



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto en la estabilidad y en la actividad de mutaciones
sitio-específicas en el C-terminal de la nitrilasa de
Rhodococcus sp. V51B**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biología

P R E S E N T A :

Hugo Alberto Larrañaga Ramírez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Georgina Regina Garza-Ramos Martínez
2019**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Larrañaga
Ramírez
Hugo Alberto
56325352
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de ciencias
Biología
310168090

2. Datos del tutor

Dra. Georgina Regina
Garza Ramos
Martínez

3. Datos del sinodal 1

Dr. Saúl
Gómez
Manzo

4. Datos del sinodal 2

Dra. Sandra Margarita
Morales
Mulia

5. Datos del sinodal 3

Dr. Ismael
Bustos
Jaimes

6. Datos del sinodal 4

Dr. Daniel Alejandro
Fernández
Velazco

7. Datos del trabajo escrito

Efecto en la estabilidad y en la actividad de mutaciones sitio-específicas en el C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B
55p
2016

Tabla de contenidos	
Agradecimientos.....	IV
Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VI
1. Introducción.....	1
1.1. Enzimas.....	1
1.2. Nitrilos.....	2
1.3. Nitrilasas.....	2
1.4. Estructura.....	6
1.5. Oligomerización.....	7
1.6. Espirales cortas.....	7
1.7. Filamentos de tamaño variable.....	8
1.8. C-terminal.....	10
1.9. Modelos computacionales.....	11
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos particulares.....	13
5. Hipótesis.....	14
6. Metodología.....	14
6.1. Diseño de mutantes.....	14
6.2. Clonación y expresión de las mutantes.....	14
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
6.4. Digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación.....	15
6.5. Transformación bacteriana.....	15
6.6. Purificación de DNA por minipreparación de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	16
6.7. Purificación de DNA para secuenciar.....	16
6.8. Sobreexpresión de proteínas y purificación de proteínas.....	17
6.9. Actividad específica por determinación de amonio.....	17
6.10. Incubaciones.....	18
6.11. Dispersión dinámica de luz.....	18
6.12. Dicroísmo Circular.....	18
6.13. Estimación de la estructura secundaria.....	19
6.14. Desplegamiento térmico.....	19
6.15. Modelo computacional.....	19
6.16. Mutantes <i>in silico</i>	20
7. Resultados.....	21
7.1. Alineamiento entre la nitrilasa de <i>Rhodococcus</i> sp.V51B Δ 27 y la CynD de <i>B. pumilus</i> C1. y selección de las mutaciones.....	21
7.2. Sobreexpresión de las mutantes G338E, K339, G338E+K339 y P331Y+G338E+K339.....	22
7.3. Purificación de las mutantes G338E, K339, G338E+K339 y P331Y+G338E+K339.....	22
7.4. Dicroísmo Circular.....	24
7.5. Desplegamiento térmico.....	26
7.6. Dispersión dinámica de luz.....	27
7.7. Actividad catálitica.....	27

7.8.	Creación de mutantes sencillas.....	28
7.9.	Diseño de las mutantes.....	28
7.10.	Extracción de DNA y doble digestión.....	29
7.11.	PCR.....	29
7.12.	Transformación y sobreexpresión.....	30
7.13.	Purificación.....	31
7.14.	Dicroísmo circular.....	32
7.15.	Desplegamiento térmico.....	33
7.16.	Dispersión dinámica de luz.....	33
7.17.	Actividad catalítica.....	34
7.18.	Cambio de pH e incubaciones.....	34
7.19.	Modelo computacional.....	35
7.20.	Descripción del modelo.....	35
7.21.	Modelo computacional de las mutantes.....	37
7.21.1.	P331A.....	40
7.21.2.	P331Y.....	41
7.21.3.	G338E.....	43
8.	Discusión.....	44
9.	Conclusiones.....	52
10.	Perspectivas.....	52
11.	Bibliografía.....	53

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi asesora la doctora Georgina Garza-Ramos por permitirme ser parte del LFQIP. Así como asesorar y enseñarme los conocimientos y técnicas necesarias, que permitieron la realización de este proyecto. Estoy muy agradecido por lo que me ha enseñado y la confianza que ha depositado en mí.

Agradezco a mis asesores por el tiempo y dedicación que pusieron en revisar esta tesis. A su vez varios me dieron clases, las cuales fueron muy importantes en la carrera y en la área en la que trabajé.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la educación científica y humanista a lo largo de estos años y convertirse en mi segundo hogar.

Quiero agradecer especialmente a las personas que más me han ayudado a lo largo de toda mi vida y continúan siendo uno de los pilares más importantes mis padres. Gracias a su cariño, consejos y regaños que me han formado como persona. Gracias por su incansable apoyo es que este proyecto se pudo realizar.

Abreviaturas

CD: Dicroísmo Circular

CynD: Cianuro dihidrtatasa

DLS: Dispersión dinámica de luz

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D.O.: Densidad óptica

dNTPs: Dinucleótidos trifosfatados

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kb: Mil pares de bases

kDa: Kilo Daltons

Lb: Luria Bertani

NitFhit: Proteína de fusión con dominio nitrilas (Nit) en el extremo N-terminal y una proteína llamada Fragile histidine triad protein (Fhit) en el extremo C-terminal

SOC: Super Optimal broth with Catabolic repression

pb: Pares de bases

PDB: Protein Data Bank

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pfu: Polimerasa de *Pyrococcus furiosus*

RNAasa: Ribonucleasa

Reu: Rosetta Energy Units

R_h: Radio hidrodinámico

S-300: Superdex 300

T_m: Temperatura media de fusión

Resumen

Las nitrilasas son enzimas que catalizan la conversión de los nitrilos en sus respectivos ácidos carboxílicos y libera amonio en el proceso. Las nitrilasas junto con las cianuro dihidratasa forman la familia de las nitrilasas, que a su vez junto con otras doce familias forman la superfamilia de las nitrilasas. Los miembros de la superfamilia de las nitrilasas tienen una baja similitud en secuencia, aunque una gran similitud a nivel estructural. Todas las proteínas de esta superfamilia comparten un plegamiento característico $\alpha\beta\alpha$ y una triada catalítica conservada formada por Glu-Lys-Cys (Pace & Brenner, 2001). Algunos miembros de la familia nitrilasa pueden formar filamentos helicoidales de gran tamaño. Entre estas enzimas se encuentra la Cianuro dihidratasa (CynD) de *Bacillus pumilus* C1. A pH 8 la CynD forma oligómeros de 18 subunidades. Sin embargo, al cambiar el pH a 5.4, la proteína se reorganiza en filamentos helicoidales (Jandhyala et al., 2003). En este proceso se han implicado algunos residuos del C-terminal. Otro ejemplo es la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1. La proteína silvestre forma oligómeros de 12 subunidades con forma de "C". Al eliminar los últimos 35 aminoácidos del extremo C-terminal de la nitrilasa, se da la formación de filamentos helicoidales (Thuku et al., 2007). En un alineamiento entre la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B con la CynD de *B. pumilus* GMA1, se encontró que la primera es 27 aminoácidos más larga. En el laboratorio se creó y caracterizó la mutante trunca NitCΔ27, la cual es 6 veces más activa y forma oligómeros de mayor tamaño que la enzima silvestre.

El objetivo de este proyecto fue diseñar y caracterizar mutantes sitio específicas en el C-terminal de la NitCΔ27 que puedan mejorar las interacciones electroestáticas, las cuales a su vez promuevan la formación de filamentos helicoidales más estables. Las mutantes se plantearon con base en un alineamiento entre la NitCΔ27 y la Cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Las mutaciones seleccionadas fueron la mutación de la glicina 338 por un ácido glutámico (G338E) y la inserción de una lisina en la posición 339 (K339). Ambas mutantes fueron más activas, aunque su temperatura de fusión aparente (T_m) es menor que NitCΔ27. Se creó una mutante doble al unir las dos mutaciones sencillas (G338E+K399), la cual conserva 45% de la actividad y tiene una T_m 6 K menor que NitCΔ27. Por último, se creó un mutante triple al mutar la prolina 331 por una tirosina en la mutante doble (P331Y+G338E+K399). Esta última mutante es inactiva y no tiene una transición cooperativa al desnaturizar por calor. Para comprobar que el cambio de la prolina 331 es el único responsable de las características bioquímicas de la mutante P331Y+G338E+K399, se creó la mutante P331Y. Además, se creó otra mutante con un cambio más conservado en la posición 331, la mutante P331A. Mientras P331A ha perdido aproximadamente el 50% de su actividad, P331Y solo mantiene 0.5% de su actividad y no presenta una transición cooperativa al desplegar por calor. Por último, ya que no se dispone de una estructura reportada de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B, se creó un modelo por homología con la finalidad de explicar estructuralmente los resultados obtenidos.

Introducción

Enzimas

Las enzimas son catalizadores de origen biológico, es decir incrementan la velocidad con la que se lleva una reacción química (Nelson & Cox, 2013). Los incrementos en la velocidad de reacción de los que son capaces las enzimas van del orden de 10^6 hasta 10^{19} veces la velocidad de la reacción no catalizada (Wolfenden & Snider, 2001). Esto es posible porque disminuyen la energía de activación de las reacciones catalizadas. Además, en contraste con los catalizadores inorgánicos, estas reacciones se dan en condiciones suaves (pH y temperatura fisiológicos) y de manera específica a su sustrato. Sin las enzimas la mayoría de las reacciones bioquímicas que mantienen la vida no serían lo suficientemente rápidas (Mckee & Mckee, 2003).

Muchas enzimas dependen de otros compuestos químicos para realizar su actividad. A estos compuestos se les denomina grupos prostéticos. A los grupos prostéticos formados por iones inorgánicos (Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , etc) se les denomina cofactores y a los formados por compuestos orgánicos u organometálicos se les denomina coenzimas. A la enzima sin sus grupos prostéticos se llama apoenzima y a la enzima con sus grupos prostéticos se le llama holoenzima (Nelson & Cox, 2013)

Una de las regiones más importantes de una enzima y la que le confiere muchas de sus cualidades es el sitio activo. En el sitio activo se posiciona el sustrato, los grupos prostéticos y algunas cadenas laterales de los aminoácidos, para llevar a cabo la catálisis (Mckee & Mckee, 2003). La enzima utiliza algunos mecanismos generales para aumentar la velocidad, por ejemplo catálisis ácido-base, catálisis covalente y catálisis de ion metálico. Además favorece las reacciones químicas al acercar y limitar el movimiento del sustrato (Nelson & Cox, 2013).

El incremento en la velocidad y la especificidad por su sustrato son características no solo útiles para los organismos vivos, también lo son en la industria. Actualmente varias industrias hace uso de enzimas en algunos de sus procesos. Por ejemplo, en la industria textil el empleo de lacasas y catalasas reduce los materiales usados y los desechos generados (Beilen & Li, 2002). En la industria química se emplea una nitrilo hidratasa, para sintetizar 100 000 toneladas de acrilamida al año (Gong et al., 2012).

Las nitrilasas son un grupo de enzimas que se han estudiado intensivamente, debido a los productos de interés comercial que pueden generar. Los nitrilos son precursores en la síntesis de una amplia variedad de ácidos y amidas. Entre los compuestos que se pueden sintetizar con la ayuda de nitrilasas se encuentra el ácido mandélico, el ácido nicótico y el ácido acrílico (Gong et al. 2012). Además, las nitrilasas pueden sintetizar precursores de los fármacos Clopidogrel (agente antiplaquetario) y Gabapentina (anticonvulsivante). Otra enzima de la familia de las nitrilasas con una aplicación importante es la cianuro dihidratasa; enzima que puede ayudar en la biorremediación de las aguas residuales contaminadas con cianuro (Martínková et al., 2017).

Nitrilos

Los nitrilos ($RC\equiv N$) son los derivados orgánicos del ácido cianhídrico ($HC\equiv N$), que a su vez son parte de los cianuros junto con las sales del ácido cianhídrico. Los nitrilos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; son sintetizados por una gran variedad de plantas, bacterias y hongos, y en un nivel menor por algas y artrópodos. Los dos grupos más numerosos de nitrilos en los organismos vivos son los cianoglucósidos y los cianolípidos, ambos presentes principalmente en plantas. Sin embargo, se han descrito cianoglucósidos derivados del aminoácido valina en artrópodos. Aparte de los dos grupos anteriormente mencionados se han aislado una gran variedad de nitrilos en todos los dominios de la vida, pero sin llegar a ser tan numerosos como los primeros. En el reino animal la síntesis de nitrilos está limitada a dos phyla, Arthropoda y Porifera. Los poríferos producen nitrilos derivados del dibromotirosina como bactericidas mientras los miriápodos producen nitrilos como medio de protección contra los depredadores. Por ejemplo el polidésmino *Harpaghe haydeniana* libera cianuro y mandelonitrilo al sentirse amenazado. Por último en plantas se ha propuesto al índol-3-acetonitrilo como precursor de la hormona vegetal ácido índol-3-acético.

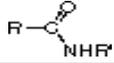
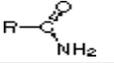
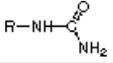
Otro de las funciones de los nitrilos en los organismos vivos es como intermediario en la incorporación de cianuro. En el caso de los hongos, estos son capaces de incorporar el cianuro al unirlo con ciertos aldehídos, para formar α -amino nitrilos. Mientras tanto bacterias y plantas son capaces de incorporar el cianuro al unirlo a ciertos aminoácidos como la cisteína o la serina, para formar β -ciano alanina (Legras et al., 1990).

Las plantas también usan a los nitrilos como intermediario en la incorporación de cianuro. Una de las principales fuentes de cianuro en las plantas es la síntesis de la hormona vegetal etileno. El precursor inmediato del etileno es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, el cual libera etileno y ácido ciano fórmico. Este último se descompone en dióxido de carbono y ácido cianhídrico. Para evitar la toxicidad del cianuro, este se transforma en β -ciano alanina y posteriormente es degradado por una nitrilasa en ácido aspártico y asparagina (Piotrowski, 2008).

Nitrilasas

La superfamilia de las nitrilasas contiene 13 ramas. Los miembros de la superfamilia catalizan una variedad de reacciones de hidrólisis sobre enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos, por lo que se les denomina también superfamilia de las hidrolasas carbono-nitrógeno, y se encuentran distribuidos en animales, bacterias, plantas y hongos. A pesar de que la clasificación se construyó con base únicamente en la secuencia de aminoácidos, cada rama resultante tiene una actividad y función biológica distinta. La rama 1, también conocida como la familia de las nitrilasas, agrupa a las nitrilasas y las cianuro dihidratasas; y es la única rama de la superfamilia con actividad de nitrilasa, es decir hidroliza los nitrilos en sus correspondientes ácidos y liberan amonio en el proceso. Otras ramas de la superfamilia de las nitrilasas tienen actividad de amidasas y carbamilasas *N*-acetiltransferasas (Pace & Brenner, 2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la superfamilia de las nitrilasas en 13 familias distintas.

Rama de la superfamilia	Nitrilasa	Amidasa	Amidasa reversa	Carbamilasa	Sustrato proteico
					
1- Nitrilasa	Sí				
2- Amidasa alifática		Sí			
3- Amidasa amino terminal		Sí			Sí
4- Biotinidasa		Sí	Sí		A veces
5- β- ureidopropionasa		Sí		Sí	
6- Carbamilasa		Sí		Sí	
7- NAD sintasa procariota		Predicho			
8- NAD sintasa eucariota		Predicho			
9- Apolipoproteína N-aciltransferasa			Sí	Sí	Sí
10- Nit y NitFhit					
11- NBI 1					
12- NBI 2					Predicho
13- No fusionados					

En los renglones se indica la familia y en las columnas se indica el tipo de reacción catalizada por cada familia. Tomado de (Pace & Brenner, 2001).

A partir de las estructuras cristalográficas y N-carbamil-D-aminoácido-amidohidrolasa (PDB: 1ERZ) y la proteína de fusión de NitFhit, la cual es una nitrilasa (Nit) unida a proteína llamada Fragile histidine triad protein (Fhit) (PDB: 1EMS) se determinó que el sitio activo de la superfamilia está conformado por un glutamato, una lisina y una cisteína (Pace & Brenner, 2001). También se ha implicado la participación de otro glutamato, E142, en el sitio activo de la amidasa de *Geobacillus pallidus* RAPc8 (PDB: 2PLQ) (Kimani et al., 2007). Se ha propuesto que el glutamato homólogo en la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) estabiliza a la lisina 135 por medio de dos puentes de hidrógeno (Zhang et al., 2014) (Figura 1). Tanto la triada catalítica como el glutamato extra son residuos conservados en todos los miembros de la superfamilia, por lo que se ha propuesto un sitio activo formado por una tétrada en lugar de una triada catalítica (Thuku et al., 2009).

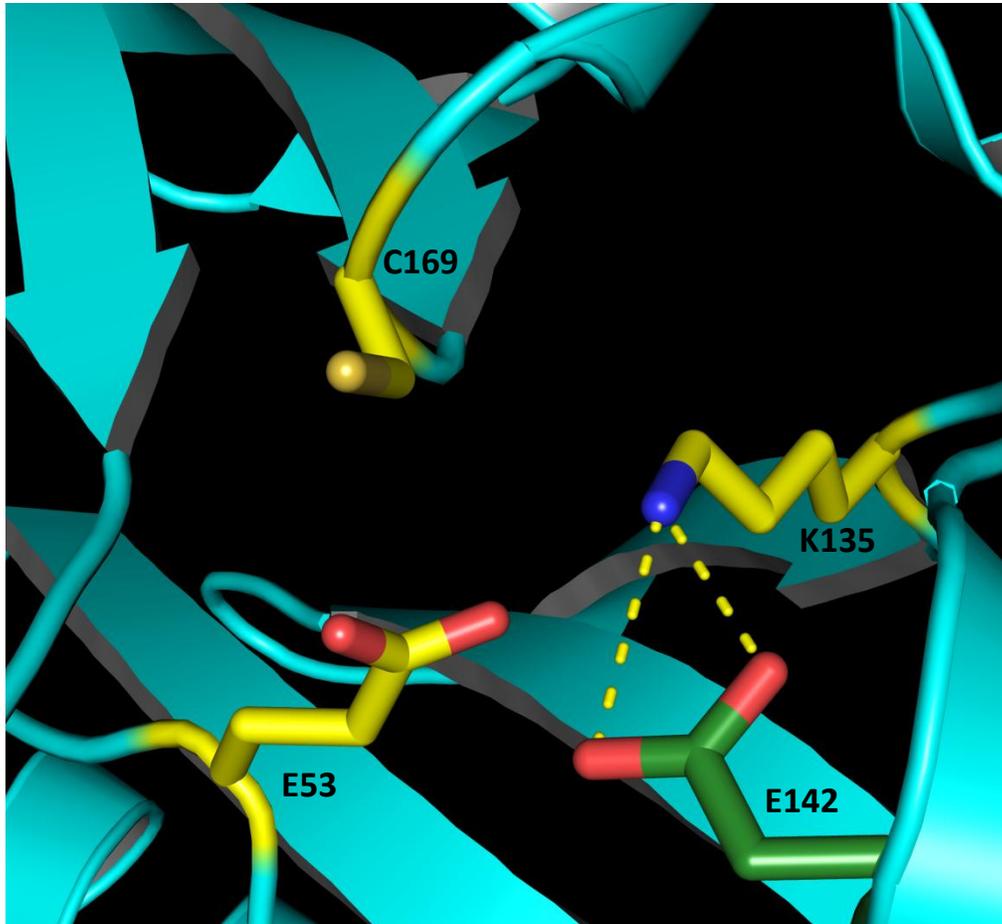


Figura 1. Sitio catalítico de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3wuy) (Zhang et al., 2014). En amarillo están marcados el glutamato 53, la lisina 135 y la cisteína 169 de la triada catalítica y en verde el glutamato 142 homólogo al glutamato de la amidasa de *G. pallidus* RAPc8 que se ha implicado en el mecanismo de reacción (Kimani et al., 2007).

Ya que no se ha resuelto la estructura de alguna nitrilasa con su sustrato o algún análogo, solo se cuenta con una propuesta del mecanismo de reacción. La reacción propuesta empieza cuando el glutamato desprotona a la cisteína y la activa (Zhang et al., 2014). Una vez activada la cisteína realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo ciano formando un complejo enzima sustrato unido covalentemente. Posteriormente el ataque nucleofílico de una molécula de agua al carbono del grupo nitrilo y da paso a la formación de un intermediario tetraédrico que se hidroliza en el enlace C-N, liberando amonio. El ataque nucleofílico de una segunda molécula de agua forma el ácido correspondiente al nitrilo y regenera a la enzima. Si el enlace entre el azufre y el carbono del intermediario tetraédrico se hidroliza, se forma la amida correspondiente al nitrilo. Ha de notarse que dependiendo de los impedimentos estéricos y la distribución de las cargas generados por el grupo R se puede virar la reacción hacia la formación de amidas (Fernandes et al. 2006; Williamson et al., 2010) (Figura 2).

