

La bacteria marina *Marinomonas mediterranea* como modelo de estudio: de la síntesis de melaninas al análisis de un nuevo sistema CRISPR-Cas

Antonio Sánchez-Amat y Patricia Lucas-Elío



Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia 30100



Miembros del grupo Biotecnología Microbiana de la UMU: Andrés Andreo Vidal (Estudiante de Máster), Patricia Lucas-Elío (Profesora Titular de Universidad), Antonio Sánchez Amat (IP, Catedrático de Universidad), Alejandra Aroca Crevillén (Estudiante de Grado) e Isabel María García Guillén (Estudiante de Máster).

El grupo de investigación “Biotecnología Microbiana” se creó en la UMU en el año 2004. El objetivo inicial del grupo era profundizar en el estudio de enzimas oxidativas que actúan sobre compuestos fenólicos, aunque, como se comentará más adelante, esta línea inicial se ha ido diversificando y ampliando a lo largo de los años. El grupo ha trabajado con diversos microorganismos modelo, siendo el más relevante de todos ellos *Marinomonas mediterranea*. Esta bacteria marina fue aislada y clasificada por nuestro grupo en un proyecto, en colaboración con el Dr. Francisco Solano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B de la UMU, orientado al estudio de la melanogénesis en bacterias.

Las melaninas son pigmentos oscuros sintetizados por polimerización de compuestos fenólicos. Dentro de estos pigmentos, las eumelaninas son sintetizadas mediante la actuación de la enzima tirosinasa, que oxida

la tirosina primero al difenol L-dopa y posteriormente a dopaquinona a partir del cual se genera el pigmento melánico. Son pocos los microorganismos estudiados que expresan tirosinasas, siendo *M. mediterranea* uno de ellos. El estudio de la tirosinasa de *M. mediterranea* permitió determinar que el gen que la codifica forma parte de un operón junto con un segundo gen que codifica una proteína implicada en la transferencia de Cu a la tirosinasa (López-Serrano *et al.*, 2007). Esta proteína constituye un mecanismo novedoso de transferencia de Cu y por tanto es de interés en el estudio de los procesos de homeostasis de este metal. El estudio de tirosinasas sintetizadas por *Ralstonia solanacearum* reveló que esta bacteria sintetiza una enzima que, al contrario de la mayoría de las tirosinasas, muestra una mayor actividad sobre la tirosina que sobre el difenol L-dopa (Hernandez-Romero *et al.*, 2006). Este tipo de enzimas pueden tener aplicación en la síntesis de

compuestos difenólicos. De hecho, el mismo L-dopa es utilizado para el tratamiento del Parkinson.

M. mediterranea sintetiza, además de la polifenol oxidasa tirosinasa, una lacasa que es capaz de oxidar un amplio rango de compuestos fenólicos (Solano *et al.*, 2000). Las lacasas son enzimas que han recibido una gran atención por su interés en procesos biotecnológicos. Las lacasas más estudiadas son las de hongos. Sin embargo, las enzimas bacterianas muestran propiedades diferentes en aspectos como tolerancia salina y a pH alcalino, lo que puede hacerlas interesantes en ciertas aplicaciones (Tonin *et al.*, 2016).

La creciente resistencia microbiana a los antibióticos ha renovado el interés por la investigación de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Desde los años 70 se conocía que algunas bacterias marinas

synthetizaban antimicrobianos de alto peso molecular cuya actividad era inhibida por catalasa, pero el mecanismo de actuación era desconocido. El trabajo de nuestro grupo ha contribuido a demostrar que esta actividad antimicrobiana se debe a la síntesis de aminoácido oxidasa que generan, entre otros productos, peróxido de hidrógeno. Un resultado destacado en esta línea de trabajo ha sido la caracterización de LodA, la primera enzima con actividad Lisina ϵ -oxidasa, por lo que recibió un nuevo número EC (EC 1.4.3.20) (Gómez *et al.*, 2006). LodA tiene también el interés de ser la primera aminoácido oxidasa descrita que no posee FAD como cofactor, sino una quinona (CTQ, cisteína triptofilquinona). La síntesis de CTQ tiene lugar mediante un proceso de modificación post-traduccional en el que interviene una segunda enzima (LodB) codificada en el mismo operón que LodA (Gómez *et al.*, 2010, Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Esta línea de trabajo encaminada a caracterizar el mecanismo de modificación post-traduccional se mantiene en colaboración con el laboratorio del Dr. Victor Davidson (University of Central Florida, USA).

