



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CLONACIÓN DE LA CIANURO DIHIDRATASA DE *BACILLUS*
PUMILUS GMA1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MARCO VLADIMIR GRANADOS HERNÁNDEZ



TUTOR: DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

2009

Este trabajo contó con el apoyo del proyecto **CONACYT 41328Q**

Índice

Resumen	1
Capítulo 1. Marco teórico	1
1.1 Cianuro y nitrilos	1
1.1.1 Cianuro	1
1.1.2 Nitrilos	3
1.1.3 Hidrólisis de los nitrilos	3
1.2. Importancia de las enzimas degradadoras de cianuro	4
1.3. Estructura de la superfamilia nitrilasa	5
1.3.1 Evolución y clasificación	5
1.3.2 Ramas de la superfamilia nitrilasa	7
1.3.3 Enzimas degradadoras de cianuro: nitrilasa, cianuro hidratasa y cianuro dihidratasa	9
1.3.4 La nitrilasa y su importancia	10
1.3.5 La cianuro hidratasa	12
1.3.6 La cianuro dihidratasa	12
1.4. Generalidades de las cianuro dihidratasas	13
1.4.1 Distribución	13
1.4.2 Mecanismo de reacción	15
1.4.3 La cianuro dihidratasa de <i>Bacillus pumilus</i>	17
Capítulo 2. Justificación	20
Capítulo 3. Objetivos	21
3.1 General	21
3.2 Particulares	21

Capítulo 4. Metodología	22
4.1 Reactivación de la cepa	22
4.2 Extracción de DNA cromosómico de <i>B. pumilus</i> GMA1.	22
4.3 Amplificación del gen <i>cynD</i> por PCR	23
4.4 Ligación del gen <i>cynD</i> en el vector pGEM-T	24
4.5 Transformación de <i>E. coli</i> con la ligación entre el vector pGEM-T y el gen <i>cynD</i>	25
4.6 Purificación del plásmido pGEM- <i>cynD</i>	25
4.7 Digestiones del plásmido pGEM- <i>cynD</i>	26
4.8 Subclonación del gen <i>cynD</i> en el vector pET22b(+)	27
4.9 Ligación entre pET22b(+) y el gen <i>cynD</i>	27
4.10 Mutagénesis sitio-dirigida	28
4.11 Inducción de actividad por IPTG	30
4.12 Purificación de la proteína CynD	31
4.13 Determinación de proteínas por el método del Ácido Bicinconínico (BCA)	32
4.14 Ensayo colorimétrico de cianuro	33
4.15 Ensayo cinético para la enzima CynD	33
Capítulo 5. Resultados	35
5.1 Extracción de DNA cromosómico de <i>B. pumilus</i> GMA1	35
5.2 Amplificación del gen <i>cynD</i> por PCR y clonación en el vector pGEM-T	35
5.3 Transformación de la ligación entre el vector pGEM-T con el gen <i>cynD</i> en células competentes de <i>E. coli</i>	35
5.4 Purificación y análisis del plásmido pGEM- <i>cynD</i>	36
5.5 Secuencia del gen <i>cynD</i> y subclonación en el vector de expresión pET22b(+)	36
5.6 Mutagénesis sitio dirigida	40
5.7 Subclonación del gen <i>cynD</i> mutado en pET22b(+)	40
5.8 Análisis de inducción de la expresión del gen <i>cynD</i>	40

5.9 Purificación de la enzima por cromatografía de afinidad	41
5.10 Conservación de la proteína pura	43
5.11 Propiedades cinéticas de la cianuro dihidratasa recombinante de <i>B. pumilus</i>	
GMA1	43
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas	46
6.1 Conclusiones	46
6.2 Perspectivas	47
Capítulo 7. Referencias	48

Índice

Resumen

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Cianuro y nitrilos

1.1.1 Cianuro

1.1.2 Nitrilos

1.1.3 Hidrólisis de los nitrilos

1.2. Importancia de las enzimas degradadoras de cianuro

1.3. Estructura de la superfamilia nitrilasa

1.3.1 Evolución y clasificación

1.3.2 Ramas de la superfamilia nitrilasa

1.3.3 Enzimas degradadoras de cianuro: nitrilasa, cianuro hidratasa y cianuro dihidratasa

1.3.4 La nitrilasa y su importancia

1.3.5 La cianuro hidratasa

1.3.6 La cianuro dihidratasa

1.4. Generalidades de las cianuro dihidratasas

1.4.1 Distribución

1.4.2 Mecanismo de reacción

1.4.3 La cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus*

Capítulo 2. Justificación

Capítulo 3. Objetivos

3.1 General

3.2 Particulares

Capítulo 4. Metodología

4.1 Reactivación de la cepa

4.2 Extracción de DNA cromosómico de *B. pumilus* GMA1.

4.3 Amplificación del gen *cynD* por PCR

- 4.4 Ligación del gen *cynD* en el vector pGEM-T
- 4.5 Transformación de *E. coli* con la ligación entre el vector pGEM-T y el gen *cynD*
- 4.6 Purificación del plásmido pGEM-*cynD*
- 4.7 Digestiones del plásmido pGEM-*cynD*
- 4.8 Subclonación del gen *cynD* en el vector pET22b(+)
- 4.9 Ligación entre pET22b(+) y el gen *cynD*
- 4.10 Mutagénesis sitio-dirigida
- 4.11 Inducción de actividad por IPTG
- 4.12 Purificación de la proteína CynD
- 4.13 Determinación de proteínas por el método del Ácido Bicinconínico (BCA)
- 4.14 Ensayo colorimétrico de cianuro
- 4.15 Ensayo cinético para la enzima CynD

Capítulo 5. Resultados

- 5.1 Extracción de DNA cromosómico de *B. pumilus* GMA1
- 5.2 Amplificación del gen *cynD* por PCR y clonación en el vector pGEM-T
- 5.3 Transformación de la ligación entre el vector pGEM-T con el gen *cynD* en células competentes de *E. coli*
- 5.4 Purificación y análisis del plásmido pGEM-*cynD*
- 5.5 Secuencia del gen *cynD* y subclonación en el vector de expresión pET22b(+)
- 5.6 Mutagénesis sitio dirigida
- 5.7 Subclonación del gen *cynD* mutado en pET22b(+)
- 5.8 Análisis de inducción de la expresión del gen *cynD*
- 5.9 Purificación de la enzima por cromatografía de afinidad
- 5.10 Conservación de la proteína pura
- 5.11 Propiedades cinéticas de la cianuro dihidratasa recombinante de *B. pumilus* GMA1

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

- 6.1 Conclusiones
- 6.2 Perspectivas

Capítulo 7. Referencias

Resumen

La cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1 pertenece a la superfamilia nitrilasa y tiene la capacidad de degradar el cianuro formando ácido acético y amonio sin necesidad de cofactores. Esto ha despertado el interés de algunas industrias por usar estas enzimas en el tratamiento de residuos industriales contaminados con cianuro. Actualmente es necesario eliminar el cianuro antes de liberar los residuos al ambiente mediante procesos químicos costosos y poco amables con el ambiente, cuyos subproductos son también tóxicos. Este trabajo tuvo como objetivo la clonación, expresión y purificación de la cianuro dihidratasa (*cynD*) de *B. pumilus* GMA1 en *Escherichia coli*. La clonación se realizó utilizando cebadores diseñados con base en la secuencia conservada de otras cianuro dihidratasa de distintas cepas de *B. pumilus*. Estos cebadores incluyeron sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* para facilitar la subclonación del gen a un vector de expresión tipo pET. El amplicón correspondiente al gen *cynD* se clonó en un vector tipo TA y se obtuvo su secuencia de nucleótidos. Ésta reveló que el gen contiene un sitio de restricción interno para la enzima *NdeI*. Este sitio de restricción fue eliminado por mutagénesis sitio específica sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína. El gen mutado fue subclonado sin problemas en el vector de expresión pET22b(+). Este vector permitió la expresión y posterior purificación de la cianuro dihidratasa. La enzima pura fue capaz de utilizar cianuro como sustrato y su caracterización cinética a 30°C y pH 7.5 indicó que su K_m es de 8.8 mM, mientras que su k_{cat} es de 227 s⁻¹.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Cianuro y nitrilos

1.1.1 Cianuro

El cianuro está presente en una amplia gama de compuestos químicos de distinta naturaleza y el humano esta expuesto a estos compuestos en sus formas gaseosas, líquidas y sólidas. El origen de estos compuestos es tanto natural como antropogénico. Muchas formas del cianuro son usadas en procesos industriales o están presentes en el ambiente, en las que el ión cianuro (CN^-) es el agente tóxico primario (1).

El cianuro de hidrógeno se usa principalmente en la producción de sustancias tales como adiponitrilo, metil metracrilato, agentes quelantes, metionina y cianuros de potasio y sodio. El cianuro de hidrógeno es también usado en la formulación de fumígenos para uso en barcos, grandes edificios, molinos de harina y como fumigante de semillas en cámaras de vacío (2).

El cianuro de sodio y el cianuro de potasio son sales cristalinas higroscópicas ampliamente usadas en procesos de extracción de oro, el templado de acero, así como en técnicas de impresión, teñido y fotografía. También son utilizados en la síntesis de productos químicos orgánicos e inorgánicos como por ejemplo, nitrilos, ácidos carboxílicos, amidas, ésteres y agentes quelantes (3).

En la naturaleza se puede encontrar al cianuro en más de 2000 especies de plantas, incluyendo frutas y vegetales, los cuales contienen glucósidos cianogénicos. Estos compuestos naturales liberan cianuro de hidrógeno por una reacción hidrolítica al ser ingeridos. Los glucósidos cianogénicos más comunes en plantas son la amigdalina, la linamarina, la prunasina, la lotaustralina y la taxifilina (2).

El cianuro de hidrógeno es liberado en la atmosfera mediante procesos naturales biogénicos de plantas, bacterias y hongos. En el aire, el cianuro esta presente como cianuro de hidrogeno gaseoso (ácido cianhídrico) en finas partículas de polvo (4).

La mayoría de la población esta expuesta a muy bajos niveles de cianuro en el ambiente. Sin embargo hay sectores que tienen, ya sea por su por su oficio (trabajadores de la industria) o su alimentación (consumidores de casaba), una alta exposición a éste.

El cianuro es incorporado rápidamente al cuerpo y las concentraciones más altas se pueden encontrar en el hígado, pulmones, sangre y cerebro (3).

Aproximadamente el 80% del cianuro absorbido es metabolizado a tiocinato en el hígado por la enzima mitocondrial tiocianato sulfurotransferasa (rodanasa). El tiocinato es excretado en la orina. En rutas menores para la detoxificación del cianuro se involucran reacciones con cisteína para producir ácidos carboxílicos aminotiazolin- e iminotiazolidin (4).

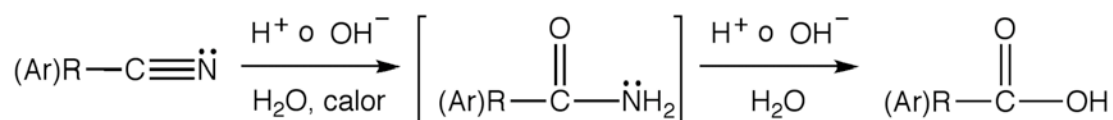
1.1.2 Nitrilos

El nitrilo es un compuesto químico en cuya molécula existe el grupo funcional cianuro o ciano, $R-C\equiv N$. Los nitrilos se pueden considerar derivados orgánicos del cianuro de hidrógeno, en los que el hidrógeno ha sido sustituido por un radical alquilo. Se nombran añadiendo el sufijo nitrilo al nombre de la cadena principal; por ejemplo etanonitrilo, CH_3CN (5).

La química de los de los nitrilos se caracteriza en la hidrólisis de estos a ácidos carboxílicos. Esta reacción tiene lugar en presencia de un ácido o de una base fuertes a altas temperaturas, y en ambos casos el primer producto es una amida, que no puede ser aislada a menos que su velocidad de hidrólisis sea inferior a la velocidad con que se descompone el nitrilo inicial. Los nitrilos se obtienen por la acción del cianuro de sodio o de potasio sobre los haluros de alquilo, y también calentando las amidas en presencia de un deshidratante (5).

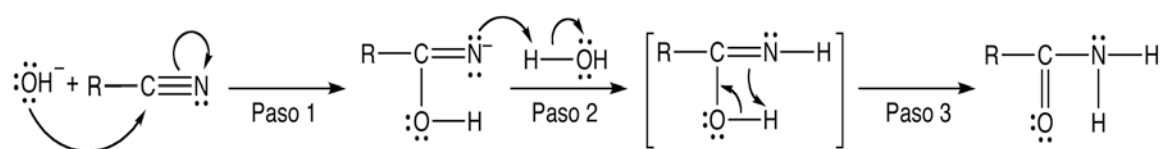
1.1.3 Hidrólisis de los nitrilos

La reacción de hidrólisis de los nitrilos en medio básico o ácido se presenta en dos etapas; primero el nitrilo se convierte a una amida, la cual luego se hidroliza al ácido carboxilílico correspondiente:



En general se escogen las condiciones básicas para convertir un nitrilo a un ácido, debido a que se forma la sal soluble del ácido carboxílico y es posible visualizar la prueba de la reacción completa cuando la mezcla de reacción heterogénea original se vuelve homogénea. En condiciones acuosas ácidas, la mezcla de reacción permanece heterogénea a menos que se emplee un disolvente orgánico polar (5).

En solución básica, el nitrilo se convierte a la amida correspondiente por el siguiente mecanismo de reacción:



Una vez que se forma la amida, ésta se hidroliza para formar el ácido carboxílico correspondiente (5).

1.2. Importancia de las enzimas degradadoras de cianuro

Como resultado de varios procesos industriales se producen grandes cantidades de desechos que contienen cianuro, el cual es un potente inhibidor de la citocromo oxidasa, por lo tanto es tóxico para los organismos aerobios. En el caso de los humanos se ha relacionado la larga exposición al cianuro con ciertas neuropatías (6).