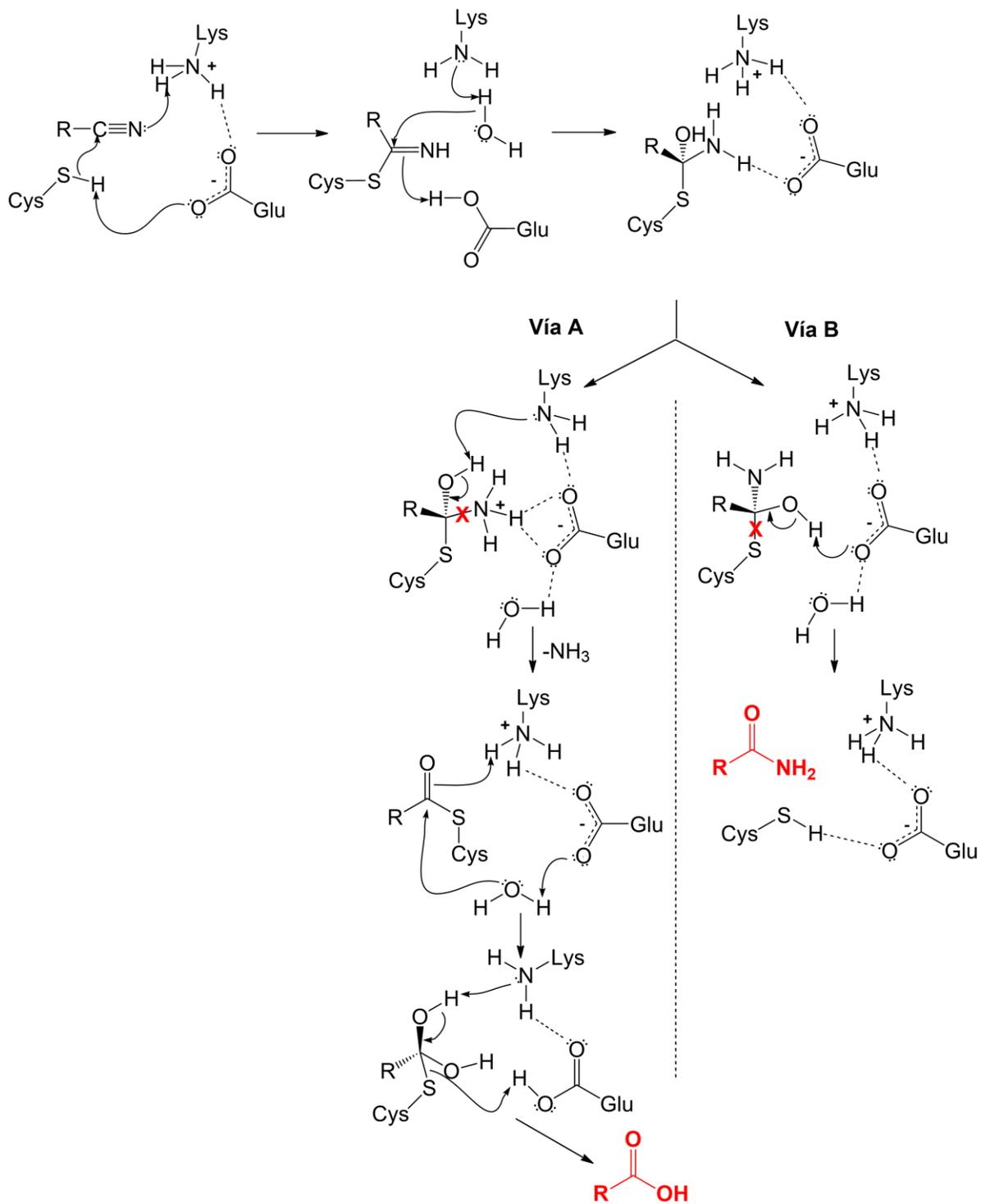


Figura 2. Mecanismo de reacción de las nitrilas. Cuando se hidroliza el enlace C-N la reacción termina en la formación del ácido carboxílico (Ruta A), cuando se hidroliza el enlace C-S la reacción termina en la formación de amida (Ruta B). Modificado de (Jandhyala et al., 2005).

Estructura

Los miembros de la superfamilia nitrilasa son enzimas con un plegamiento tipo $\alpha\beta\alpha$ sándwich y con la tendencia a formar estructuras oligoméricas (Pace & Brenner, 2001). Las subunidades tienen una masa molecular entre 30 y 45 kDa. A la fecha se han publicado las estructuras de dos nitrilasas: la de *Pyrococcus abyssi* (PDB: 3IVZ) (Raczynska et al., 2011) y la de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) (Zhang et al., 2014). Ambas presentan una gran similitud a nivel de estructura terciaria y se cristalizaron como dímeros. Sin embargo, hay dos diferencias importantes. La primera diferencia está en el C-terminal. En la nitrilasa de *P. abyssi*, el C-terminal de cada subunidad penetra al interior de la otra subunidad, estableciendo interacciones específicas que participan en la dimerización. En el caso de *Syechocystis* sp. PCC6803 la estructura del C-terminal no se pudo resolver, ya que durante el proceso de cristalización, un corte proteolítico eliminó los últimos 56 residuos. La segunda diferencia son dos inserciones entre los aminoácidos 61-73 y 228-248 en la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 con respecto a la nitrilasa de *P. abyssi*. Estas inserciones forman parte de la cavidad del sitio activo y los cambios en el volumen de la cavidad podrían explicar las diferencias en el tipo de sustrato que catalizan (Figura 3). La nitrilasa de *P. abyssi* sólo es capaz de hidrolizar dinitrilos alifáticos, mientras que la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 es capaz de hidrolizar un amplio espectro de nitrilos, principalmente alifáticos (Zhang et al., 2014).

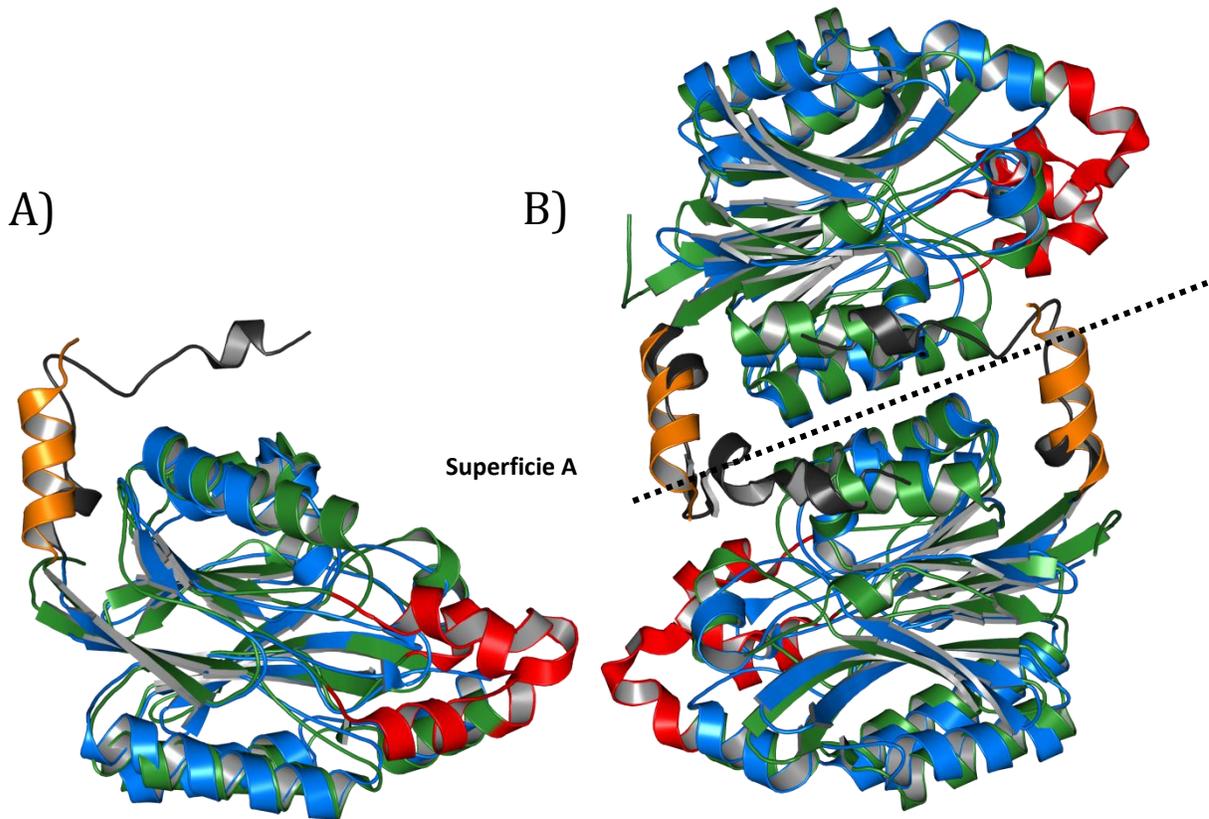


Figura 3. Sobreposición de las estructuras de las nitrilasas de *Pyrococcus abyssi* (3ivz) (Raczynska et al., 2011) y de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) (Zhang et al., 2014). a) Sobreposición de los monómeros de

3IVZen azul con su C-terminal en gris oscuro y el monómero de 3WUYen verde con su C-terminal en naranja. En rojo se marcaron las inserciones la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 con respecto a la nitrilasa de *P. abyssi*. b) Sobreposición de los dímeros cristalográficos de 3WUY y 3IVZ. La superficie A, a través de la cual los monómeros interactúan para formar dímeros, está marcada en ambos dímeros.

Oligomerización

La gran mayoría de las nitrilasas y las cianuro dihidratasas se ensamblan en homooligómeros activos. Mientras algunas nitrilasas se ensamblan en espirales cortas con un número definido de subunidades, otras nitrilasas se ensamblan en filamentos largos de tamaño variable (Thuku, et al., 2009). Existen nitrilasas que no se ensamblan en homooligómeros como la nitrilasa dimérica activa de *P. abyssi* (Mueller et al., 2006) y la nitrilasa monomérica de *Arthobacter* sp. J1 (Bandyopadhyay et al., 1986), aunque son atípicos.

Espirales cortas

Dos ejemplo de espirales cortas son la CynD de *Pseudomonas stutzeri* AK61 de 14 subunidades (Sewell et al. 2003) y la CynD de *Bacillus pumilus* C1 de 18 subunidades (Jandhyala et al., 2003). El número de subunidades y la forma de los oligómeros de las dos enzimas se pudo determinar por medio de microscopía electrónica. También las nitrilasas de *Rhodococcus rhodochrous* J1, *Fusarium solani* O1 (Vejvoda et al., 2008) y *F. solani* IMI196840 forman espirales cortas (Vejvoda et al., 2010) (Figura 5). En el caso de *R. rhodochrous* J1 se concluyó que el oligómero está compuesto por 12 subunidades y por medio de microscopia electrónica se ha observado ensamblado en espirales cortas, que no completan una vuelta que se pueden ver como estructuras en forma de C (Figura 4) (Thuku et al., 2007). En las nitrilasas de *F. solani* el número exacto de subunidades por oligómero falta por determinarse (Vejvoda et al., 2010).

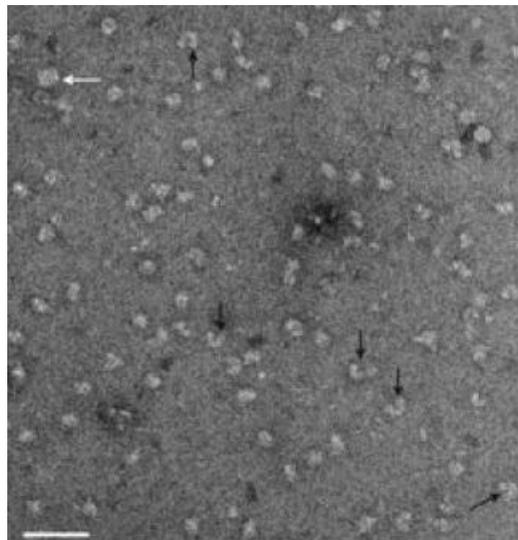


Figura 4. Microscopia electrónica de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1. En la imagen se muestran partículas heterogéneas del dodecámero. Las flechas negras indican los agregados en forma de C y las flechas blanca indica un contaminante identificado como GroEL (Thuku, et al., 2007).

Filamentos de tamaño variable

La CynD de *B. pumilus* C1 forma filamentos helicoidales al disminuir el pH. Las espirales cortas se presentan a pH entre 6 y 8, mientras que los filamentos largos de tamaño variable (50-300 nm) se favorecen a pH 5.4 (Figura 5). Tanto las espirales cortas como los filamentos helicoidales se forman a partir de un bloque dimérico (Jandhyala et al., 2003). La formación de filamentos por cambios en el pH es un proceso reversible y está acompañado de un ligero incremento en la actividad (Jandhyala et al., 2005).

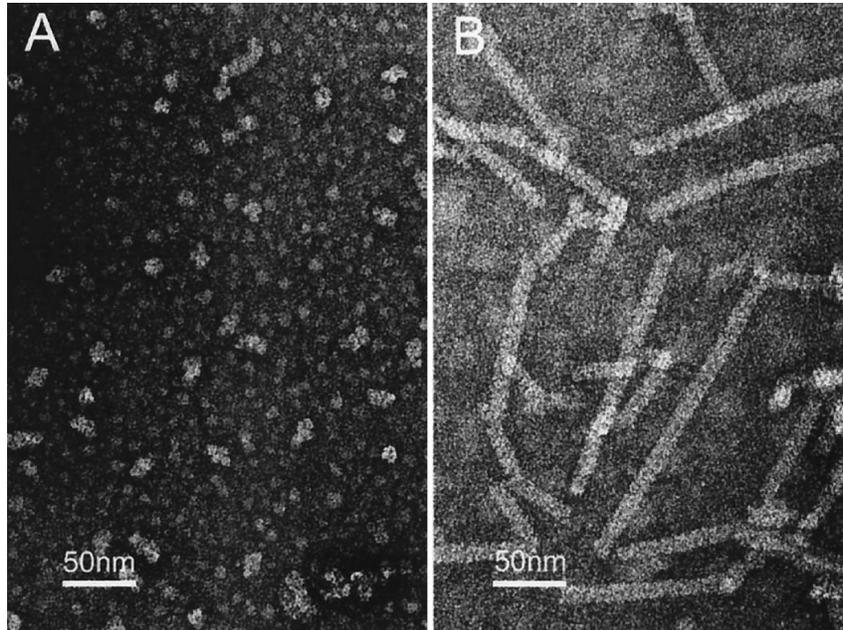


Figura 5. Microscopías electrónicas de la CynD de *B. pumilus* C1. A) Microscopía electrónica a pH 8.0. Se observa espirales cortas. B) Microscopía electrónica a pH 5.4. Se observa la formación de filamentos largos. Tomado de (Jandhyala et al., 2005).

Filamentos similares a los de la CynD de *B. pumilus* C1 también se han descrito en la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1. A diferencia de los filamentos de *B. pumilus* C1, la nitrilasa forma filamentos después un corte autoproteolítico que eliminó los últimos 39 residuos del extremo C-terminal. Posteriormente se crearon mutantes truncas en las que se eliminaron los últimos 39 residuos del C-terminal y se encontraron filamentos similares a la muestra con corte autoproteolítico (Thuku et al., 2007) (Figura 6).

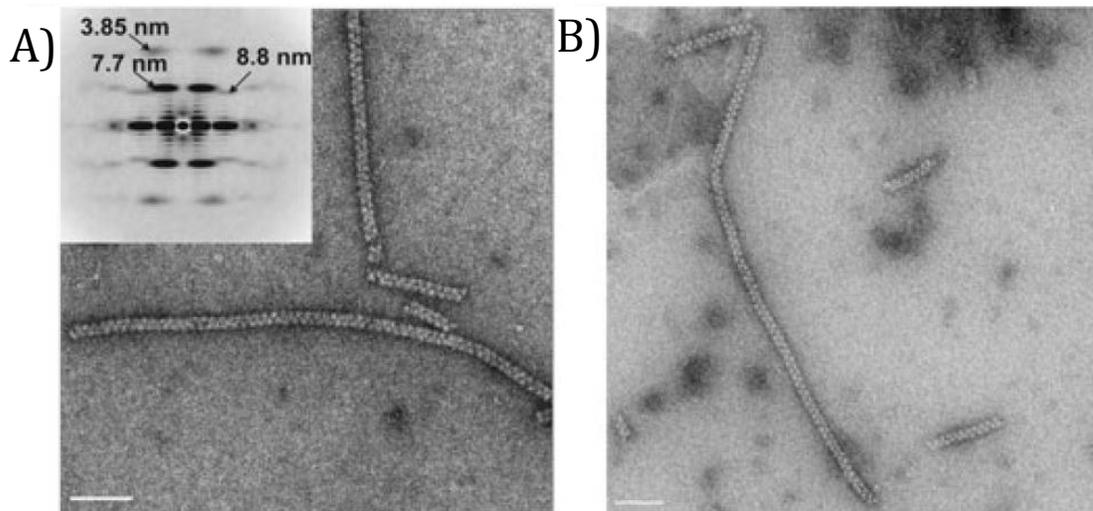


Figura 6. Microscopía electrónica de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1. A) Microscopia electrónica de la nitrilasa que sufrió un corte autoproteolítico B) Microscopia electrónica de la nitrilasa trunca J1ΔC327. Ambas proteínas forman espontáneamente filamentos. Tomado de (Thuku, et al. 2007).

A partir de las micrografías de los filamentos se pudo reconstruir su estructura tridimensional. Posteriormente se ajustó un modelo de la estructura terciaria de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, en la estructura del filamento. Con ello se relacionaron las superficies de la proteína con las superficies de los filamentos helicoidales (Thuku et al., 2007). La superficie A es la superficie por la cual los monómeros de la nitrilasa interactúan entre ellos. Además esta interacción se ha podido observar en las estructuras cristalográficas de las nitrilasas de *P. abyssi* (PDB: 3IVZ) (Raczynska et al 2011) y de *Syechocystis* sp. PCC6803 (PDB: 3WUY) (Zhang et al., 2014). La superficie C es perpendicular a la superficie A y permite que los dímeros se asocien en oligómeros. Esta superficie no se ha observado en la estructura cristalográfica de una nitrilasa. Sin embargo, sí se ha observado en la β -alanina sintasa de *Drosophila melanogaster* (2VHI), miembro de la superfamilia de las nitrilasas (Lundgren et al., 2008). La superficie D es perpendicular a superficie C y es la responsable de la elongación de los filamentos (Figura 7). Esta superficie solo surge cuando los oligómeros forman un giro completo (Thuku et al., 2009).

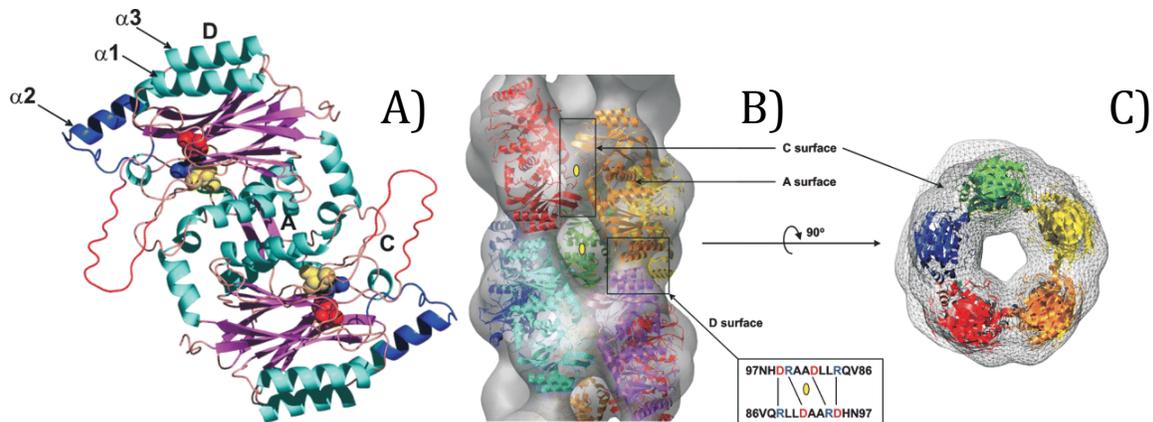


Figura 7. Ajuste de un modelo de la nitrilasa en la estructura de un filamento. A) Modelo de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 ensamblada como dímero a través de la superficie A. B) Ajuste del modelo en la estructura tridimensional del filamento de la nitrilasa. Se muestran las superficies de interacción entre subunidades. C) Vista superior del filamento con los modelos ajustados. Tomado de (Thuku et al., 2007).

C-terminal

El extremo C-terminal de las nitrilasas bacterianas y de las amidasas cristalizadas es entre 40 y 100 aminoácidos más largo que el de sus homólogos estructurales y no está conservado, ni a nivel de de secuencia, ni de estructura. La función exacta del C-terminal extendido en la familia de las nitrilasas no se conoce con certeza, aunque existen varios casos que indican su importancia (Thuku et al., 2009). En la estructura de la nitrilasa de *P. abyssi* el C-terminal de un monómero se entrelaza con C-terminal del otro monómero, por lo que se ha propuesto que el C-terminal es importante para fortalecer las interacciones de la superficie A (Raczynska et al., 2011). Otro ejemplo de la importancia del C-terminal es la CynD de *B. pumilus* 8A3, la cual es incapaz de formar filamentos, aunque es muy similar a la CynD de *B. pumilus* C1, la cual sí forma filamentos. Ambas proteínas difieren únicamente en 7 residuos incluyendo 3 histidinas en el C-terminal. Ya que el cambio entre espirales cortas y filamentos se da a pH cercanos a 6, y considerando al pKa del grupo imidazol de las histidina, se ha propuesto que las histidinas del C-terminal son las responsables del cambio en el estado oligomérico. Al protonarse las histidinas adquieren una carga positiva, la cual genera repulsiones electroestáticas entre las subunidades. Como resultado el radio de las hélices cortas aumentan impidiendo las interacciones de la superficie E. La superficie E es la responsable de terminar la elongación en la CynD al impedir que se incorporen más subunidades. Por lo tanto, al impedir las interacciones en la superficie E, las espirales cortas se pueden reorganizar en filamentos helicoidales largos (Thuku et al., 2009). El último ejemplo de la importancia del C-terminal de las nitrilasas es la *R. rhodochrous* J1. La nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 forma filamentos activo después de eliminar 39 residuos del C-terminal. Se ha propuesto que el C-terminal a través de impedimentos estéricos imposibilita la terminación de una vuelta completa. Como resultado se impide la formación de filamentos y se obtienen espirales cortas (Figura 6). Sin embargo, si se eliminan demasiados residuos del C-terminal se pierde la actividad, probablemente se pierden interacciones esenciales para la formación de los filamentos helicoidales (Thuku et al. 2007).

Modelos computacionales

El uso de modelos por homología es una práctica común cuando no se dispone de la estructura de una proteína, pero necesaria para la interpretación de los datos. Como requerimiento se necesita la secuencia de la proteína de interés y un homólogo cercano, cuya estructura esté resuelta (Venselaar et al., 2009). En la familia de las nitrilasas se ha recurrido al uso de modelos por homología, inicialmente porque no se disponía de la estructura de ninguna nitrilasa, pero sí de otros miembros de la superfamilia de las nitrilasas. A la fecha se han publicado las estructuras de dos nitrilasas, la nitrilasa de *P. abyssi* (PDB: 3IVZ) (Raczynska et al., 2011) y la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (PDB: 3WUY) (Zhang et al., 2014). Lo cual permite mejorar los modelos hechos, para el resto de las nitrilasas. A continuación se exponen algunos casos en los que se usaron modelos de nitrilasas y el uso que se les dio a estos.

