karpouzas, D. G. (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation*, 22(1), 215-228
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., y Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845
- Kitajima, N., Fujisawa, K., Morooka, Y., y Toriumi, K. (1989). . mu.-. eta. 2:. eta. 2-Peroxo binuclear copper complex, [Cu (HB (3, 5-(Me₂CH) 2pz) 3)] 2 (O₂). *Journal of the American Chemical Society*, 111(24), 8975-8976
- Knop, D., Yarden, O., y Hadar, Y. (2015). The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1025-1038
- Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., y Dijkstra, B. W. (2017). Structure of human tyrosinase related protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(33), 9812-9815
- Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., y Dijkstra, B. W. (2018). Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry–A European Journal*, 24(1), 47-55

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., y Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291
- Lerch, K. (1995). Tyrosinase: Molecular and active-site structure: ACS Publications.
- Li, W., McWilliam, H., Goujon, M., Cowley, A., Lopez, R., y Pearson, W. R. (2012). PSI-Search: iterative HOE-reduced profile SSEARCH searching. *Bioinformatics*, 28(12), 1650-1651
- Lontie, R. (2018). *Copper Proteins and Copper Enzymes: Volume III*: CRC Press.
- Lüthy, R., Bowie, J. U., y Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), 83
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., et al. (2010). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D225-D229
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., y Šali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29(1), 291-325
- Martin, A. C. R. (2014). Viewing multiple sequence alignments with the JavaScript Sequence Alignment Viewer (JSAV). *F1000Research*, 3, 249-249
- Martinez, M. V., y Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(6), 195-200
- Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H., y Inlow, J. K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(1), 108-123
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., y Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(1), 197-201
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., y Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981-8990
- Mayer, A. M. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26(1), 11-20
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331
- Molina-Castillo, S., Thomé-Ortiz, H., y Espinoza-Ortega, A. (2019). Conocimiento ecológico tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en el centro de Mexico. *AGROProductividad*, 12(5), 3-9
- Molinari, M., y Helenius, A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*, 288(5464), 331-333
- Morris, Q., y Llauradó, G. (2017). Propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de las setas *Pleurotus spp.* In J. E. Sánchez y D. J. Royse (Eds.), *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.*
- Mount, D. W. (2008a). Comparison of the PAM and BLOSUM amino acid substitution matrices. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(6), pdb. ip59
- Mount, D. W. (2008b). Using gaps and gap penalties to optimize pairwise sequence alignments. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(6), pdb. top40

- Muñoz-Muñoz, J. L., del Mar García-Molina, M., Garcia-Molina, F., Berna, J., Garcia-Ruiz, P. A., García-Moreno, M., *et al.* (2013). Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols, o-aminophenols and o-phenylenediamines: Potential use in industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 91, 17-24
- Nagai, T., y Suzuki, N. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3922-3926
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., *et al.* (2000). Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, 290(5494), 1163-1166
- Naresh, K., Sreekumar, A., y Rajan, S. (2015). Structural insights into the interaction between molluscan hemocyanins and phenolic substrates: an in silico study using docking and molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 61, 272-280
- Nosanchuk, J. D., y Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 5(4), 203-223
- Olivares, C., García-Borrón, J. C., y Solano, F. (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry*, 41(2), 679-686
- Olivares, C., y Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research*, 22(6), 750-760
- Olmea, O., Rost, B., y Valencia, A. (1999). Effective use of sequence correlation and conservation in fold recognition. *Journal of molecular biology*, 293(5), 1221-1239
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current protocols in bioinformatics*, 42(1), 3.1. 1-3.1. 8
- Pearson, W. R., y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2444-2448
- Peñalver, M., Rodríguez-López, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Cánovas, F., y Tudela, J. (2002). Method for the determination of molar absorptivities of thiol adducts formed from diphenolic substrates of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 309(2), 180-185
- Perumal, P. C., Sowmya, S., Pratibha, P., Vidya, B., Anusooriya, P., Starlin, T., *et al.* (2015). Isolation, structural characterization and in silico drug-like properties prediction of a natural compound from the ethanolic extract of *Cayratia trifolia* (L.). *Pharmacognosy research*, 7(1), 121
- Pratibha, P., Sophia, D., Perumal, P. C., y Gopalakrishnan, V. K. (2014). In-silico docking analysis of *Emilia sonchifolia* (L.) dc. gas chromatography-mass spectroscopy derived terpenoid compounds against pancreatic cancer targets (AKT and BRCA2). *World J Pharm Pharm Sci*, 3, 1844-1855
- Ramachandran, G. T., y Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins *Advances in protein chemistry* (Vol. 23, pp. 283-437): Elsevier.

