



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Clonación y expresión del gen *nitA* de *Rhodococcus pyridinovorans*”

Tesis

Que para obtener el grado de:

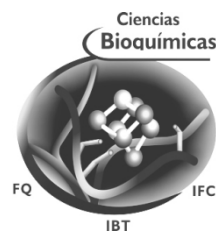
“Maestro en Ciencias Bioquímicas”

Presenta:

Leyva Hernández Eduardo

Tutor:

Georgina Garza-Ramos Martínez





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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización del mismo se recibió una beca de CONACyT del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Agradecimientos

A la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, por su asesoría y paciencia durante la realización del proyecto y durante la escritura de la tesis. Por lo que esto significa en mi formación, así como por permitirme introducir mi cuchara en la docencia.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández cuya ayuda fue fundamental no solo durante la secuenciación de la proteína si no también a lo largo de todo el proyecto y por su apoyo como miembro del jurado en las correcciones de la tesis.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, quienes a pesar de su ocupada agenda siempre acudieron gentilmente a evaluar mis avances durante cada tutorial. También a este último por formar parte del jurado.

A la Dra. Brenda Valderrama Blanco, al Dr. Ismael Bustos Jaimes y a la Dra. Amelia Farrés González-Saravia por formar parte del jurado y ayudarme con las múltiples correcciones de la tesis.

A la Dra. Mariana Peimbert Torres cuya genialidad me ayudó mucho más allá de la licenciatura. Una vez más veo la luz gracias a tu apoyo y amistad.

A la M. en C. Laura I. Álvarez Añorve por el apoyo en la preparación de medios de cultivo y geles de electroforesis. Gracias por ser la primera en dejarme dar clases y apoyarme a lo largo del año escolar.

Al QFB. Antonio Anaya por compartir la carga de la última parte de este proyecto, por su apoyo y amistad.

A mi madre Ma. Mónica Hernández Medina, para quien no me alcanzan las palabras de agradecimiento. Te quiero mucho, gracias por perdonar mis errores.

A mi abuela “Vito” por imprimir en mí la fuerza para salir adelante, porque el obtener un título no es cuestión de inteligencia si no de aprovechar las oportunidades. Gracias a ti y a mi madre me fue posible lograr esto y no me cansare de admitir que tus propios logros son mucho más grandes.

A mi tía abuela Paulina Medina

A mi padre Emilio Leyva Méndez

A mis primos Adriana y Gustavo, con quienes he tenido la oportunidad de volver a convivir.

A mis tíos, en especial a Pedro y Gerardo y al resto de mi familia, incluyendo a aquellos que ya no están conmigo.

A Alberto ...nunca cambies, aunque creo que no lo harías aunque te lo dijera. David ... muchas gracias por el continuo escrutinio de mi vida ... y Fermín, porque la vida no sería lo mismo sin tomarse ese tiempo para hacer cosas que uno solo puede hacer con los amigos.

A Lorena y Valeria porque el momento en el que se que forjó esta amistad, aunque tarde, es un recuerdo que apreció de todo corazón. Gracias por darle color a este último año. “A seguir volando libélulas”.

A Huilver y familia, a Julio César y Daniel por toda la amistad y compañía que me han brindado desde aquellos viejos tiempos. Cada uno de ustedes me ha ayudado a su manera de manera invaluable.

A Mayra por ser una gran amiga y depositar su confianza en mí.

A Jeka, quien me ayudo con cuanta tontería se me ocurrió, Fátima y a mi padawan Jasmín.

A Emma, porque no pude agradecerte antes, gracias.

A Martín, Luis y Juan por brindarme su amistad y compañía durante las largas horas en el laboratorio.

No creo en el altruismo, pero sí creo en que tenemos que aprender a soltar nuestro gran ego. Es como un gran caparazón que no nos deja movernos libremente. Con eso encima no podremos ser felices con nadie, ni siquiera con nosotros mismos.

No se deberá engañar a un perro
con comida; porque no nos ayudará
a pasar el río al morirnos.

Náhuatl, Zongolica, Veracruz

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Aspecto histórico de las nitrilasas	2
Las nitrilasas en la naturaleza	3
El potencial biotecnológico de las nitrilasas	5
Uso industrial de las nitrilasas	5
Nitrilasas y nitrilo hidratadas en la eliminación de nitrilos contaminantes del ambiente	6
Aplicación de las nitrilasas en la síntesis asimétrica	7
La superfamilia de las nitrilasas	8
El dominio Nit como estructura modelo y la probable triada catalítica de las nitrilasas	9
Estructura y función de las nitrilasas	12
ANTECEDENTES	14
<i>R. pyridinovorans</i> como modelo de estudio	14
OBJETIVO	15
Objetivos particulares	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Medios de cultivo	16
Inducción de la nitrilasa con benzonitrilo, valeronitrilo y caprolactama	17
Obtención de la secuencia por espectrometría de masas	18
Transformación de células competentes	19
Purificación de ADN total	19
Purificación de plásmidos de ADN	20
Diseño de oligonucleótidos para amplificar nitA a partir del ADN total	20
Diseño de oligonucleótidos para la inserción de sitios de restricción en el gen nitA	20
Reacción en cadena de la polimerasa	21
Electroforesis en geles de agarosa	21
Purificación de ADN en geles de agarosa	22

Secuenciación	22
Ensayos de expresión y solubilidad	22
SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)	23
Expresión de la nitrilasa recombinante	23
Purificación de la nitrilasa recombinante	23
Ensayo cromatográfico de actividad	24
Ensayo de determinación de amonio con L-GDH	25
Ensayo colorimétrico de actividad	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Búsqueda de secuencias consenso	26
Inducción de la nitrilasa de <i>R. pyridinovorans</i>	28
Obtención de la secuencia por espectrometría de masas	30
Clonación del gen de la nitrilasa de <i>R. pyridinovorans</i>	32
Diseño de oligonucleótidos	32
Amplificación y clonación a partir de ADN total	33
Subclonación de <i>nitA</i> en el vector de expresión pET-24a+	34
Obtención de <i>nitA</i> con sitios de restricción	34
Clonación de <i>nitA</i> _{res} en el pET-24a+	36
Secuencia del Gen de la nitrilasa de <i>R. pyridinovorans</i>	37
Expresión del gen <i>nitA</i>	41
Cinética de inducción	41
Expresión y solubilidad	42
Purificación de la nitrilasa recombinante	43
Inducción y precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	43
Cromatografía	44
Actividad de la nitrilasa recombinante	48
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS	32

Resumen

El uso de biocatalizadores que presentan estereoquímica definida es uno de los principales caminos a seguir en el área de la química orgánica sintética, y depende esencialmente de la obtención y estudio de nuevas enzimas. Recientemente, se encontró una cepa que produce una nitrilasa en muestras de suelo, la cual se identificó como *Rhodococcus pyridinivorans*. Las nitrilasas desempeñan, con gran enantioselectividad, la conversión de nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos. Pese a su amplia distribución en la naturaleza, la bioquímica de estas enzimas se encuentra pobremente descrita en la literatura y se carece de una estructura cristalográfica. A diferencia de la mayor parte de las enzimas de la subfamilia de las nitrilasas, la nitrilasa de *R. pyridinivorans* ha mostrado que convierte eficientemente sustratos alifáticos y aromáticos. En ensayos de biotransformación se comprobaron niveles de conversión de valeronitrilo y benzonitrilo que se aproximan al rendimiento estequiométrico. Esto la agrupa dentro de un número reducido de nitrilasas capaces de utilizar ambos tipos de nitrilos y la hace un buen prospecto para obtener información fisicoquímica y cinética. El trabajo tiene como punto de partida la nitrilasa de *R. pyridinivorans* obtenida de la bacteria silvestre por inducción del gen *nitA* con caprolactama. El rendimiento que se obtiene a partir de cultivos de la cepa silvestre es muy bajo, por lo que se decidió clonar el gen *nitA* en *E. coli*, para obtener a la enzima de forma recombinante. Por medio de electroforesis desnaturante se identificó una banda de proteína correspondiente al monómero de la nitrilasa de 34 kDa. Esta banda se purificó para ser analizada por espectroscopia de masas y se determinó la secuencia de aminoácidos de los fragmentos obtenidos por digestión proteolítica. Los oligonucleótidos utilizados para clonar este gen se diseñaron basados en la secuencia de la nitrilasa, que mostró el mayor puntaje de identidad con la de los péptidos. El gen *nitA* se clonó en el vector pGEM-T y se subclonó en el vector de expresión pET-24a+. La secuencia de este gen reveló una identidad mayor al 90% con la secuencia CAC88237 de *R. rhodochrous*. Se logró expresar con éxito a la nitrilasa recombinante y se desarrolló una estrategia de purificación que permite obtener a la proteína funcional y estable. Se obtuvieron las constantes cinéticas para los dos sustratos tipo, benzonitrilo y valeronitrilo. Estas constantes indican que la enzima recombinante es mucho más activa para el benzonitrilo que para el valeronitrilo. Esta enzima es un modelo de estudio bastante atractivo. Por la dependencia de la actividad y especificidad de su estado oligomérico, la clonación de este gen, la expresión de su enzima funcional y el establecimiento de protocolos para su purificación y manejo, facilitarán y permitirán la continuación de los estudios de caracterización estructurales y cinéticos sobre esta enzima.