En la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 se reconstruyó la superficie de los filamentos a partir de las micrografías. Sin embargo, no era claro la forma en la que se posicionaba la proteína para formar los filamentos. Para responder esta pregunta, se ajustó un modelo por homología de la nitrilasa en la estructura del filamento. Después de este análisis en computadora se pudo asociar las superficies de interacción de los filamentos con las superficies de la proteína (Thuku et al., 2007). Los modelos por homología también se han usado para explicar la actividad de algunas nitrilasas a sustratos en específico. Por ejemplo en la nitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 tienen una alta actividad hacia dinitrilos alifáticos y baja drásticamente su actividad hacia los nitrilos alifáticos, aromáticos y arilacetónitrilos, en ese orden. Para explicar su especificidad, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular entre sustrato y el sitio activo con un dinitrilo y su correspondiente mononitrilo en un modelo (Kim et al., 2009). Otro ejemplo es la nitrilasa *R. rhodochrous* ATCC 33278, la cual tiene actividad tanto para nitrilos alifáticos, como con nitrilos aromáticos. Sin embargo, al mutar la tirosina 142 por una alanina, se pierde la actividad hacia los nitrilos alifáticos y se incrementa la actividad hacia los nitrilos aromáticos. Al igual que el caso anterior, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular entre sustrato y el sitio activo en un modelo. En este caso, los ensayos se realizaron tanto en la enzima silvestre y la enzima mutada con un nitrilo alifático y un nitrilo aromático. En los modelos al mutar la tirosina 142 por una alanina, disminuye la distancia entre el sustrato y la cisteína catalítica. Esto se debe a que la tirosina 142, al estar cerca del sitio activo, genera impedimentos estéricos con el sustrato. Al mutar la posición por una alanina, los impedimentos estéricos disminuyen, aumentando la actividad (Yeom et al., 2008).

En ninguno de los casos anteriores se creó un modelo a partir de las estructuras de otras nitrilasas, se usaron las estructuras de otros miembros de la superfamilia de las nitrilasas. Es importante notar que son anteriores a la publicación de la primera estructura reportada de una nitrilasa. Un caso posterior es el de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* ZJB09122. En este caso se usó evolución dirigida, para aumentar la estabilidad y la actividad de la nitrilasas, sin perder su regio-selectividad. Para explicar el efecto las mutaciones en la actividad y en la estabilidad se creó un modelo a partir de la estructura de *Syechocystis* sp. PCC6803 (PDB: 3WUY). Sin embargo, el C-terminal de la nitrilasa fue difícil de modelar, ya que hay poca similitud entre el C-terminal de la nitrilasa de *A. facilis* ZJB09122 y sus homólogos cristalizados. En el trabajo solo se pudo recrear con éxito una de

las 3 mutantes y dar una explicación a partir de la estructura. Las otras dos mutaciones, que ocurrieron en el C-terminal, no se pudieron explicar a partir del modelo (Xu et al., 2018).

Antecedentes

Dos miembros de la familia de las nitrilasas han sido aislados en el laboratorio, la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (Leyva, 2009) y la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1 (Granados, 2009). La nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B hidroliza benzonitrilo, acrilonitrilo, propionitrilo, adiponitrilo y valerionitrilo. El tamaño de la nitrilasa se estimó por medio de filtración en gel y dispersión dinámica de luz (DLS). Por la primera técnica se estimó que forma un oligómero de aproximadamente 480 kDa, formado por 10-12 subunidades y por la segunda técnica se estimó el tamaño de su radio hidrodinámico en 15 nm (Cáliz, 2015). La CynD de *B. pumilus* GMA1 al igual que otras CynD forma oligómeros de diversos tamaños. A pH 8.0 la CynD forma oligómeros de 22 subunidades y a pH 5.4 forma filamentos de gran tamaño, variando entre 85 y 200 nm de longitud.

Para promover la formación de filamentos en la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B se crearon dos mutantes con el extremo C-terminal truncado en las posiciones T328 y R340, a las cuales se les eliminaron 39 y 27 aminoácidos del C-terminal respectivamente. Nit Δ 39 se diseñó de acuerdo al sitio del corte autoproteolítico de la nitrilasa *R. rhodochrous* J1, ya que comparten una identidad del 97%. De esta manera se pretendía generar filamentos helicoidales de forma similar a lo reportado para la nitrilasa de *R. rhodochorus* J1. Por otro lado, el alineamiento de las secuencias de la nitrilasa *Rhodococcus* sp. V51B y la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1 (51.9% en similitud), indica que el extremo C-terminal de la nitrilasa se extiende 27 aminoácidos. Nit Δ 27 es 27 residuos más corta para que el extremo C-terminal fuera de la misma longitud que el C-terminal de de *B. pumilus* GMA1.

La caracterización de Nit Δ 27 mostró que tiene una actividad 6 veces mayor que la nitrilasa silvestre. Por DLS el tamaño del radio hidrodinámico fue de aproximadamente 36 nm, lo cual es aproximadamente 16 nm mayor que la nitrilasa silvestre. Nit Δ 39 mostró un comportamiento similar, por DLS forma estructuras con un radio hidrodinámico de aproximadamente 194 nm y es 10 veces más activa que la enzima silvestre. Por microscopía electrónica de transmisión se observó que ambas mutantes forman filamentos helicoidales. En el caso de Nit Δ 39 se observaron filamentos de entre 50 y 400 nm de longitud y con diámetro entre 10 y 13 nm. En el caso de Nit Δ 27 se observó una población heterogénea con una longitud máxima de 50 nm y un radio aproximado de 13 nm. En contraste, la nitrilasa silvestre formo vueltas incompletas con forma de C similares a las observadas en la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku et al. 2007). Lo cual sugiere que al acortar el C-terminal se incrementa la longitud de los filamentos y con ello la actividad.

Justificación

Se ha propuesto que en la familia de las nitrilasas el extremo C-terminal forma parte de las superficies de interacción A y C, las cuales son importantes para la formación de filamentos. Parece que en las nitrilasas la formación de filamentos es esencial para la actividad. Entonces cambios en el C-terminal pueden mejorar la estabilidad de las interacciones a lo largo de las superficies A y C, aumentando la actividad. En la CynD de *B. pumilus* se ha mostrado que residuos del C-terminal están implicados en la formación de filamentos activos a pH 5.4. Si se cambiaran algunos residuos en el extremo carboxilo terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B, por residuos únicos de CynD de *B. pumilus*, se esperaría inducir nuevas interacciones que incrementen la estabilidad y por lo tanto la actividad catalítica. Las mutaciones se introducirán en la nitrilasa trunca NitCΔ27, similar en longitud a la CynD, y así determinar los cambios en la actividad, estabilidad y oligomerización de las diferentes mutantes. Los cambios estructurales por las mutantes introducidas se evaluarán mediante modelado por homología. Las distintas estructuras atómicas de diversos miembros de la superfamilia, como la β-alanina sintasa de *Drosophila melanogaster* (2VHH), y la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3wuy) proveen la base para modelar por homología las interfaces en las nitrilasas. Por análisis de secuencias homólogas se identificarán las regiones de la enzima implicadas en las interacciones a nivel del C-terminal.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar mutaciones sitio-dirigidas que refuercen las interacciones de las regiones entre las subunidades involucradas en la formación de los filamentos helicoidales y realizar la caracterización bioquímica y estructural de las mutantes seleccionadas.

Objetivos particulares

- Crear las distintas mutantes por medio de técnicas de biología molecular.
- Clonar y sobreexpresar las distintas mutantes.
- Purificar las distintas mutantes
- Caracterizar las mutantes por métodos fisicoquímicos
 - Determinar la actividad de las mutante a distintos pH
 - Determinar su estructura secundaria por dicroísmo circular
 - Determinar su estabilidad térmica
 - Determinar su radio hidrodinámico por DLS
 - Determinar su estabilidad con respecto al tiempo de incubación.
 - Obtener un modelo *in silico* de la nitrilasa NitCΔ27 y de las mutantes seleccionadas

Tabla 2: Secuencia de los oligonucleótidos usados para introducir las mutaciones puntuales.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)
P331A Sentido	5'-CG TTC GTG GCG CAG TTC GGG GCA CTC GAC GG-3'	70
P331A Antisentido	5'-CC GTC GAG TGC CCC GAA CTG CGC CAC GAA CG-3'	70
P331Y Sentido	5'-CG TTC GTG TAG CAG TTC GGG GCAC TCG ACGG-3'	70
P331Y Antisentido	5'-CC GTC GAG TGC CCC GAA CTG GTA CAC GAA CG-3'	70

Los tripletes con la mutación están marcados en cuadros negros con letras blancas. En la tercera columna se muestra la temperatura media de fusión.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las mutantes puntuales fueron creadas por medio de PCR usando como templado la nitrilasa de NitCΔ27 dentro del vector pET24a (+). Aunque la T_m calculada fue de 70 °C, experimentalmente la temperatura óptima de alineamiento para las dos mutantes fue de 55 °C (tabla 2). Para el PCR se usó la DNA polimerasa Pfu recombinante (Thermofisher) en el amortiguador proporcionado por la compañía, aunque la concentración de MgSO₄ se ajustó a 3 mM y se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final 3% v/v. La reacción se llevó en un volumen final de 50 μl, con 50 ng de templado, 200 ng de oligonucleótidos forward y reverse, 0.75 mM de dNTPs y 2.5 U de Polimerasa. El programa usado en el termociclador para amplificar las secuencias se encuentra en la tabla 3.

Tabla 3. Programa del termociclador, para amplificar las mutantes puntuales.

Número de paso	Tiempo	Temperatura °C
1	2 min	94
2	30 seg	94
3	30 seg	55
4	12 min	72
5	Repetir 25 veces desde el paso 2	
6	15 min	72
7	Indefinidamente	4

Digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación

Antes de transformar los productos de PCR se digirió el templado por la enzima *DpnI* (New England BioLabs), ya que este proviene de células DH5 (dam (+)). La digestión se realizó hora y media a 37 °C en el amortiguador 2.1 (New England BioLabs). Para inactivar las enzimas la muestra se calentó a 80 °C durante 20 min.

Transformación bacteriana

Se transformaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α o BL 21 (DE3) pLysS al mezclar 50 μ l de células con 1 a 3 μ l de DNA. La mezcla se dejó reposar veinte min en hielo y posteriormente se pasó a una celda de electroporación fría (4 °C). Se aplicó un pulso eléctrico a la celda con células usando un electroporador Micro Pulser (BioRad). Después del pulso las células se resuspendieron en medio Super Optimal broth with Catabolic repression (SOC) y se incubaron una hora a 37 °C y 2000 rpm. Las células en medio SOC se sembraron en placas de medio Luria Bertani (LB) sólido adicionada con kanamicina y cloranfenicol dependiendo la cepa. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron y marcaron las colonias para procedimientos posteriores.

Purificación de DNA por minipreparación de DNA plasmídico por lisis alcalina

Las colonias seleccionadas se inocularon en tubos con 10 mL de medio LB adicionadas con kanamicina a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se cosecharon las células. La pastilla resultante se resuspendió 100 μ l de una solución 50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 10mg/mL de lisozima y Tris-HCl a pH 8. Después se dejó incubando 45 min a 37 °C en una incubadora. Al terminar de incubar se agregó 200 μ l de una solución recién preparada de 0.2M de NaOH y 4% SDS. Después dejar la mezcla 10 min en hielo se adicionó 150 μ l de una solución de Acetato de Potasio 5mM a pH 5. Otra vez la mezcla recién hecha se incubó en hielo. Al cabo de 10 min en hielo se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 5 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante, el cual se pasó a un tubo eppendorf nuevo y se desechó la pastilla. Al sobrenadante se le agregó 200 μ l de fenol y 200 μ l de cloroformo. Se agitó y se centrifugó a 140 rpm durante 5 min. En esta ocasión se formaron dos fases líquidas, una sobre la otra. Se tomó la fase superior, acuosa, y se desechó la fase inferior, no-polar. A la fase acuosa se le adicionó 750 μ l de 2-propanol y se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. La pastilla formada se recuperó con cuidado y se desechó la fase acuosa.

Por último se eliminó el fenol restante por medio de lavados con alcohol etílico al 70%. Los cuales consistían en agregar 1 mL de alcohol etílico al 70% y centrifugar a 11000 rpm 3 min. Se recupera la pastilla y se desecha el alcohol. Este proceso se repite hasta que la muestra pierda el olor a cloroformo. Antes de usar el DNA se agregó amortiguador con RNAasa y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Purificación de DNA por QIAprep Miniprep Kit

Ya que el fenol puede interferir en la secuenciación, se purificó DNA por medio de este que no usa fenol, cuando era necesario secuenciar los genes. Se inocularon cultivos de medio LB adicionados con kanamicina a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente se cosecharon las células y el plásmido se purificó de la pastilla con el kit "QIAprep Miniprep Kit" (QIAGEN). El kit se basa en la adsorción del DNA en una placa de sílica a altas concentraciones de sal y eluye al disminuir la concentración de sal. Por lo tanto, el plásmido purificado eluye sin rastros de fenol. El plásmido purificado con el gen fue secuenciado en la compañía Laragen Inc. (USA) usando los oligonucleótidos universales T7_{pro} y T7_{ter}.

Sobreexpresión de proteínas y Purificación de proteínas

Se transformaron células BL 21 (DE3) pLysS con los plásmidos que contienen los genes mutados. Las colonias crecieron en placas de medio LB sólido con Kanamicina y cloranfenicol. Se inoculó un cultivo (O.N.) de 50 mL de medio LB con Kanamicina y cloranfenicol y se dejó en el agitador 12 h a 37 °C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 1 mL de medio LB y con él se inoculó un litro de medio LB con Kanamicina. El medio se dejó crecer a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda de 0.6 ($D.O_{600} \approx 0.6$) y se adicionó 0.095 g de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), a una concentración final de 0.4 mM de IPTG. El litro de medio se dejó crecer otras 8 h a 28 °C y 200 rpm.

Al finalizar las 8 h el litro de medio se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. La pastilla recién formada se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (Tris 100 mM, KCl 150 mM y EDTA 1 mM) y se adicionó 0.2 mM PMFS disuelto en DMSO. Las células resuspendidas se rompieron en el sonicador al aplicar 20 pulsos de 35% de amplitud durante 30 seg y descansos de 1 min entre pulso. Las células fragmentadas se centrifugaron a 15000 rpm durante 20 min. La pastilla se desechó y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas solubles en el sobrenadante se precipitaron con sulfato de amonio a una saturación del 20% (4.56 g en 40 mL). El sobrenadante con sulfato de amonio se incubó 2 días a 4 °C. Para separar las proteínas precipitadas se centrifugó el sobrenadante a 15000 rpm durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de proteínas en 1 mL de amortiguador de KH_2PO_4 10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y B-Mercaptoetanol 14.25 mM a un pH de 7 (Amortiguador A). Las proteínas resolubilizadas se filtraron y después se inyectaron en la columna S-300 a un flujo de 0.5 mL/min controlado por un equipo HPLC (Waters). Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones más puras se juntaron y concentraron en filtros Amicon Ultra (Millipore). Para separar los contaminantes de la nitrilasa, el eluido se purificó por cromatografía de intercambio aniónico en una columna SourceQ. La columna se equilibró previamente con Amortiguador A y después de inyectar el eluido se aplicó un gradiente de 0.2 a 1 M de NaCl a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE, las más puras se juntaron. Si la proteína contenía contaminantes se daba un segundo paso de purificación por la columna SourceQ. Antes de inyectar la muestra por la columna la muestra se dializa, para eliminar el exceso de sales. El segundo paso por la columna es similar al primero, pero a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones puras se juntaron y concentraron, para su caracterización posterior.

Actividad específica por determinación de amonio

En los ensayos de actividad se midió la concentración de amonio con el reactivo comercial Spectroquant (MERCK®), el cual se basa en el método de Berthelot (Figura 9). En la reacción de Berthelot el amonio reacciona en condiciones alcalinas con el hipoclorito formando una cloramina. El cual a su vez reacciona con un derivado fenólico (Timol) formando una N-cloroimina de quinona. En esta reacción se adiciona nitroprusiato, que funciona como catalizador. En el último paso una N-cloroimina de quinona reacciona con un derivado fenólico formando indofenol. En medio alcalino el indofenol se desprotona generando una coloración azul. Los ensayos se realizaron por

triplicado a 30 °C y 1 mM de benzonitrilo en un volumen final de 1mL. Para observar el efecto del pH se probaron dos amortiguadores: amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM a pH 7.8 y amortiguador de citratos de sodio 10 mM y NaCl 50 mM a pH 5.4. Debido a la alta actividad de algunas enzimas los tiempos de reacción se redujeron de 10 a 5 min. Las reacciones se iniciaron al agregar 2.5 µg de enzima y se pararon al agregar 100 µl de ácido clorhídrico 2 M. Para leer la muestra se añadió el primer reactivo del kit que contiene hidróxido de sodio aumentando el pH y después se aforó a 5 mL. Se añadieron los siguientes reactivos y leyó la absorbancia a 690 nm. La concentración de amonio en los ensayos se estimó con una curva estándar de amonio.

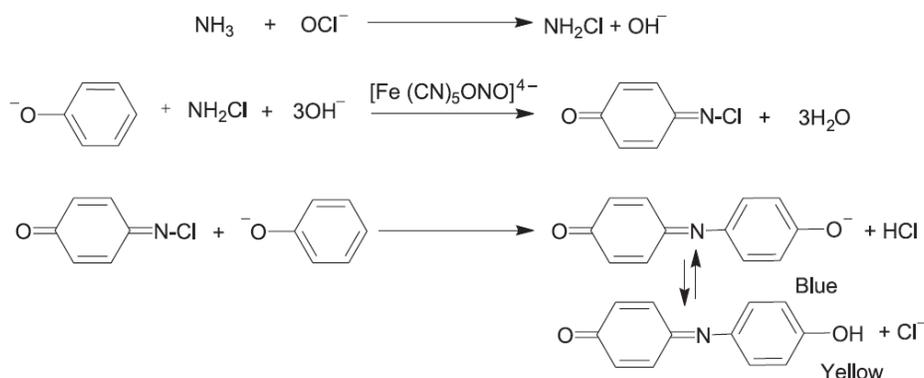


Figura 9. Reacción de Berthelot. Tomado de (Afkhami & Norooz-Asl, 2008).

Incubaciones

Para saber si la inactivación por pH es un proceso reversible y cómo afecta la recuperación de la actividad, se realizaron varias incubaciones de la enzima tanto a pH 5.4 como a pH7.8. La proteína se llevaba a una concentración de 0.1mg/mL al diluir en amortiguador citratos o amortiguador fosfatos, dependiendo del pH al que se quisiera hacer la incubación. Posteriormente la proteína diluida se incubó a 30 °C. Al final de la incubación se tomaron 25 µl, es decir 2.5 µg de enzima, y se realizó una prueba de actividad de 10 min en amortiguador de fosfatos.

Dispersión dinámica de luz

Las proteínas se centrifugaron 14000 rpm durante 10 min y se recuperaron los sobrenadantes. Después se filtraron los sobrenadantes en un filtro Millipore™ Millex-GV de 0.22 µm. Se midió la concentración y se ajustó la concentración a 0.2 mg/mL al agregar amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.8, previamente filtrado. Las muestras se transfirieron a una cubeta de cuarzo y se estimaron los radios hidrodinámicos (R_h) por dispersión dinámica de luz en un equipo Zetasizer® (Malvern™). Las proteínas se midieron a una concentración de 0.2 mg/mL en amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.8 y a 25 °C.

Dicroísmo circular

El espectro del dicroísmo circular y las transiciones de desplegamiento térmico se realizaron en el espectropolarímetro JASCO™ J-715 equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura. Todas las mediciones se realizaron a una concentración aproximada de 0.2 mg/mL de enzima en amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.8 en un celda de 0.1 cm de recorrido óptico para UV-lejano. Se midió el espectro de dicroísmo circular de las distintas enzimas entre 190 y 260 nm. El espectro final fue el promedio de 5 mediciones consecutivas a una velocidad de 1 nm/seg. También se realizó la medición del espectro del amortiguador en la misma celda, el cual se le restaría a todas las mediciones de proteína. Con la señal respectiva de la enzima sin el amortiguador se calculó la elipticidad molar $[\theta]$. La masa promedio de gramos por mol de aminoácido fue 110.

Estimación de la estructura secundaria

Para estimar el porcentaje de estructura secundaria a partir de los espectros de dicroísmo circular, se usó el paquete CDPro. CDPro contiene 3 diferentes programas para estimar la estructura secundaria, CDSSTR, ContinLL y SELCON3. Los tres programas se basan en comparar el espectro de dicroísmo circular con los dicroísmos circulares de proteínas cuya estructura sea conocida. Se escogió la base de datos con mayor número de espectros y cuyos espectros contenidos en la base de datos tuvieran un rango similar. Los datos reportados son el promedio de los 3 programas incluidos en el paquete, CDSSTR, ContinLL y SELCON3. La frecuencia absoluta se calculó al multiplicar el número de residuos por las frecuencias relativas obtenidas.

Desplegamiento térmico

En la misma muestra con la que se obtuvo el espectro de dicroísmo circular, se obtuvo la transición del desplegamiento térmico. La medición se realizó de 20 a 90 °C a una velocidad de 1 °C/min y a una concentración de 0.2 mg/mL. La transición se midió con los cambios en señal de dicroísmo circular a 208 nm para la mayoría de las proteínas. Para las proteínas sin mínimo a 208 nm la transición térmica se midió a 220 nm. Ninguna de las transiciones térmicas fue reversible, por lo tanto que no se pudo calcular los parámetros termodinámicos. A pesar de no ser reversibles, las transiciones se ajustaron a un modelo de dos estados, para obtener la temperatura media de transición aparente (tm_{app}) (Ecuación 1)

$$y = \frac{(m_1x+b)+(m_2x+c)e^{\left(\frac{H}{R}\left(\frac{1}{x}-\frac{1}{tm}\right)\right)}}{1+e^{\left(\frac{H}{R}\left(\frac{1}{x}-\frac{1}{tm}\right)\right)}} \quad (1)$$

La ecuación 1 se obtiene de la ecuación de van't Hoff, donde "H" es la entalpia expresada en Kcal mol⁻¹, "R" es la constante de los gases ideales expresada en Kcal K M⁻¹, "tm" es la temperatura media de transición en K, "y" es la variable dependiente y es la fracción desnaturalizada y "x" es la variable independiente y es la temperatura en K. En la ecuación la pretransición y la postransición se ajustaron a dos rectas, donde "m₁" es la pendiente de la pretransición y b la ordenada al origen de la pretransición, "m₂" es la pendiente de la postransición y "c" la ordenada al origen de la

postransición. El ajuste se realizó en el programa OriginPro por medio de iteraciones con el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Modelo Computacional

A falta de una estructura de alguna nitrilasa del género *Rhodococcus* que permitiera explicar los resultados a nivel molecular, se creó un modelo *in silico* de la nitrilasa de NitCΔ27 en el servidor en línea I-TASSER. Ya que las mutaciones se realizaron sobre el C-terminal, se cargó al servidor la secuencia de CΔ27 con 3 moldes diferentes que cubrían el C-terminal. Se usaron como moldes las estructuras de las amidasas de *P. aeruginosa* (2UXY), de *Geobacillus pallidus* RAPc8 (2PLQ) y de *H. pylori* (2DYU). También, se cargó en el servidor la secuencia de NitCΔ27 sin usar una estructura como molde, tal y como sugiere el servidor. En todas las ocasiones, entre 6 y 8 de las 10 mejores estructuras seleccionadas como molde por el meta servidor LOMETS corresponden a la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY). Esto sugiere que 3WUY es la estructura principalmente usada como molde en todos los casos. Después de obtener todos los modelos por homología, las 4 estructuras predichas se relajaron usando la opción relax del programa Rosseta, es decir se muestreó el espacio conformacional cercano a la conformación inicial. Cabe mencionar que el programa Rosseta estima la energía de una molécula al asignarle un puntaje usando principios físicos y estadísticos, llamado Rosetta Energy Units (REU). Los REUs tiene la misma convención que la energía libre de Gibbs. Puntajes negativos indican conformaciones termodinámicamente favorables. Es importante notar que no existe una conversión directa entre REUs y unidades físicas de energía. Por lo tanto, los REUs se deben tomar con discreción. Los puntajes obtenidos de las 3 estructuras en las que se usó un molde fueron similares entre ellas. Sorprendentemente, la estructura predicha en la que no se indicó un molde previo obtuvo mejores puntajes al ser relajada, por lo que se decidió continuar solamente con la estructura sin molde.