A nivel industrial, los productos de desecho que contienen cianuro deben ser tratados antes de ser desechados en el ambiente. Por lo general se utilizan métodos como la cloración alcalina, o el uso de otros compuestos químicos peligrosos; ambos métodos representan grandes costos para la industria además de producir otro tipo de compuestos que también son dañinos para el ambiente (7,8). Ciertos microorganismos, sin embargo, han mostrado que pueden utilizar y degradar el cianuro, lo cual representa una oportunidad para desarrollar nuevos métodos biológicos para la desintoxicación del cianuro en desechos industriales (9,10).

1.3. Estructura de la superfamilia nitrilasa

1.3.1 Evolución y clasificación

La superfamilia nitrilasa consiste en tiol-enzimas involucradas en la biosíntesis de productos naturales así como en la modificación postraducciona en plantas, animales y hongos. En base al análisis global de secuencia y estructura, los miembros de la superfamilia nitrilasa se han clasificado en trece ramas, de las cuales en nueve de ellas su especificidad por el sustrato puede ser anticipada. A pesar de la clasificación histórica de todas esas secuencias, únicamente una de las ramas presenta propiamente actividad como nitrilasa, mientras que ocho ramas aparentemente presentan actividad de tipo amidasa (14).

Los miembros de la superfamilia nitrilasa se encuentran en todas las plantas, animales y hongos. En muchos de estos organismos existen múltiples proteínas relacionadas con más de una rama de la superfamilia. Algunas secuencias relacionadas con la superfamilia nitrilasa también se encuentran filogenéticamente aisladas en procariontes que, aparentemente, tienen una relación ecológica con plantas y animales. Es probable que esta superfamilia haya aparecido antes de la separación entre plantas, animales y hongos, radiando familias, y posteriormente se extendió lateralmente en bacterias y arqueas (14).

En base a la búsqueda y el análisis de secuencia de estas proteínas se sabe que los miembros de la superfamilia nitrilasa presentan actividades de nitrilasa, amidasa alifática, β -ureidopropionasa, β -alanina sintasa y *N*-carbamil-D-aminoacil amidohidrolasa, entre otras. Las reacciones llevadas a cabo por las nitrilasas, amidasas, carbamilasas, y las *N*- acil transferasas se muestran en la figura 1 (14).

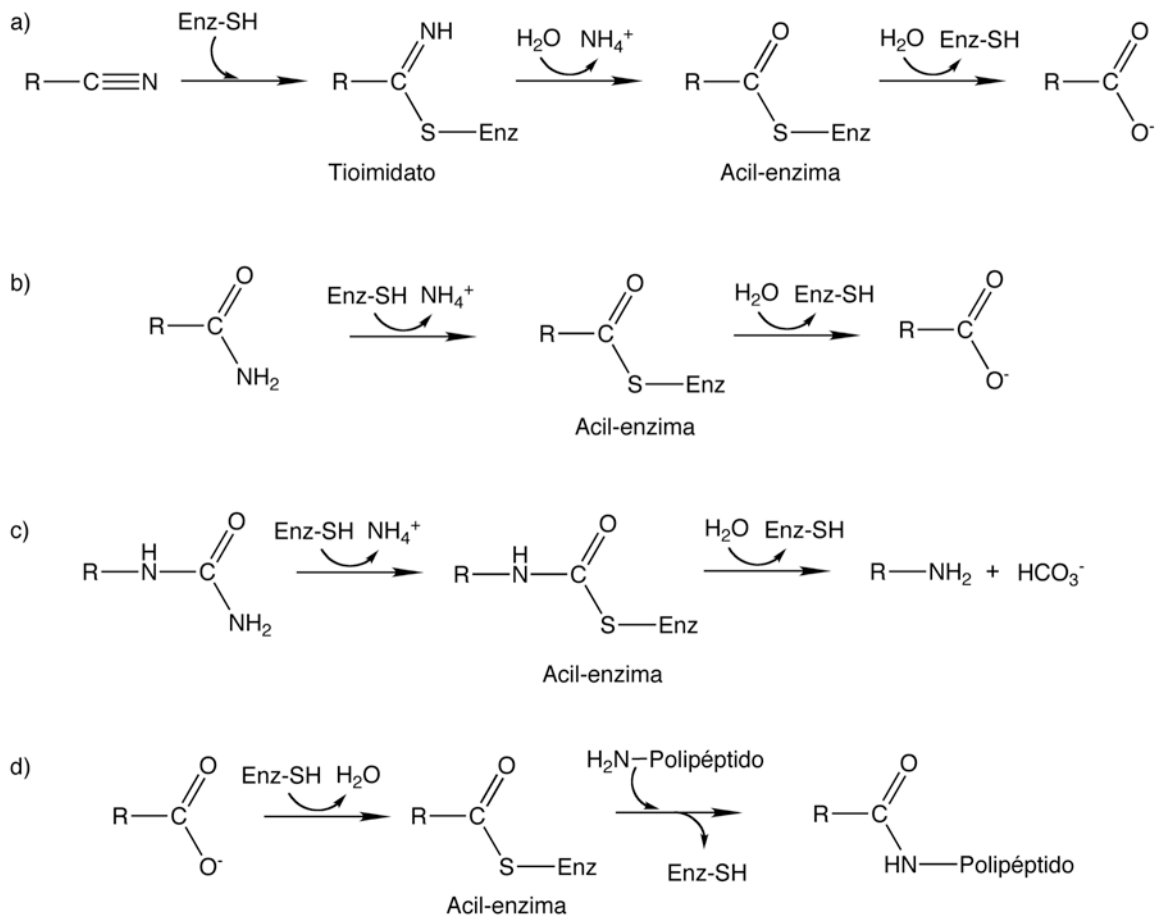


Figura 1. En la figura se muestran los cuatro tipos de reacción llevados a cabo por los miembros de la superfamilia nitrilasa. a) La reacción de nitrilasa es llevada a cabo por las enzimas de la rama 1. En plantas el sustrato es el indol-3- acetoniitrilo y el producto es el ácido indol-3-acético. b) La reacción de amidasa es la más frecuentemente encontrada en la superfamilia. Las enzimas de las ramas 2 a 4 son amidasas y poseen dominios relacionados a las nitrilasas; las ramas 7 y 8 están propuestas para ser clasificadas como amidasas específicas para glutamina. c) La reacción de carbamilasa es un caso especial de la reacción amidasa y se lleva a cabo por las ramas 5 y 6. d) *N*-aciltransferasas llevan a cabo la reacción amidasa en reversa transfiriendo un ácido graso de un fosfolípido a un polipéptido amino terminal.

1.3.2 Ramas de la superfamilia nitrilasa

Rama 1: Nitrilasa

Los miembros de esta rama se han encontrado en plantas, animales (*Caenorhabditis elegans*), hongos (*Saccharomyces cerevisiae*) y diversas bacterias. La mejor evidencia *in vivo* de la actividad de nitrilasa en plantas es la transformación del indolacetonitrilo en ácido indolacético, el principal factor de crecimiento en *Arabidopsis thaliana* (14).

Rama 2: Amidasa alifática

Las amidasas alifáticas comprenden de una pequeña rama de proteínas con alto porcentaje de identidad encontradas en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Helicobactera*. Estas hidrolizan sustratos tales como las carboxiamidas de las cadenas laterales de glutamina y asparagina, utilizando la cisteína conservada dentro la superfamilia nitrilasa (14).

Rama 3: Amidasa amino-terminal

La degradación de proteínas dependientes de ubiquitina es regulada por la regla del amino terminal. La proteína Nat1 de *S. cerevisiae* desamina los residuos asparagina y glutamina a aspartato y glutamato permitiendo tasas más rápidas de recambio proteico. La proteína Nat1 tiene su homólogo en hongos, en el caso de los mamíferos el amino terminal de las amidasas parece no estar relacionado.

Rama 4: Biotinidasas

Las biotinidasas utilizan la actividad de amidasa-esterasa específica para liberar biotina de la biotinamida, los conjugados como biotin-lisina y péptido-biotina, así como del biotinilmetil éster. La deficiencia en la biotinidasa puede resultar en la incapacidad de reciclar biotina, la cual es manifestada en anormalidades neurológicas y cutáneas en humanos (14). Las enzimas de la rama 4 son las únicas amidasas en la súper familia nitrilasa y son conocidas también por su preferencia por los sustratos de la forma $R-C=O(NHR')$.

Rama 5: β -ureidopropionasa

Es una enzima involucrada en el catabolismo de bases de pirimidina y de la producción de β -alanina, el sustrato de esta enzima es un tipo de carbamilasa (como se ve en la figura 1C) (14).

Rama 6: Carbamilasa

Una variedad de bacterias que expresan actividad específica de descarbamilación de D-aminoácidos. Estas enzimas han sido explotadas en la producción de antibióticos β -lactámicos sistémicos (16).

Ramas 7 y 8: NAD sintetasa dependiente de glutamina

La capacidad de estas enzimas para utilizar glutamina como fuente de amonio se ha correlacionado con la presencia de un dominio de glutamina amidotransferasa (GAT) (14).

Rama 9: Apolipoproteína *N*-acil tranferasa

Las modificaciones en la ruta de síntesis de lipoproteína de Braun, uno de los mayores componentes de la membrana externa en *E. coli*, han sido estudiadas por décadas. Los defectos en esta ruta de modificación postraduccional son asociados a la sensibilidad al cobre. La lipoproteína es proteolizada dejando expuesta a una cisteína en el amino terminal. Después esta cisteína es modificada con diacilglicerol, las enzimas de la rama 9 condensan los ácidos grasos para el amino terminal del residuo cisteína modificado (14).

Rama 10: Nit

Nit fue originalmente identificado como una extensión de un amino terminal de aproximadamente 300 aminoácidos presentes en moscas y gusanos, es homólogo a la proteína supresora de tumores Fhit presente en humanos y ratones. De acuerdo a un estudio hecho en 8 tejidos distintos en los que se midieron los niveles de ARNm, se encontró que la correlación entre Fhit y Nit es muy alta y que juntas formarían una proteína "piedra roseta".

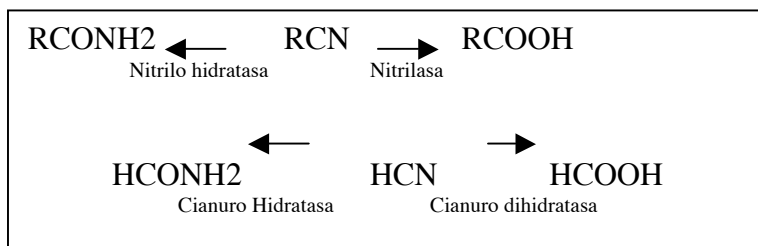
Ramas 11 a 13

Estas ramas han sido las menos caracterizadas. Se sabe que las ramas 11 y 12 poseen similitudes en diferentes grupos pero aún no están bien caracterizados, se cree que la rama 12 posee proteínas en forma de rosetta, en la que un distintivo dominio relacionado a la superfamilia nitrilasa está fusionado a otro dominio amino terminal de aproximadamente 21 aminoácidos, este a su vez está relacionado a la superfamilia de las amino terminal trans-acetilinas (RimI), sugiriendo de esta manera que los miembros de la rama 12 participan en modificaciones postraduccionales (19).

1.3.3 Enzimas degradadoras de cianuro: nitrilasa, cianuro hidratasa y cianuro dihidratasa

El cianuro es abundante en la naturaleza y lo podemos encontrar tanto en su forma inorgánica (HCN) como en su forma orgánica o nitrilos (RCN). Las plantas sintetizan una serie de nitrilos. El 5-indol-3-acetonitrilo (IAN) es un intermediario en la biosíntesis de la hormona del crecimiento más importante: el ácido indolacético AIA (20). La β -ciano-L-alanina (Ala (CN)) se encuentra ampliamente distribuida en plantas y es producida por la cianoalanina sintasa a partir del cianuro y la cisteína. Esta ruta juega un rol importante en la desintoxicación de cianuro en plantas (21). La degradación de glucosinolatos permite la producción de nitrilos. Los glucosinolatos no son tóxicos, pero los compuestos producto de su degradación si lo son, como son los nitrilos e isotiocianatos. La degradación de glucosinolatos ocurre en los tejidos dañados de plantas (22).

Las enzimas degradadoras de cianuro y nitrilos han sido estudiadas ampliamente en varias especies microbianas y se han ido incrementando en plantas. La conversión enzimática de HCN/nitrilo a su correspondiente ácido puede llevarse a cabo en un proceso de un solo paso como en el caso de las nitrilasas y las cianuro dihidratasas (CDH) o en dos pasos con una amida como intermediario como en el caso de las nitrilo hidratasas y las cianuro hidratasas (CH), como lo ilustra el siguiente cuadro (18,20).



La cianuro hidratasa aunque es funcionalmente diferente de la nitrilasa y la cianuro dihidratasa, esta relacionada a estas enzimas (23). Las nitrilasas, cianuro hidratatas (CH) y cianuro dihidratatas (CDH) han sido clasificadas en una sola familia conocida como familia Nitrilasa/Cianuro Hidratasa, la cual también incluye a las menos relacionadas amidasas alifáticas (24). Esta familia es parte de un gran grupo de proteínas conocidas como las CN hidrolasas y más recientemente se les clasificó dentro de la superfamilia nitrilasa (14) como se mencionó anteriormente.

Las enzimas degradadoras de nitrilos (nitrilasas, cianuro hidratatas y cianuro dihidratatas) son un grupo de proteínas homólogas que forman una superfamilia. Estas enzimas muestran similitudes significativas tanto en su secuencia de aminoácidos como a nivel estructural, aunque presentan diferencias en su capacidad catalítica (25).

1.3.4 La nitrilasa y su importancia

La enzima nitrilasa fue descrita por primera vez por Thimman y Mahadevan (23). Es una enzima con la capacidad de metabolizar compuestos de tipo nitrilo. Esta proteína, obtenida de hojas de cebada, cataliza la conversión del indol-3-acetonitrilo (IAN) a ácido indolacético (AIA) y fue llamada inicialmente indolacetonitrilasa (14). Análisis de sustrato con la enzima purificada en 26 nitrilos diferentes indicó que la enzima tiene un amplio espectro de reconocimiento de sustrato, un ejemplo de los organismos bien caracterizados con actividad nitrilasa se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Organismos bien caracterizados que poseen actividad de nitrilasa.