Estudios recientes de nuestro grupo han revelado que aproximadamente el 1% de los genomas microbianos contienen genes que codifican proteínas similares a LodA que pueden agruparse en varios grupos filogenéticos (Campillo-Brocal *et al.*, 2015). No todas las enzimas de este grupo son lisina oxidasas. De hecho, en la propia *M. mediterranea* un segundo gen de este grupo codifica una glicina oxidasa (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). En nuestra opinión, el grupo de proteínas similares a LodA constituye un enorme reservorio de enzimas de potencial interés biotecnológico en las numerosas aplicaciones que tienen las aminoácido oxidasas. Entre estas aplicaciones se incluyen el diseño de biosensores o su uso en biotransformaciones. Desde el punto de vista fisiológico, se ha observado que algunas de estas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo de biopelículas microbianas (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

En el desarrollo de las líneas de investigación anteriormente mencionadas, nuestro grupo ha puesto a punto en *M. mediterranea* una gran variedad de técnicas de Biología Molecular que han sido esenciales en el estudio de los sistemas CRISPR-Cas en esta bacteria. Los sistemas CRISPR (Cluste-

red Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)- Cas (CRISPR associated genes) proveen a los procariontes de mecanismos de resistencia adaptativa a la infección por elementos genéticos invasivos. Básicamente, el sistema funciona mediante la adquisición de fragmentos del genoma del elemento invasivo y su integración como "espaciadores" en los *loci* CRISPR. Posteriormente, los espaciadores serán transcritos y procesados en fragmentos de RNA (crRNA) que guiarán a unas nucleasas Cas para la degradación del agente infeccioso original ante una nueva invasión. Los sistemas CRISPR-Cas muestran una enorme diversidad, observándose que algunos de estos sistemas de tipo III-B poseen dominios de retrotranscriptasa asociados a la proteína Cas1 que participa en la adquisición de espaciadores (RT-Cas1). Usando como modelo *M. mediterranea*, el único microorganismo con RT-Cas1 para el que existían técnicas de manipulación genética, la colaboración entre nuestro grupo y el grupo del Dr. Andrew Z. Fire (Stanford University, Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006 por sus estudios de interferencia de RNA) ha puesto de manifiesto por primera vez que la adquisición de espaciadores tiene lugar también a partir de RNA (y no sólo DNA, como se había descrito anteriormente). La proteína RT-Cas1 de *M. mediterranea* lleva a cabo la retrotranscripción de RNA y su integración como nuevo espaciador (Silas *et al.*, 2016). *M. mediterranea* forma parte de la microbiota asociada a la planta marina *Posidonia oceanica*. Mediante el muestreo de estos ambientes en las costas de Cabo de Palos, y otras zonas del mar Mediterráneo, se han aislado nuevas cepas de este microorganismo, así como fagos capaces de infectarlas. Estos datos están permitiendo profundizar en el estudio de los sistemas CRISPR-Cas de *M. mediterranea* ofreciendo resultados muy interesantes en cuanto a su modularidad y a la cooperación entre distintos tipos de sistemas presentes en las cepas aisladas.

REFERENCIAS

- Campillo-Brocal JC, Chacón-Verdú MD, Lucas-Elío P y Sánchez-Amat A** (2015) Distribution in microbial genomes of genes similar to *lodA* and *goxA* which encode a novel family of quinoproteins with amino acid oxidase activity. *BMC Genomics* 16: 231.
- Campillo-Brocal JC, Lucas-Elío P y Sanchez-Amat A** (2013) Identification in *Marinomonas mediterranea*



Fondos marinos del Mediterráneo con *Posidonia oceanica*, hábitat natural de *Marinomonas mediterranea*.

of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity. *MicrobiologyOpen* 2: 684-694.

Chacón-Verdú MD, Campillo-Brocal JC, Lucas-Elío P, Davidson VL y Sánchez-Amat A (2015) Characterization of recombinant biosynthetic precursors of the cysteine tryptophylquinone cofactors of l-lysine-epsilon-oxidase and glycine oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* 1854: 1123-1131.

Gómez D, Lucas-Elío P, Sanchez-Amat A y Solano F (2006) A novel type of lysine oxidase: L-lysine-epsilon-oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1764: 1577-1585.

Gómez D, Lucas-Elío P, Solano F y Sanchez-Amat A (2010) Both genes in the *Marinomonas mediterranea* *lodAB* operon are required for the expression of the antimicrobial protein lysine oxidase. *Mol Microbiol* 75: 462-473.

Hernandez-Romero D, Sanchez-Amat A y Solano F (2006) A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio - Role of the seventh histidine and accessibility to the active site. *FEBS Journal* 273: 257-270.

López-Serrano D, Solano F y Sanchez-Amat A (2007) Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology* 153: 2241-2249.

Mai-Prochnow A, Lucas-Elío P, Egan S, Thomas T, Webb JS Sanchez-Amat A y Kjelleberg S (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 190: 5493-5501.

Silas S, Mohr G, Sidote DJ, Markham LM, Sanchez-Amat A, Bhaya D, Lambowitz AM y Fire AZ (2016) Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein. *Science* 351: aad4234.

Solano F, Lucas-Elío P, Fernández E y Sanchez-Amat A (2000) *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: isolation of a multipotent polyphenol oxidase mutant. *J Bacteriol* 182: 3754-3760.

Tonin F, Melis R, Cordes A, Sanchez-Amat A, Pollegioni L, and Rosini E (2016) Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *N.Biotechnol* 33: 387-398.