Introducción

Aspecto histórico de las nitrilasas

Recientemente ha habido un gran avance en los métodos biológicos para caracterizar y analizar la secuencia y la función de genes, operones e incluso genomas de organismos obtenidos directamente del ambiente. Este campo se conoce como metagenómica o genómica ambiental. Dentro de los múltiples beneficios que conlleva el desarrollo de esta área se encuentran el descubrimiento de nuevas funciones biológicas, perfiles metabólicos de comunidades microbianas y un incremento en la información contenida en las bases de datos. Esto ha causado que el número de familias que se conocen también haya ido en aumento.

Desde un punto de vista pragmático, la metagenómica ha permitido el descubrimiento de enzimas con un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas. La nitrilasa es una de estas enzimas que ha atraído gran interés como biocatalizador. Por su capacidad de convertir nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos. Hasta el 2005 existían 41 patentes basadas en enzimas capaces de hidrolizar nitrilos tan sólo en EUA de un total de más de 200 en todo el mundo. A pesar del gran interés industrial en torno a estas enzimas, son muy pocos los trabajos que tratan con los aspectos enzimológicos como el mecanismo catalítico y la estructura de estas proteínas (Podar et al., 2005).

La actividad de nitrilasa fue descrita por primera vez por Thimann y Mahadevan en 1964 a partir de una enzima que fue aislada de hojas de cebada, al descubrir que catalizaba la conversión del indolacetonitrilo (IAN) a ácido indolacético (IAA), por lo que en un principio recibió el nombre de indolacetonitrilasa. Posteriormente se descubrió que esta enzima actuaba sobre un rango más amplio de nitrilos por lo que se le cambió el nombre a nitrilasa. La primer nitrilasa bacteriana que se descubrió fue aislada de una bacteria de suelo, posiblemente, del género *Pseudomonas*, seleccionada por su capacidad de crecer utilizando ricino como única fuente de carbono (O'Reilly y Turner, 2003). Las primeras investigaciones llevaron a pensar que las nitrilasas eran específicas para nitrilos aromáticos (Harper, 1977a, b) pero, posteriormente, se reportaron nitrilasas de diversas fuentes que eran activas tanto con nitrilos alifáticos (Kobayashi et al., 1990a) como con nitrilos aromáticos (Wieser et al., 1997; Vejvoda et al, 2007).

Hasta la fecha se han caracterizado aproximadamente 10 nitrilasas, 1 de plantas y 9 de bacterias (Mylerová y Martínková, 2003; O'Reilly y Turner, 2003). Sin embargo, sólo se han clonado 6 genes y sólo se ha reportado en la literatura la sobreexpresión de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1. Además sólo se han podido purificar a homogeneidad las nitrilasas de: *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi et al., 1992), *Alcaligenes faecalis* JM3 (Nagasawa y Yamada, 1990b) y *Pseudomonas fluorescens* (Layh et al., 1998).

Las nitrilasas en la naturaleza

Las nitrilasas se han encontrado en plantas, animales, hongos, bacterias e incluso en algunos procariontes filogenéticamente aislados. Se encuentran formando parte de las rutas metabólicas del cianuro, lo que le permite a estos organismos degradar estos compuestos para utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno.

Se ha especulado mucho acerca de que el metabolismo microbiano de nitrilos es, por lo menos en parte, una consecuencia de las relaciones ecológicas entre organismos eucariontes y procariontes. Lo cierto es que las relaciones establecidas por similitud en la secuencia entre diferentes nitrilasas, no reflejan la taxonomía de los organismos en los que se les encuentra. Un ejemplo claro de esto, es el hecho de que la mayoría de los géneros o especies que presentan dos nitrilasas (*Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae* y *Burkholderia fungorum*) tienen genes de estas enzimas que no están emparentados entre sí y pertenecen a diferentes subfamilias. Esto sugiere que hayan acontecido eventos de duplicación génica lejanos o que se hayan adquirido genes por transferencia horizontal (Podar, 2005).

Gran parte de los microorganismos en los que se ha descubierto actividad de nitrilasa son bacterias que habitan en sedimentos terrestres o marinos. Sin embargo, no existe ninguna relación entre las ubicaciones biogeográficas y las relaciones filogenéticas deducidas a partir de la similitud de su secuencia. Llegándose a encontrar, aún dentro de una misma región, secuencias de nitrilasa muy distintas entre sí. También se han encontrado nitrilasas con secuencias similares en regiones geográficamente apartadas y que se encuentran bajo diferentes condiciones climáticas (Robertson et al., 2004).

Algunos microorganismos además de contar con una ruta de degradación de nitrilos mediada por las

nitrilasas, en la que estos compuestos se degradan a ácido carboxílico y amonio en un solo paso, presentan otra vía de degradación que se lleva a cabo en dos pasos por la acción consecutiva de las nitrilo hidratasa y las amidasa. Un ejemplo de esto es la producción y degradación de aldoximas (Fig. 1) por organismos de los géneros *Rhodococcus*, *Corynebacterium* y *Fusarium* (Kato et al., 2000).

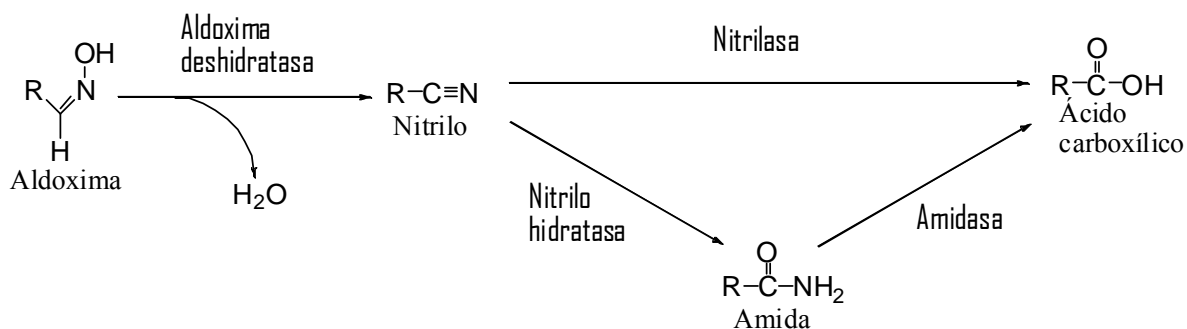


Figura 1. Ruta de degradación de aldoximas (Kato et al., 2000). Este es uno de los muchos casos en los que microorganismos degradan nitrilos tanto por la vía de las nitrilasa como por la vía de la nitrilo hidratasa-amidasa.