Bacteria	
<i>Acido vorax facilis</i> 72W	(22)
<i>Acinetobacter</i> sp. AK226	(22)
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	(22)
<i>Alcaligenes faecalis</i> JM3	(22)
<i>Bacillus</i> sp. OxB-1	(22)
<i>Bacillus pallidus</i> Dac521	(22)
<i>Comamonas testosteroni</i>	(22)
<i>Kleibsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	(22)
<i>Pseudomonas</i> ?	(22)
<i>Pseudomonas</i> sp. SI	(22)
<i>Pseudomonas</i> DSM 7155	(22)
<i>Nocardia</i> (Rhodococcus) NCIB11216	(22)
<i>Nocardia</i> (Rhodococcus) NCIB11215	(22)
<i>Rhodococcus rhodococcus</i> K22	(22)
<i>Rhodococcus</i> ATCC39484	(22)
<i>Rhodococcus rhodochrorus</i> PA-34	(22)
<i>Rhodococcus rhodochrorus</i> JI	(22)
Hongos	
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i>	(22)
<i>Fusarium solani</i> IMI196840	(22)
Plantas	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	(22)
Cebada	(23)
Col China	(22)

La tasa de hidrólisis de la indolacetonitrilasa fue ocho veces más grande con 3-cianopiridina que con IAN, razón por la cual fue renombrada como "nitrilasa" para indicar el amplio rango de sustrato que posee (29). En estudios posteriores se observó que la actividad de nitrilasa se encontraba presente extractos enzimáticos obtenidos de bacterias del suelo (*Pseudomonas*), seleccionadas para crecer en un medio que contenía el nitrilo natural, ricina (*N*-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona) como única fuente de carbono (13), demostrando así que la actividad nitrilasa no es exclusiva de las plantas. Aunque la mayoría

de las nitrilasas no cuenta con una caracterización bioquímica completa, los datos que arroja la literatura indican que las propiedades bioquímicas dependen fuertemente de la especie. Los estudios realizados hasta ahora muestran que las diferencias más significativas son la especificidad por sus sustratos, la estructura nativa, las propiedades de agregación y los valores de pH óptimos (14).

1.3.5 La cianuro hidratasa

La enzima cianuro hidratasa fue identificada en 1972 (24) en el hongo *Sthempylium loti*, un hongo patógeno de la planta cianogénica *Lotus corniculatus*. En este trabajo encontraron que la que la tolerancia de *S. loti* al cianuro se debía a la presencia de una enzima que era inducida por la exposición al cianuro, la cual convertía el HCN en formamida. También notaron que existía un gran parecido en el espectro de pH de esta enzima con la nitrilasa de la cebada (29). Esta enzima se ha detectado desde entonces en muchas especies de hongos y no así en plantas y bacterias (20,25).

Estas enzimas presentan mucha más especificidad por el sustrato que las nitrilasas, siendo el HCN el sustrato más efectivo para todas ellas. Las enzimas de *Fusarium oxysporum* N-10 y *Fusarium solani* pueden hidrolizar el complejo metal-cianuro tetracianoniquelato (II) (TCN) (14) además de otros nitrilos aromáticos, pero la actividad de la enzima de *F. oxysporum* N-10 es muy baja (aproximadamente 0.05% de la actividad frente a HCN) (30). El producto de la hidrólisis de nitrilo es su correspondiente amida, la cual indica que la enzima esta catalizando una mono hidrólisis del sustrato y por consiguiente la reacción es de nitrilo hidratasa y no de nitrilasa.

1.3.6 La cianuro dihidratasa

Las cianuro dihidratasas comprenden un grupo de enzimas bacterianas producidas por *Alcaligenes xylooxidans* ssp. *denitrificans* DF3, *Bacillus pumilus* C1 y *Pseudomonas stutzeri* AK61. Ingvorsen *et al.* (1991) (11) encontró que *Alcaligenes xylooxidans* ssp. *Denitrificans* cepa DF3 cataliza la hidrólisis de HCN a formato sin producir formamida como intermediario libre. A esta enzima se le llamó cianidasa o cianuro dihidratasa (CDH). Más cianuro dihidratasas se han identificado en *B. pumilus* C1 (31), *P. florescens* NCIMB 11764 (30) y *P. stutzeri* AK61 (12). Existe un estudio comparativo de estas enzimas en el

que se determinaron sus eficiencias relativas y además se consideró su estabilidad frente a factores como el pH, la temperatura y la presencia de metales. Los autores reportan que las dos enzimas bacterianas tienen un comportamiento similar con respecto al pH, conservado más del 50% de actividad en el intervalo de 5.2 a 8.0. En cuanto a las propiedades cinéticas, se encontró que tanto su K_m como su V_{max} son similares (6-7 mM y 0.1 mmol min⁻¹ mg⁻¹). Igualmente se reportó que su tolerancia a metales era parecida. En el caso de la cianuro hidratasa del hongo *Gloeocercospora sorghi*, la enzima tiene mayor afinidad por el cianuro mientras que su actividad es notablemente mayor ($K_m = 90$ mM, $V_{max} = 4$ mmol min⁻¹ mg⁻¹). En cuanto a su actividad a distintos valores de pH, la cianuro hidratasa presenta mayor actividad a pH 8.5. Sin embargo esta enzima presenta una muy pobre estabilidad térmica. La cianuro hidratasa prácticamente no fue inhibida por el Hg²⁺ pero el Pb²⁺ la inhibió significativamente más que a las cianuro dihidratasa bacterianas (13).

La cianuro dihidratasa es específica para cianuro, ninguna de las cianuro dihidratasa estudiadas hasta la fecha produce formamida a partir de HCN por lo que no muestra actividad de cianuro hidratasa. *P. florescens* NCIMB 11764 (31) metaboliza HCN en varias rutas diferentes. La mayor actividad bajo condiciones aeróbicas es de cianuro oxigenasa dependiente de NADH, la cual produce CO₂ y NH₃. Esta enzima no se encuentra relacionada con las enzimas de la familia nitrilasa/cianuro hidratasa. La cepa también produce formamida y ácido fórmico y las cantidades de estos productos dependen de las condiciones de crecimiento. Kunns *et al.* (1994) (31) propone que la enzima posee actividad tanto de cianuro hidratasa como de cianuro dihidratasa.

1.4. Generalidades de las cianuro dihidratasa

1.4.1 Distribución

Como se mencionó, la cianuro dihidratasa pertenece a la superfamilia de la nitrilasa y su importancia radica en la capacidad que tiene para convertir el cianuro en formato y amonio. Esto la hace candidata para ser utilizada en biorremediación de materiales contaminados con cianuro, ya que su utilización representaría un ahorro considerable en los costos destinados para el tratamiento de éstos, comparado con métodos químicos convencionales, que a su vez son agresivos con el ambiente (9).

La cianuro dihidratasa de *P. stutzeri* AK61 (7) comparte una identidad del 35 y 28% respectivamente con las cianuro hidratatasas de *G. sorghi* y *Fusarium lateritium* y un 35.1% de identidad con la nitrilasa alifática de *Rhodococcus rhodochrous* K22 (9). Esta enzima hidrolítica no requiere de cofactores ni sustratos adicionales para funcionar adecuadamente. La cianuro dihidratasa purificada de *P. stutzeri* AK61 es capaz de catalizar la hidrólisis del cianuro a formato y amonio. Esta bacteria fue aislada de las aguas de desecho de una planta procesadora de plata (12). Esta enzima está compuesta por una cadena polipeptídica de 38 kDa. La enzima activa tiene una masa molecular mayor a los 1000 kDa por filtración en gel.

La secuencia de aminoácidos deducida de esta secuencia nucleotídica (GenBank D82961) tiene una remarcable homología con las nitrilasas (E.C. 3.5.5.1), que catalizan la hidrólisis de nitrilos a amonio y a su correspondiente ácido carboxílico (34). De esta secuenciación también se logró encontrar que la homología entre la cianuro dihidratasa de *P. stutzeri*, la nitrilasa alifática de *R. rhodochrous* se encuentra principalmente en las regiones centrales y amino terminal del sitio activo. Estas regiones homólogas de la cianuro dihidratasa también fueron observadas en otras nitrilasas provenientes de *Klebsiella ozaenae* y *Alcaligenes faecalis* JM3 (31) y cianuro hidratatasas como *Gloeocercospora sorghi* y *Fusarium lateritium*, las cuales convierten el cianuro en formamida (34).

Las secuencias de aminoácidos de la cianuro dihidratasa, nitrilasa y cianuro hidratasa fueron comparados para identificar los residuos conservados. Estos residuos fueron encontrados principalmente en cinco regiones homólogas (figura 2).

			*	*		**	
cdh	45	FPEAFIPGYP-WFAFLGHPEY-----NKIYVCISCSEKDGGSLYLAQLWFNP	119				
aln	51	FPEVWIPGYPYWAWIGDVKWA-----NNTALVMGYSEKDGASRYLSQVFIDQ	126				
bxn	43	FPELWIPGYP-GFMLTHNQTE-----HNTALSGYSERAGRTRYMSQMLIDA	117				
arn	45	FGETWLPGYP-FHVWLGAPAW-----LGIFIALGYSERSGGSLYLGQCLIDD	119				
chy-F	46	FPEVWIPGYPYWMWKVTYLQ-----NQIFVSLGFSEIDHATLYLSQVLIGP	118				
chy-G	46	FPEVWIPGYPYWMWKVNYLQ-----NQIYVSIQVSEIDHATLYLTQVLISP	118				
			**	*	*		
cdh	152	-TEIGNLGGLMCWEHNVPLDIAAMNSQNEQVHVAAWPGF-	190				
aln	159	-FGFGRVGGELNCWEHFQPLSKYMMYSLNEQIHVASWPAMF	198				
bxn	150	-TSVGRVGALNCAENQLNKFALAAEGEQIHISAWPFT-	188				
arn	152	-TELGRVGALCWEHLSPLSKYALYSQHEAIIHAAWPSFS	191				
chy-F	152	RLRLAASGQLNCWENMNPFLKSLNVSAGEQVHVAAWPVYP	192				
chy-G	151	QTEIGRLGQLNCWENMNPFLKSLAVARGEQIHVAAWPVYP	191				
			*	*	*	**	
cdh	230	-----RDYFNTFKSGHTRIEYGPDGPEPI---FKYYIDPVGHYSNQSLSM-N	293				
aln	244	-----KRALLPLGGWARIEYGPDGKSL---AKAAADPA GHYSRPDVLSLK	313				
bxn	236	-----YNPNQYLGGGYARIEYGPDMQLK---AKYSLDPTGHYSRPDVFSVS	299				
arn	241	-----NASLLKVGGSSEIFAPDGRTL---AKAINDPVGHYSKPEATRLV	305				
chy-F	243	PEGVEPETDPSVYNGHARIEYRPDGSLV---TKVLADFA GHYMRPDLIRLL	311				
chy-G	242	PPGVEPETDATPYNGHARIEYRPDGSLY---TKALADFA GHYMRPDLIRLL	310				

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa alifática (aln), bromoxinil nitrilasa (bxn), arilacetónitrilasa (arn), cianuro hidratasa de *F. laterutium* (chy-F) y de *G. sorghi* (chy-G) y de la cianuro dihidratasa (cdh) (número de acceso Gen Bank: aln, D12583; bxn, J03196; arn, D13419; chy-F, M99046; chy-G, M99044) (34).

Gracias la comparación de secuencias de estos miembros de la súper familia nitrilasa se han hecho estudios en los cuales se propone que mediante mutagénesis dirigida en las regiones conservadas de estas secuencias, se puede estudiar el efecto de estas mutaciones en la actividad o estructura de la cianuro dihidratasa (34).

1.4.2 Mecanismo de reacción

Dakshina Jandhyala y colaboradores en 2005 (13) propusieron un mecanismo de reacción para las cianuro hidratatas y cianuro dihidratatas (figura 3). El glutamato actúa como base general activando un ataque nucleofílico por una cisteína al C del nitrilo, dando como resultado la formación de tioamidato [1]. La lisina actúa como base general catalizando el ataque de una molécula de agua al C del tioamidato, dando lugar a un intermediario tetraédrico [2]. En las cianuro hidratatas el enlace C—S se rompe permitiendo la liberación de formamida, mientras que en el caso de las cianuro dihidratatas el enlace C—N se rompe permitiendo la liberación de amonio y la formación de un intermediario tioacil-enzima [3]. Posteriormente el glutamato activa una segunda molécula de agua que ataca al C

carbonílico del tioacilo, dando lugar a un intermediario tetraédrico oxianiónico [4], el cual se descompone para liberar ácido fórmico y regresar a la enzima a su estado inicial.