En la naturaleza la mayoría de las nitrilasas se encuentran como dímeros. Por esta razón, se decidió usar el modelo (monómero) para formar el dímero. Para modelar el dímero se duplicó el monómero y cada copia se alineo estructuralmente con los monómeros de la estructura dimérica nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) en el programa PyMOL. Los alineamientos estructurales entre el modelo y las estructuras resueltas como dímeros en la superfamilia de las nitrilasas revelaron choques estéricos entre los C-terminal. Para mejorar el modelo del dímero se buscó el mínimo del energético del monómero usando programa Rosseta. Los puntajes antes y después de minimizar la estructura indican una mejora. Sin embargo, al momento de alinear de nuevo los monómeros los carboxilos terminales se siguen sobrelapando. Entonces se decidió usar rosseta, para buscar el mínimo energético de las dos estructuras acopladas. Primero se creó un nuevo archivo con extensión pdb con dos copias del modelo posicionadas de acuerdo al dímero de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803.

Los primeros intentos para minimizar terminaban con puntajes desfavorables. Al observar el resultado, la estructura del modelo se había perdido. Probablemente tener los carboxilos terminales sobrelapados da un puntaje muy positivo. Entonces interfiere con el algoritmo de la

opción “minimize”, ya que independientemente de los movimientos que se realicen los puntajes siguen siendo desfavorables. Para limitar el movimiento de la cadena principal, se volvió a minimizar, pero esta vez se le impusieron restricciones al movimiento de la cadena principal. En esta ocasión los carboxilos terminales se pudieron acoplar sin formar impedimentos estéricos. Además, los puntajes obtenidos por fin fueron negativos indicando una conformación favorable.

Mutantes *in silico*

Para explicar el efecto de las mutaciones usando el modelo *in silico*, se recrearon las mutaciones sencillas en el modelo. Para ello se usó el programa PyMOL con la opción de mutagénesis. La frecuencia y rotámeros disponibles para mutar una posición proviene de la lista de Shapovalov & Dunbrack (2011). Al momento de recrear las mutaciones se escogió el rotámero más frecuente y se creó un nuevo archivo .pdb por cada mutante sencilla. Para permitir que las mutaciones se acomoden en la estructura de NitC Δ 27, se usó la opción relax de Rosseta. Cada mutante sencilla se relajó *in silico* y entonces se pudieron analizar los efectos de cada mutación sobre la estructura.

Resultados

Alineamiento entre la nitrilasa de *Rhodococcus sp.V51B* Δ 27 y la CynD de *B. pumilus* C1 y selección de las mutaciones

Conociendo la importancia de los extremos C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.V51B* y de la CynD de *B. pumilus* en la oligomerización y formación de filamentos, se buscaron las diferencias más significativas entre ambas secuencias en el extremo C-terminal. Para encontrar las posiciones que podían ser modificadas, se alinearon las secuencias de la CynD de *B. pumilus* con el de la nitrilasa NitC Δ 27, como previamente se mencionó, la nitrilasa de *Rhodococcus sp.V51B* fue acortada en 27 residuos en el extremo C-terminal, para tener una longitud en secuencia similar a la CynD de *B. pumilus* (Figura 10).

```

      10      20      30      40      50
R. sp. V51B  MVEYTNTEKVAAVQAQPVWFDAAKTVDKTVSNIAEAARNGCELVAFFEV
B. pumillus C1M T S IY P K F R A A A V Q A A P I Y L N L E A S V E K S C E L I D E A A S N G A K L V A F F E V A
      50      60      70      80      90     100
R. sp. V51B  F I P G Y P Y H I W V D S P L A G M A K F A V R Y H E N S L T M D S P H V Q R L L D A A R D H N I A
B. pumillus C1 F L P G Y P W F A F I G H P E Y - T R K F Y H E L Y K N A V E I P S L A I Q K I S E A A K R N E T Y
      100     110     120     130     140     150
R. sp. V51B  V V V G I S E R D G G S L Y M I Q L I I D A D G Q L V A R R R K L K P T H V E R S V Y G E G N G S D
B. pumillus C1 V C I S C S E K D G G S L Y L A Q L W F N P N G D L I G K H R K M R A S V A E R L I W G D G S G S M
      150     160     170     180     190     200
R. sp. V51B  I S V Y D M P P A R L G A L N C W E H F Q I L T K Y A M Y S M H E Q V H V A S W P G M S L Y Q P E V
B. pumillus C1 M P V F Q T E I G N L G G L M C W E H Q V P L D L M A M N A Q N E Q V H V A S W P G Y - - - - -
      200     210     220     230     240     250
R. sp. V51B  P A F G V D A Q L T A T R M Y A L E G Q T F V V C T T Q V V T P E A H E F F C E N E E Q R K L I G R
B. pumillus C1 - - - F D D E I S S - R Y Y A I A T Q T F V L M T S S I Y T E E M K E M I C L T Q E Q R D Y F E T
      250     260     270     280     290     300
R. sp. V51B  - G G G F A R I I G P D G R D L A T P L A E D E E G I L Y A D I D L S A I T L A K Q A A D P V G H Y
B. pumillus C1 F K S G H T C I Y G P D G E P I S D M V P A E T E G I A Y A E I D V E R V I D Y K Y Y I D P A G H Y
      300     310     320     330     340
R. sp. V51B  S R P D V L S L N F N Q R R T - - - T P V N T P L S T I H A T H T F V Q Q F G A L D G V -
B. pumillus C1 S N - Q S L S M N F N Q Q P T P V V K H L N H Q K N E V F T Y E D I Q Y Q H G I L E E K V

```

Figura 10. Alineamiento entre las secuencias de NitCΔ27 y la CynD de *Bacillus pumilus* C1. Las secuencias comparten una identidad del 37.1% y una similitud de 54.3%. En fondo negro y letras blancas están marcados los residuos de la triada catalítica y marcado con un cuadro negro el ácido glutámico 142 de *G. pallidus* RAPc8 implicado en el sitio activo. Las posiciones mutadas están marcadas en fondo azul con letras blancas. Nótese que la inserción de un residuo en la posición 343 de acuerdo al alineamiento posición 339 en la proteína, en la nitrilasa de *Rhodococcus sp.*V51B, desplaza a la última valina a la posición 344 de acuerdo al alineamiento. Como resultado ambas secuencias acaban en lisina valina.

En el alineamiento se encontraron posiciones que al ser mutadas aumentarían la identidad del C-terminal de la nitrilasa con respecto al de la CynD. Se plantearon dos mutante sencillas. La primera mutante es la inserción de una lisina en la posición 339 de la proteína, 343 de acuerdo al alineamiento, (K339). La segunda es el cambio de la glicina 338 de la proteína, 342 de acuerdo al alineamiento, por una ácido glutámico. Ambos cambios se encuentran contiguos en la secuencia de la CynD por lo que se diseñó también la mutante doble: G338E+K339. Además se consideró el cambio de la Prolina 331, 345 de acuerdo al alineamiento, por un tirosina, diseñando originalmente una mutante triple: P331Y+G338E+K339.

Sobreexpresión de las mutantes G338E, K339, G338E+K339 y P331Y+G338E+K339

Con la finalidad de obtener las nitrilasas, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con los genes de las 3 nitrilasas mutantes, la inserción K399 y NitCΔ27 dentro del vector de expresión pET24a(+). Se inocularon medios de LB con las bacterias transformadas y se dejaron crecer a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 (D.O.₆₀₀≈0.6). Cuando los medios alcanzaron la densidad óptica deseada, se agregó el inductor IPTG y se dejó induciendo 8 horas a 30 °C. Sin embargo, al momento de romper las células las mutantes G338E+K339 y P331Y+G338E+K339, las proteínas no se encontraban en la fracción soluble. Para aumentar la cantidad de proteína en la fracción soluble, se bajó la temperatura de inducción a 28 °C y se mantuvo el tiempo de inducción.

Al disminuir la temperatura, se aumentó la cantidad de proteína soluble de todas las mutantes, por lo que se decidió usar esta temperatura de ahí en adelante (Figura 11).

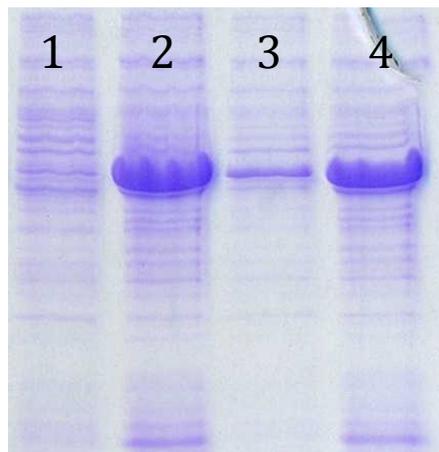


Figura 11. SDS-PAGE de la expresión de la mutante G338E. (1) Células antes de inducir. (2) Células 8 h después de haber agregado IPTG. (3) Células lisadas (4) Sobrenadante de los extractos totales.

Purificación de las mutantes G338E, K339, G338E+K339 y P331Y+G338E+K339

Se usó el protocolo de purificación de Nit Δ 27 en todas las mutantes, ya que las mutantes están diseñadas a partir de Nit Δ 27. El primer paso de la purificación consistió en precipitar la nitrilasa con sulfato de amonio. En el laboratorio ya se había encontrado que la nitrilasa Nit Δ 27 precipita al 20% de saturación de sulfato de amonio. Antes de continuar la purificación las proteínas se centrifugan para separar la proteína precipitada del sobrenadante. Las pastillas recién formadas se suspendieron en dos mililitros de Amortiguador A. El siguiente paso de la purificación consistió en pasar las muestras por una columna de exclusión molecular y se usó la columna Sephacryl S-300 con un volumen aproximado de 50 mL previamente equilibrada con Amortiguador A. Las distintas mutantes empezaron a eluir a los 110 min a un flujo de 0.5 mL/min (Figura 12). Por lo tanto todas las mutantes salieron de la columna poco después de un volumen de columna. Lo que sugiere la formación de oligómeros de gran tamaño al igual que el de Nit Δ 27.

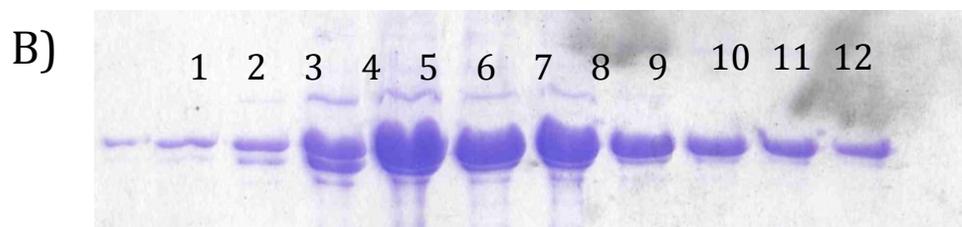
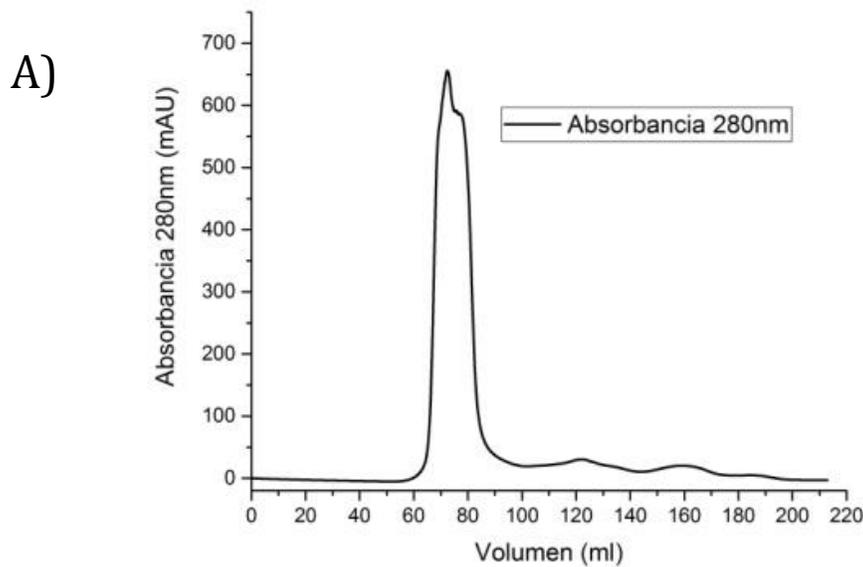


Figura 12. Purificación de la proteínas Nit Δ 27 y las mutantes. A) cromatograma de exclusión de Nit Δ 27 en la columna de exclusión Sephacryl 300. B) SDS-PAGE de la cromatografía de filtración en gel Los carriles 1 al 11 corresponden al primer pico que eluyó entre el mililitro 62 y el mililitro 88. En el carril 12 el mililitro 90. Nótese que el volumen de columna es de 50 mL.

Todas las construcciones incluyendo Nit Δ 27 requirieron otro paso de purificación y consistió en separar las proteínas por su carga. Para ello se usó la columna de intercambio aniónico Source Q. Las fracciones más puras resultantes de la columna S-300 se juntaron y se inyectaron en la columna Source-Q previamente equilibrada con Amortiguador A.

Después de pasar el primer volumen de columna, empezaron a salir todas las proteínas que no se pegaron a la columna. Después se incrementó la fuerza iónica del medio al ir aumentando el porcentaje de Amortiguador B, la cual es una solución idéntica al Amortiguador A, pero con mayor concentración de cloruro de sodio. Todas las nitrilasas eluyeron de la columna a un porcentaje de 35% de Amortiguador B. En la mayoría de las mutantes la resolución de la corrida permitió separar los contaminantes de la nitrilasa (Figura 13).

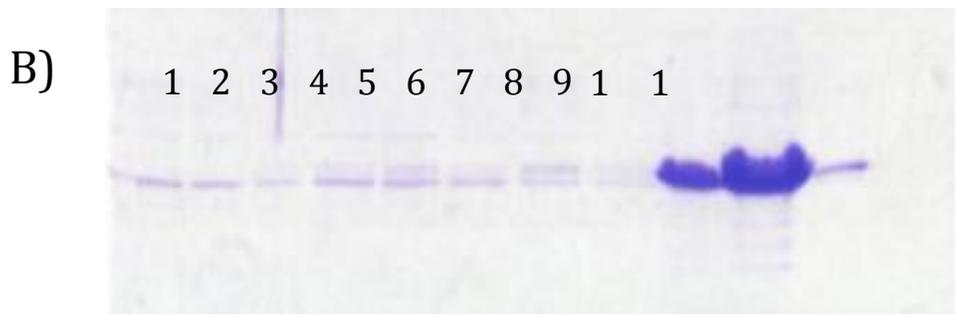
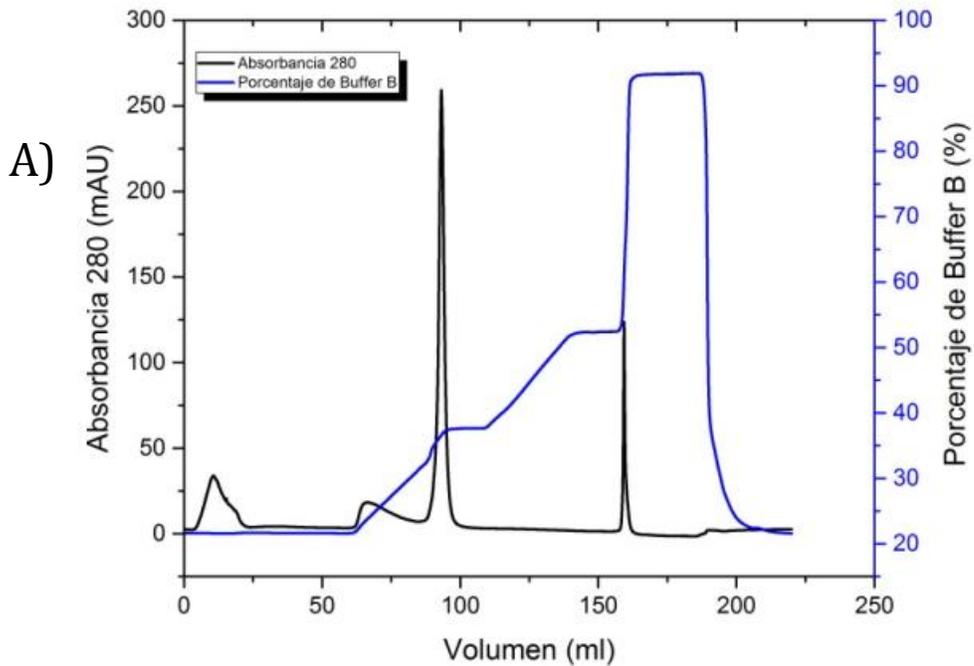


Figura 13. Filtración de las proteínas NitCΔ27 y las mutantes. A) Cromatograma de intercambio anionico empleando la columna Source-Q B) SDS-PAGE de la cromatografía de intercambio aniónico. Los carriles del 1 al 3 corresponden a las fracciones después del primer volumen de columna. Los carriles del 4 al 8 corresponden al aumento gradual en la concentración de sal. Los carriles del 9 al 11 corresponden a las fracciones a 35% de Amortiguador B. El carril corresponde al pico en 100% de Amortiguador B.

En la figura 14 se muestra un gel representativo de cada uno de los pasos de purificación. Al final se obtuvieron todas las mutantes con un alto grado de pureza. Sin embargo, el rendimiento varió significativamente entre mutantes. En un extremo, la mutante triple con un rendimiento de 2.1 miligramos de proteína por litro de cultivo y la mutante K339 con rendimiento de 11.313 miligramos de proteína por litro de cultivo.

35

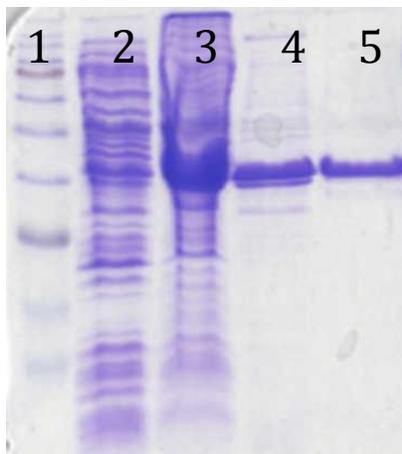


Figura 14. SDS-PAGE de cada uno de los pasos de la purificación (Nit Δ 27). 1) marcador de masa molecular. 2) Células lisadas. 3) Precipitación en sulfato de amonio al 20 %. 4) Muestra después de pasar por la columna S-300 5) Muestra después de pasar por la columna S15Q.

Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que permite estimar de una manera no invasiva, la estructura de las proteínas. La técnica se basa en la absorción diferencial de luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda. Los compuestos quirales, ya sea por tener centros quirales, estar unidos a estos centros quirales o simplemente por su ubicación asimétrica, debido a la estructura, absorben principalmente a determinadas longitudes de onda luz polarizada circularmente a la derecha o a la izquierda. En proteínas, al medir en longitudes de onda iguales o menores a los 240 nm la señal obtenida se debe principalmente al enlace peptídico (Kelly, Jess & Price, 2005).

Para conocer el efecto sobre la estructura secundaria de las mutaciones sobre en el C-terminal se midió el espectro de dicroísmo circular entre 200 nm y los 250 nm. Con la finalidad de comparar los resultados de las mutantes y validar las mediciones, se midió el espectro de la nitrilasa trunca Δ 27. Como se observa en la figura 15, el espectro resultante es idéntico al anteriormente reportado y con los mínimos a 208 nm y a 220 nm, los cuales indican una proteína con una estructura secundaria compuesta de alfas y betas (Gómez, 2016). El espectro obtenido comparte similitudes con los espectros reportados de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku, 2006) y las nitrilasas de *Fusarium solani* IM1196840 y *Fusarium solani* O1 (Vejvoda et al., 2010).

Se obtuvo el espectro de las mutantes hechas a partir de la nitrilasa Nit Δ 27. La mutante sencilla G338E tiene una señal mayor que Nit Δ 27 y conserva los mínimos a 208 y 220 nm. Sin embargo, la inserción K339 tiene una señal menor y pierde el mínimo a 220 nm. La mutante doble, es decir G338E+K339, tiene un espectro más cercano al de K339 que al de G338E o Nit Δ 27. No obstante la mutante doble mantiene su mínimo a 220 nm. Lo cual indica que la inserción de una lisina en posición 339 provoca la pérdida de estructura secundaria y probablemente, la pérdida de estructura secundaria de la mutante G338+K339 también se deba a la inserción K339. Por último la mutante triple, P331Y+G338E+K339, pierde los dos mínimos y la intensidad de la señal se ve reducida. Probablemente, la mutante triple ha perdido parte de su estructura.