Las nitrilasas en plantas participan en la síntesis de compuestos como las auxinas, principalmente en la del de ácido indolacético (IAA), la biotina y los cianolípidos (O'Reilly y Turner, 2003; Pace y Brenner, 2001; Banerjee et al., 2002; Piotrowski et al., 2001; Bartel y Fink, 1994; Bartling et al., 2007). También están involucradas en la síntesis de la β -ciano-L-alanina, lo que constituye una ruta de detoxificación de cianuro. El cianuro es un metabolito tóxico para la planta que es liberado inevitablemente en todas las plantas superiores durante la síntesis de la hormona etileno o a partir de glucósidos cianogénicos, los cuales son sintetizados por algunas plantas debido a que les brindan resistencia a fitopatógenos (O'Reilly y Turner, 2003; Jenrich et al., 2007). En resumen, esta ruta de desintoxicación consiste en hacer reaccionar un cianuro y una cisteína para obtener una molécula de β -ciano-L-alanina (Fig. 2). Aquí interviene la cianoalanina hidratasa, esta enzima fue descrita como una nitrilasa que también presenta actividad de nitrilo hidratasa. Así gracias a esta, la β -ciano-L-alanina es convertida en ácido aspártico y asparagina en proporciones de $\approx 1:1$ y amonio. Homólogos de estas nitrilasas se han encontrado en varias plantas superiores, entre ellas algunos pastos de la familia Poaceae (Jenrich et al., 2007).

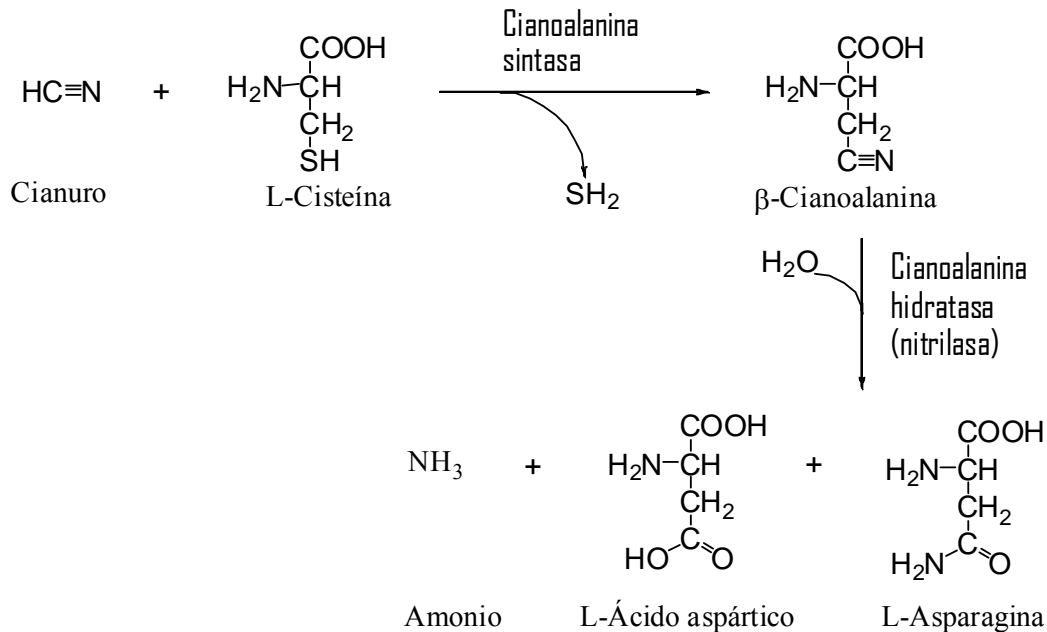


Figura 2. Ruta de detoxificación del cianuro en plantas superiores (Jenrich et al., 2007). En plantas superiores es muy importante la ruta de desintoxicación del cianuro en la que se forma la β -cianoalanina. La enzima encargada de degradar esta molécula es una nitrilasa que también presenta actividad de nitrilo hidratasa, conocida con el nombre de cianoalanina hidratasa.

El potencial biotecnológico de las nitrilasas

Uso industrial de las nitrilasas

Las nitrilasas, al igual que las nitrilo hidratasas, son enzimas con un enorme potencial biotecnológico, ya que la industria química hace uso extenso de varios nitrilos para fabricar una gran variedad de polímeros y productos químicos con múltiples funciones. Los nitrilos pueden servir como intermediarios en la síntesis orgánica de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas y otros compuestos heterocíclicos (Tauber et al, 2000; March, 2001; Zhou et al, 2005), los cuales se usan como disolventes, conservadores, intermediarios en la síntesis de fármacos, herbicidas, pesticidas, edulcorantes, etc. Algunos ejemplos son el acetonitrilo que es utilizado como solvente, el adiponitrilo que se usa como precursor del nylon-6,6 y el acrilonitrilo que es precursor de fibras

acrílicas y plásticos. El diclobenil (2,6-diclorobenzonitrilo, también conocido por su nombre comercial, Casoron) se ocupa como herbicida en los cultivos de arroz, trigo, cebada, maíz y bayas (Zhou et al., 2005). La nitrilasa sobreexpresada de *R. rhodochrous* J1 ha servido en la producción de compuestos como el ácido acrílico, componente principal de la pintura acrílica, el ácido metacrílico, que se usa en la fabricación de polímeros para la construcción de muebles y objetos diversos (Nagasawa et al., 1988b), el ácido *p*-aminobenzoico, ingrediente activo de los bloqueadores solares (Kobayashi et al., 1989b) y el ácido pirazinoico, un agente antimicobacteriano (Kobayashi et al., 1990b). Actualmente se utiliza a la nitrilo hidratasa de *Rhodococcus rhodochrous* en la producción a gran escala de acrilamida y nicotinamida (Matthew et al., 1988; Nagasawa y Yamada, 1990a). Otra aplicación en potencia de las enzimas capaces de hidrolizar nitrilos es la modificación enzimática de materiales sintéticos. Un ejemplo de gran peso es la demanda que existe por mejorar las propiedades del poliacrilonitrilo. En este caso se busca mejorar propiedades como la cantidad de humedad que puede absorber y la velocidad de secado sin afectar las buenas propiedades mecánicas del polímero como su elasticidad (Fischer-Colbrie et al., 2007; Gübitz y Paulo, 2003).

El uso de enzimas en la obtención de estos productos, es de particular importancia en aquellos casos en los que los sustratos o los productos son lábiles a altas temperaturas o valores extremos de pH; ya que estas enzimas permitirían la conversión de estos compuestos a temperaturas y pH moderados. También se ha puesto especial interés en nitrilasas de organismos termófilos como la de *Bacillus pallidus* (Almatawah et al., 1999; Cramp y Cowan, 1999). Este interés se debe principalmente a que las enzimas de organismos termófilos son por lo general más resistentes a la proteólisis y a su desnaturalización química y física que sus contrapartes mesófilas (Daniel et al., 1982). Por lo que, en definitiva, un mejor entendimiento de este tipo de enzimas podría permitir su uso extensivo en la industria, incrementando la producción y disminuyendo los costos.

Nitrilasas y nitrilo hidratatas en la eliminación de nitrilos contaminantes del ambiente

El uso desmesurado de los nitrilos por la industria ha dispersado estos compuestos en el ambiente como desechos industriales y residuos de productos agroquímicos. Por lo que, si su liberación no llega a controlarse, puede llegar a convertirse en un serio problema ambiental. Esta problemática ha permitido que se considere la acción de las nitrilasas dentro del campo de la biorremediación como una alternativa para la eliminación de nitrilos contaminantes del ambiente. Hasta el momento, sólo se ha implementado la degradación de estos compuestos utilizando microorganismos completos, dado que la

degradación de nitrilos de esta forma presenta la ventaja de que puede llevarse a cabo por medio de dos rutas enzimáticas distintas. Estas rutas, de las cuales ya se hizo mención anteriormente, involucran la acción de las nitrilasas o de las nitrilo-hidratasas (NHAsas) junto con las amidasas (Zhou et al., 2005; Kobayashi y Shimizu, 2000).