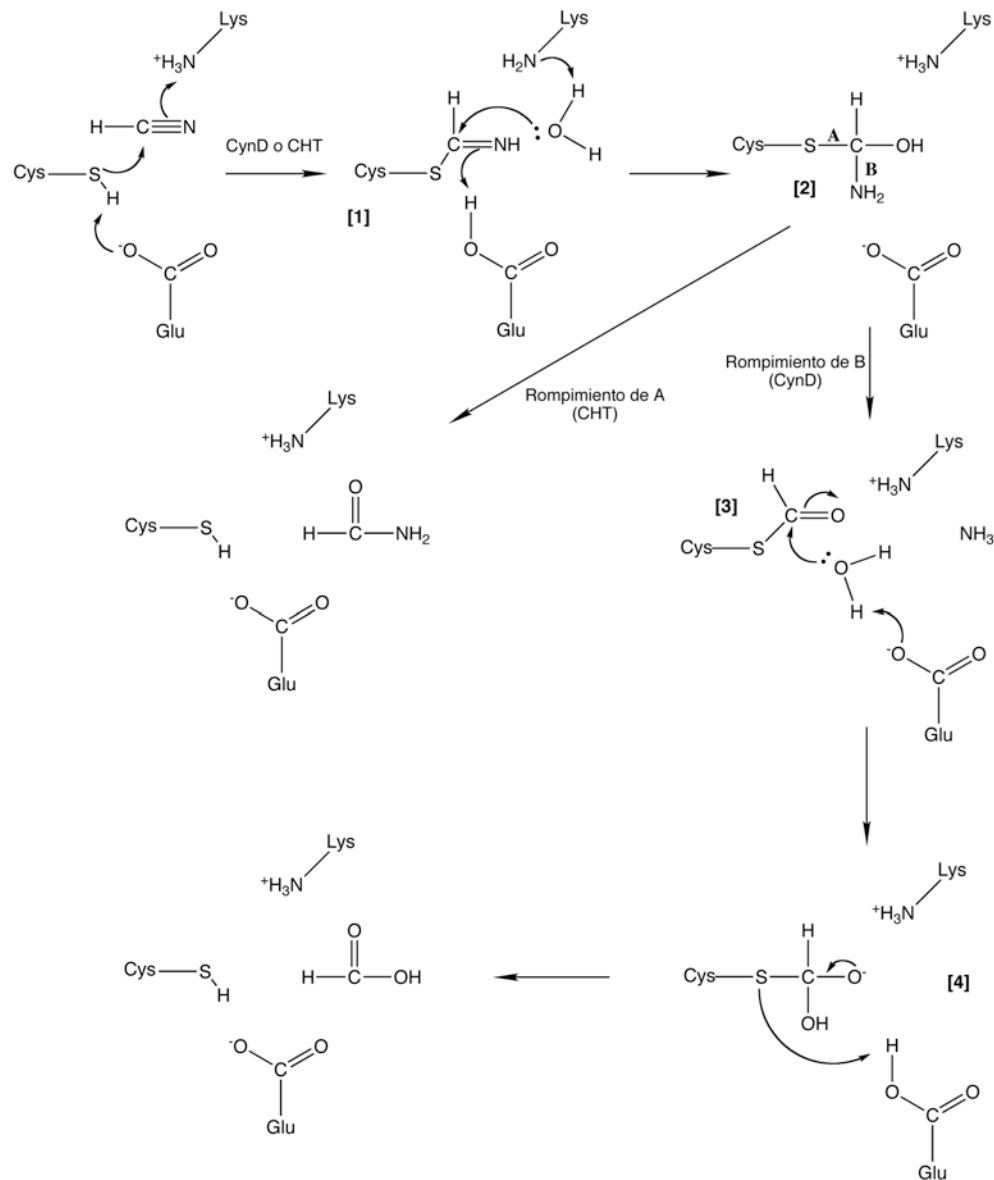


Figura 3. Mecanismo de reacción de la cianuro hidratasa (CTH) y cianuro dihidratasa (CynD) (13). Ver texto para mayores detalles.

1.4.3 La cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus*

Otra cianuro dihidratasa descrita es la producida por *B. pumilus* C1, una bacteria gram positiva que fue aislada del agua de desecho, contaminada con cianuro, de una compañía minera en Sudáfrica (27). En un estudio se mostró que la enzima trabaja óptimamente a 37°C y a un pH 7.8-8.0 (32).

Posteriormente en estudios de reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica se mostró que la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* 8A3 (28) consta de 18 subunidades formando una estructura en espiral, en la que las subunidades se reacomodan para formar una hélice dextrógira extendida como se muestra en la figura 4.

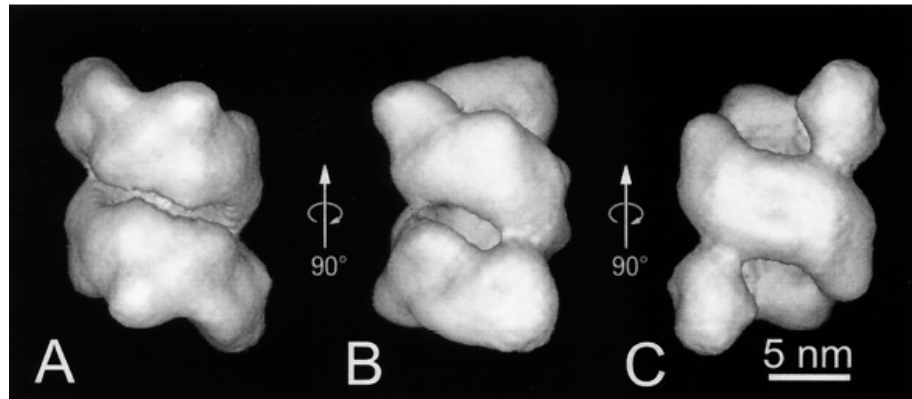


Figura 4. Tres reconstrucciones tridimensionales a partir de micrografía de electrones de la proteína CynD de *B. pumilus* a 3.2 nm de resolución. Se muestra la vista hacia debajo de los dos ejes de plegamiento (en A y C) y la vista perpendicular de los dos ejes de plegamiento (B). La estructura es un espiral de dos vueltas de principio a fin formadas por 18 subunidades (28).

En el estudio hecho por Jandhyala en 2003 (28) encontró que había cierta relación entre la estructura cuaternaria y el pH, ya que las pequeñas espirales antes descritas permanecen como discretas partículas en un rango de pH entre 6 y 8 (figura 5A). En contraste, a pH menor de 5.4 las pequeñas partículas se asocian para dar lugar a estructuras en forma de filamentos alargados (figura 5B). El diámetro de los filamentos es de 13 nm y tienen una periodicidad de 8 nm. El sombreado unidireccional en los filamentos en el ángulo favorable

(figura 5C) permitieron a los autores sugerir que las cadenas expuestas en el lado externo del filamento van de abajo a la derecha hacia arriba a la izquierda (regla de la mano izquierda).

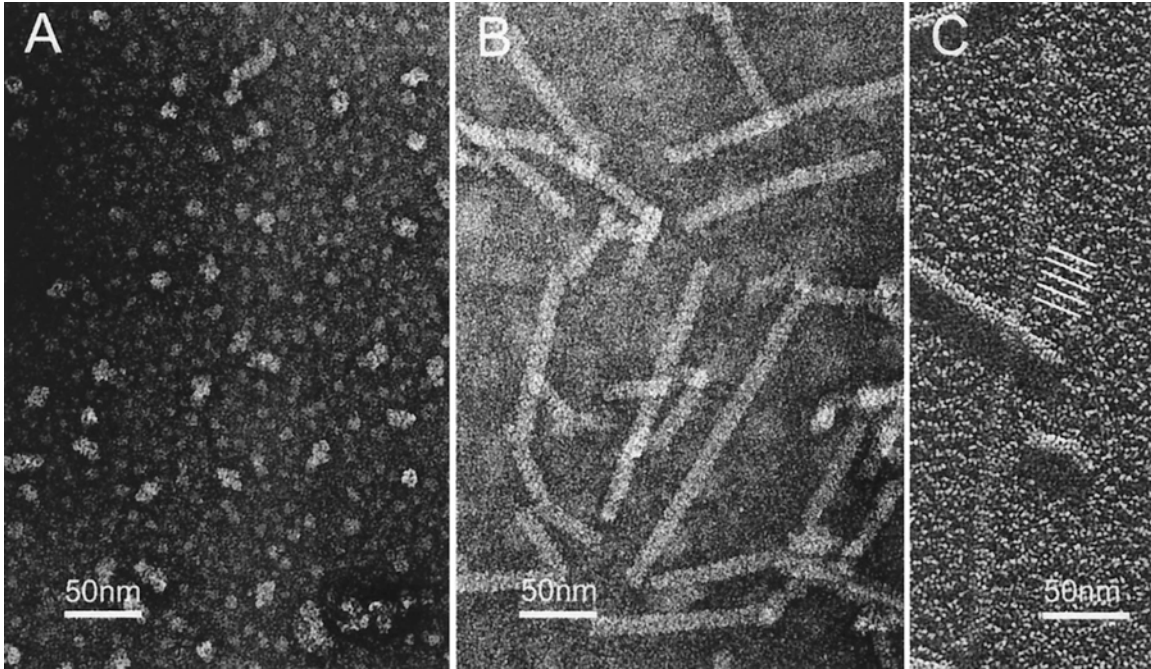


Figura 5. Micrografías electrónicas que muestran la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* a pH 8.0 en (A) y a pH 5.4 en (B), ilustrando la transición de discretas partículas a filamentos extendidos. Micrografía por sombreado de platino-carbón (C) que muestra la periodicidad de los giros en las subunidades a lo largo del filamento (28).

En un gel de electroforesis de la enzima entrecruzada con de glutaraldehído sugiere que el componente fundamental de la espiral es un dímero de 37 kDa por subunidad (figura 6) (11).

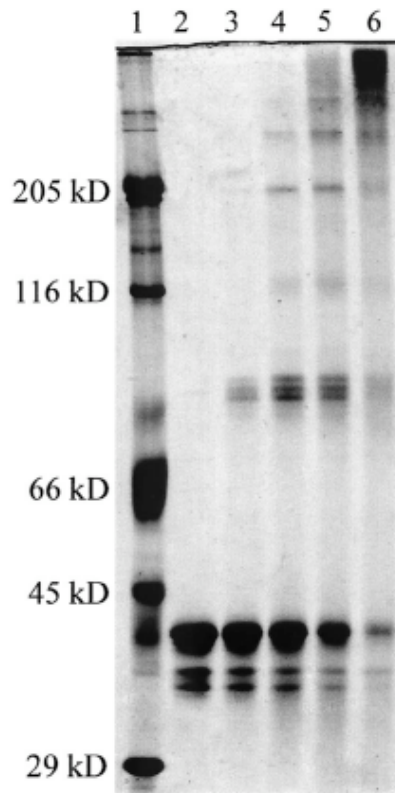


Figura 6. Gel PAGE-SDS que muestra el efecto de la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* entrecruzada con glutaraldehído. En carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se encuentra la cianuro dihidratasa sin entrecruzar con dos bandas de menor peso molecular que los autores postulan que provienen de la proteólisis de la banda principal contaminación. Del carril 3-6 la enzima entrecruzada con 0.002, 0.005, 0.010 y 0.020% de glutaraldehído respectivamente (28).

Capítulo 2. Justificación

Ensayos de actividad realizados dentro de nuestro grupo sugieren que la cepa GMA1 de *B. pumilus*, bacteria aislada en aguas termales mexicanas, tiene una enzima capaz de degradar nitrilos y que esta actividad es mas notoria si se incuba a la bacteria en presencia de 1 mM de cianuro. Estos resultados sugieren que este organismo cuenta con la enzima cianuro dihidratasa u otra enzima capaz de degradar nitrilos. Consideramos que esta enzima, de ser igual a las ya reportadas para este género bacteriano, no sólo tiene el potencial biotecnológico ya descrito para estas enzimas, sino que es un excelente modelo para estudiar interacciones proteína-proteína e incluso para probar reacciones de interés biotecnológico como es la hidrólisis de nitrilos. Por esta razón nos propusimos expresarla en *E. coli* y estudiar sus propiedades cinéticas elementales.

Capítulo 3. Objetivos

3.1 General

- Estudiar la cianuro dihidratasa (CynD) de *B. pumilus* GMA1 expresada en *Escherichia coli*

3.2 Particulares

- Cultivar la bacteria *B. pumilus* GMA1 y extraer su ADN cromosómico
- Diseñar cebadores para PCR que nos permitan amplificar el gen *cynD*
- Amplificar el gen *cynD* y clonar el producto de PCR en un vector tipo TA
- Subclonar el gen *cynD* al vector de expresión pET22b(+) en el mismo marco de lectura que una etiqueta de His en el extremo C-terminal
- Expresar la proteína CynD
- Purificar la cianuro dihidratasa recombinante por afinidad
- Obtener los parámetros cinéticos elementales k_{cat} y K_m de la enzima recombinante frente a cianuro.

Capítulo 4. Metodología

4.1 Reactivación de la cepa

La cepa de *B. pumilus* GMA1 conservada en glicerol a -70°C fue sembrada en placas de LB a 37°C para la posterior extracción de DNA cromosómico. Para la extracción se utilizó el método de Ausbel y col. (1992) (35). Una vez obtenido el DNA cromosómico se continuó con el proceso de amplificación por PCR y posterior clonación.

4.2 Extracción de DNA cromosómico de *B. pumilus* GMA1 (Modificado de (35))

1. Cultivar la cepa en 50 mL de medio LB por 18 h a 37°C con agitación constante de 250 rpm.
2. Obtener la biomasa por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos.
3. Resuspender las células con 2 mL de amortiguador TE (tris 10 mM y EDTA 0.2 mM pH 8).
4. Agregar 1 mg de lisozima e incubar a 37°C durante una hora.
5. Adicionar 100 μL de SDS 10%, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante una hora.
6. Adicionar 200 μL de NaCl 5 M y mezclar suavemente.
7. Adicionar 200 μL de solución de CTAB/NaCl (10%/0.7 M), mezclar suavemente e incubar 15 min a 65°C .
8. Adicionar un volumen de fenol-cloroformo (1:1), mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
9. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y agregar 0.6 volúmenes de 2-propanol, mezclar suavemente por inversión y centrifugar a 14,000 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante.
10. Adicionar 1 mL de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min. Descartar el sobrenadante.
11. Repetir el paso anterior dos o tres veces hasta que desaparezca el olor a fenol de la muestra.
12. Secar el ADN a 50°C con vacío y guardarlo a 4°C hasta ser usado.

13. Al usar el ADN purificado, resuspenderlo en 1 mL de amortiguador TE o agua destilada estéril.

4.3 Amplificación del gen *cynD* por PCR

Fue necesaria la amplificación del gen *cynD* mediante PCR para su clonación en un vector de expresión, para lo cual se utilizaron los cebadores CynDfN y CynDrX los cuales contienen, respectivamente, los sitios específicos para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' del gen. El cebador CynDrX no incluye el codón de término, sino que incluye dos codones que le permiten fusionarlo a una etiqueta de His en el vector de expresión pET22b+. La secuencia de los cebadores se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen *CynD*.

Cebador	Secuencia
CynDfN 26 nt T _m 56°C 42% GC	5'-ACCTGCCATATGACAAGTATTTACC-3
CynDrX 27 nt T _m 57°C 41% GC	5'-CTCGAGAACTTTTTCTTCCAGTATAACC-3

Las secuencias sombreadas corresponden a los sitios de restricción introducidos.