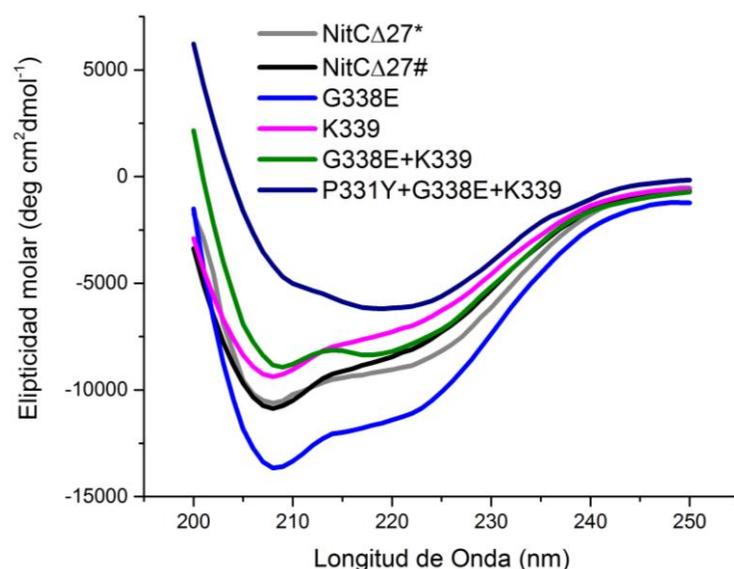


Figura 15. Espectro de CD en el UV lejano de NitCΔ27 y sus mutantes derivadas. El espectro obtenido es el promedio de 5 mediciones. NitCΔ27* es el espectro previamente reportado de NitCΔ27 (Gómez, 2016). NitCΔ27# es el espectro obtenido en este proyecto de NitCΔ27.

Para estimar el porcentaje de estructura secundaria a partir de los espectros de dicroísmo circular, se deconvolucionaron los espectros usando el programa CDPro (Tabla 4). El programa CDPro compara el espectro entrante con una base de datos con espectros de proteínas cuyas estructuras se han resuelto por cristalografía. Los porcentajes entregados son los de la proteína cuyo espectro mejor se ajusta a los datos.

Tabla 4. Porcentajes de estructura secundaria.

Mutante	Hélices alfa	Hebras beta	Giros	Desordenadas
NitCΔ27 *	30.1±0.7	20.5±0.4	21.0±0.3	28.2±0.4
NitCΔ27 #	28.1±1.0	19.6±0.8	22.8±0.3	29.1±0.6
G338E	37.3±1.4	15.1±0.9	22.6±2.1	25.4±0.8
K339	25.9±1	26.2±2.3	20.2±0.4	26.3±7.6
G338E+K339	27.8±0.8	25.4±1.9	21.1±0.3	26.1±2.2
P331Y+G338E+K339	17.4±0.6	30.7±1.1	22.3±2.3	30.7±2.0

Los espectros de CD se deconvolucionaron usando el paquete de programas CDPro. El resultado mostrado es el promedio de los programas CDSSTR, ContinLL y SELCON3 incluidos en el paquete. NitCΔ27* es el espectro previamente reportado de NitCΔ27 (Gómez, 2016). NitCΔ27# es el espectro obtenido en este proyecto de NitCΔ27.

El porcentaje obtenido de giros y estructuras desordenadas en todas las mutantes prácticamente no varía, con excepción de la mutante triple (P331Y+G338E+K339). Los porcentajes de las dos mediciones NitCΔ27 son bastante similares, lo cual ya era esperado dado la similitud entre los dos espectros. Curiosamente K339 y G338E+K339 son más similares entre ellas que con otras mutantes con aproximadamente 27% de hélices alfa y 25% de hebras beta. En los extremos se encuentran G338E y P331Y+G338E+K339, el primero con un elevado porcentaje de hélices alfa 37% y el último con un porcentaje menor de hélices alfa, 17% aproximadamente. La ganancia de

hélices alfa en G338E está acompañada con la pérdida de hebras beta, de la misma manera en P331Y+G338E+K339 la pérdida de hélices alfa está acompañado de la ganancia en hebras beta (Tabla 4).

Desplegamiento térmico

Para evaluar la estabilidad térmica de las mutantes se siguió el despliegamiento térmico de las mutantes por medio de CD (Figura 16). En la mayoría de las mutantes se siguió la pérdida de estructura secundaria midiendo a 208 nm, ya que es el mínimo global y por lo tanto se espera que tenga la transición más marcada. Sin embargo, en la mutante triple, P331Y+G338E+K339, la transición se midió a 220 nm, ya que se perdió el mínimo a 208 nm.

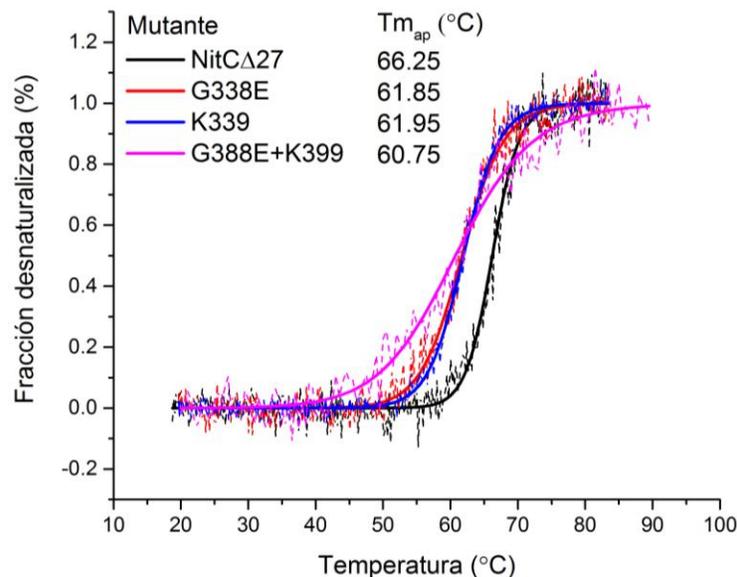


Figura 16. Transiciones térmicas de despliegamiento entre los 20 °C y los 90 °C 0.2 mg/ml. La mutante triple no presentó una transición en el intervalo observado, aunque la señal va disminuyendo conforme se aumenta la temperatura. En línea punteada los datos de despliegamiento y en línea continua las transiciones ajustadas con el modelo de van't Hoff.

Ninguna de las proteínas tuvo un despliegamiento reversible, por lo que no se pudo estimar de manera exacta los parámetros termodinámicos. Aun así, los despliegamientos térmicos se ajustaron con el modelo de van't Hoff y se calculó las temperaturas medias de desnaturalización aparentes ($T_{m_{ap}}$) de las mutantes. Ya que la mutante triple no tiene una transición, no se intentó obtener sus parámetros termodinámicos. Sin embargo, la intensidad de la señal disminuyó conforme se aumentó la temperatura. Los datos del despliegamiento térmico junto con los de CD indican la pérdida de estructura de la mutante triple. El resto de las mutantes estudiadas sí presentaron una transición al aumentar la temperatura y se pudieron estudiar. Las mutantes sencillas, G338E y K339, tienen Tms similares, aunque menores a NitCΔ27. La mutante doble, G338E+K339, también tiene una Tm menor que NitCΔ27 y su transición es menos cooperativa que NitCΔ27. El intervalo en el que se lleva la transición de G338E+K339 es de aproximadamente 50 °C. Lo cual indica que G338E+K339, G338E y K339 tienen una menor estabilidad térmica con respecto a NitCΔ27.

Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz se basa en las variaciones de la intensidad causadas por el movimiento Browniano. La frecuencia de las fluctuaciones en la intensidad de la luz es inversamente proporcional al radio de las partículas. Las partículas de menor tamaño se mueven más rápido, por lo tanto tienen fluctuaciones con mayor frecuencia que partículas de mayor tamaño. De la misma manera las partículas más grandes son más lentas y sus fluctuaciones en la intensidad son menos frecuentes. Es importante notar que las partículas se ajustan a una esfera, sea o no una esfera. Con el equipo Zetasizer® se puede estimar el radio hidrodinámico (R_h) de partículas en solución en el rango de 0.3 nm a 0.5 μm .

Para conocer el efecto de las mutaciones en el tamaño de los oligómeros, se estimó el tamaño de estos por medio de dispersión dinámica de luz. Todas las mutantes se distribuyeron principalmente en un pico y tuvieron una polidispersidad menor al 20% por lo que son bastante homogéneas. Las mutantes K339 y G338E tienen tamaños similares y a la vez mayores a NitC Δ 27. Sin embargo, la combinación de ambas mutaciones, G338E+K339, es más cercano a NitC Δ 27 que a cualquiera de las mutantes sencillas que la forman. P331Y+G338E+K339 forma agregados mucho mayores que el resto de las mutantes y es la única con toda su masa en un solo pico (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de dispersión dinámica de luz.

Mutante	R_h (nm)	Polidispersidad %	Masa %
NitC Δ 27	7.1 \pm 0.7	9.9	93.7
K339	12.3 \pm 1.7	13.5	95.8
G338E	10.2 \pm 1.0	9.8	96.6
G338E+K339	6.2 \pm 0.7	11.8	98.2
P331Y+G338E+K339	68.0 \pm 3.7	16.6	100

Actividad catalítica

El objetivo principal del proyecto fue incrementar la actividad de la enzima trunca NitC Δ 27 a través de mutaciones puntuales. Por medio de un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Berthelot se midió la concentración de amonio, uno de los productos de la reacción de la nitrilasa. Las actividades específicas se midieron al inicio a 10 min, con 0.005 mg de enzima y a una concentración de 1 mM de benzonitrilo. Sin embargo, los valores de actividad obtenidos fueron muy cercanos al límite superior del ensayo, es decir 20000 $\mu\text{mol NH}_4 \text{ min}^{-1} \text{ mg (proteína)}^{-1}$. Para poder estimar de manera apropiada la actividad específica, se mido la actividad con solo 2.5 μg de enzima a 5 y 10 min. La tabla 6 presenta las actividades específicas de todas las mutantes y la actividad relativa con respecto a NitC Δ 27. Las actividades presentadas son el promedio de dos triplicados, uno a 5 min y otro a 10 min.

Tabla 6. Actividad específica de NitCΔ27 y de las mutantes K339, G338E, K339+G338E y P331Y+G338E+K339.

Mutante	Actividad específica*	Actividad relativa (%) #
NitCΔ27	24073±165.7	100
K339	27815±1615.9	115.5
G338E	27578±192.8	114.6
G338E+K339	10913±280.5	45.3
P331Y+G338E+K339	ND	ND

*La actividad específica se calculó como $\mu\text{mol NH}_4 \text{ min}^{-1} \text{ mg (proteína)}^{-1}$. # La actividad de específica de todas se normalizo contra NitCΔ27. ND actividad específica no detectada.

Todas las mutantes sencillas, K339 y G338E, tuvieron un incremento en la actividad. En todos los experimentos han quedado agrupados los dos mutantes. Sin embargo, la mutante doble, es decir la unión de las dos mutantes sencillas, perdió parte de su actividad. A pesar de que las mutaciones individualmente confieren mayor tamaño y actividad, juntas tienen el efecto contrario. Los primeros ensayos con la mutante triple, P331Y+G338E+K339, no dieron muestra de actividad. Entonces se incrementó la cantidad de enzima en la reacción a 25 μg y el tiempo de reacción se incrementó a 30 min. Aun así, no se observó actividad. Que la mutante triple no sea activa, es congruente con los datos de CD, desplegamiento térmico y DLS. Ya que la mutante triple, P331Y+G338E+K339, tiene una mutación más que la doble, G338E+K339, y la mutante doble es menos activa que NitCΔ27, no se puede deducir si la inactividad es debida solamente a la mutación puntual P331Y o a su combinación con las otras dos mutaciones ya presentes.

Creación de las mutantes sencillas

Para poder responder si la inactividad y la pérdida de estructura se deben únicamente al cambio de la prolina 331 por una tirosina, se creó la mutante sencilla prolina 331 por una tirosina (P331Y). Para observar el efecto de otros cambios más conservados en la posición 331, se creó la mutante prolina 331 por alanina (P331A).

Diseño de las mutantes

Se diseñaron oligos complementarios de 31 bases de longitud en los que 28 o 29 bases son complementarias a la secuencia de la nitrilasa y los demás permiten el cambio de codon. Con el servidor en línea “Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator” se estimó su temperatura de fusión del DNA. Además con el mismo servidor se confirmó la ausencia de hairpins o de auto complementariedad. Posteriormente se comprobó que los oligos solo tuvieran afinidad por su secuencia blanco usando el programa SnapGene Viewer (Figura 17).

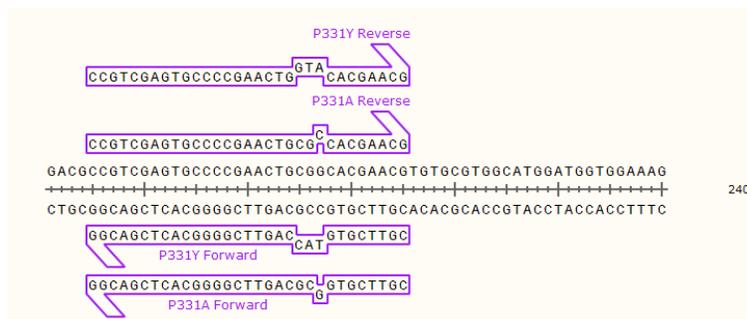


Figura 17. Oligonucleótidos para la mutagénesis. Los oligos sobre la posición a la que son complementarios y las bases diferentes.

Extracción de DNA y doble digestión

Antes de hacer el PCR se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α con el gen NitC Δ 27 dentro del vector pET24a(+) y se purificó el plásmido por el método de minipreparación de DNA plasmídico por lisis alcalina. Para comprobar que el plásmido aislado tiene un gen se realizó un ensayo de doble digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Nde*I, las cuales rodean al gen NitC Δ 27. Se realizaron digestiones con *Hind*III y *Nde*I por separado y juntas (Figura 18). Antes de las digestiones se observan muchas bandas indicando distintas formas de DNA superenrollado. Al digerir con solamente una de las enzimas de restricción se obtiene un fragmento lineal de aproximadamente 6 kb, el cual corresponde al plásmido más el gen (6269 pb). Al digerir con las dos enzimas de restricción se ve un fragmento de aproximadamente 5 kb que corresponde al plásmido pET24 a (+) (5246 pb) y una banda de aproximadamente 1 kb que corresponde al gen NitC Δ 27 (1023 pb).

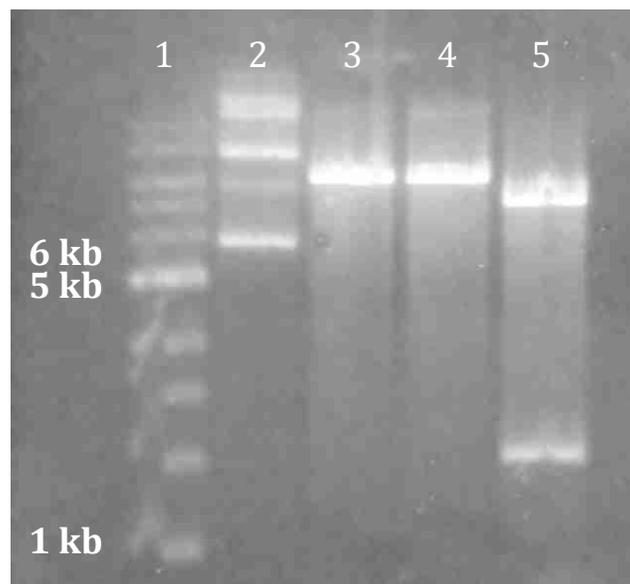


Figura 18. Digestiones del plásmido pET24 a (+) con la nitrilasa NitC Δ 27. (1) marcador de masa molecular. (2) El plásmido sin digerir. (3) Digestión del plásmido con la enzima de restricción *Hind*III. (4) Digestión del plásmido con la enzima de restricción *Nde*I. En ambos carriles aparece solo una banda de aproximadamente 6 kb (5) Plásmido digerido con *Hind*III y *Nde*I. En este carril aparecen dos bandas de aproximadamente 1 kb y de aproximadamente 5 kb.

PCR

Se logró amplificar las dos construcciones a dos concentraciones distintas de MgSO $_4$ 2 mM y 3 mM. En la figura 19 se muestra el producto de PCR de P331A y P331Y. Al final del PCR se obtuvo una mezcla de DNAs proveniente del DNA usado como templado y del DNA producido en la reacción, siendo este último el de interés, ya que tiene las mutaciones deseadas. Para eliminar de esa mezcla el templado se usó una enzima de restricción sensible a la metilación, es decir solo digiere DNA metilado. El templado fue aislado de una bacteria que metila el DNA, por lo tanto es

degradado. En cambio, el DNA procedente del PCR no tiene ninguna marca, por lo tanto no es degradado. De esta manera se evita transformar bacterias con el de la nitrilasa Nit Δ 27.

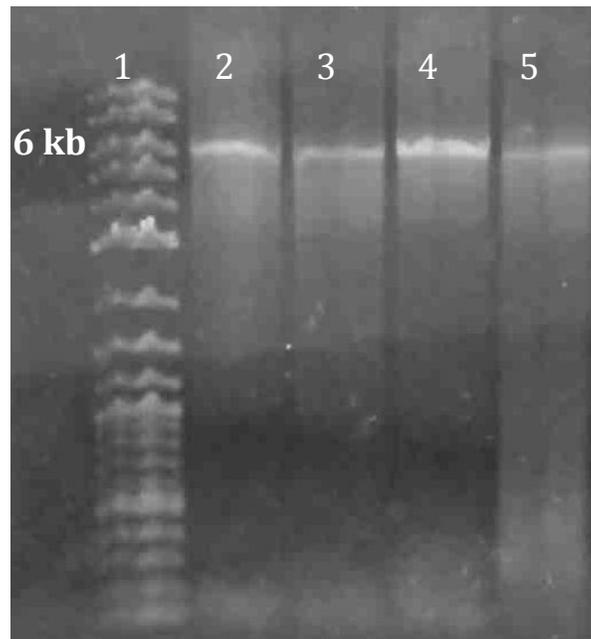


Figura 19. Plásmidos amplificados por PCR. (1) Marcador de masa molecular. (2) Plásmido amplificado de la mutante P331A a una concentración de 2 mM de $MgSO_4$. (3) Plásmido amplificado de la mutante P331A a una concentración de 3 mM de $MgSO_4$. (4) Plásmido amplificado de la mutante P331Y a una concentración de 2 mM de $MgSO_4$. (5) Plásmido amplificado de la mutante P331Y a una concentración de 3 mM de $MgSO_4$. En la parte inferior de los carriles 2, 3, 4 y 5 se ven los oligos.

Para obtener más DNA se transformaron células DH5 α con el DNA no metilado. Las bacterias se dejaron crecer en medio Lb sólido adicionadas con Kanamicina. Después se inocularon tubos con medio LB. Cada tubo se inoculo con una colonia diferente. Al día siguiente se extrajo DNA de los cultivos por medio del kit “QIAprep Miniprep Kit”, el cual no usa fenol. El DNA extraído se mando a secuenciar en ambos sentidos, para comprobar la presencia de las mutaciones deseadas y la ausencia de otras mutaciones adicionales. Las secuencias de las mutantes se analizaron en el programa SnapGene Viewer y se comprobó la presencia de la mutación deseada y la ausencia de otras mutaciones.

Transformación y sobreexpresión

Se transformaron células electrocompetentes BL21 (DE3) pLys con los plásmido con las mutantes P331A y P331Y dentro de los vectores de expresión pET24a(+). Después se inocularon medios LB para sobreexpresar las proteínas. Ambas construcciones se pudieron sobreexpresar en las mismas condiciones que las mutantes anteriores (Figura 20). Solo la mutante P331Y tuvo una expresión menor, parecida a la expresión de la mutante triple.

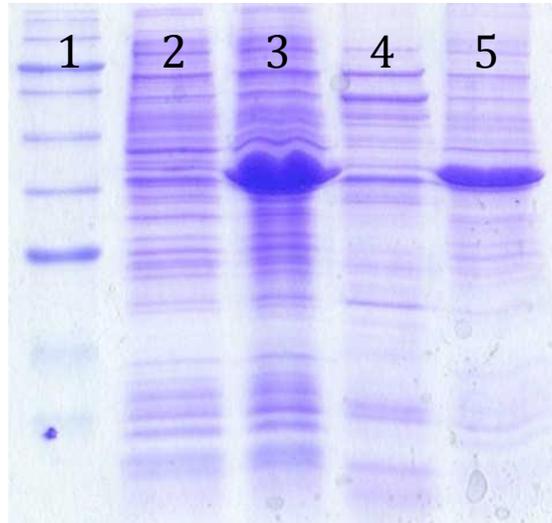


Figura 20. SDS-PAGE de la expresión de la mutante P331A. (1) Marcador de masa molecular (2) Células antes de inducir. (3) Células 8 h después de haber agregado IPTG. (4) Extracto total de las células lisadas. (5) Sobrenadante de los extractos totales.

Purificación

Para purificar las nuevas mutantes se empleó el mismo protocolo usado con las otras mutantes, ya que todas las mutantes anteriores se pudieron purificar con este protocolo. Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 20% de saturación. Después de 2 días se centrifugaron los cultivos. La pastilla resultante se resuspendió con Amortiguador A se inyectó en la columna de filtración en gel S-300. Las fracciones con mayor pureza se juntaron y concentraron, antes de inyectarse en la columna de intercambio aniónico Source Q. Al final del último paso de purificación se obtuvo la proteína en alto grado de pureza (Figura 21).

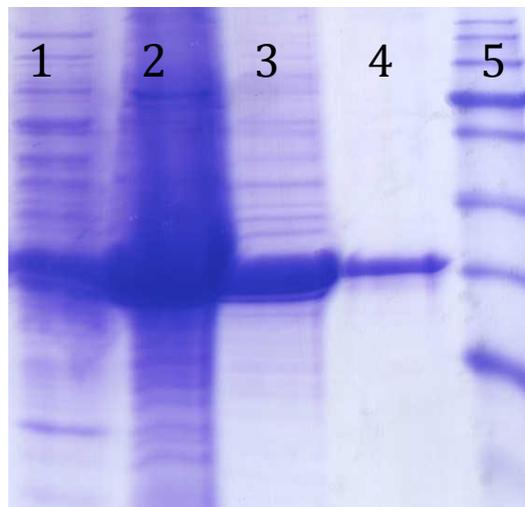


Figura 21. SDS-PAGE de cada uno de los pasos de la purificación (P331A). 1) marcador de masa molecular. 2) Células lisadas. 3) Precipitación en sulfato de amonio al 20 %. 4) Muestra después de pasar por la columna S-300 5) Muestra después de pasar por la columna S15Q.