Estos sistemas han probado ser eficaces en la detoxificación enzimática de herbicidas basados en nitrilos (Harper, 1985; Stalker et al., 1988) y en la degradación del acetonitrilo, acrilonitrilo y benzonitrilo (Tinggang et al., 2007). De acuerdo al seguimiento de este proceso, el acetonitrilo y el acrilonitrilo siguen preferentemente la ruta de dos pasos (NHAsa-amidasa). Mientras que la degradación del benzonitrilo ocurre en un solo paso (nitrilasa), convirtiéndose directamente en ácido benzoico y amonio. En general, este y otros estudios han mostrado que estos sistemas de degradación pueden funcionar en un amplio rango de condiciones, incluso en ambientes anaerobios.

Aplicación de las nitrilasas en la síntesis asimétrica

El conocimiento de que dos formas enantioméricas del mismo compuesto pueden diferir en actividad y reactividad es de relevancia no sólo para los seres vivos sino también para la industria química y farmacéutica de hoy en día. La utilización de biocatalizadores con estereoquímica definida es entonces uno de los principales caminos a seguir dentro de la línea de investigación de la química orgánica sintética y depende esencialmente del descubrimiento y estudio de nuevas enzimas. El conocimiento del espacio de secuencias protéicas que se tiene actualmente, a pesar de ser bastante amplio, sigue representando tan sólo una pequeña fracción de la información disponible en la biósfera. Este espacio no explorado de secuencias abre la posibilidad de que existan enzimas con geometrías y parámetros cinéticos que se ajusten a las necesidades planteadas (Robertson et al., 2004).

Las nitrilasas son, en este rubro, enzimas que representan una herramienta poco explorada que podría servir en la síntesis de moléculas enantiopuras. La hidrólisis enzimática de nitrilos tiene la capacidad de llevar a cabo conversiones con valores cercanos al 100% de exceso enantiomérico dada la irreversibilidad y enantioselectividad de la reacción. Estas se han utilizado en la síntesis quiral de algunos fármacos y se sabe que actúan con gran estereo y regio-especificidad (Mylerová y Martínková, 2003; Banerjee et al., 20006a, b). Como el ácido (*R*)-4-amino-3-fenilbutirato que se usa como tranquilizante, ó el (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-butanoico intermediario en las síntesis de Lipitor, fármaco que se usa para disminuir los niveles de colesterol (Singh et al., 2006).

La superfamilia de las nitrilasas

Los cianuros son compuestos abundantes en la naturaleza y se les puede encontrar como cianuros inorgánicos (HCN) o como cianuros orgánicos o nitrilos (RCN). Estos últimos son, en su mayoría, extremadamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Pollak et al., 1991). La conversión de un nitrilo a su correspondiente ácido es un proceso que puede llevarse a cabo en un solo paso, tal y como lo hacen las cianuro deshidratasa (CDH) y las nitrilasas. O en dos pasos, pasando por un intermediario amida, como en el caso de las cianuro hidratasa (CH) y las nitrilo hidratasa (O'Reilly y Turner, 2003; Nagasawa et al., 1986).

En base a un análisis de secuencia y de especificidad de la reacción, se agrupó a las CDH, CH y nitrilasas dentro de la misma familia, la cual, a su vez, forma parte de una superfamilia conocida con el nombre de superfamilia de las nitrilasas. Mientras que las nitrilo hidratasa, a pesar de ser funcionalmente más parecidas, quedaron fuera de este grupo debido a la falta de similitud en la secuencia. Se puede decir entonces que dentro de la conversión de nitrilos tenemos dos grupos de enzimas que no están relacionados evolutivamente (O'Reilly y Turner, 2003; Pace y Brenner, 2001).

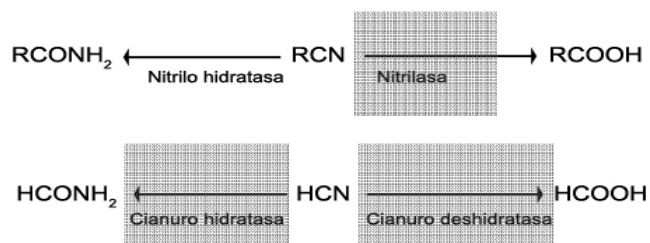


Figura 3. Reacciones de conversión de cianuros en sus correspondientes ácidos carboxílicos. Las enzimas enmarcadas dentro del cuadro gris se encuentran relacionadas evolutivamente, a juzgar por su similitud en su secuencia.

Todos los miembros de esta superfamilia son enzimas que llevan a cabo una gran variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces C-N de tipo no peptídico. Se han clasificado, por similitud de secuencias y por la especificidad de la reacción, en trece ramas distintas. Se piensa que la superfamilia de la nitrilasa probablemente surgió antes de que ocurriera la separación de plantas, animales y hongos. Posteriormente, divergió en familias y luego se dispersó lateralmente a arqueas y bacterias. Aunque históricamente ha sido llamada superfamilia de las nitrilasas, en realidad la mayoría de las ramas contienen miembros que son amidasa con distintas afinidades o enzimas que condensan cadenas acilo

a grupos amino y solamente los miembros de una rama de la superfamilia presentan la actividad de nitrilasa (O'Reilly y Turner, 2003; Pace y Brenner, 2001).

Se puede decir que dentro de la superfamilia de las nitrilasas se llevan a cabo cuatro tipos de reacciones generales. Sin embargo, independientemente del tipo de reacción, se propone que todas estas reacciones proceden a través de un intermediario acil-enzima. Estas reacciones son:

- a) La reacción de la nitrilasa. Como se mencionó anteriormente, sólo la rama 1 de la superfamilia de las nitrilasas lleva a cabo esta función.
- b) La reacción de amidasa. Llevada a cabo por miembros de las ramas 2, 3, 4, 7 y 8.
- c) La reacción de carbamilasa. Realizada por miembros de las ramas 5 y 6.
- d) La reacción de amidasa en sentido inverso. Desempeñada por la rama 9.

El dominio Nit como estructura modelo y la probable triada catalítica de las nitrilasas

Aunque no se tiene la estructura cristalográfica de ninguna nitrilasa, se cuenta con la estructura cristalográfica de algunos miembros de la superfamilia de las nitrilasas, como el dominio Nit de la proteína NitFhit del gusano *C. elegans*, que pertenece a la rama 10 de la superfamilia (PDB ID, 1EMS; Pace et al., 2000), las enzimas N-carbamil-D-amino amido-hidrolasas de *Agrobacterium radiobacter* (PDB ID, 1FO6; Wang et al., 2001) y de *Agrobacterium* sp. cepa KNK712 (PDB ID, 1ERZ; Cheng-Yu et al., 2003), una hidrolasa CN putativa de levadura (PDB ID, 1F89; Kumaran et al., 2003), una proteína hipotética PH0642 de *Pyrococcus horikoshii* (PDB ID, 1J31; Sakai et al., 2004) y una amidasa de *Geobacillus pallidus* RAPc8 (PDB ID, 2PLQ; Agarkar et al., 2007).

A partir del 2000, el grupo de Pace propuso como estructura modelo de las nitrilasas al dominio Nit de la proteína NitFhit de *C. elegans*. NitFhit se encuentra formando parte de un complejo tetramérico, donde se forman dos interfaces homotípicas entre los dominios Nit a las que se les ha dado el nombre de interface norte-sur e interfase este-oeste. Hasta el momento, no se han encontrado sustratos para este dominio, pero se piensa que de tener actividad, ésta mantendría una relación estrecha con el dominio Fhit. Con frecuencia los genes de enzimas que trabajan en rutas metabólicas relacionadas mantienen ubicaciones génicas cercanas entre sí y en algunas ocasiones esto ha coincidido con la fusión de dos genes, permitiendo que en algunos organismos se forme una proteína a partir de dos proteínas sin relación filogenética. Los eventos de fusión han sido bastante comunes en la superfamilia de las

nitrilasas, ya que distintos miembros de las 7 ramas han pasado por este suceso. Es probable que en algunos casos la fusión haya relacionado la producción de amonio con su consumo, aunque en otros parece que este evento incidió en miembros de esta superfamilia que están más relacionados con cascadas de señalización celular. Este es el caso del homólogo de NitFhit en el humano, el cual sirve de supresor de tumores (Pace et al., 2000).