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones de termociclado:

1 ciclo	95°C /3.0 min
29 ciclos	95°C /1.0 min 51°C /1.0 min 72°C /1.5 min
1 ciclo	72°C / 15.0 min

La PCR se realizó utilizando el siguiente protocolo:

Reactivo	(μL)
CynDfN (120 ng/ μl)	1.0
CynDrX (120 ng/ μl)	1.0
Amortiguador para Taq 10x	5.0
dNTP's (2.5 mM)	1.0
Taq 10x (20 U/ μL)	0.1
Molde (10 ng/ μl)	1.0
Agua bidestilada	40.9

4.4 Ligación del gen *cynD* en el vector pGEM-T

Una vez amplificado el gen *cynD*, de aproximadamente 1000pb, se ligó en el vector pGEM-T. Este vector cuenta con 3015 pb, un operador *lac*, una secuencia Shine-Dalgarno y el gen de la β -lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina (Figura 7). La ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones del producto: incubación a 4°C por 24 horas.

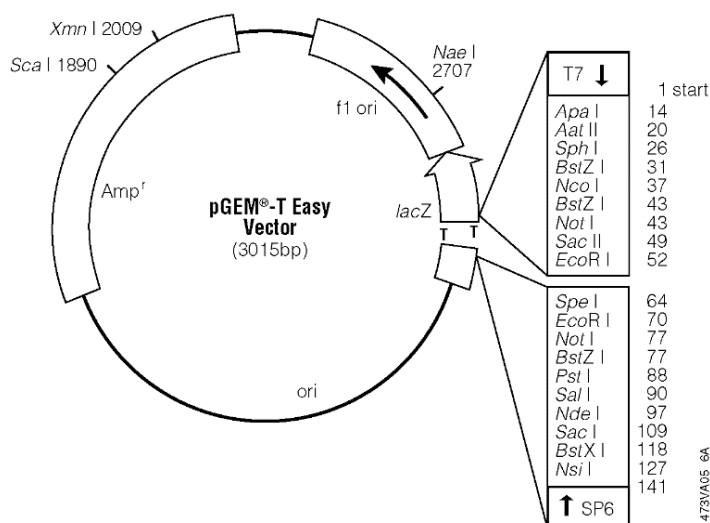


Figura 7. Mapa del vector de clonación pGEM-T.

4.5 Transformación de *E. coli* con la ligación entre el vector pGEM-T y el gen *cynD*

La reacción de ligación entre el vector pGEM-T con el gen *cynD* se utilizó para transformar en células competentes de *E. coli* DH5 α por electroporación con el siguiente protocolo:

1. Tomar una alícuota de células electrocompetentes (50 μ L) almacenadas a -70°C y descongelar en hielo lentamente.
2. Ya descongeladas, agregar el DNA a transformar (2 μ L) y dejar en hielo por 5 minutos.
3. Transcurrido el tiempo de incubación en hielo pasar las células competentes a una celda de electroporación de 2 mm de paso previamente enfriada. A continuación producir la descarga eléctrica de 2.0 kV en el electroporador (*Gene pulser II*, BIO-RAD).
4. Posterior al choque eléctrico se añaden 0.5 mL de medio LB a las células y se pasan a tubos estériles para ser incubadas por una hora a 37°C con agitación.
5. Por último sembrar 100 μ L de las células transformadas en placas de agar LB con ampicilina (50 μ g/mL) e incubar toda la noche a 37°C.

4.6 Purificación del plásmido pGEM-cynD

La extracción y purificación del plásmido pGEM-cynD se realizó siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001) (36) con las siguientes modificaciones:

1. Cultivar el microorganismo en 5 mL de LB con ampicilina (50 μ g/mL) hasta una DO₆₀₀ de 1. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm a 15°C.
2. Resuspender las células en 100 μ L de disolución I (50 μ M glucosa, 25 μ M Tris-HCl pH 8, 10 μ M EDTA y 10 mg/mL de lisozima) e incubar a 37°C por 1 hora.
3. Adicionar 200 μ L de una disolución recién preparada de 0.2 M NaOH y 4% de SDS. Mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo durante 10 minutos.
4. Agregar 150 μ L de una disolución de acetato de potasio 5 M pH 5 y poner en hielo durante 10 minutos.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Traspasar 400 μ l del sobrenadante a un tubo nuevo.

6. Agregar 400 μL de fenol saturado de amortiguador y mezclar suavemente. Adicionar 400 μL de cloroformo y mezclar suavemente. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Traspasar 700 μL de la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar el ADN plasmídico mediante la adición de un volumen igual de 2-propanol. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Recolectar el precipitado (plásmido) por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14,000 rpm.
9. Lavar tres veces el precipitado con 0.5 mL etanol al 70%, secar al vacío y resuspender en 50 μL de amortiguador TE adicionado con RNAsa.

4.7 Digestiones del plásmido pGEM-cynD

Se digirió el plásmido pGEM-cynD con las enzimas *XhoI* y *NdeI* en un periodo de incubación de 3 horas a 37°C. La reacción de digestión se preparó como se describe a continuación:

Reactivos	<i>XhoI/NdeI</i> (μL)
Plásmido pGEM-CynD	3.0
Enzima <i>NdeI</i> (20.000 U/ μL)	0.5
Enzima <i>XhoI</i> (20.000 U/ μL)	0.5
Amortiguador 4, 10x	1.0
Agua destilada	5.0

4.8 Subclonación del gen *cynD* en el vector pET22b(+)

Una vez hechas las digestiones en el plásmido pGEM-cynD con *XhoI* y *NdeI* se obtuvo el inserto del gen *cynD*, el cual fue purificado en un gel de agarosa con el *DNA and Gel Band Purification Kit* de Amersham Biosciences. Por otro lado el vector pET22b(+) también fue

digerido y purificado bajo las mismas condiciones. Este plásmido posee un peso de 5493 pb (Figura 8). Se determinaron las concentraciones de ambos productos (vector e inserto) para su posterior ligación.

4.9 Ligación entre pET22b(+) y el gen *cynD*

Por la concentración encontrada del vector y el inserto se mezclaron en una relación 1:1 para la ligación como se muestra en la siguiente tabla en incubación a 4°C por 24 horas:

Componente	Cantidades en (µL)
pET22b(+)*	5
Inserto <i>cynD</i> *	5
DNA Ligasa de T4 (400.000 U/µL)	2
Amortiguador 10x	2
Agua Destilada	6

*Previamente digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

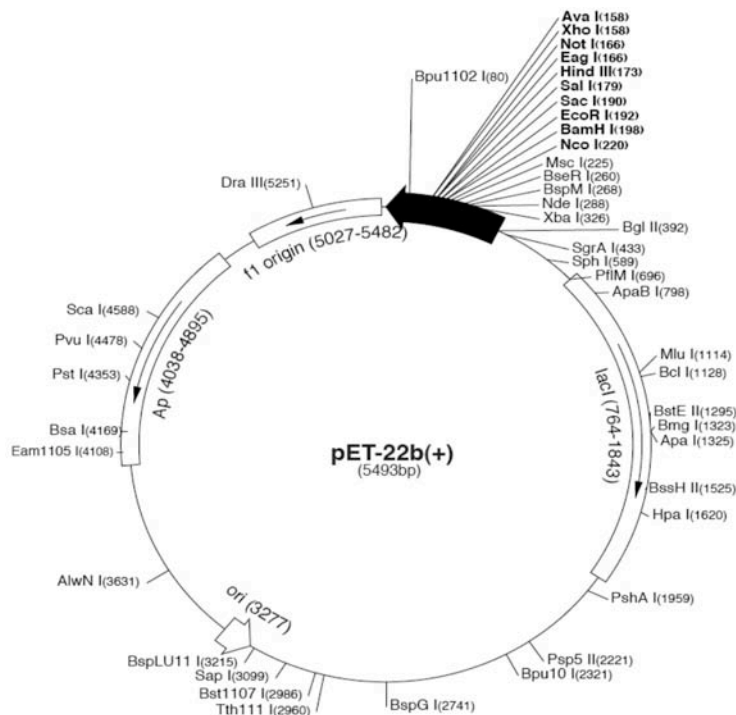


Figura 8. Mapa del vector de expresión pET22b(+).

El producto de la ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes BL21 de las cuales posteriormente se purificó el plásmido y fue digerido también con las enzimas *XhoI* y *NdeI* para verificar la existencia del inserto dentro del vector.

4.10 Mutagénesis sitio-dirigida

Se diseñaron cebadores para realizar la mutación sitio-dirigida en el gen *cynD*. Esta mutación se produjo con la finalidad de eliminar uno de los sitios de restricción de *NdeI* que naturalmente se encuentra en el gen *cynD* y que nos impidió usar el inserto que se encontraba en el plásmido pGEM-cynD para subclonarlo en el vector de expresión pET22b(+). La mutación sitio-específica para el sitio de restricción *NdeI* se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit *Qiuk Change (stratagene)*, las condiciones de reacción y de termociclado. Los cebadores diseñados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores mutagénicos.

Cebador	Secuencia
• BPCDF	5'-GAAGTATT <u>CACCT</u> TATGAGGAC-3'
• BPCDR	5'-GTCCTCATA <u>G</u> GTGAATACTTC-3'

En negritas y subrayadas se encuentran las bases que fueron cambiadas con respecto a la secuencia del gen silvestre

La PCR se realizó utilizando el siguiente protocolo:

Reactivos	Volumen (µL)
Agua destilada	30
Amortiguador para <i>Pfu</i> 10x	5
ADN molde, p <i>Gbpl</i> _nx (10 ng/µL)	1
Oligo cebador F (120 ng/µL)	1
Oligo cebador R (120 ng/µL)	1

dNTPs 2.5 mM	1
<i>Pfu</i> polimerasa (2.5 U/ μ L)	1

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones de termociclado:

1 ciclo	95°C / 3min
	95°C / 1min
15 ciclos	51°C / 1min
	72°C / 15min
1 ciclo	72°C / 1min

Posterior al termociclado se le agregó a la mezcla resultante 1 μ L de la enzima de restricción *DpnI* y se incubó por 2 horas a 37°C para eliminar el ADN parental metilado. Posteriormente se utilizó 1 μ L de la muestra para transformar en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. Las células recombinantes se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina y se les extrajo el plásmido por el método de lisis alcalina descrito previamente. Se verificó el éxito de la mutación por medio de la secuenciación y la digestión de los plásmidos purificados en geles de agarosa al 1%.

El gen mutado, pero que codifica para una proteína idéntica a la silvestre, se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* al igual que el vector pET22b(+), se purificaron el gen (*cynD*) y el vector (pET22b(+)) y se ligaron como se describió previamente. Nuevamente se utilizó la reacción de ligación para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue y las células transformantes fueron seleccionadas en placas de agar LB con ampicilina. Una vez más se purificaron los plásmidos de las colonias transformadas y se verificó la presencia del inserto por cortes con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, así como por secuenciación. El plásmido con el gen *cynD* mutado, denominado pET-*cynD*, se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3), que serían utilizadas posteriormente para producir la proteína CynD.

4.11 Inducción de actividad por IPTG

Para inducir el gen *cynD* se ensayó a una concentración de IPTG 0.5 mM. A partir de las colonias obtenidas de la transformación en células BL21(DE3), se sembró una colonia de la caja Petri para ponerla a crecer toda la noche en 10 mL de medio LB con ampicilina. De ese tubo se tomaron 500 μ L para inocular dos tubos de 10 mL con medio LB y ampicilina. A uno de los tubos se le adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM, mientras que el otro se usó como control. Ambos tubos se dejaron crecer en incubación a 37°C con agitación constante (230 rpm) durante cuatro horas. En ese lapso se fueron tomando alícuotas de 500 μ l cada media hora, tanto del tubo control como del tubo con IPTG. Posteriormente se obtuvo la biomasa por centrifugación de cada una de las fracciones a 14000 rpm por 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 20 μ l de agua y 5 μ l de amortiguador de cargado (Tris-HCl 0.1 M, 2-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, EDTA 5mM, glicerol 10%, pH 7.). Ya resuspendida la biomasa fueron puestas en baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Las fracciones fueron corridas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) (37).

4.12 Purificación de la proteína CynD

Una vez inducida la actividad, se desarrolló el protocolo para la obtención del extracto intracelular y su posterior purificación a partir de un lote de un litro de cultivo. Se preparó el preinóculo sembrando una colonia de la bacteria transformante en 10 mL de medio LB con ampicilina. Éste se incubó toda la noche a 37°C con agitación 220 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se inoculó, con 5 mL del preinóculo, un matraz de 2 L con 1 L del mismo medio de cultivo. Al inicio de la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0.6$) se añadió el IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se incubó a 37°C durante cuatro horas. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos, y esta fue lavada tres veces con KCl al 0.15% (400 mL). Las células fueron resuspendidas en 20 mL de amortiguador de sonicado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 7.5). Posteriormente la muestra se sometió a 20 pulsos de sonicación de 20 segundos de duración a 40-50 W de potencia. Finalmente se centrifugó la muestra a 15000 rpm por 20 minutos, y el sobrenadante se conservó a 4°C para su purificación en el cromatógrafo.

La fusión de una etiqueta de histidinas con nuestra proteína permite su purificación mediante una resina de afinidad que contiene níquel, que es un metal afín al grupo imidazol de la His. Se utilizó el equipo cromatográfico HPLC de Waters el cual consiste en un controlador (600S), una bomba (626), detector dual de absorbancia (2487), desgasificador en línea (AF) y un colector de fracciones (III), el programa utilizado para el manejo del equipo fue el *Empower* (Waters). Se utilizó una velocidad de flujo de 4 mL/min durante toda la corrida cromatográfica para pasar las disoluciones por la columna. Primero se pasaron 200 ml de agua destilada, 200 mL de NiSO₄ 10 mM y 200 mL de amortiguador de equilibrado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 20 mM e imidazol 20 mM, pH 7.5). Después se inyectaron 15 ml de extracto intracelular, enseguida se pasaron 200 del amortiguador de equilibrado. Para eluir la proteína se pasó el amortiguador de elusión (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7.5) de forma gradual para formar un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM durante 80 min, al final se recogen las fracciones (de 4 mL). Una vez recolectadas las fracciones, estas son analizadas en geles SDS-PAGE para determinar en que parte del gradiente se encuentra nuestra proteína así como su pureza.