- Ramsden, C. A., y Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(8), 2388-2395
- Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C., y Hollenstein, G. (2003). Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*, 64(2), 339-366
- Ren, Q., Henes, B., Fairhead, M., y Thöny-Meyer, L. (2013). High level production of tyrosinase in recombinant Escherichia coli. *BMC biotechnology*, 13(1), 18
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., et al. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9923-9928
- Rivas Romero, D. P. (2015). *Modelación molecular y estudio de la isoforma 1A/IRE (+) de la proteína DMT1 humana*. (Ingeniera Civil en Biotecnología), Universidad de Chile.
- Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H., y Tuczek, F. (2011). Copper–O 2 reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4077-4098
- Rost, B. (2001). Protein secondary structure prediction continues to rise. *Journal of structural biology*, 134(2-3), 204-218
- Rost, B., y Sander, C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *Journal of molecular biology*, 232(2), 584-599
- Royse, D. J., Baars, J., y Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 5-13
- Ruddock, L. W., y Molinari, M. (2006). N-glycan processing in ER quality control. *Journal of cell science*, 119(21), 4373-4380
- Sáenz-Suárez, H., Lareo, L. R., Oribio-Quinto, C., Martínez-Mendoza, J., y Chávez-Zobel, A. (2011). Predicción computacional de estructura terciaria de las proteínas humanas Hsp27, aB-cristalina y HspB8. *Universitas Scientiarum*, 16(1), 15-28
- Sander, C., y Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 9(1), 56-68
- Schallreuter, K. U., Salem, M. M., Hasse, S., y Rokos, H. (2011). The redox–biochemistry of human hair pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, 24(1), 51-62
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., y Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of molecular biology*, 405(1), 227-237
- Seo, S.-Y., Sharma, V. K., y Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2837-2853
- Sher, H., Al-Yemeni, M., y Khan, K. (2011). Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) in two different agroecological zones of Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 10(2), 183-188
- Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 17(4), 355-362

- Solem, E., Tuczec, F., y Decker, H. (2016). Tyrosinase versus catechol oxidase: one asparagine makes the difference. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(8), 2884-2888
- Solomon, E. I., Heppner, D. E., Johnston, E. M., Ginsbach, J. W., Cirera, J., Qayyum, M., et al. (2014). Copper active sites in biology. *Chemical reviews*, 114(7), 3659-3853
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., y Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7), 2563-2606
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J. C., Mayer, A. M., y Harel, E. (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant physiology*, 105(4), 1301-1311
- Sullivan, M. L. (2015). Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in plant science*, 5, 783
- Torres, C. A. V., Ocampo, R. D., Rodríguez, W. M., Chang, J. V., y Salazar, T. M. C. (2017). CALIDAD ALIMENTICIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*, FRESCO Y DESHIDRATADO, CULTIVADO EN TRES RESIDUOS AGRÍCOLAS. *Revista ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, 8(2), 75-83
- TOYOFUKU, K., Ikuo, W., SPRITZ, R. A., y Vincent, J. (2001). The molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): sorting failure and degradation of mutant tyrosinases results in a lack of pigmentation. *Biochemical Journal*, 355(2), 259-269
- Tran, L. T., Taylor, J. S., y Constabel, C. P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: lineage-specific duplication and expansion. *BMC genomics*, 13(1), 395
- Tripathi, S. K., Singh, S. K., Singh, P., Chellaperumal, P., Reddy, K. K., y Selvaraj, C. (2012). Exploring the selectivity of a ligand complex with CDK2/CDK1: a molecular dynamics simulation approach. *Journal of Molecular Recognition*, 25(10), 504-512
- Urán, M. E., y Cano, L. E. (2011). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Infectio*, 12(2)
- Van Gelder, C. W., Flurkey, W. H., y Wichers, H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7), 1309-1323
- van Holde, K. E., Miller, K. I., y Decker, H. (2001). Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15563-15566
- Vital, A. C. P., Goto, P. A., Hanai, L. N., Gomes-da-Costa, S. M., de Abreu Filho, B. A., Nakamura, C. V., et al. (2015). Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1028-1035
- Vivas-Reyes, R., Ahumado, M., y Cabezas, J. (2010). Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de la fosfolipasa A2 citosólica pancreática dependiente de calcio presente en *Rattus norvegicus*. *Revista colombiana de química*, 39(2), 181-197
- Volbeda, A., y Hol, W. G. J. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 209(2), 249-279

- Walker, J. R., y Ferrar, P. H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15(1), 457-498
- Weijn, A., Bastiaan-Net, S., Wichers, H., y Mes, J. (2013). Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal genetics and biology*, 55, 42-53
- Wichers, H., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C., Biancone, G., Hoerberichts, F., et al. (2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(4), 336-341
- Wichers, H., Van den Bosch, T., Gerritsen, Y., Oyevaar, J., Ebbelaar, C., Recourt, K., et al. (1995). Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Mushroom Science*, 14, 723-728
- Yang, J., y Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174-W181
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., y Naaz, I. (2014). Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry research international*, 2014
- Zhang, C., Freddolino, P. L., y Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W291-W299
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9(1), 40