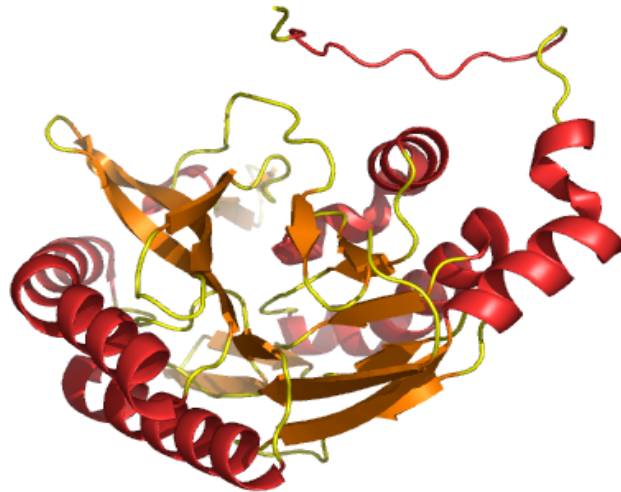


Figura 4. Dominio Nit de la proteína NitFhit de *C. elegans* (Pace et al., 2000). Este dominio presenta el motivo ABBA, en el que tres hélices α (rojo) forman cada una de las tapas y en medio se tiene dos hojas β (naranja) de seis hebras cada una. Los loops se señalan en amarillo y los aminoácidos de la triada catalítica putativa en verde.

A pesar de que se desconoce la función del dominio Nit, esta proteína presenta un 22% de similitud con nitrilasas de plantas y bacterias. Además ha servido para establecer un patrón general de plegamiento que es un motivo estructural único formado por cuatro capas α - β - β - α , el ABBA “sándwich” (Fig. 4), en donde en la parte inferior se encuentran tres hélices α formando una tapa, en medio dos hojas beta de seis hebras cada una y en la parte superior se encuentra otra tapa formada también por tres hélices α . Aunque los segmentos de la secuencia que corresponden a las hélices α y las hebras β están alternados, la arquitectura general de la estructura tridimensional de tipo sándwich α - β - β - α se conserva una vez que se pliega la proteína por completo (Pace et al., 2000; Brenner, 2002). Este motivo estructural posiciona una triada catalítica Glu-Lys-Cys que media la catálisis en la superfamilia de las nitrilasas. El análisis de más de 176 secuencias proteicas no redundantes de la

superfamilia de la nitrilasa (Fig. 5), apoya la idea de que estas enzimas poseen esta triada Glu-Lys-Cys (Pace y Brenner, 2001). De las nitrilasas descritas hasta el momento (rama 1 de la superfamilia), incluyendo aquéllas del género *Rhodococcus*, se ha visto que todas se inactivan por compuestos capaces de modificar químicamente el grupo tiol. Esto es una evidencia que indica la participación de por lo menos una cisteína en la catálisis que desempeñan estas enzimas. Para la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 se determinó la cantidad de cisteínas reactivas por subunidad, utilizando el modificador químico 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico). La estequiometría de la reacción de inactivación, junto con el alineamiento de distintas nitrilasas en el que se observa una cisteína altamente conservada, sugieren la participación de este residuo en la función del sitio activo (Kobayashi et al., 1992). Un estudio posterior en el que se diseñaron enzimas mutantes en las que se sustituyó esta cisteína por alanina, mostró que el cambio causa la pérdida de la actividad catalítica, lo que apoya fuertemente esta idea.

1 -Nitrilasas	f P E a f	h R K l . p T	l . C W E n . . p
2 -Amidasas alifáticas	F P E Y S	Y R K i P W c	i l C d D G n y P
3 -N-Terminal Amidasas	F P E . .	Y r K . F L .	. l C M D . . P Y
4 -Biotinidasa	f P E d .	Y r K . h L y	F t C F D i l f y
5 -B-Ureidopropionasas	. Q E A W	. R K N H I P	N l C Y G R H H P
6 -Carbamilasas	F p E L A	Y R K i H L P	f l C N D R R W P
7 -Pro.NAD+ Sintetasa	f P E L .	. . K . . L P	. l C E D . w . p
8 -Eu. NAD+ Sintetasa	G P E L E	R p K m . l a	E i C E E L w . p
9 -ALP.N-aciltransferasa	w p E . a	. . K . . l v	. i C y E . . f .
10 -Nit y NitFhit	L P E . f	y r K . H l F	. i C Y D . R F p
11 -NB11	. q E l f	Y R K . H l P	. i C w D q w f p
12 -NB12	F P E i F	Q y K l H i T	q l C Y D i E F P
13 -Otras	l P E . .	y r K . h L f	. i C y d . r F p

Figura 5. Alineamiento de las secuencias consenso de las trece ramas de la superfamilia de las nitrilasas (Pace y Brenner, 2001). Los residuos estrictamente conservados en todas las ramas están en letras rojas con fondo amarillo, los residuos conservados en por lo menos nueve ramas, se encuentran en letras azul oscuro con fondo azul claro, mientras que las letras negras con fondo azul turquesa denotan a aquellos residuos conservados en un intervalo de 6 a 8 ramas. Las letras mayúsculas indican un nivel de consenso de al menos 90%, mientras que las letras minúsculas representan un consenso mínimo de 50%. La ausencia de letras indica un consenso menor al 50%.

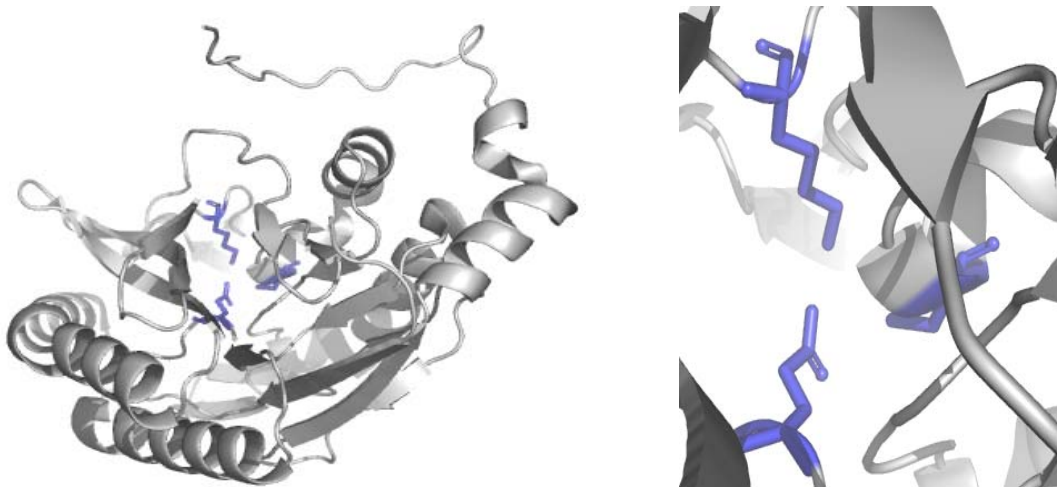


Figura 6. Representación del sitio catalítico putativo formado por los residuos E54, K127 y C169, basada en la estructura cristalográfica del dominio Nit de *C. elegans* (Pace et al., 2000).

Estructura y función de las nitrilasas

En la mayoría de los microorganismos, las nitrilasas no se expresan constitutivamente. Se ha reportado que la nitrilasa en *Nocardia sp.* se induce por benzonitrilo (Collins y Knowles, 1983). El acetonitrilo se ha usado para inducir la expresión de nitrilasa en *Fusarium oxysporum* (Goldhust y Bohak, 1989). En *Rhodococcus rhodochrous* J1 la nitrilasa se induce fuertemente por el isovaleronitrilo (Nagasawa et al., 1988a).