4.13 Determinación de proteínas por el método del Ácido Bicinconínico (BCA)

Los iones Cu⁺ formados en condiciones alcalinas se ligan al enlace peptídico de los aminoácidos en las proteínas. Este complejo es detectado por la reacción con el BCA produciendo un color púrpura intenso, el cual es proporcional a la cantidad de proteína.

Preparación del reactivo BCA

Reactivo	Cantidad	Procedimiento
BCA	5.00 g	Enjuagar todo el material a usar con agua destilada. En un vaso de pp, disolver las sales con un poco de agua destilada. Ajustar el pH a 11.3 con una disolución de NaOH concentrada (10N, por ejemplo). Aforar a 500mL con agua destilada. Transferir la disolución a un frasco de vidrio y conservar en refrigeración (4°C).
Na ₂ CO ₃ anhidro	8.55 g	
Tartrato dibásico dihidratado	0.80 g	
NaOH lentejas	2.00 g	
NaHCO ₃ anhidro	4.73 g	
H ₂ O	Aforar a 500 mL	

Curva de calibración con un estándar de albúmina bovina

#tubo	[proteína] (mg/mL)	Std. Albumina (1 mg/mL)	Agua destilada	*Mezcla BCA-Cu ²⁺
		(μL)	(μL)	(mL)
1 (B)	0	0	100	1
2	0.02	2	98	1
3	0.05	5	95	1
4	0.1	10	90	1
5	0.15	15	75	1
6	0.2	20	80	1
7	0.4	40	60	1
8	0.6	60	40	1
9	0.8	80	20	1
10	1	100	0	1

*Mezcla: 9,800μL de BCA + 200μL de CuSO₄ 4% w/v (4 g/100 mL). La disolución adquiere un color verde.

Para la preparación de la muestra problema (extracto intracelular sonificado) se siguió el siguiente protocolo:

Se diluyeron 10 μL del extracto intracelular o cualquier otra muestra con 90 μL de agua destilada (factor de dilución 1 en 10). Posteriormente se diluyeron 10 μL de la disolución anterior con 90 μL de agua destilada (factor de dilución 1 en 10), finalmente se adicionó 1 mL de mezcla BCA-Cu²⁺. Se mezcló perfectamente (en vortex) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Por último se midió absorbancia a 562 nm y los valores se interpolaron en la curva patrón.

4.14 Ensayo colorimétrico de cianuro

Se utilizó el método colorimétrico para la determinación de la cantidad de cianuro diseñado por Fisher y Brown (1952) (33), el cual fue modificado para nuestros fines (determinar la cantidad de sustrato consumido por la CynD). Se toma una alícuota de 50 μL de una disolución que contiene cianuro, así como de disoluciones de NaCN de concentración conocida para usarlos como patrón (ver adelante). Posteriormente a cada tubo se le agregan 50 μL de NaHCO₃ 0.5 M y 50 μL de ácido pícrico (1% p/v). Las muestras se incuban en

baño María por 5 minutos. Al terminar el tiempo de incubación son puestos de inmediato en hielo para la conservar el color producto de la reacción. Finalmente a cada tubo se le agregan 850 μL de agua y se leen en el espectrofotómetro a 520 nm contra un control de referencia, que es agua (no la concentración 0.0 de cianuro).

4.15 Ensayo cinético para la enzima CynD

Para obtener las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la enzima recombinante se utilizó el método colorimétrico descrito anteriormente, el cual nos permite cuantificar cuanto cianuro fue consumido por la enzima (30).

Se prepararon tubos con concentraciones conocidas de NaCN y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. La reacción enzimática es iniciada por la adición de la enzima a una concentración final de 20 nM e incubada por 20 min a 30°C. Al cabo de ese tiempo se inactiva la enzima por calentamiento en baño María durante 10 min. De esta disolución se toman 50 mL para determinar concentración de cianuro por el método colorimétrico descrito previamente. El protocolo seguido se muestra a continuación:

NaCN (mM)	H ₂ O (μL)	NaCN 50 mM (μL)	Amortiguador* (μL)	Enzima 0.5 μM (μL)
0.0	200	0	280	20
0.5	195	5	280	20
1.0	190	10	280	20
2.0	180	20	280	20
3.0	170	30	280	20
5.0	150	50	280	20
7.0	130	70	280	20
10.0	100	100	280	20
12.0	80	120	280	20
15.0	50	150	280	20
20.0	0	200	280	20

* amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Extracción de DNA cromosómico de *B. pumilus* GMA1

De las células reactivadas de *B. pumilus* (Figura 9) se purificó DNA cromosómico como se describe en los métodos.

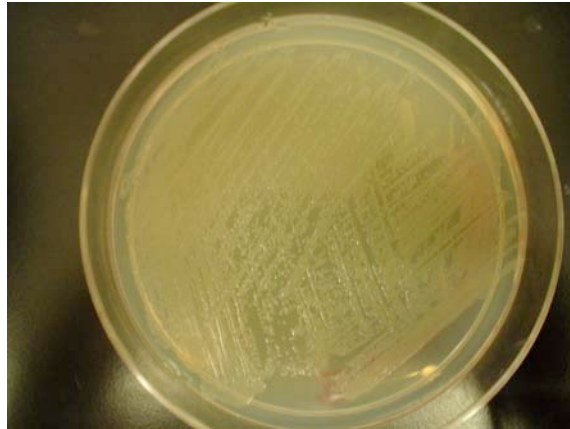


Figura 9. Cepa activada de *B. pumilus* GMA1 en placa de agar LB

5.2 Amplificación del gen *cynD* por PCR y clonación en el vector pGEM-T

Se logró amplificar el gen *cynD* mediante PCR (Figura 4). El producto de amplificación mostró un peso aproximado de 1000 pb, peso esperado para el ADN que correspondería al gen *cynD* que codifica para la cianuro dihidratasa de otras especies de *B. pumilus* (10). El amplicón del gen *cynD* se ligó con del vector pGEM-T como se describió en la sección de métodos.

5.3 Transformación de la ligación entre el vector pGEM-T con el gen *cynD* en células competentes de *E. coli*

Una vez hecha la reacción de ligación se realizó la electroporación para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , de las cuales se obtuvieron colonias aisladas, lo cual nos indicó el resultado positivo en la ligación.

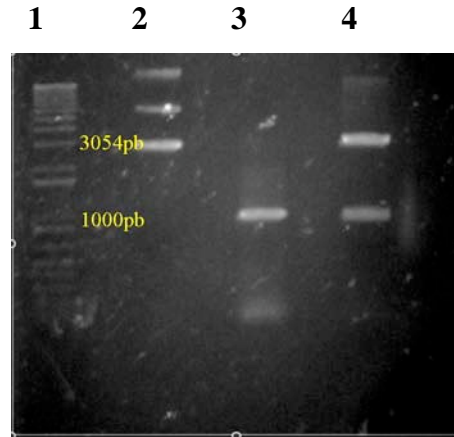


Figura 10. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, ADN cromosómico de *B. pumilus*; tercer carril, muestra la amplificación del gen *cynD* 1000 pb aprox. En el cuarto carril se muestra en gen *cynD* 1000 pb en el vector pGEM 3051 pb digeridos con *XhoI* y *NdeI*. Las muestras se analizaron en gel de agarosa al 1%.

5.4 Purificación y análisis del plásmido pGEM-cynD

El plásmido pGEM-cynD, producto de la ligación, se analizó por digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. La digestión que este tuviese los sitios de restricción adicionados por los cebadores y el inserto del gen *cynD* con un peso de aproximadamente 1000 pb mediante la digestión con las, tanto el inserto como el vector se encontraron en el gel de agarosa al 1% con un peso de 3000 y 1000 pb respectivamente (Figura 10, carril 4).

5.5 Secuencia del gen *cynD* y subclonación en el vector de expresión pET22b(+)

Las digestiones hechas tanto al plásmido pGEM-cynD, como al vector pET22b(+) para la posterior ligación entre el inserto que corresponde al gen *cynD* y el vector pET22b(+) fueron verificadas en gel de agarosa al 1% (Figura 12). En este experimento se encontraron bandas en los pesos esperados, esto es en 5.5 kpb para el pET22b(+) y en aproximadamente 1.0 kpb para el inserto. Cabe mencionar que el peso del inserto aparece un poco menor a lo esperado. Sin embargo asumimos que este comportamiento se debía a la elevada concentración de inserto que se observa en la figura. Estas bandas fueron purificadas y posteriormente ligadas como se describe en la metodología.

1 2 3 4

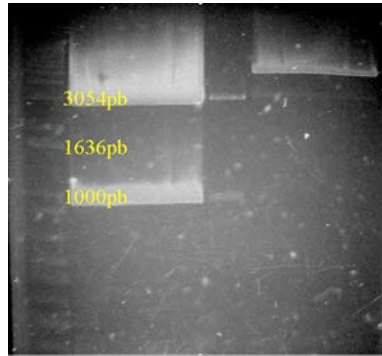


Figura 11. Digestión del el plásmido pGEM-cynD (aproximadamente 3.0 y 1.0 kpb respectivamente) con *NdeI* y *XhoI* en los carriles 2 y 3. En el carril 1 se encuentra un marcador de peso molecular y en el carril 4 está el vector pET22b(+) (aproximadamente 5.5 kpb) digerido con las mismas enzimas de restricción.

La reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue. Sin embargo, en ninguno de los intentos de transformación se lograron obtener colonias transformantes. Simultáneamente se secuenció el inserto *cynD* de *B. pumilus* GMA1 (Tabla 4). La secuencia, traducida a proteína, corresponde a una proteína con 98% de identidad a la que codifica el gen *cynD* reportado para la cepa C1 de *B. pumilus* (1) (Tabla 5 y Figura 12). Ambos genes contienen un sitio de restricción para *NdeI* vecino al extremo que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína CynD (Tabla 5), y en consecuencia cercano al sitio de restricción *XhoI* que adicionamos en dicha región. La presencia de este sitio genera una región parcial del gen *cynD* flanqueado por dos sitios de restricción *NdeI*, que evidentemente no pueden ser clonados en el vector pET22b(+) cortado con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. La cercanía entre este sitio extra y el sitio *XhoI* hicieron complicada su detección ya que no fue evidente el cambio de tamaño del inserto (ver Figuras 10 y 11). Por lo cual se decidió hacer mutagénesis sitio dirigida para eliminar uno de los sitios de restricción para *NdeI*. La secuencia del gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1 fue depositada en el GenBank con el número de acceso EU713463.

Tabla 4. Secuencia del gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1.

CATATGACAAGTATTTACCCAAAGTTTCGAGCAGCTGCCGTGCAAGCAGCACCTGTCTACTTAAATTTGGAAG
 CAAGCGTTGAGAAATCATGTGAACTGATCGACGAGGCAGCTTCAAATGGTGCAAAGCTTGTGGCATTCCCAGA
 AGCATTTTTACCTGGTTATCCTTGGTTTTGCTTTTTATTGGTCATCCAGAATATACGAGAAAGTTCTATCATGAA
 TTATATAAAAAATGCCGTTGAAATCCCTAGCTTAGCCATTCAAAAAATCAGTGAGGCAGCAAAAAGAAATGAAA
 CGTATGTTTGTATATCATGCAGTGAAAAAGATGGCGGCTCCCTCTATTTAGCTCAGCTTTGGTTTAATCCAAA
 TGGGGATTTAATAGGAAAACACCGGAAAATGAGAGCTTCTGTAGCAGAAAGACTCATTTGGGGGGATGGAAGT
 GGAAGTATGATGCCAGTCTTTCATACTGACATTGGAAACCTTGGCGGATTGATGTGCTGGGAGCATCAAGTCC
 CGCTTGATCTTATGGCGATGAATGCTCAAAAATGAGCAAGTACATGTAGCCTCTTGGCCAGGTTATTTTTGACGA
 TGAAATTTCAAGCAGATATTATGCCATCGCGACACAGACATTTGTGCTGATGACATCATCTATATATACGGAA
 GAAATGAAAGAAATGATTTGTTTAAACGCAGGAGCAAAGAGATTACTTTGAAACATTTAAGAGCGGGCATACTG
 GCATTTACGGGCCGGACGGGGAACCGATCAGTGATATGGTTCCCTGCTGAAACGGAAGGAATTGCTTACGCTGA
 AATTGATGTAGAAAGAGTCATTGATTACAAGTATTATATTGATCCGGCTGGACACTACTCCAATCAAAGTTTG
 AGTATGAATTTTCATCAGCAGCCCACTCCGGTTGTAAAACATTTACATCATCAAAAAAATGAAGTATTC**CAT**
ATGAGGACATTCAATATCAACATGGTATACTGGAAGAAAAGTT**CTCGAGAATCAC****TAGTGAATTC**

En negritas se resaltan los sitios de restricciones para *Nde*I (CATATG), *Xho*I (CTCGAG) y *Eco*RI (GAATTC) insertadas por los cebadores. En cursivas se muestran los codones de inicio (ATG) y de término (TAG) de la proteína silvestre.

Tabla 5. Secuencia de la cianuro dihidratasa (CynD) de *B. pumilus* GMA1.

MTSIYPKFRAAAVQAAPVYLNLEASVEKSCELIDEAASNGAKLVAFP**E**AFLPGYPWF⁴⁸AFIGHPEYTRK¹³⁰FYHEL
 YKNAVEI⁴⁸PSLAIQKISEAAKRNETYVCISCSSEKDGGSLYLAQLWFNPNGDLIGK¹³⁰HR**K**M¹⁶⁴RSVAERLIWGDGSG
 SMMPVFHTDIGNLGGLM**C**WEHQVPLDLAMNAQNEQVHVASWPGYFDDEISSRYAIAIATQTFVLMTSSIIYTEE
 MKEMICLTQEQRDYFETFKSGHTCIYGPDGEPISDMVPAETEGIA⁴⁸YAEIDVERVIDYKYYIDPAGHYSNQSL¹³⁰S
 MNFHQQPTPVVKHLHHQKNEVFTYEDIQYQHGI⁴⁸LEEKV*

En negritas y sombreados se muestran los aminoácidos putativos que conforman la triada catalítica de esta enzima, Glu48, Lys130 y Cys164 (38).