Dicroísmo Circular

Para conocer el efecto del cambio de la prolina 331 sobre la estructura secundaria y explicar las características bioquímicas de la mutante P331Y+G338E+K339 se midió el espectro de dicroísmo circular de las mutantes sencillas P331A y P331Y. Los cambios en la posición 331 parece tener un efecto negativo sobre la estructura secundaria, en ambas mutantes se pierde parcialmente el mínimo a 208. Sin embargo, el efecto es más marcado en la mutante P331Y, el cual tiene un espectro muy similar al de P331Y+G338E+K339 (Figura 22).

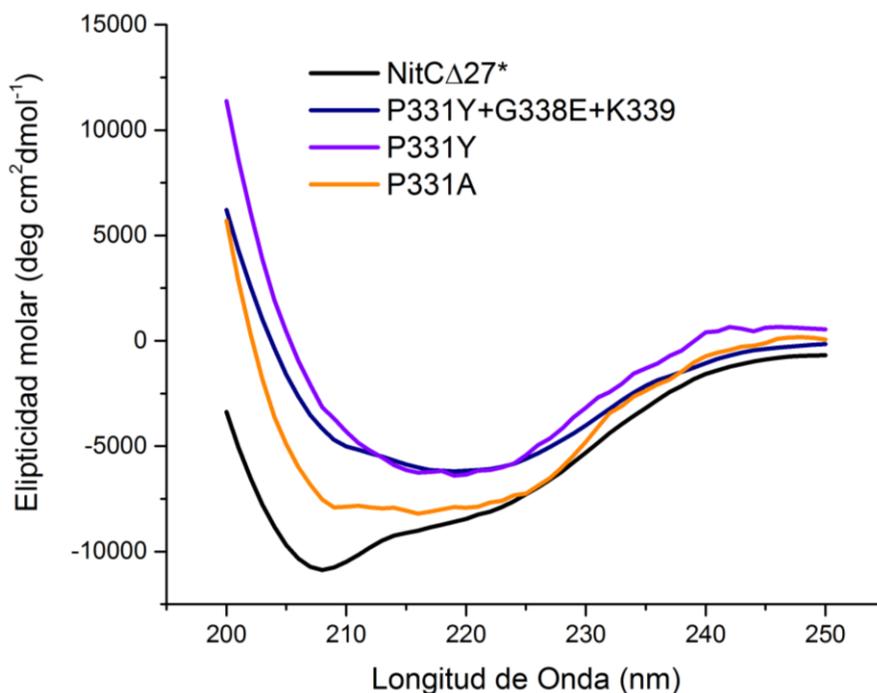


Figura 22. Espectro de CD en el UV lejano de la nitrilasa trunca NitC Δ 27 y las mutantes en la posición 331. El espectro obtenido es el promedio de 5 mediciones.

A partir de los espectros de dicroísmo circular se pueden obtener los porcentajes de estructura secundaria de las mutantes. En los porcentajes de las mutantes sencillas en la posición 331 se observa la misma tendencia que en las mutantes anteriores. Los porcentajes de giros y estructuras desordenadas en todas las mutantes no variaron significativamente. La pérdida en estructura de hélices alfa vienen acompañados de pérdidas en hebras beta (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de estructura secundaria.

	Hélices alfa	Hebras beta	Giros	Desordenado
NitCΔ27	28.1 \pm 1.0	19.6 \pm 0.8	22.8 \pm 0.3	29.1 \pm 0.6
P331A	24.5 \pm 1.1	23.8 \pm 1.4	21.4 \pm 1.2	29.1 \pm 0.4
P331Y	17.1 \pm 0.9	33.0 \pm 1.4	20.1 \pm 1.2	28.6 \pm 1.9
G338E+K339+P331Y	17.4 \pm 0.6	30.7 \pm 1.1	22.3 \pm 2.3	30.7 \pm 2.0

Los espectros de CD se deconvolucionaron usando el paquete de programas CDPro. El resultado mostrado es el promedio de los programas CDSSTR, ContinLL y SELCON3 incluidos en el paquete.

Es importante notar que P331Y tiene porcentajes de estructura secundaria cercanos a los porcentajes G338E+K339+P331Y. P331A también pierde estructura hélices alfa, sin embargo está dentro del rango de otras mutantes activas.

Desplegamiento térmico

Para evaluar la estabilidad térmica de las mutantes con cambio en la posición 331 se monitoreó el despliegamiento térmico de las mutantes (Figura 23). El despliegamiento térmico de P331A se siguió a 208 nm mientras el despliegamiento térmico de P331Y se siguió a 220 nm.

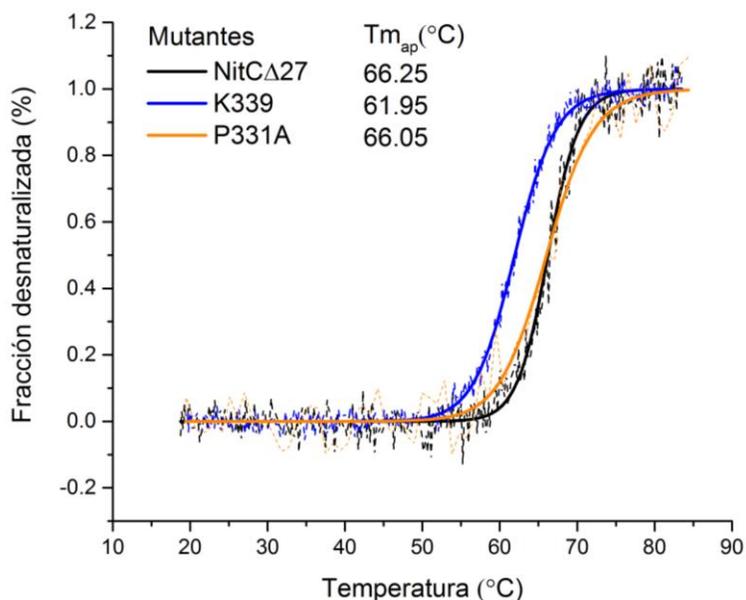


Figura 23. Transiciones térmicas de despliegamiento entre los 293.15k (20 °C) y los 363.15k (90 °C). A) Transiciones de todas las mutantes antes de ser ajustada. La mutante triple no presentó una transición en el intervalo observado, aunque la señal va disminuyendo conforme se aumenta la temperatura. B) Transiciones ajustadas con el modelo de van't Hoff. En línea punteada los datos de despliegamiento y en línea continua el ajuste.

La mutante P331Y no presentó una transición al aumentar la temperatura al igual que la mutante P331Y+G338E+K339. Sin embargo, la mutante P331A presentó una transición cooperativa y una T_m similar a la de NitC Δ 27. Esto indica que la mutación de la prolina 331 por tirosina es la responsable de una transición térmica cooperativa. A pesar de que la transición P331A no es reversible los datos se ajustaron con el modelo de van't Hoff y se calculó las temperatura medias de desnaturalización aparentes ($T_{m_{ap}}$) de P331A. A diferencia que G338E y K399, P331A tiene una T_m similar a NitC Δ 27, por lo tanto es más estable que G338E y K399.

Dispersión dinámica de luz

Para conocer el efecto de la posición 331 en el tamaño de los oligómeros, se estimó el radio hidrodinámico por DLS. P331Y al igual que P331Y+G338E+K339 forma agregados de gran tamaño, los cuales están formados por casi la totalidad de la masa de la muestra. Sin embargo, P331A se distribuye en dos picos uno gran tamaño, similar al de P331Y y otro de aproximadamente el doble

de NitCΔ27 y cercano al tamaño de las mutantes sencillas. Además, es la única muestra con una polidispersidad mayor al 20% (Tabla 8).

Tabla 8. Datos de dispersión dinámica de luz.

Mutante	R _h (nm)	Polidispersidad %	Masa %
NitCΔ27	7.1±0.7	9.9	93.7
K339	12.3±1.7	13.5	95.8
P331A	14.8±1.9	12.9	24.2
	56.6±20.5	32.5	75.8
P331Y	47.0±3.7	7.9	100
P331Y+G338E+K339	68.0±3.7	16.6	100

Actividad catalítica

Para conocer si el cambio de la posición 331 disminuye la actividad a los niveles de la mutante P331Y+G338E+K339. La actividad de las mutantes se midió por triplicado con 2.5 μg de enzima a 5 y 10 min. Las mutaciones en la posición 331 disminuyen la actividad específica de las enzimas. El cambio más marcado se presenta en la mutante P331Y, la cual solo conserva 0.5% de la actividad. Sin embargo, la mutante P331A conserva alrededor del 50% de la actividad (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad específica de NitCΔ27 y de las mutantes P331A, P331Y y P331Y+K339+G338E.

	Actividad específica*	Actividad Relativa (%)#
NitCΔ27	24073±166	100
G338E+K339	10913±280.5	45.3
P331A	11046±373	45.9
P331Y	123±40	0.5
Triple	ND	ND

*La actividad específica se calculó como μmol NH₄ min⁻¹ mg (proteína)⁻¹. # La actividad de específica de todas se normalizo contra NitCΔ27. ND actividad no detectada.

La mutante P331Y pierde la mayor parte de su actividad, conservando solamente un 0.5% de la actividad de la NitCΔ27. En cuanto a estructura la señal de dicroísmo circular y los porcentajes de estructura secundaria son muy similares a la triple mutante. Además no presenta una transición térmica y tiende a formar agregados de gran tamaño. Lo cual parece indicar que el cambio de prolina por tirosina es la responsable de la mayor parte de las características bioquímicas observadas en la mutante P331Y+G338E+K339.

La mutación de la prolina 331 por un alanina, también tiene efectos sobre la estructura y la actividad. La enzima se encuentra dividida en dos poblaciones de distinto tamaño. La población de mayor tamaño tiene un radio hidrodinámico mucho mayor al de las mutantes activas. Sin embargo, su tamaño es comparable al de los agregados inactivos de P331Y. Por el otro lado, la población de menor tamaño tiene un radio hidrodinámico cercano a las mutantes G338E y K339. Si las dos poblaciones se comportan como las mutantes con el mismo tamaño, la población de menor tamaño es activa, mientras que la población de mayor tamaño es inactiva, lo cual explicaría la disminución en la actividad catalítica.

Cambio de pH e incubaciones

Se ha demostrado que la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 es inactiva a pH menor a 6 (Kobayashi, Nagasawa & Yamada, 1989). Sin embargo, la CynD de *B. pumilus* C1 es activa a pH 5.4 (Jandhyala et al., 2005). Como las mutaciones están diseñadas en base a la CynD de *B. pumilus* C1 se pensó que las mutantes pudieran presentar actividad a pH 5.4. Sin embargo, las mutantes y la NitCΔ27 fueron inactivas a pH 5.4. Para saber si la inactivación por pH es un proceso reversible y como afecta la recuperación de la actividad, se realizaron incubaciones en amortiguador de citratos a pH 5.4, a 30 °C, y se determinó la actividad residual regresando las enzimas a pH 7.8. En la figura 24 se presenta la actividad residual de las enzimas al incubar a pH 5.4. Hasta el minuto 15 tanto las mutantes G338E y K339 como NitCΔ27 mantienen su actividad al incubar a pH 5.4. Sin embargo, a los 30 min NitCΔ27 pierde aproximadamente la mitad de su actividad. Lo que indica que las mutantes G338E y K339 son más estables.

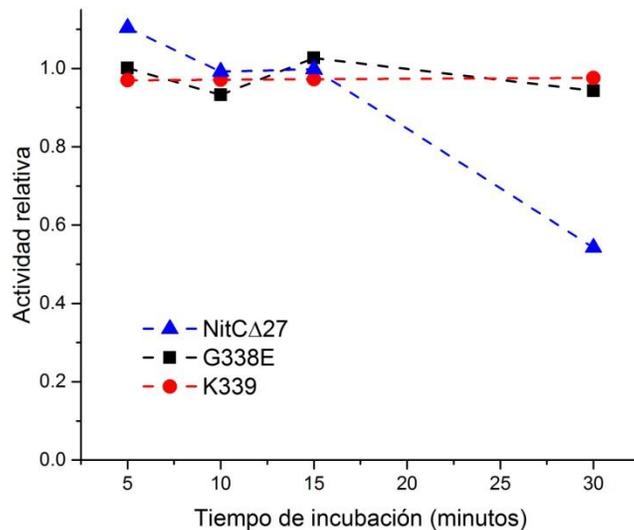


Figura 24. Incubaciones a pH 5.4 de NitCΔ27 y las mutantes G338E y K339. Se presenta la actividad relativa de cada una de las mutantes.

Modelo computacional

Se creó un modelo por homología de la nitrilasa NitCΔ27 en el servicio I-TASSER, para explicar el efecto de las mutaciones sobre la estructura de la nitrilasa. Debido a la falta de estructuras resueltas de nitrilasas y a la poca identidad entre NitCΔ27 y las estructuras resueltas, el modelo se basó principalmente en la estructura de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY). A nivel de estructura primaria las nitrilasas del género *Rhodococcus* tiene solo una inserción de 5 aminoácidos con respecto a la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803. Sin embargo, el género *Rhodococcus* tiene un C-terminal extendido. Además en la estructura de *Syechocystis* sp. PCC6803 los últimos 56 residuos no se pudieron resolver, ya que un corte proteolítico los eliminó (Figura 25).

Descripción del modelo

La estructura del modelo está formada por 13 hélices alfa y 11 hebras beta. La parte globular del modelo se asemeja a la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY), aunque el C-terminal de NitCΔ27 es más largo (Figura 25). El C-terminal del modelo se proyecta fuera de la parte globular, se entrelaza con el C-terminal del otro monómero y al final regresa al interior de la parte globular, cerca del sitio activo (Figura 26). Incluso se llega a formar un puente de hidrógeno entre la N-amida de la arginina 130 y el carboxilo de la leucina 336. Esta interacción es importante, porque la arginina 130 está al lado de la lisina 130, la lisina catalítica. En las amidasas, cuyas estructuras están resueltas, el C-terminal tiene un patrón similar al modelo de NitCΔ27 (Andrade et al., 2007) (Hung et al., 2007) (Kimani et al., 2007). Sin embargo, el porcentaje de hélices alfa es menor y la mayor parte del C-terminal está formada por giros y estructuras desordenadas.

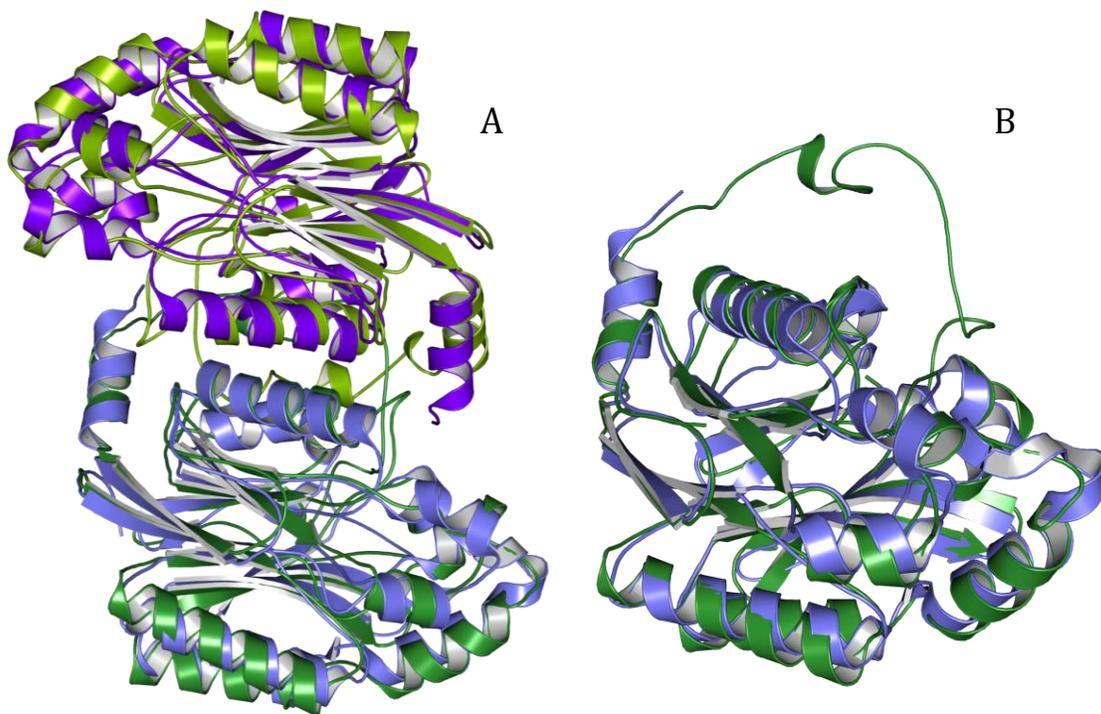


Figura 25. Comparación de las estructuras la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) en azul y el modelos hecho por homología de nitrilasa *Rhodococcus* sp. V51B NitCΔ27 en verde.

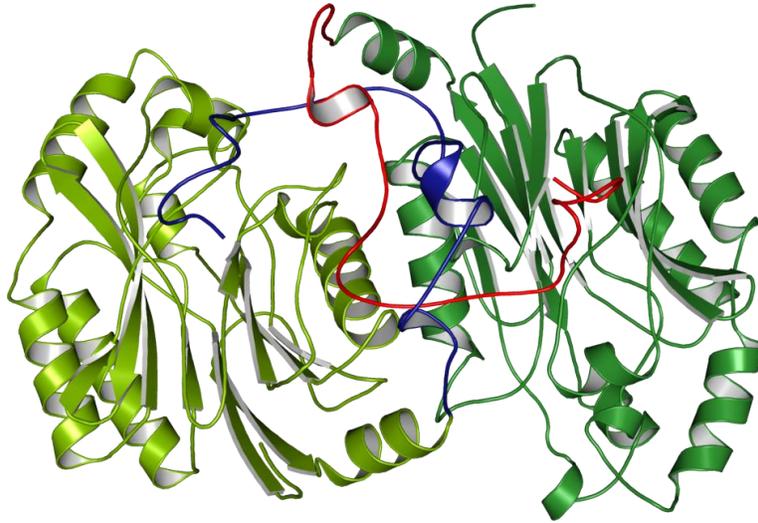


Figura 26 Dímero de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B Nit Δ 27. Los C-terminal están resaltados en otro color. El monómero A con C-terminal azul y el monómero B con C-terminal rojo. Nótese como se entrelazan entre ellos antes de regresar a la parte globular.

Para darle más soporte al modelo, se compararon las frecuencias de elementos de estructura secundaria del modelo con las frecuencias obtenidas experimentalmente por dicroísmo circular (CD) y las frecuencias de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia de aminoácidos en alfas, betas y otras conformaciones.

	Frecuencia (modelo)		Frecuencia (CD)		Frecuencia (3wuy)	
	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
Helices alfa	94	27.7%	95.15	28.1%	107	37.7%
Hojas beta	66	19.5%	66.44	19.6%	69	24.0%
Otras	179	52.8%	176.05	51.93%	111	38.7%

Se comparan las frecuencias de elementos de estructura secundaria del modelo con las frecuencias obtenidas después de la deconvolución de los datos de dicroísmo circular (CD).

Usando la prueba no paramétrica chi cuadrada (χ^2), para comparar las frecuencias absolutas del modelo y las frecuencias absolutas obtenidas por dicroísmos circular, se encontró que son iguales estadísticamente ($p < 0.05$).

Modelo computacional de las mutantes

Para observar el efecto de las mutaciones sencillas en la estructura de Nit Δ 27, se realizaron las mutaciones en el modelo de Nit Δ 27. Las mutantes sencillas, P331Y, P331A y G338E, se pudieron modelar, pero K339 al ser una inserción no se pudo modelar de esta manera. Las mutantes G338E+K339 y P331Y+G338E+K339 tampoco pudieron ser modeladas, porque dependen de la mutante K339.

P331A

Al mutar la prolina 331 por una alanina en el modelo no se observan cambios importantes en la estructura secundaria y terciaria, incluido las proximidades de la mutación (Figura 27). Sin embargo, se observa la ruptura de un puente de hidrógeno en las proximidades de la posición 331. En NitC Δ 27 el C-carbonilo de la valina 330 forma un puente de hidrógeno con la amina de la glutamina 332. Al cambiar la prolina por alanina, el grupo carbonilo se aleja de la N-amida, rompiendo el puente de hidrógeno (Figura 28).

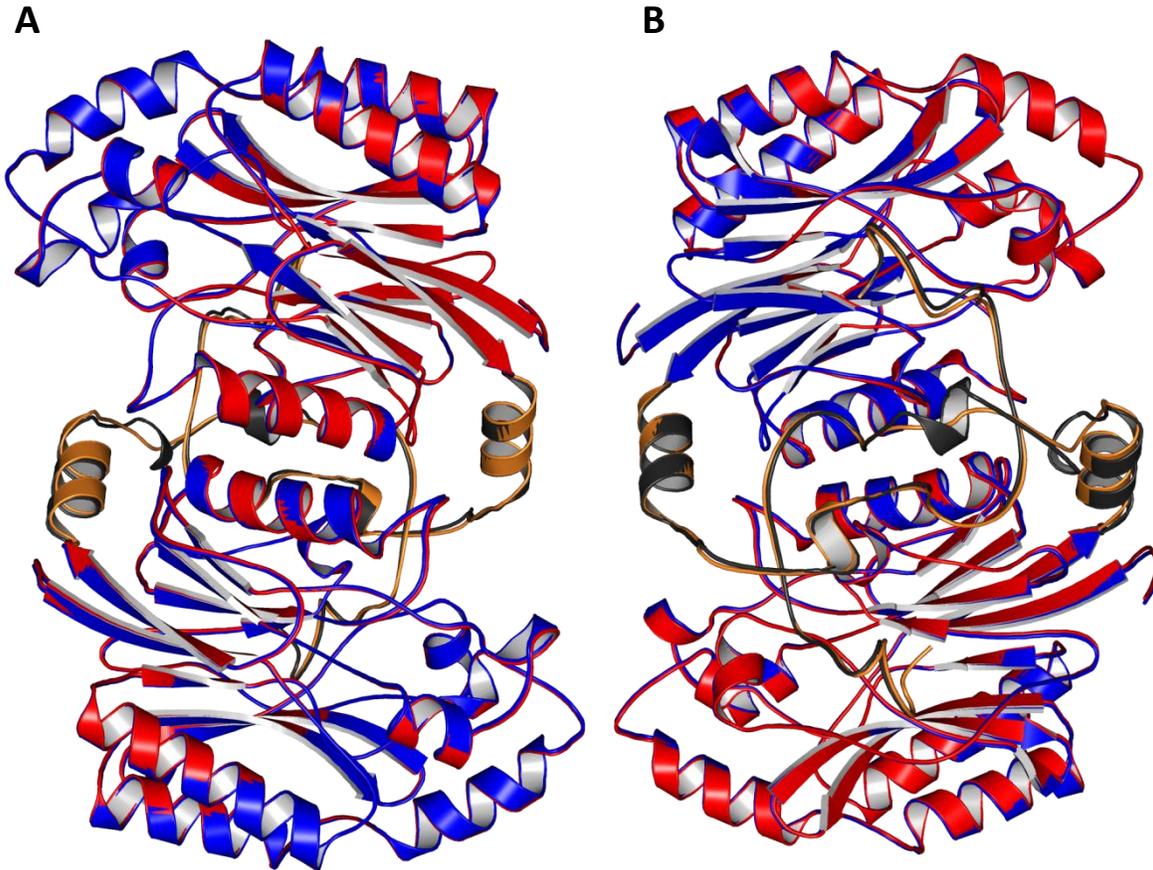


Figura 27. Comparación de las estructuras NitC Δ 27 y P331A. En azul con el C-terminal en negro NitC Δ 27 y en rojo con el C-terminal en naranja P331A. A) Vista frontal. B) Vista del reverso.