Las nitrilasas son enzimas formadas por subunidades con un tamaño promedio de 40 kDa (variando dentro de un rango de 32 a 47 kDa). Las subunidades se asocian en homooligómeros, siendo este último estado la forma activa. Los homooligómeros son de diferentes tamaños dependiendo de la especie, dentro de un rango de 6 a 26 subunidades (O'Reilly y Turner, 2003). En algunos casos el sustrato induce esta asociación. Por ejemplo, en presencia de benzonitrilo los monómeros de la nitrilasa de *Nocardia sp* NCIB 11216 se asocian en un dodecámero de 560 kDa (Harper, 1977a) y la nitrilasa de *R. rhodochrous*, además de asociarse, se transforma a su forma activa en presencia del sustrato, sales o disolventes orgánicos (Nagasawa et al; 2000). Recientemente, se observó la estructura de uno de estos multímeros mediante microscopía electrónica (Fig. 7). Se trata del oligómero de la nitrilasa

recombinante de *Rhodococcus rhodochrous* J1. Este adoptó una estructura helicoidal tras la modificación pos-transcripcional de sus subunidades, en la que se cortó el extremo carboxilo terminal a partir del aminoácido 327. Aunque de primera intención, esta oligomerización podría ser tachada de artificio, la evidencia indica que es probable que los 39 aminoácidos del extremo carboxilo terminal no sean más que un mero impedimento estérico para la formación de la hélice, por lo que se espera encontrar estructuras similares para los oligómeros de otras nitrilasas (Thuku et al., 2007).



Figura 7. Micrografía electrónica de los oligómeros formados a partir de las subunidades truncadas de la nitrilasa recombinante de *R. rhodochrous* J1. La barra de escala blanca ubicada en la esquina inferior izquierda es igual a 50 nm (Thuku et al., 2007).

Basados en la especificidad por el sustrato, las nitrilasas se clasifican en tres categorías. Aquéllas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos o arilacetónitrilos y las que tienen la capacidad de hidrolizar tanto nitrilos aromáticos como alifáticos (Banerjee et al., 2002).

Mahadevan y Thimann (1964), e incluso Harper (1977a), fueron los primeros en proponer posibles mecanismos catalíticos para las nitrilasas. Actualmente, el mecanismo propuesto con mayor aceptación para la reacción catalizada por las nitrilasas involucra un ataque nucleofílico de un grupo tiol del residuo cisteína de la triada sobre el carbono del grupo ciano, lo que forma un intermediario tiomidato. Después, entra una molécula de agua que se disocia posiblemente por el efecto básico del grupo ciano y el OH ataca nucleofílicamente al carbono imídico formando un intermediario iminoéster tetraédrico que se hidroliza dando lugar al ácido carboxílico, amoniacó y a la enzima libre (Kobayashi et al., 1998).

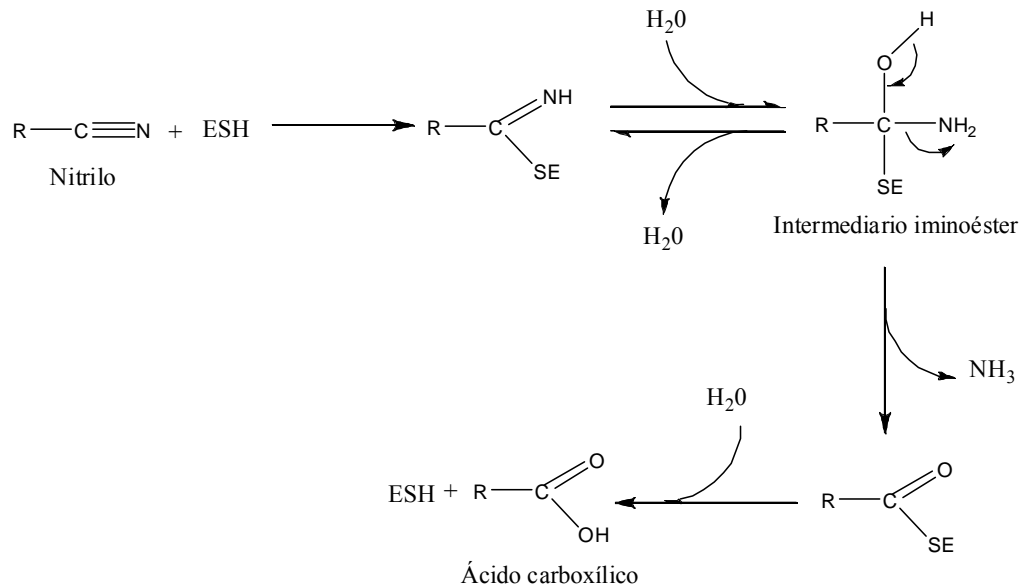


Figura 8. Mecanismo de reacción propuesto para la nitrilasa

Antecedentes

***R. pyridinovorans* como modelo de estudio**

Ignacio Regla (tesis de doctorado, 2005) y Víctor Saldívar realizaron un tamizaje ambiental en Jiutepec, Morelos, en el que se recolectaron diferentes cepas de suelo. La selección se hizo en un medio que contenía un nitrilo aromático (benzonitrilo) o un nitrilo alifático (valeronitrilo), como única fuente de carbono y nitrógeno. La cepa obtenida en ambos medios recibió el nombre de V51B y fue identificada, mediante la secuenciación del gen del RNA ribosomal 16S, como *Rhodococcus pyridinovorans*.

Las nitrilasas se encuentran ampliamente distribuidas dentro del género *Rhodococcus*, el cual está compuesto por mico- actinomicetos Gram-positivos. Los actinomicetos constituyen un grupo mal definido de microorganismos que, aunque son unánimemente clasificados dentro de los Esquizomicetos formando el orden Actinomicetales, en general son estudiados separadamente por sus características especiales. El rasgo más destacable es su capacidad para formar agregados filiformes, parecidos a las hifas fúngicas y que tienen aproximadamente una micra de espesor, originando un micelio ramificado que puede subdividirse en células bacterianas aisladas. Su cultivo en un medio líquido no produce una

turbidez uniforme como en el caso de las bacterias sino que forman agregados y su crecimiento no sigue el modelo exponencial de las bacterias sino el cúbico propio de los hongos.

Los estudios previos sobre el metabolismo de los rodococos han revelado un espectro de actividades enzimáticas que se han aplicado a la transformación estereo y regio-específica de nitrilos y esteroides, y a la biotransformación enantioselectiva de α -amino amidas a (S)- α -amino ácidos, particularmente a la producción industrial de acrilamida.

En los ensayos de actividad realizados por Antonio Anaya (tesis de licenciatura, 2006), tanto las células completas como los extractos celulares de *R. pyridinovorans* V51B fueron capaces de realizar la conversión del benzonitrilo y del valeritrilo, lo que indica que esta cepa sintetiza una nitrilasa capaz de hidrolizar tanto nitrilos aromáticos, como alifáticos.

Esto resulta interesante ya que las nitrilasas que son capaces de hidrolizar ambos tipos de nitrilos son escasas. No hay hasta ahora un estudio completo de estas enzimas, además de que se desconoce su mecanismo de estabilización por ligandos y la relación entre su actividad y su asociación oligomérica.

Objetivo

Este proyecto propone la clonación del gen *nitA* de *R. pyridinovorans* y su subclonación en un vector de expresión en *E. coli* para la producción de la enzima recombinante, con el propósito de hacer un estudio estructural y enzimológico completo para el uso de esta enzima en la síntesis enantioselectiva de ácidos carboxílicos de interés.

Objetivos particulares

Dentro de los objetivos particulares, se ha planeado diseñar un conjunto de oligonucleótidos que sirvieran para poder clonar, mediante PCR, el gen *nitA*. Diseñar oligonucleótidos en base a secuencias consenso obtenidas a partir de alineamientos de secuencias de nitrilasas en el GenBank o en base a la secuenciación de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*. Clonar el gen *nitA* en un vector de expresión y obtener las condiciones de expresión de la proteína en un sistema de *E. coli* bajo el control del promotor lac.