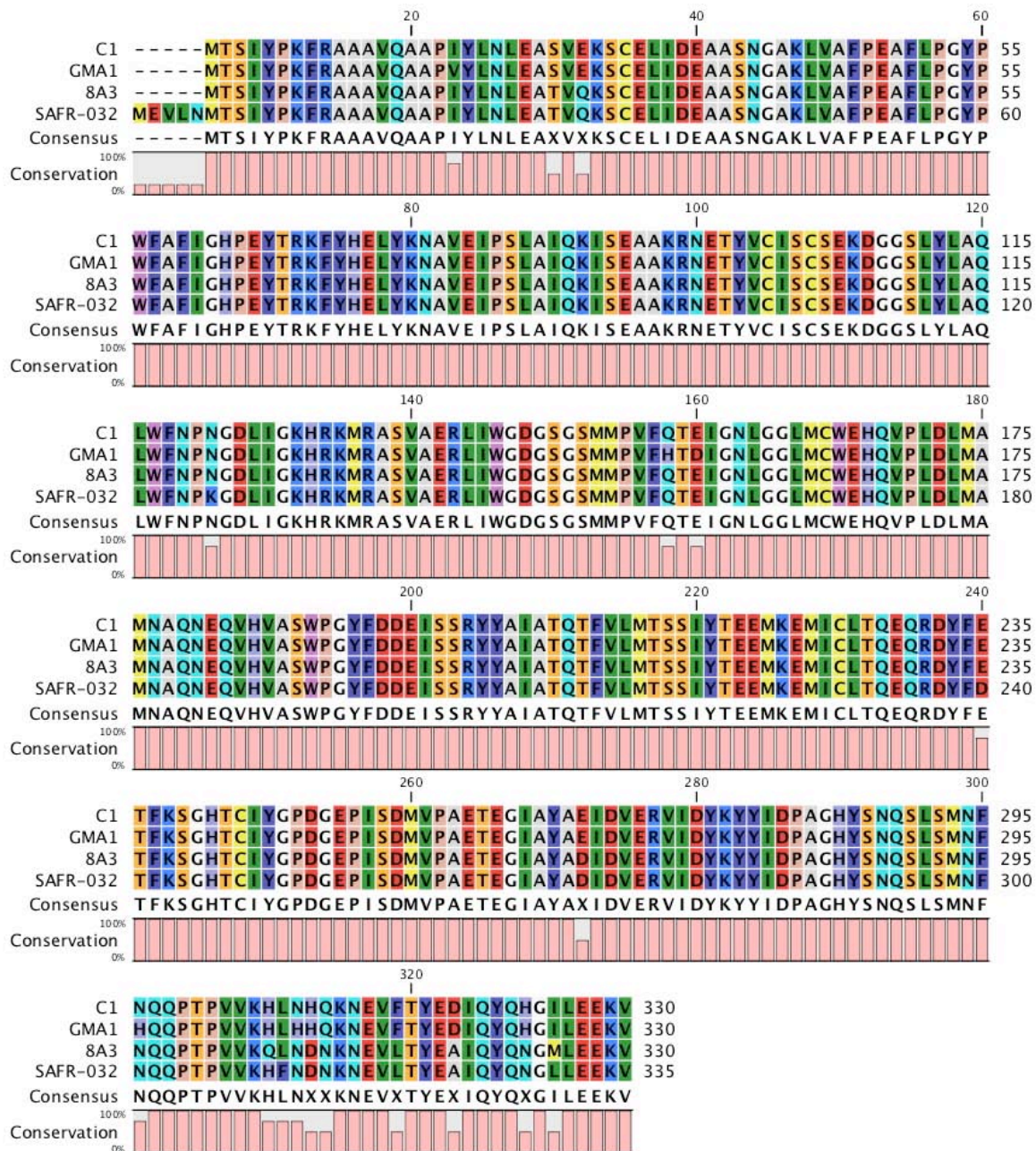


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cianuro dihidratasa conocidas de distintas cepas de *B. pumilus*. Las cepas corresponden y sus números de acceso en el GenBank son: C1, AAN77004; GMA1, EU713463; 8A3, AAN77003; SAFR-032, NC_009848.

5.6 Mutagénesis sitio dirigida

La secuencia del sitio de restricción interno *NdeI* (CATATG) está compartida entre tres codones correspondientes a Thr315, Tyr316 y Glu317:

```
ACA TAT GAG  
Thr Tyr Glu
```

Para no alterar la secuencia de la proteína se decidió cambiar la primera adenina del sitio de restricción (región sombreada) por una citosina, formando el codón ACC que también codifica para treonina:

```
ACC TAT GAG  
Thr Tyr Glu
```

Con esta información y la secuencia del gen *cynD* se diseñaron los cebadores BPCDF y BPCDR (ver sección de métodos) para eliminar el sitio de restricción *NdeI* extra que no permite la clonación del gen en el vector pET22b(+). La mutagénesis sitio-dirigida usando el plásmido pGEM-*cynD* como molde resultó exitosa como se comprobó por secuenciación del gen *cynD* (resultado no mostrado).

5.7 Subclonación del gen *cynD* mutado en pET22b(+)

El plásmido pGEM-*cynD* mutado se utilizó para nuevamente intentar la subclonación del gen *cynD* en el vector pET22b(+) usando la misma metodología descrita previamente. En esta ocasión la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue con la reacción de ligación produjo varias colonias recombinantes, a las que se les extrajo el plásmido y se verificó la presencia del inserto y la mutación por secuenciación. Este plásmido se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) y probar su expresión.

5.8 Análisis de inducción de la expresión del gen *cynD*

La expresión del gen *cynD* se evaluó mediante la presencia de la proteína CynD. En la Figura 13 se muestran los perfiles de proteína intracelular de las células inducidas y sus respectivos controles. Principalmente a las 3 y 4 h después de la inducción es evidente la

aparición de una banda intensa cuyo peso molecular coincide con el peso molecular teórico de esta proteína (38 kDa). Con estas condiciones de inducción se procedió al escalamiento del cultivo a 1 L para realizar la purificación de la enzima por afinidad.

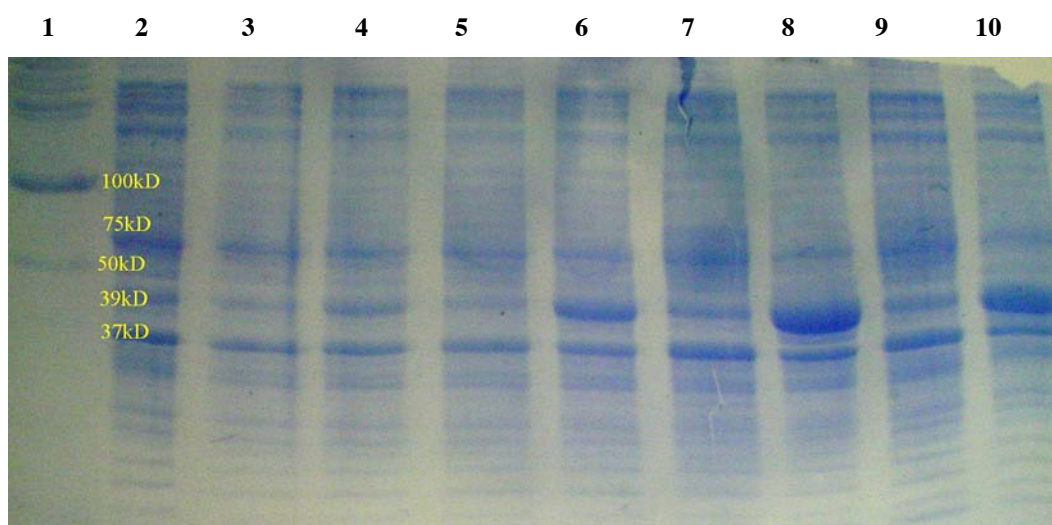


Figura 13. Gel SDS-PAGE que muestra la inducción de actividad por IPTG a lo largo de 4 horas. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. En los carriles 2, 3, 5 y 7 se muestran los perfiles de proteínas intracelulares de células sin inducir después de 1, 2, 3 y 4 h (controles). En los carriles 4, 6, 8, y 10 se muestran los perfiles de proteínas intracelulares de células inducidas, mostrando el máximo de inducción a la hora 4. La banda correspondiente a la CynD se encuentra en el peso molecular de aproximadamente 39 kDa.

5.9 Purificación de la enzima por cromatografía de afinidad

La producción de la enzima se realizó en 1 L de medio de cultivo como se describe en la sección de métodos. Las células cosechadas después de la inducción se rompieron por ultrasonido y se separó la fracción soluble del extracto celular (15 ml) por centrifugación. Esta fracción se inyectó en la columna de afinidad para etiquetas de histidina, previamente equilibrada como se marca en el protocolo. La proteína unida a la matriz se eluyó de la columna con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM. En el cromatograma se puede ver un aumento gradual en la absorbancia a 280 nm durante el gradiente debido a la capacidad del imidazol de absorber la luz UV (Figura 14). No obstante, entre los minutos 130 y 150 la

absorbancia aumenta debido a la elisión de la proteína. Esto corresponde a un intervalo del gradiente de 60 a 85%, o bien a un intervalo de concentración de imidazol de 308 a 428 mM.

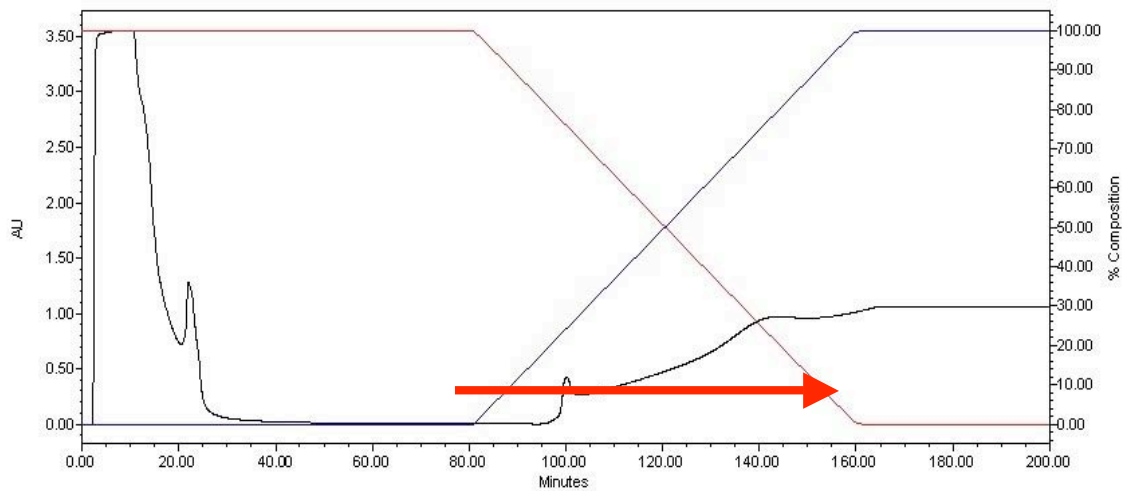


Figura 14. Cromatograma de la purificación de la CynD en columna de afinidad (Ni). La velocidad de flujo de 4ml/min, a temperatura ambiente (23°C), con un gradiente de elución de 20 a 50 mM de imidazol, mediante la combinación de amortiguador de equilibrado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7.5) y amortiguador de elución (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7.5).

Para comprobar que la enzima era el pico observado entre los minutos 130 y 150 se analizaron estas fracciones por SDS-PAGE. El resultado del análisis se muestra en la Figura 15. Como se puede ver, en todo el intervalo se observa una especie electroforéticamente pura que corresponde al mismo peso que la proteína sobre-expresada observada en el extracto intracelular.

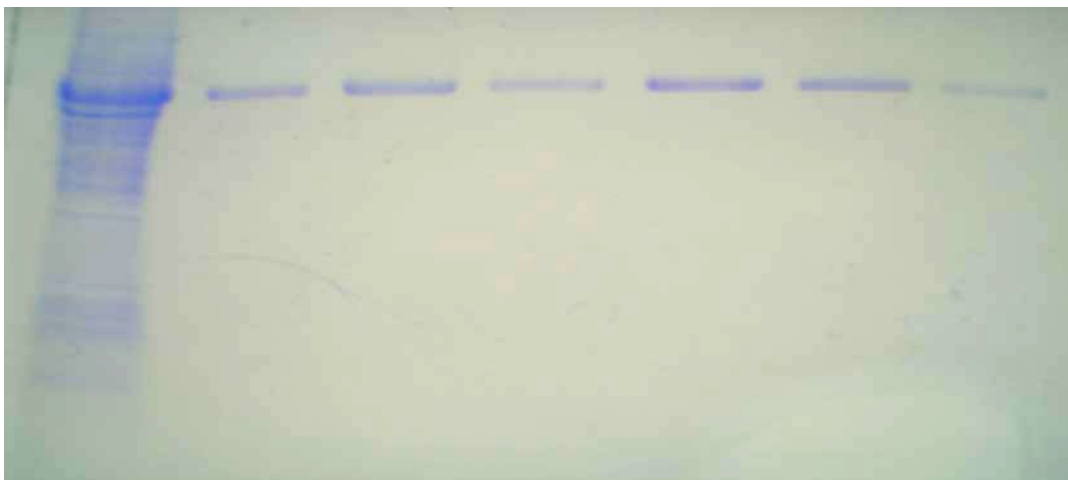


Figura 15. SDS-PAGE de las fracciones del minuto 130 al 155 de la purificación. En el primer carril se muestra el extracto intracelular del que se inició la purificación. Los carriles 2 al 7 contienen muestras de las fracciones de los minutos 130, 135, 140, 145, 150 y 155 respectivamente.