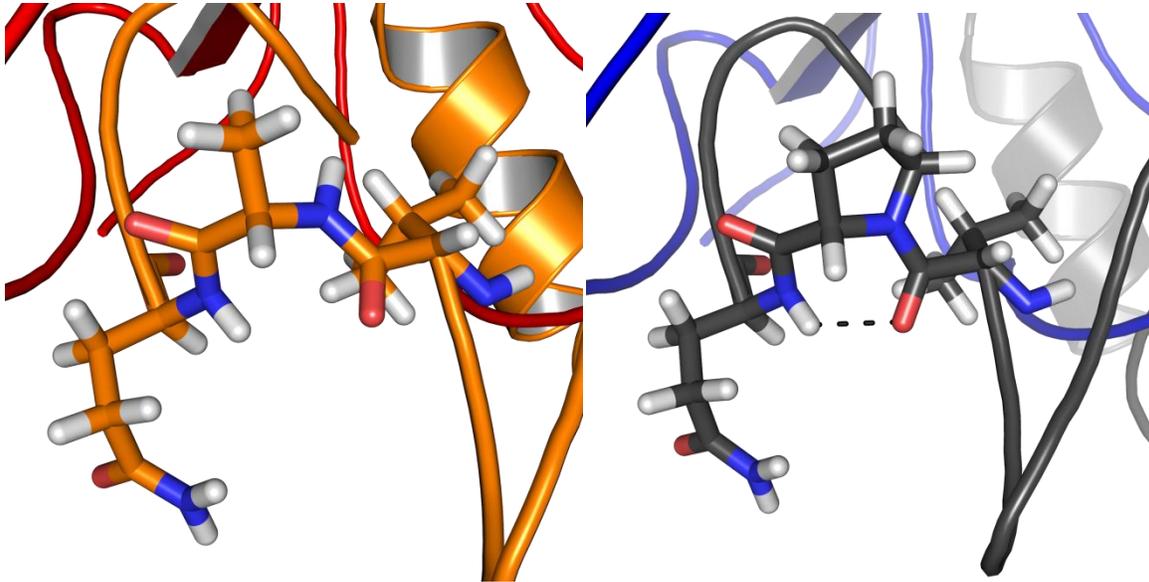


Figura 28. Comparación de la posición 331 de la mutante P331A y NitC Δ 27. Se representa el puente de H entre la V330 y la Q332 en NitC Δ 27.

P331Y

Al igual que en la mutante anterior el modelo no sufrió cambios importantes en la estructura secundaria y terciaria, incluido las proximidades de la mutación (Figura 29). De la misma manera el puente de hidrógeno entre la valina 330 y la glutamina 332 se rompe al mutar la posición (Figura 30). En este la tirosina 331 se proyecta fuera del interior de la proteína y expone su grupo hidroxilo al solvente.

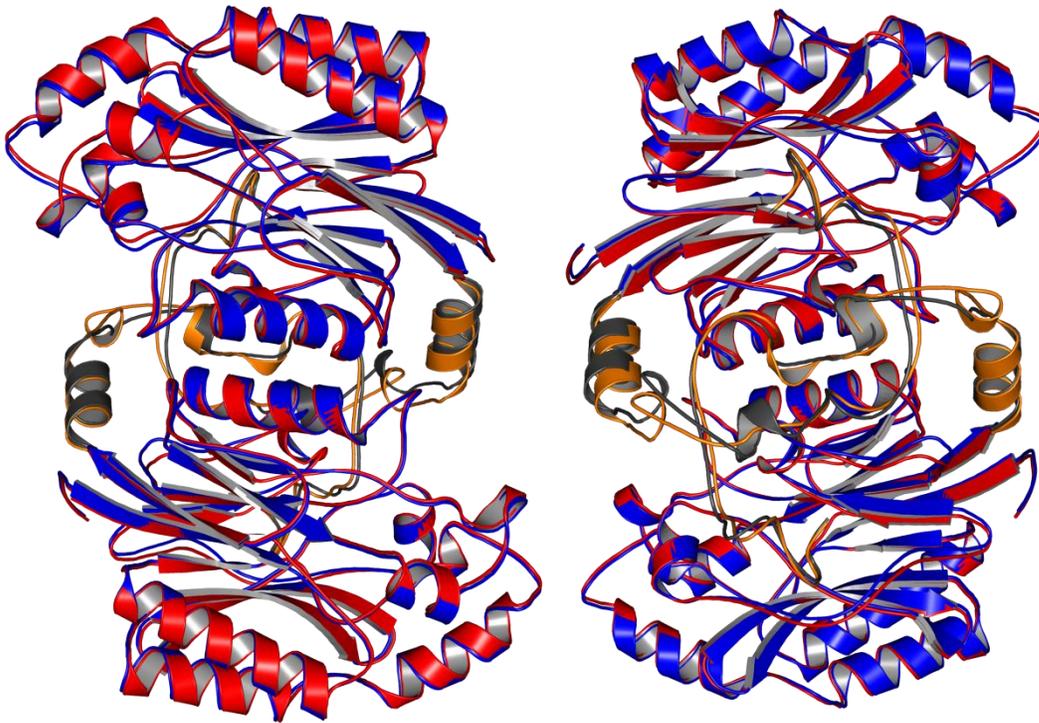


Figura 29. Comparación de las estructuras de NitC Δ 27 (azul) y la mutante P331Y (rojo). Se muestran los extremos C-terminal en negro para NitC Δ 27 y en naranja para P331Y.

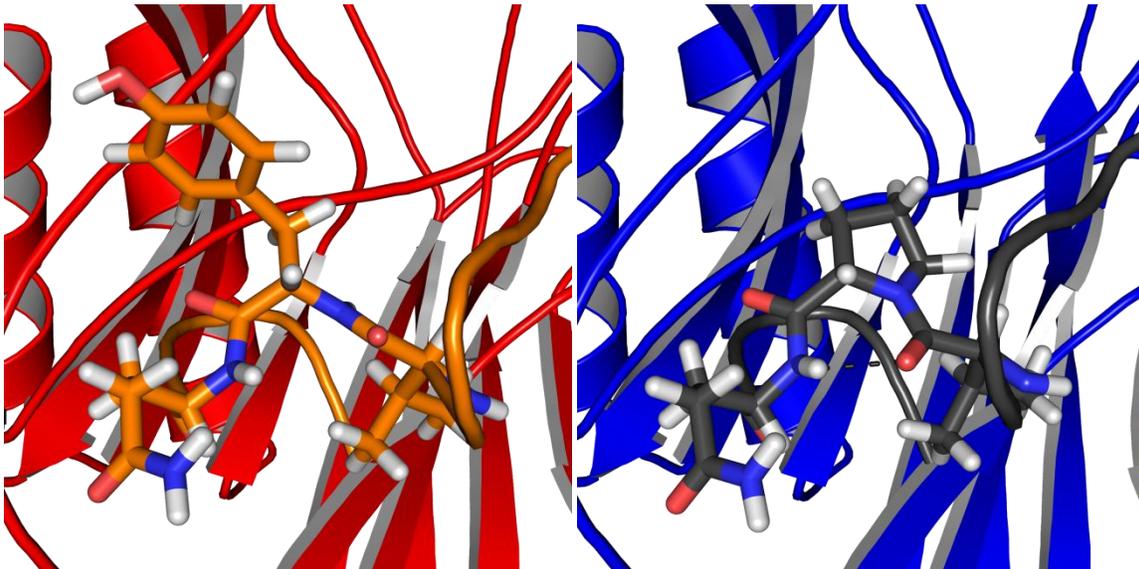


Figura 30. Comparación de la posición 331 de NitC Δ 27 y P331Y. Se representa el puente de H entre la V330 y la Q332 en NitC Δ 27.

G338E

En contraste con P331A y P331Y, el cambio de la glicina 338 por un ácido glutámico desplazó la posición de algunos aminoácidos del extremo C-terminal, aunque mantuvo intacta la parte globular (Figura 31). En el modelo los últimos 15 residuos del extremo del C-terminal se desplazaron y permitieron que el grupo ácido saliera del interior de la proteína. Este residuo proyecta su grupo ácido hacia la superficie C y forma un nuevo puente de hidrógeno con la N-amida de la glicina 145 (Figura 32)

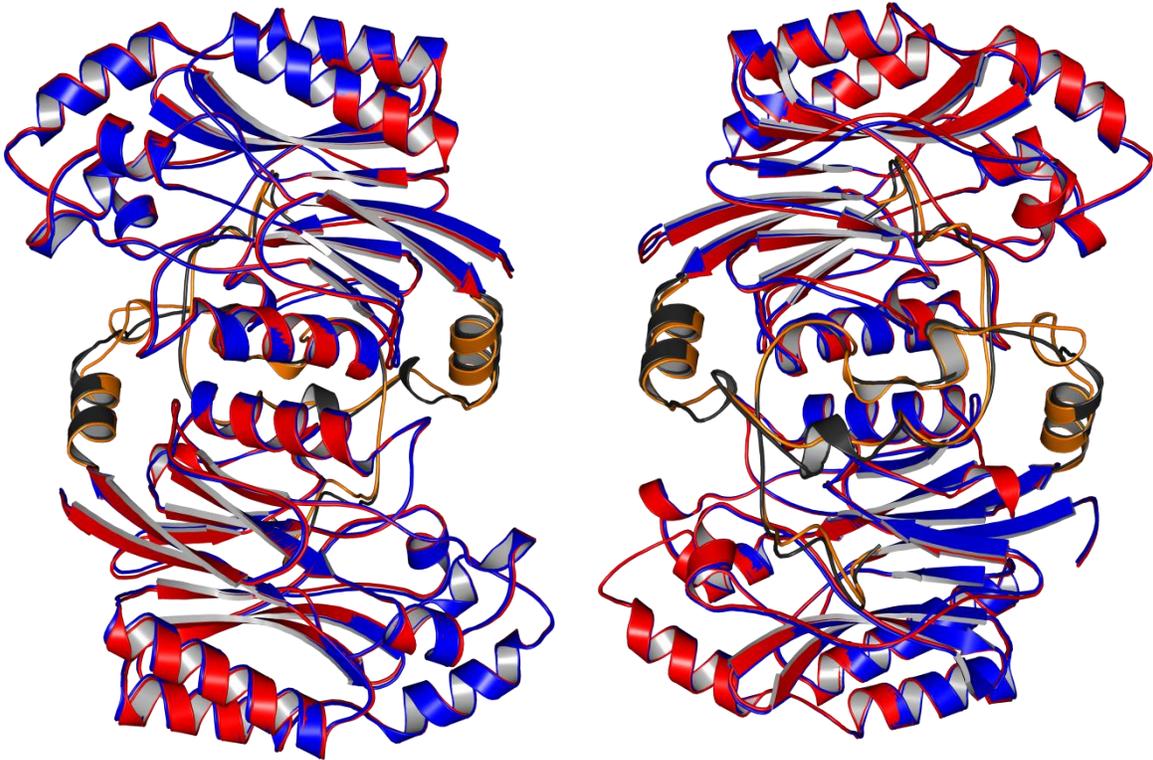


Figura 31. Comparación de las estructuras de NitC Δ 27 (azul) y G338E (rojo). Se muestran los extremos C-terminal en negro para NitC Δ 27 y en naranja para G338E.

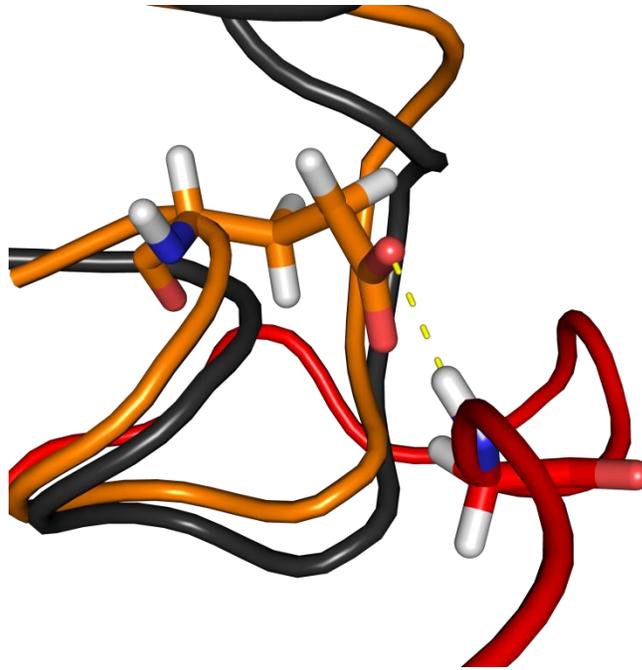


Figura 32. Comparación de la posición 338 de NitC Δ 27 y G338E. En negro el C-terminal de NitC Δ 27 y en naranja el C-terminal de G338E. Se representa el puente de H en la mutante G338E y el desplazamiento de los residuos alrededor de la posición 388 al mutar la glicina por un ácido glutámico

Discusión

La caracterización de las mutantes NitC Δ 39 y NitC Δ 27 sugiere una relación entre la actividad y la estabilidad con el estado oligomérico de la enzima. Además, en la CynD de *B. pumilus* se sabe que el C-terminal está implicado en la formación de filamentos. Entonces, si se cambian algunos residuos del C-terminal de NitC Δ 27 por residuos cargados del C-terminal de la CynD de *B. pumilus*, se favorecerían algunas interacciones en las superficies de oligomerización de NitC Δ 27 y con ello aumentar y/o estabilizar la formación de filamentos. Se construyeron dos mutantes simples G338E y K339, las cuales introducen residuos cargados al final del C-Terminal. Además se creó la mutante doble G338E+K339, con la idea de sumar los efectos observados. Un cambio drástico que salió del alineamiento, es el cambio de la prolina 331 por una tirosina. Los datos obtenidos de las mutantes sencillas, parecen indicar que los residuos mutados se encuentran—cerca de alguna de las superficies de interacción entre los monómeros. El aumento del radio hidrodinámico, sugiere un incremento en el tamaño del oligómero que a su vez se acompaña de un aumento en la actividad y la estabilidad de la enzima. Sin embargo, la disminución de las T_m aparentes de G338E y K339 indican una menor estabilidad térmica. Debido a que las transiciones fueron irreversibles no se pudo estimar el resto de los parámetros termodinámicos, para calcular una curva de estabilidad global. La diferencia más importante entre las dos mutantes sencillas es su espectro de dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular indican un incremento de hélices alfa en la mutante G338E, mientras la inserción de una lisina en la posición 339 pierde el mínimo a 208 nm, indicando una pérdida en hélices alfa.

Se esperaba que los efectos de G338E y K339 se sumaran al combinar las dos mutantes en una sola. Sin embargo, los resultados experimentales son contrarios a lo esperado. El tamaño del radio hidrodinámico se redujo al tamaño de NitCΔ27, aunque la actividad fue menor que la actividad de NitCΔ27, aproximadamente en un 45%. El espectro de G338E+K339 es similar al de K339, es decir hay una pérdida de hélices alfa. En el único aspecto en el que parece que los efectos de K339 y G338E son aditivos fue en la estabilidad a 30 °C, aunque su T_m aparente es menor y es poco cooperativa. La transición abarca un intervalo de aproximadamente 50 °C. En comparación NitCΔ27 completa su transición en un intervalo de 15 °C.

En contraste con las mutantes anteriores la mutante P331Y+G338E+K339 es inactiva, pierde estructura y tiende a formar agregados de gran tamaño. En cuanto a estructura, de acuerdo al espectro de dicroísmo circular pierde hélices alfa y gana hebras beta mientras mantiene los porcentajes del resto de las estructuras. Además, no presenta una transición térmica en el rango de 20 a 90 ° C. Los cambios observados en la doble mutante con respecto a los de la triple mutante, sugieren que la mutación P331Y es responsable de los cambios deletéreos en la triple mutante. Para determinar la importancia de la P331 se crearon las mutantes sencillas P331Y y P331A. La mutante P331Y pierde la mayor parte de su actividad, conservando solamente un 0.5% de la actividad de la NitCΔ27. En cuanto a estructura la señal de dicroísmo circular y los porcentajes de estructura secundaria son muy similares a la triple mutante. Además no presenta una transición térmica y tiende a formar agregados de gran tamaño. Lo cual parece indicar que el cambio de prolina por tirosina es la responsable de la mayor parte de las características bioquímicas observadas en la mutante P331Y+G338E+K339.

A diferencia de las mutantes P331Y+G338E+K339 y P331Y, la mutante P331A es activa, aunque conserva el 45.9% de la actividad con respecto a NitCΔ27. Su espectro de dicroísmo circular pierde el mínimo a 208 nm, que se traduce como una pérdida de hélices alfa, aunque no es tan marcado como en la mutante P331Y. P331A presenta una clara transición térmica y el valor de las T_m es similar a NitCΔ27. Los datos de DLS indican la presencia de dos poblaciones. Una población con un radio hidrodinámico de 14.8±1.9 y otra población de 47.0±3.7. La población de mayor tamaño tiene un radio hidrodinámico mucho mayor al de las mutantes activas. Sin embargo, su tamaño es comparable al de los agregados inactivos de P331Y. Por el otro lado, la población de menor tamaño tiene un radio hidrodinámico cercano a las mutantes G338E y K339. Si las dos poblaciones se comportan como las mutantes con el mismo tamaño, la población de menor tamaño es activa, mientras que la población de mayor tamaño es inactiva, lo cual explicaría la disminución en la actividad catalítica.

Explicar los resultados de las diferentes mutantes con la información que se posee es limitada, muchos de los datos requieren de una estructura, para darle una mejor interpretación. Ya que no se dispone de la estructura reportada de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B, se optó por crear un modelo. Como las mutaciones se realizaron al final del extremo C-terminal, fue importante que el modelo abarcara la totalidad del C-terminal. Sin embargo, existe un problema, las dos estructuras reportadas de nitrilasas brindan poca información acerca del C-terminal. En el caso de la nitrilasa de *P. abyssi* (3IVZ) el C-terminal es muy corto, por lo que no brinda información de la sección en la

que se realizaron las mutaciones en este proyecto. Mientras que en el caso de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) tiene el largo correcto y tiene similitud con el C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B. Sin embargo, durante el proceso de cristalización se eliminaron los últimos 56 residuos por un corte proteolítico (Zhang et al., 2014) (Figura 33). Como resultado la estructura resuelta de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY) es más corta que la estructura resuelta de la nitrilasa de *P. abyssi* (3IVZ). Por otro lado, se ha podido resolver las estructuras de los C-terminal de las amidasas de *G. pallidus* RAPc8 (2PLQ) (Kimani et al., 2007), *H. pylori* (2dyu) (Hung et al., 2007) y *P. aeruginosa* (2UXY) (Andrade et al., 2007), aunque el contenido de hélices alfa en el C-terminal de las amidasas es superior al predicho para las nitrilasas, por lo tanto las observaciones hechas en las amidasas probablemente no sean transferibles a las nitrilasas (Thuku et al., 2009).

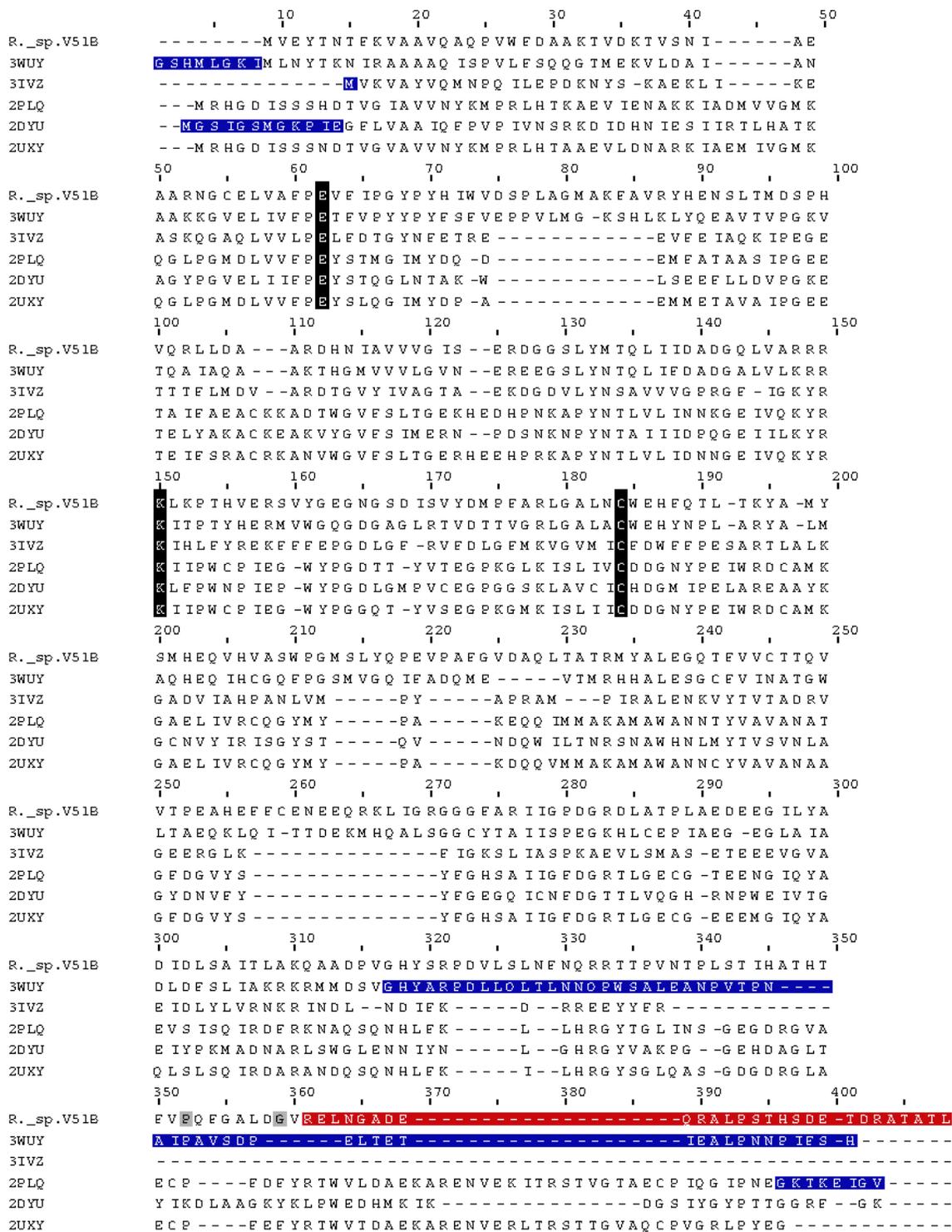


Figura 33. Alineamiento de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.*V51B con las secuencias de las nitrilasas y amidasas cristalizadas. La primera línea corresponde a la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B. La segunda y tercera línea corresponde a las secuencias de la nitrilasa de *Syechocystis sp.* PCC6803 (Zhang et al., 2014) (3WUY) y *P. abyssii* (Raczynska et al., 2011) (3IVZ) respectivamente. De la cuarta a la sexta línea corresponden a la secuencias de las amidasas de *G. pallidus* RAPc8 (2PLQ) (Kimani et al., 2007), *H. pylori* (2DYU) (Hung et al., 2007) y *P. aeruginosa* (2UXY) (Andrade et al

2007) respectivamente. En fondo negro con letras blancas la triada catalítica. En fondo azul con letras blancas los fragmentos de la secuencia que no se pudieron observar en las estructuras. En fondo rojo con letras blancas los aminoácidos del C-terminal que se eliminaron en NitCΔ27. En fondo gris las posiciones sobre las que se efectuaron las mutaciones.