Materiales y Métodos

Medios de cultivo

Medio Luria – Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad (g) requerida para 1 L de medio
Tryptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
Bacto Agar	5

- Se ajusta el pH a 7, en el caso de los medios líquidos no se agrega agar.

Medio con caprolactama

Reactivo	Cantidad (g) requerida para 1 L de medio
Glucosa	15
Glutamato monosódico	3
Fosfato de Na	1
Extracto de Levadura	1
Sulfato de Mg	0.1
Caprolactama	5

- Se ajusta el pH a 7

(Nagasawa et al, 1990c)

Cajas con LB sólido

Se utilizaron concentraciones finales de Kanamicina de $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ y de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ para Ampicilina.

El glicerol y el etanol (99.9%) se obtuvieron de Merck. El marcador de ADN fue una escalera de ADN de 1 kb de Invitrogene. El amortiguador de las reacciones de PCR fue el 10x Reaction Buffer de Stratagene. Para clonar el gen *nitA* se utilizó el pGEM[®]-T Easy Vector System de Promega. El resto de los reactivos que se utilizaron son de Sigma. Se usó agua desionizada y de grado mili Q.

Inducción de la nitrilasa con benzonitrilo, valeronitrilo y caprolactama

La inducción de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* se realizó basada en la información descrita por Nagasawa et al (1988a) y Kobayashi et al (1989b). Esta se llevó a cabo en aproximadamente 3 días utilizando benzonitrilo o valeronitrilo. El microorganismo se incubó a 30°C con agitación (200 rpm). En el caso del benzonitrilo y del valeronitrilo se utilizó un preinóculo de 10 ml para inocular 250 ml de medio LB. Al mismo tiempo, se agregó 1 µl de benzonitrilo por cada ml de medio ó 0.5 µl de valeronitrilo por ml de medio, con la intención de que la bacteria utilizara estos sustratos y empezara a expresar la nitrilasa. Como la bacteria consume el sustrato, al cabo de cierto tiempo es normal que éste desaparezca. Por esta razón, después de cierto tiempo se hicieron refuerzos agregando la misma cantidad de sustrato que se agregó en la inoculación. Entre 4 y 6 h después, se volvió a agregar sustrato. Entre 14 y 18 h después se utilizó el cultivo de 250 ml para inocular un matraz de 1 L de medio LB, al mismo tiempo se volvió a agregar sustrato. Se agregó sustrato por última vez entre las 28 y las 30 h y se cosecharon las células a las 36 h.

También se ocupó caprolactama como inductor. Para este caso se utilizó un medio de cultivo diferente reportado por Nagasawa et al (1990c). Dado que la caprolactama no es sustrato, sus niveles no disminuyen a lo largo del tiempo, por lo que no fue necesario agregar caprolactama posteriormente. En este caso la inducción tardó alrededor de 4 días, al termino de los cuales se cosecharon las células.

Se creció un cultivo control para tener un punto de referencia. A este cultivo no se le agregó ningún inductor y se crecieron de manera similar a los cultivos inducidos con benzonitrilo y valeronitrilo, ya que se utilizó un preinóculo de 10 ml para inocular 250 ml de LB, los cuales fueron a su vez utilizados para inocular 1 L de LB, cosechándose a las 36 h aproximadamente. La inducción se realizó en dos ocasiones para probar la reproducibilidad del evento.

Después de cosechar las células se lavaron de 3 a 4 veces utilizando un amortiguador (KHPO₄ 50

mM, pH 7.2). Posteriormente, se pusieron 8 ml de *amortiguador de lisis* (Trietanolamina 10 mM (TEA), ácido etilendiaminotetraacético 1.0 mM (EDTA) y ditioneitol 1.0 mM (DTT), pH 7.6), se agregó 1 mg de lizosima por cada 3 g de biomasa y se puso en agitación, a 37 °C por 3 h.

Para sonicar se utilizaron 8 pulsos de 2 min de duración a una amplitud de 60, dejando lapsos de 1 min entre cada pulso para evitar que la muestra se sobrecalentara. El sonicado se centrifugó a 18 000 rpm por 30 min, se recuperó el sobrenadante de esta centrifugación y se hizo una precipitación diferencial del 20% al 45% con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Cada una de las muestras de la primera y la segunda inducción (Sin inductor [S1 y S2], benzonitrilo [B1 y B2], valeronitrilo [V1 y V2] y caprolactama [C1 y C2]) se dializaron y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Obtención de la secuencia por espectrometría de masas

Con la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza, se realizó un análisis de espectrometría de masas a la proteína inducida por los sustratos. Para realizar este análisis, se corrieron dos SDS-PAGE al 7.5%. El primer gel fue preparativo y en este sólo se corrió el precipitado al 45% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de un cultivo inducido con valeronitrilo. El segundo gel fue analítico y se utilizó para correr el marcador de pesos moleculares junto con las muestras de precipitados al 45% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de cultivos inducidos con caprolactama y valeronitrilo. También, se corrieron muestras de los mismos cultivos sin inducir.

Se realizó una transferencia del gel preparativo a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), donde posteriormente se tiñó con azul de Coomassie. La banda correspondiente a la nitrilasa fue identificada y aislada utilizando el gel analítico como referencia. Se realizó una digestión con tripsina de esta banda para realizar el análisis de los péptidos mediante el espectrómetro de masas por ionización por electro spray (ESI). Se usó un espectrómetro de masas híbrido en tándem 3 200 Q TRAP de Applied Biosystems/MDS Sciex, equipado con una fuente iónica nano-electro spray y una cabeza MicroIonSpray II. El instrumento estaba acoplado en línea a un sistema de nano-cromatografía líquida de ultra rendimiento ACQUITY de Waters (nanoACQUITY UPLC), equipado con una columna de desalado y una columna analítica C18 UPLC con puentes de etileno (BEH), ambas de Waters. El espectrómetro de masas se operó en modo de adquisición dependiente de información, lo que involucra un cambio automático del modo MS al MS/MS en la detección de los iones cargados (2^+ a 4^+). Para la identificación de proteínas, los datos de MS/MS se usaron para

realizar una búsqueda en la base de datos no redundante del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBIInr, <http://www.ncbi.nih.gov>) usando el programa MASCOT (Versión 1.6b9, Matrix Science, UK).

Transformación de células competentes

Se prepararon células electro y quimiocompetentes de *E. coli* de las cepas Top10, XL1-Blue y BL21 (DE3) pLys. Para cada transformación se usaron 50 μ L de células y de 1 a 3 μ L del plásmido correspondiente. Las células electrocompetentes se transformaron con un pulso de 2.5 V en una celda de 0.2 cm, a 4 °C. Las células quimiocompetentes se incubaron a 4°C y se les dio un choque térmico a 42 °C por 50 s. Para ambos casos, después de la transformación, las células se incubaron nuevamente a 4 °C por 5 min. Se recuperaron en 1 ml de LB, dejándolas a 37°C con agitación (200 rpm) por 1 h. Al término de esta hora se sembraron de 100 a 300 μ L de las células en placas de agar con el antibiótico correspondiente.

Purificación de ADN total

Para la obtención del ADN genómico total se centrifugaron cultivos de *R. pyridinovorans* de 10 ml crecido por 12 h, la pastilla se resuspendió en 100 μ L de disolución 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 10mg/ml de lisozima. Se incubó a 37°C, 1 h. Se adicionó 200 μ L de disolución recién preparada de 0.2 M NaOH y 4% de SDS, mezclándose y dejando incubar en hielo durante 10 min. Se agregó 150 μ L de una disolución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente. A la fase líquida se le agregó medio volumen de fenol saturado de amortiguador y medio volumen de cloroformo. Se mezcló, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa. Este paso puede repetirse varias veces para procurar que la muestra de ADN esté limpia. Se agregó 2-propanol y se dejó a temperatura ambiente durante por lo menos 30 min. Finalmente, se centrifugó, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 50 μ L de H₂O con RNAsa a una concentración final de 50 μ g/ml.