5.10 Conservación de la proteína pura

Una vez determinadas las fracciones en la que se encontró la proteína pura estas fueron colectadas y dializadas frente a 50 volúmenes de una disolución de fosfato de potasio 20 mM pH 7.5, a 4°C y en presencia de 1 mM de β -mercaptoetanol. Posteriormente se concentró la proteína con polietilenglicol y finalmente con glicerol para su conservación a -20°C. Cabe mencionar que no se estudió sistemáticamente el efecto de el almacenamiento en estas condiciones. Sin embargo fue notorio que después de tres semanas la enzima perdió totalmente su actividad.

5.11 Propiedades cinéticas de la cianuro dihidratasa recombinante de *B. pumilus* GMA1

Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m de la enzima recombinante fueron medidos mediante el ensayo colorimétrico para la determinación de cianuro descrito en los métodos. La curva de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato se encuentra en la figura 16. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se obtuvieron los parámetros cinéticos.

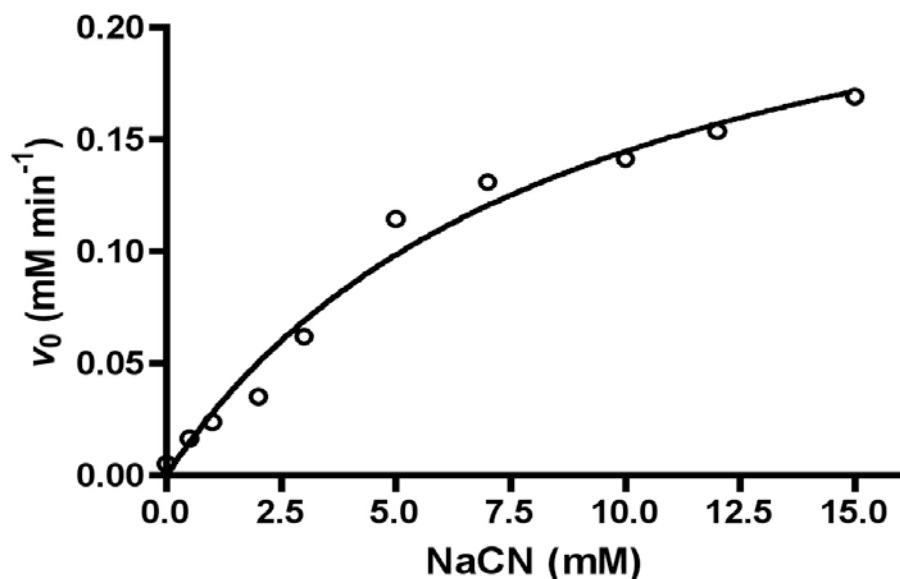


Figura 16. Gráfica de las velocidades iniciales de la cianuro dihidratasa (CynD) recombinante en función de la concentración de NaCN a 30°C y pH de 7.5.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1.

$V_{\max} = 0.272 \pm 0.032 \text{ mM min}^{-1}$
$k_{\text{cat}} = 227 \pm 27 \text{ s}^{-1}$
$K_m = 8.816 \pm 2.11 \text{ mM}$

Los valores de K_m de la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1 tiene valores similares a los de las enzimas de *P. stutzeri* AK61 y *B. pumilus* C1 (tabla 7). Por su parte la cianuro hidratasa *G. sorghi* presenta una K_m mucho mayor. Desafortunadamente el nuestro es el único trabajo en el que se reporta una k_{cat} . Sin embargo, a partir de los datos de la enzima de *B. pumilus* C1 pudimos calcular que su k_{cat} corresponde a 63 s^{-1} , aunque la temperatura del ensayo fue de 23°C (13). Esta diversidad de condiciones de reacción hace imposible su comparación directa. Sin embargo pudimos comprobar que nuestra enzima tiene propiedades cinéticas relativamente similares a las enzimas ya reportadas. Esto la convierte en un modelo para el estudio de las interacciones proteína-proteína que, como se mencionó en la introducción, permiten la formación de filamentos. Más interesante aún es

la posibilidad de explorar condiciones de pH que favorezcan la formación de fibras y correlacionarlas con las propiedades catalíticas de la enzima. De hecho era de esperarse que si una elevada concentración de sustrato favorece la formación de fibras, deberíamos de observar un comportamiento cinético sigmoide y no el hiperbólico observado. Los estudios cinéticos de esta enzima aun tienen mucho por enseñarnos sobre sus propiedades estructurales.

Tabla 7. Propiedades cinéticas reportadas para algunas enzimas degradadoras de cianuro.

Enzima	K_m (mM)	pH/Temp °C	V_{max} (mmol ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹)	Fuente
Cianuro dihidratasa de <i>B. pumilus</i> C1	7.3 ± 1.4	7.6/23	0.097 ± 0.011	(13)
Cianuro dihidratasa de <i>P. stutzeri</i>	5.9 ± 2.0	7.6/23	0.10 ± 0.016	(12)
Cianuro dihidratasa de <i>B. pumilus</i> GMA1	8.8 ± 2.1	7.5/30	0.35 ± 0.039*	Este trabajo.
Cianuro hidratasa de <i>G. sorghi</i>	90 ± 35	7.8/23	4.4 ± 1.5	(13)

* La diferencia de valor entre este dato y el mostrado en la tabla 6 obedece a las unidades en que está reportado. En este caso es una velocidad máxima específica.

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

Se logró amplificar el gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1 por PCR.

El amplicón correspondiente al gen *cynD* fue clonado en el vector pGEM-T.

La secuencia del gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1 presenta una identidad de 98% a nivel de proteína con el gen *cynD* de *B. pumilus* C1.

El gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1 presenta un sitio de restricción de *NdeI* en la región que codifica para el C-terminal de la cianuro dihidratasa. Este sitio de restricción fue eliminado por mutagénesis sitio-dirigida sin alterar la secuencia de la proteína. El gen *cynD* de *B. pumilus* GMA1 pudo ser clonado y expresado en *E. coli* gracias a esta mutación silenciosa.

La enzima recombinante expresada, con una etiqueta de His en el extremo C terminal, es capaz de utilizar cianuro como sustrato, como se demostró por el método colorimétrico.

El ensayo colorimétrico para la determinación de cianuro se utilizó para estudiar la cinética de utilización del mismo. Mediante las velocidades iniciales se lograron calcular los parámetros cinéticos de la cianuro dihidratasa recombinante de *B. pumilus* GMA1. La V_{\max} en las condiciones estudiadas (30°C, pH7.5) es de 0.2724 mM min⁻¹ mg⁻¹, que corresponde a una k_{cat} de 227 s⁻¹. La constante de Michaelis-Menten, K_m , en las mismas condiciones fue de 8.816 mM.

6.2 Perspectivas

Es necesario desarrollar un estudio más a fondo para caracterizar adecuadamente la CynD de *B. pumilus* GMA1 en el cual se tomen en cuenta más variaciones en los factores que influyen en la cinética enzimática como son pH, temperatura, tiempos de incubación, la concentración de enzima, así como la de sustrato. Una vez hecha esta caracterización sería conveniente hacer ciertas mutaciones en el sitio activo como lo propone Atsushi 1997 (33), lo cual influirá en la función de nuestra enzima.

Estudiar si esta enzima recombinante presenta la capacidad de formar filamentos como se ha reportado para otras cianuro dihidratasa y nitrilasas. Del mismo modo es importante estudiar la relación entre el estado de oligomerización y la catálisis.

Capítulo 7. Referencias

1. Hartung R (1982) Cyanide and nitriles. In: Clayton GD, Clayton FE, eds. Patty's industrial hygiene and toxicology, 3rd ed. Vol. II C. New York, NY, John Wiley & Sons, pp. 4845–4906.
2. ATSDR (1997) Toxicological profile for cyanide. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
3. Cicerone RJ, Zellner R (1983) The atmospheric chemistry of hydrogen cyanide (HCN). *Journal of Geophysical Research*, 88:689–696.
4. DECOS (2002) Hydrogen cyanide, sodium cyanide and potassium cyanide. The Hague, Minister and State Secretary of Social Affairs and Employment, Dutch Expert Committee on Occupational Standards.
5. Wingrove, A. S. 1984. Química Orgánica. Págs. 1025-1030 Towson State University HARLA S.A. de C.V. México D. F.
6. Solomonson, L. P.. *Cyanide as a metabolic inhibitor*, Academic Press, London, United Kingdom. Cyanide in biology 1981 p. 11 –28.
7. Knowles, C. J. 1976. *Microorganisms and cyanide*. *Bacteriol. Rev.* **40**: 652 –680.
8. Young, C. A., and T. S. Jordan. 1995. *Cyanide remediation: current and past technologies*, p. 104 –129. In L. E. Erickson, D. L. Tillison, S. C. Grant, and J. P. McDonald (ed.), *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*. Kansas State University, Manhattan, Kans.
9. Dubey, S. K., and D. S. Holmes. 1995. *Biological cyanide destruction mediated*

ated by microorganisms. World J. Microbiol. Biotechnol. **11**: 257–265.

10. Knowles, C. J. 1988. *Cyanide utilization and degradation by microorganisms*, p. 3–15. In D. Evered and S. Harnett (ed.), *Cyanide compounds in biology*. CIBA Foundation Symposium 140. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.

11. Ingvorsen, K., B. Højer-Pedersen, and S. E. Godtrfredsen. 1991. *Novel cyanide-hydrolyzing nitrilase-enzyme from Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1783–1789.

12. Watanabe, A., K. Yano, K. Ikebukuro, and I. Karube. 1998. *Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, Pseudomonas stutzeri AK61, by cyanidase* Microbiology **144**: 1677–1682.

13. Jandhyala, M.D. *Comparison of cyanide-degrading nitrilases*. J. Appl. Microbiol., 2005. **68**: p. 327-335

14. Pace, H. C., and C. Brenner. 2001. *The nitrilase superfamily: classification, structure and function*. Genome Biol. **2**: Rev.1.1–Rev.1.8.

15. Baker, RT, Varshavsky, A: *Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway*. J Biol Chem., 1995. **270**: p. 12065-12074.

16. Louwrier A, Knowles CJ., *The aim of industrial enzymic amoxicillin production: characterization of novel carbamoylase enzyme in form of crude, cell-free extract*. Biotechnol Appl Biochem 1993. **25**: p. 143-149.

17. Sard L, et al. *The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control*. Proc Natl Acad Sci USA 1999. **96**: p. 8489-8492.

- 18.** Ji L, Roth JA., *Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression.* Cancer Res 1999. **59:** p. 3333-3339.
- 19.** Yoshikawa A, Isono K., *Cloning and nucleotide sequencing of the genes rimI and rimJ which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of Escherichia coli K12.* Mol Gene Genet 1987. **209:** p.481-488.
- 20.** Ludwig-Muller J, Hilgenberg W., *A plasma membrane-bound enzyme oxidizes L-tryptophan to indole-3-acetaldoxime.* Physiologia Plantarum., 1998. **74:** p. 240-250
- 21.** Miller, JM., Coon, EE., *Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants.* Physiologia Plantarum., 1980. **65:** p. 1199-1202.
- 22.** O'Reilly, C.P.T., *The nitrilase family of CN hydrolyzing enzymes: a comparative study.* J. Appl. Microbiol., 2003. **95:** p. 1161-1174.
- 23.** Mahadevan, S., Thinmann K., *Nitrilase. II Substrate specificity and possible mode of action.* Archives of Biochemistry and Biophysics., 1964. **107:** p. 62-68.
- 24.** Fry, W.E, Millar R.L., *Cyanide degradation by an enzyme from Stemphylium loti.* Archives of Biochemistry and Biophysics., 1972. **151:**p. 468-474.
- 25.** Wang P., VanEtten, HD., *Disruption of the cyanide hydratase gene in Gloeocercospora sorghi increases its sensitivity to the phytoanticipin cyanide but does not affect its pathogenicity on the cyanogenic plant sorghum.* Fungal Genetics and Biology., 1999. **28:** p. 126-134.
- 26.** Novo C, Brown PR., *Pseudomonas aeruginosa aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and CysI 66 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism.* FEBS Lett 1995. **367:** p. 275-279.

- 27.** Meyers, P.R.; D.E. Rawlings; D.R. Woods y G.G. Lindsey. *Isolation and Characterization of a Cyanide Dihydratase from Bacillus pumilus*. Journal of Bacteriology., 1993. **175**: p. 6105-6112.
- 28.** Jandhyala D., Berman M., Meyers P y Benedik M. *CynD, the Cyanide Dihydratase from Bacillus pumilus: Gene cloning and Structural Studies*. Applied and Enviromental Microbiology., 2003. **69**: p. 4794-4805.
- 29.** Thinman, K., *Nitrilase I occurrence, preparation, and general properties of the enzyme*. Archives of Biochemistry and Biophysics., 1964. **105**: p. 133-141.
- 30.** Yanase, H, Sato, Y., *Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by Fusarium oxysporum N-10*. Applied Microbiology and Biotechnology., 2000. **53**: p. 328-334.
- 31.** Kunz, D.A., Chen, J.L. *Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*. Microbiology 1994. **140**: p. 1705-1712.
- 32.** Meyers, PR., Lindsay, GG. *Isolation and characterization of cyanide dihydratase from Bacillus pumilus C1*. J Bacteriology., 1993. **175**: p. 6105-6112.
- 33.** Fisher F.B., and J.S. Brown. 1952. *Colorimetric Determination of cyanide in stack gas and waste water*, Analytical Chemistry. **24**: p. 1440-1443.
- 34.** Watanabe A., 1997. *Investigation of potential active site of cyanide dihydratase using site-directed mutagenesis*. Biochimica et Biophysica Acta. **1832**: 1-4.
- 35.** Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). *Short protocols in molecular biology*. New York. 1992. 3rd ed.

36. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.

37. Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*. **227**:680-685.

38. Barglow, K. T., Saikatendu, K.S. Bracey, M. H., Huey R., Stevens R. C., Cravatt B. (2008). *Functional Proteomic and Structural Insights into Molecular Recognition in the Nitrilase Family Enzymes*. *Biochemistry*. **47 (51)**: p. 13514-13523.