En el proyecto se decidió hacer 4 modelos un modelo sin restricciones y a los otros 3 se les impuso como molde las estructuras de las amidasas *P. aeruginosa*, *H. pylori* y *G. pallidus* RAPc8 (Andrade et al., 2007; Hung et al., 2007; Kimani et al., 2007), por que permitían modelar las secciones en las que se realizaron las mutaciones. Sin embargo, el mejor modelo, de acuerdo al programa Rosseta, fue el modelo sin restricciones. De acuerdo al meta servidor LOMETS, el modelo sin restricciones se basó principalmente en la estructura de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY), la cual tiene pocas inserciones en la parte globular con respecto a la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B. En cambio a las amidasas le faltan varias inserciones con respecto a la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (Figura 33). Probablemente estas inserciones no se pudieron modelar adecuadamente al imponer como molde a las amidasas, en cambio el modelo sin restricciones pudo usar como molde la estructura *Syechocystis* sp. PCC6803 (3WUY). Además, tanto en el modelo sin restricciones como en los modelos que usaron las estructuras de las amidasas como molde, el C-terminal se modeló de manera similar. Esto implica que no existía ninguna ventaja en imponer una estructura, tal y como sugiere el servidor I-TASSER. Aun así, el C-terminal es la parte más débil del modelo, por la falta de estructuras resueltas de C-terminales en la familia de las nitrilasas y la poca similitud entre las estructuras resuelta y la secuencia de NitCΔ27. En la literatura se ha propuesto que el C-terminal de las nitrilasas forma parte de las superficies A y C (Thuku et al., 2009). En el modelo por homología se simuló un dímero a través de la superficie A, porque en la reconstrucción de los filamentos por Thuku et al. (2007) al ajustar el modelo el mejor ajuste fue con un dímero a través de la superficie A. En el modelo por homología de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B se puede observar como el C-terminal forma parte de la superficie A y se entrelaza con el C-terminal de la otra subunidad. En la estructura de la nitrilasa de *P. abyssi* el C-terminal de un monómero se entrelaza con C-terminal del otro monómero, por lo que se ha propuesto que el C-terminal es importante para fortalecer las interacciones de la superficie A (Raczynska et al., 2011). También algunos residuos del C-terminal se proyectan hacia la superficie C, por lo que probablemente el C-terminal también tenga interacciones en esta superficie. Sin embargo, se necesita modelar una espiral corta, para comprobar que el C-terminal forma interacciones entre subunidades a través de la superficie C.

Una vez con el modelo, se procedió a crear las mutantes y encontrar una explicación estructural de las mutaciones. Debido a que una de las mutaciones sencillas es una inserción, no se pudo recrear simplemente al cambiar el residuo de una posición. La mutante sencilla G338E, que introduce un residuo cargado en el C-terminal, fue la que provocó un mayor impacto en la estructura de los aminoácidos que la rodean. En el modelo de NitCΔ27 la glicina 338 no está expuesta al solvente, aunque está cerca de la superficie de la proteína. Al mutar la posición por un ácido glutámico, el residuo cargado se proyectó hacia la superficie C y una parte queda expuesta al solvente. Si la mutante creara una interacción con otra subunidad, explicaría el aumento en el tamaño del oligómero y en la actividad. Sin embargo, en el modelo se observa la formación de un

puente de hidrógeno entre el ácido glutámico 338 y la glicina 145 de la misma cadena polipeptídica. Al igual que la posición 338, la K339 se encuentra en el interior de la proteína, pero cerca de la superficie. La cadena de la lisina es más larga que la cadena del ácido glutámico, por lo tanto es posible que el grupo cargado de la lisina alcance la superficie y desplace en el trayecto varios aminoácidos, para acomodarse. Sin embargo, no está claro en cual superficie se proyectaría el residuo y si realizaría una interacción con otra subunidad o con la misma cadena polipeptídica. Estos desplazamientos, para acomodar el ácido glutámico y la lisina, podrían explicar las características bioquímicas de la mutante G338E+K339. A pesar de que por separado K339 y G338E aumentan la actividad y el tamaño del oligómero, juntas disminuyen el tamaño del oligómero y reducen la actividad. La pérdida de la actividad se explica parcialmente por la disminución en el tamaño del oligómero, aunque es la mitad de activa que NitCΔ27. En el modelo se observa que el C-terminal regresa al interior de la proteína, cerca del sitio activo, por lo que los cambios en el volumen de las posiciones 338 y 339 juntos, no solo pueden romper interacciones del C-terminal, también pueden afectar la cavidad del sitio catalítico. Anteriormente se ha probado que las modificaciones del C-terminal en la familia de las nitrilasas pueden aumentar la actividad y la estabilidad. La eliminación de residuos del C-terminal permite a la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 formar filamentos activos (Thuku et al., 2007). En el laboratorio se probó una relación entre la actividad y el tamaño de los filamentos con el largo del C-terminal en la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B. Mientras más corto es el C-terminal más aumenta la actividad y el largo de los filamentos (Gómez, 2016). Es la eliminación del C-terminal no es la única forma de aumentar la estabilidad y la actividad en la familia de las nitrilasas. Las mutaciones puntuales y las proteínas quiméricas con el C-terminal de otra nitrilasa, también han tenido buenos resultados. Experimentos de evolución dirigida en la familia de las nitrilasas, han encontrado mutaciones puntuales en el C-terminal, que permiten el incremento en la actividad y en la estabilidad cinética. En la CynD de *B. pumilus* C1 la mutación de la ácido glutámico 327 por una glicina, tiene un ligero incremento en la actividad y en la estabilidad cinética (Wang et al., 2011). En experimentos de evolución dirigida en la nitrilasa de *Acidovorax facilis* ZJB09122, dos de las tres mutaciones puntuales introducen lisinas en el C-terminal, aumentando la estabilidad cinética y la actividad (Xu et al., 2018). Un ejemplo de proteína quimérica es la nitrilasa de *B. pumilus* C1. Al cambiar el C-terminal de *B. pumilus* C1 por el C-terminal de *P. stutzeri* AK61, se aumenta la estabilidad y es activa a pH 9 (Crum, Park, Sewell & Benedik, 2015). Esto indica que modificar el extremo C-terminal puede tener efectos positivos en la actividad y en la estabilidad de proteínas en la familia de las nitrilasas.

Originalmente no se esperaba que mutaciones tan cercanas al final del C-terminal tuvieran un efecto tan severo sobre la estructura. Como se mencionó, en el laboratorio se habían caracterizado mutantes truncas del extremo C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B. Los cortes se realizaron a intervalos regulares desde la posición 359 a la posición 328, incluyendo dos mutantes truncas cuyos últimos residuos fueron la prolina 331 y la fenilalanina 329. Todas las mutantes fueron activas y presentaron transiciones de desplegamiento térmico cooperativas (Gómez, 2016). En este proyecto se mutó la prolina 331 por una tirosina y por una alanina, en ambos casos se pierde estructura y las mutantes son propensas a formar agregados inactivos de

gran tamaño. Esto implica que se puede eliminar la posición 331 sin afectar drásticamente la estructura, pero no se puede mutar la posición 331 con el mismo resultado.

En el modelo, la prolina 331 se encuentra en una asa parcialmente expuesta al solvente. Al mutar la posición por una tirosina, no se generan impedimentos estéricos, aunque se rompe un puente de hidrógeno entre los residuos a los lados. De acuerdo a las reconstrucciones de los filamentos de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 la prolina 331 se ubica en el interior de los filamentos (Thuku et al., 2007). Por lo tanto, es poco probable que el residuo pueda interactuar con otra subunidad. Dada la diferencia entre los resultados obtenidos y lo que indica el modelo, el modelo es incapaz de explicar las mutantes en el C-terminal. La falta de identidad entre el C-terminal y las estructuras reportadas ha dificultado modelar el C-terminal. Por lo tanto, las posibles interpretaciones de los resultados a partir del modelo están limitadas.

Ya que el modelo no permite explicar los datos, la explicación se limita a lo conocido de la prolina. La prolina es un aminoácido especial, porque su cadena lateral se une covalentemente a su amino. Esto impide los giros entre el C α y el amino y limita los ángulos diédricos de ψ . Además las posibles conformaciones del residuo anterior a la prolina también quedan limitadas, por los impedimentos estéricos de la cadena lateral (MacArthur & Thornton, 1991). Las limitaciones en las conformaciones que puede muestrear una prolina, puede tener efectos positivos en la estabilidad de una proteína, ya que disminuye el cambio en entropía conformacional entre el estado plegado y desplegado. Se ha mostrado que la mutación de algunos residuos, en la conformación correcta, por una prolina puede incrementar la estabilidad de una proteína (Matthews, Nicholson & Becktel, 1987) (Choi & Mayo, 2006). Entonces, también es posible que al cambiar una prolina por otro aminoácido se aumenten las conformaciones posibles de un residuo y aumente el cambio en entropía conformacional. Tomando en cuenta que el C-terminal de las nitrilasas no está formado principalmente por hélices alfa u hoja plegadas, aumentar las posibles conformaciones tiene un efecto importante en la estabilidad. Esto explicaría, por qué al eliminar residuos del C-terminal alrededor de la posición 331 no se provoca un efecto similar a mutar la prolina 331. Al ir recortando residuos del C-terminal, también se eliminan aminoácidos que aumentan el costo de la entropía conformacional. Entonces, al momento de eliminar la prolina 331 y los aminoácidos cercanos el costo entrópico de plegar dicha parte ha disminuido y la proteína se puede plegar sin la necesidad de las limitaciones en la posición 331. En cambio, al mutar la posición 331 todavía están los residuos que aumentaban del costo entrópico. El resultado neto es un incremento en la entropía conformacional. El aumento en la entropía conformacional no es la única causa de los efectos observados al mutar la prolina 331, ya que existe una diferencia entre la mutante P331A y P331Y. Probablemente la razón radique en la diferencia en tamaño entre la alanina y la tirosina.

Los modelos por homología son una herramienta poderosa, para interpretar los datos obtenidos, cuando no se cuenta con una estructura. Sin embargo, los modelos dependen de las estructuras ya reportadas e incluso contando con una estructura con una alta identidad, es posible que existan regiones estructuralmente diferentes. Esto se puede deber a mutaciones puntuales críticas o a problemas en el alineamiento (Venselaar et al., 2009). En el caso de la familia de las nitrilasas, con solamente dos estructuras reportadas, cuya identidad con la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B es

menor al 30%, es muy probable que existan estas diferencias. Además en ninguna de las estructuras reportadas el C-terminal abarca la región en la que se realizaron las mutaciones. Solo las estructuras de las amidasas abarcan dicha región, como se muestra en la figura 33. Por lo tanto, es muy probable que existan diferencias entre el C-terminal de la enzima y el C-terminal del modelo. A pesar de los errores del modelo, probablemente la parte globular de la proteína es cercana a la verdadera estructura de la proteína y probablemente ocurra el entrelazado de los C-terminales.

Conclusiones

- La actividad y estructura de la nitrilasa *Rhodococcus* sp. V51B están moduladas por la longitud del C-terminal.
- La nitrilasa *Rhodococcus* sp. V51B acortada en 27 residuos del C-terminal, NitC Δ 27, es activa, estable y tiende a formar estructuras oligoméricas largas y helicoidales.
- La inserción de una lisina, K339 y el cambio de la glicina 338 por glutámico sobre el C-terminal de la NitC Δ 27, le confiere actividad aumentada.
- La mutante triple P331Y+G338E+ K339de la prolina 331, altera el plegamiento de la enzima, no muestra actividad catalítica y es propensa a formar agregados. Estas propiedades se observaron en la mutante sencilla P331Y.
- Un cambio más conservado en la posición 331, P331A, altera en menor grado el plegamiento de la proteína, conservando alrededor del 50 % de la actividad catalítica.
- Los modelos estructurales de la NitC Δ 27 y las mutantes generadas posicionan al C-terminal en contacto con las superficies de interacción A y C responsables de la oligomerización; sin embargo no explican los cambios estructurales drásticos observados en las mutantes de la prolina 331.

Perspectivas

- Estudiar la formación de oligómeros de las distintas mutantes, por medio de microscopía electrónica.
- Diseñar y caracterizar más mutantes sobre el C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B
- Crear nitrilasas quiméricas con el C-terminal de CynD de *B. pumilus* C1 en la nitrilasa de *Rhodococcus* sp..

Referencias

- Afkhami, A., & Norooz-Asl, R. (2008). Micelle-mediated extraction and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 19(8), 1546-1552. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532008000800014>
- Andrade, J., Karmali, A., Carrondo, M., & Frazão, C. (2007). Structure of amidase from *Pseudomonas aeruginosa* showing a trapped acyl transfer reaction intermediate state. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(27), 19598-19605. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m701039200>
- Bandyopadhyay, A., Nagasawa, T., Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y., & Yamada, H. (1986). Purification and characterization of benzonitrilases from *Arthrobacter* Sp. strain J-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 302-306.
- Beilen, J., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion In Biotechnology*, 13(4), 338-344. [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00334-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00334-8)
- Cáliz, A. (2015). Caracterización cinética y estructural de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Choi, E., & Mayo, S. (2006). Generation and analysis of proline mutants in protein G. *Protein Engineering Design And Selection*, 19(6), 285-289. doi: 10.1093/protein/gzl007
- Crum, M., Park, J., Sewell, B., & Benedik, M. (2015). C-terminal hybrid mutant of *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase dramatically enhances thermal stability and pH tolerance by reinforcing oligomerization. *Journal Of Applied Microbiology*, 118(4), 881-889. doi: 10.1111/jam.12754
- Fernandes, B., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., & van Rantwijk, F. et al. (2006). Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(18), 2597-2603. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200600269>
- Granados, M. (2009). *Clonación de la cianuro dihidratasa de Bacillus pumilus GMA1* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gómez, A. (2016). *Estructuración y activación de la nitrilasa de Rhodococcus sp. V51B inducidas por modificaciones en el extremo C-terminal* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gong, J., Lu, Z., Li, H., Shi, J., Zhou, Z., & Xu, Z. (2012). Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 142. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-142>
- Hung, C., Liu, J., Chiu, W., Huang, S., Hwang, J., & Wang, W. (2007). Crystal Structure of *Helicobacter pylori* Formamidase AmiF Reveals a Cysteine-Glutamate-Lysine Catalytic

Triad. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(16), 12220-12229.

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m609134200>

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

Jandhyala, D., Willson, R., Sewell, B., & Benedik, M. (2005). Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 68(3), 327-335.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1903-8>

Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P., Sewell, B., Willson, R., & Benedik, M. (2003). CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: gene cloning and structural studies. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(8), 4794-4805. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4794-4805.2003>

Kelly, S., Jess, T., & Price, N. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - Proteins And Proteomics*, 1751(2), 119-139.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>

Kim, J., Tiwari, M., Moon, H., Jeya, M., Ramu, T., & Oh, D. et al. (2009). Identification and characterization of a novel nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 83(2), 273-283. doi: 10.1007/s00253-009-1862-6

Kimani, S., Agarkar, V., Cowan, D., Sayed, M., & Sewell, B. (2007). Structure of an aliphatic amidase from *Geobacillus pallidus* RAPc8. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63(10), 1048-1058. <http://dx.doi.org/10.1107/s090744490703836x>

Kiziak, C., Klein, J., & Stolz, A. (2007). Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction- and enantiospecificity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Protein Engineering Design And Selection*, 20(8), 385-396.

<http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzm032>

Kobayashi, M., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1989). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. purification and characterization. *European Journal Of Biochemistry*, 182(2), 349-356.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14837.x>

Legras, J., Chuzel, G., Arnaud, A., & Galzy, P. (1990). Natural nitriles and their metabolism. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 6(2), 83-108. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01200927>

Leyva, E. (2009). *Clonación y expresión del gen nitA de Rhodococcus pyridinovorans* (Tesis de Maestría.). Universidad Nacional Autónoma de México.

Lundgren, S., Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J., & Dobritzsch, D. (2008). The crystal structure of β -Alanine synthase from *Drosophila melanogaster* reveals a homooctameric helical turn-Like

assembly. *Journal Of Molecular Biology*, 377(5), 1544-1559.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.011>

Matthews, B., Nicholson, H., & Becktel, W. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 84(19), 6663-6667. doi: 10.1073/pnas.84.19.6663

Martínková, L., Rucká, L., Nešvera, J., & Pátek, M. (2017). Recent advances and challenges in the heterologous production of microbial nitrilases for biocatalytic applications. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 33(1). <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2173-6>

Mckee, T., & Mckee, J. (2003). *Bioquímica* (1st ed., pp. 161-164). España: Mcgraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.

Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., & Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *European Journal Of Biochemistry*, 267(1), 138-144. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00983.x>

Nelson, D., & Cox, M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed., pp. 189-200). New York: W.H. Freeman.

MacArthur, M., & Thornton, J. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *Journal Of Molecular Biology*, 218(2), 397-412. doi: 10.1016/0022-2836(91)90721-h

Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C., Boutou, E., Trauthwein, H., Verseck, S., & Antranikian, G. (2006). Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein Expression And Purification*, 47(2), 672-681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2006.01.006>

Pace, H., & Brenner, C. (2001). *Genome Biology*, 2(1), reviews0001.1. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001>

Piotrowski, M. (2008). Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*, 69(15), 2655-2667. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.020>

Raczynska, J., Vorgias, C., Antranikian, G., & Rypniewski, W. (2011). Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *Journal Of Structural Biology*, 173(2), 294-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.017>

Sewell, B., Berman, M., Meyers, P., Jandhyala, D., & Benedik, M. (2003). The Cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 Is a Two-Fold Symmetric, 14-Subunit Spiral. *Structure*, 11(11), 1413-1422. doi: 10.1016/j.str.2003.10.005

- Sewell, B., Thuku, R., Zhang, X., & Benedik, M. (2005). Oligomeric Structure of Nitrilases: Effect of mutating interfacial residues on activity. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, *1056*(1), 153-159. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1352.025>
- Shapovalov, M., & Dunbrack, R. (2011). A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions. *Structure*, *19*(6), 844-858. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>
- Thuku, R. (2006). *The structure of the nitrilase from Rhodococcus rhodochrous J1: Homology modeling and three dimensional reconstruction* (Magister). (Structural Biology) in the Department of Biotechnology, University of the Western cape.
- Thuku, R., Weber, B., Varsani, A., & Sewell, B. (2007). Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS Journal*, *274*(8), 2099-2108. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05752.x>
- Thuku, R., Brady, D., Benedik, M., & Sewell, B. (2009). Microbial nitrilases: Versatile, spiral forming, industrial enzymes. *Journal Of Applied Microbiology*, *106*(3), 703-727. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03941.x>
- Vejvoda, V., Kubáč, D., Davidová, A., Kaplan, O., Šulc, M., & Šveda, O. et al. (2010). Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IMI196840. *Process Biochemistry*, *45*(7), 1115-1120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.033>
- Venselaar, H., Joosten, R., Vroiling, B., Baakman, C., Hekkelman, M., Krieger, E., & Vriend, G. (2009). Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *European Biophysics Journal*, *39*(4), 551-563. doi: 10.1007/s00249-009-0531-0
- Wang, L., Watermeyer, J., Mulelu, A., Sewell, B., & Benedik, M. (2011). Engineering pH-tolerant mutants of a cyanide dihydratase. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *94*(1), 131-140. doi: 10.1007/s00253-011-3620-9
- Williamson, D., , K., Weber, B., Varsani, A., Frederick, J., & Thuku, R. et al. (2010). Structural and biochemical characterization of a nitrilase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus pallidus* RAPc8. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *88*(1), 143-153. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2734-9>
- Wolfenden, R., & Snider, M. (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as Catalysts. *Accounts Of Chemical Research*, *34*(12), 938-945. <http://dx.doi.org/10.1021/ar000058i>
- Xu, Z., Cai, T., Xiong, N., Zou, S., Xue, Y., & Zheng, Y. (2018). Engineering the residues on “A” surface and C-terminal region to improve thermostability of nitrilase. *Enzyme And Microbial Technology*, *113*, 52-58. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.03.001

Yeom, S., Kim, H., Lee, J., Kim, D., & Oh, D. (2008). An amino acid at position 142 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278 determines the substrate specificity for aliphatic and aromatic nitriles. *Biochemical Journal*, *415*(3), 401-407. doi: 10.1042/bj20080440

Zhang, L., Yin, B., Wang, C., Jiang, S., Wang, H., Yuan, Y., & Wei, D. (2014). Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. *Journal Of Structural Biology*, *188*(2), 93-101.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2014.10.003>