Purificación de plásmidos de ADN

Para la obtención de plásmidos derivados de pGEM-T de las cepas recombinantes se utilizó el QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). El principio bajo el cual trabaja este método es realizar la lisis alcalina de las células, para, posteriormente, separar lípidos y demás componentes proteicos del ADN. Finalmente, el ADN se une a una columna con una membrana de silicatos (A altas concentraciones de sal se forma un puente entre las cargas negativas de la membrana, las cargas positivas de las sales y las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN). Para los plásmidos pET24-a+ y derivados de este se utilizó la extracción por fenol-cloroformo. Esto se hizo con la finalidad de obtener una concentración apropiada del vector, dado que el método de obtención por columna resultó poco eficiente para este tipo de vector y cualquier constructo derivado de éste.

Diseño de oligonucleótidos para amplificar nitA a partir del ADN total

Se diseñaron los oligonucleótidos para que fueran complementarios a los extremos 5' y 3' del gen de la secuencia CAC88237 de *R. rhodochrous*, a los cuales se les dio el nombre de Amipa y Carparv para facilitar su manejo (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la clonación de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*

Nombre:	Amipa	Carparv
Secuencia (5'-3'):	ATG GTC GAA TAC ACA AAC ACA	TCA GAG GGT GGC TGT CGC CCG
Longitud (b):	21	21
Contenido de GC:	38.1%	71.4%
T _m :	52.3°C	66.4°C

Diseño de oligonucleótidos para la inserción de sitios de restricción en el gen nitA

Para introducir los sitios de restricción para *NdeI* y *HindIII* en las regiones flanqueantes del gen *nitA*, se diseñaron dos oligonucleótidos con secuencia similar a los que se utilizaron para amplificar el gen a partir del ADN genómico, con la diferencia de que al oligo que hibrida en el extremo 5' se le

adicionó el sitio de restricción para *NdeI* y al que hibrida en el extremo contrario, el de *HindIII*. Se ajustó la longitud de la secuencia de ambos oligos para que la T_m no mostrara valores muy distintos entre uno y otro. A estos oligonucleótidos se les dio el nombre de *AndeI* y *ChindIII* (Tabla 2) para facilitar el referirse a ellos.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para introducir sitios de restricción en la nitrilasa de *R. pyridinovorans*

Nombre:	<i>AndeI</i>	<i>ChindIII</i>
Secuencia (5'-3'):	CAT ATG GTC GAA TAC ACA AAC ACA TTC	AAG CTT TCA GAG GGT GGC TGT
Longitud (b):	27	21
Contenido de GC:	37.0%	52.4%
T_m :	54.6°C	59.1°C

Reacción en cadena de la polimerasa

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler de MJ Research. Dentro de la mezcla de reacción de cada PCR se incluyó el amortiguador (10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton x-100, 0.1 mg ml^{-1} de BSA, pH 8.8), moléculas ADN templado, dNTPs y dos oligonucleótidos como cebadores. Se utilizó la Taq polimerasa de New England BioLabs. El ciclado fue 2' a 95°C, 30'' a 50°C y 1'20'' a 68°C.

Se probaron las siguientes condiciones para amplificar el gen:

(1) 0.4 pmol μL^{-1} de *Amipa*, 1 pmol μL^{-1} de *Carpav*, 3.35 ng μL^{-1} de ADN. (2) 0.4 pmol μL^{-1} de *Amipa*, 1 pmol μL^{-1} de *Carpav*, 33.5 ng μL^{-1} de ADN. (3) 1.4 pmol μL^{-1} de *Amipa*, 1 pmol μL^{-1} de *Carpav*, 3.35 ng μL^{-1} de ADN. (4) 1.4 pmol μL^{-1} de *Amipa*, 1 pmol μL^{-1} de *Carpav*, 33.5 ng μL^{-1} de ADN.

Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizaron geles al 1% de agarosa en amortiguador TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 10 min. Como estándar de masa molecular se usó el marcador de pesos moleculares de escalera de ADN de 1kb de Invitrogene.

Purificación de ADN en geles de agarosa

En la purificación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit. Este kit está diseñado para extraer ADN de 70 pb a 10 kpb de geles de agarosa. La purificación elimina nucleótidos, enzimas (polimerasas o enzimas de restricción) y sales, previniendo que interfieran en las siguientes reacciones. Se basa en correr un gel de agarosa 1%, a partir del cual se corta el fragmento que contiene el ADN que se desea purificar. Este fragmento se disuelve y se une a columnas de sílica, de la misma forma que para la purificación de plásmidos.

Secuenciación

En cada paso de la clonación se mandó a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron los oligonucleótidos universales SP6_{pro} y T7_{ter} para las clonas en pGEM-T Easy vector, T7_{pro} y T7_{ter} para las del vector pET24-a+ y para secuenciar el amplificado de PCR se usaron los mismos oligonucleótidos que se ocuparon en la reacción (Carparv y Amipa). Todos los alineamientos se realizaron con el programa Bioedit.

Ensayos de expresión y solubilidad

Se ocuparon células de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLys, esta tiene un plásmido que le confiere resistencia a Cm y codifica de forma constitutiva el represor de *lac* (*lacI^q*) y la lisozima.

Se probó la expresión y solubilidad del gen *nitA* en pET24-a+ con BL21 (DE3) Plys y del gen *nitA* en pGEM-T utilizando la misma cepa.

Expresión. Para cada ensayo se usaron 2.5 ml de un cultivo de 12 h en 10 ml de LB para inocular 250 ml de LB. Todos los cultivos se crecieron con kanamicina. Los cultivos se dejaron crecer hasta que alcanzaran una D.O.₆₀₀ de 0.5 – 0.6, momento en el que se agregó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). En estos ensayos se probaron distintas concentraciones de IPTG (0.05, 0.5 y 1 mM) y cada uno se hizo a 25 y 37°C. Se tomaron alícuotas antes de inducir y 1 h, 2 h y 3 h después de la inducción. Para las inducciones de clonas en pGEM-T se tomaron alícuotas a las 24 h.

Solubilidad. A las 3 h después de la inducción, se centrifugaron los cultivos a 10 000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 7 ml de *amortiguador de lisis* con NaCl 2 M. Se sonicó a 4°C con 8 pulsos de 35 de amplitud y 30 s de duración, dejando intervalos de 1 min entre pulso y pulso. Después de sonicar, se centrifugó el extracto celular a 10 000 rpm por 10 min. Se tomó una alícuota de 10 µL del sobrenadante y otra alícuota de la pastilla.

SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)

Se utilizó el método de Laemli (Laemmli, 1970), con geles al 7.5 y al 12% de poliacrilamida. Se usó el marcador Dalton V como estándar de peso molecular y para la tinción de los geles se aplicó azul de Coomassie.

Expresión de la nitrilasa recombinante

La expresión se realizó en células BL21 (DE3) pLys, utilizando la segunda clona que se obtuvo del gen *nitA* dentro del vector pET24a+. Cada litro de cultivo fue inoculado con un preinoculo de 10 ml crecido por 12 h y se dejó en crecimiento hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.5 – 0.6. En este momento se añadió 0.5 mM de IPTG a 37°C durante 3 h, al término de las cuales se centrifugó para cosechar las células. Las células obtenidas de un litro de cultivo se resuspendieron en 40 ml de *amortiguador de lisis* con NaCl 2 M. Las células se rompieron por sonicación y el extracto total se centrifugó a 1 500 rpm durante 15 min a 4°C para separar la fracción soluble. El sobrenadante se precipitó primero al 20% y luego al 45% de saturación con (NH₄)₂SO₄.

Purificación de la nitrilasa recombinante

En una estrecha colaboración con el Q.F.B Ramiro Antonio Anaya de la UNAM, se montó el método de purificación de la nitrilasa recombinante. La fracción precipitada al 45% se solubilizó en un volumen mínimo de amortiguador de fosfatos 10 mM/ EDTA 1mM/ NaCl 200 mM/ β-mercaptoetanol 14.25 mM, pH 7.0 (Amortiguador P). Después, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min. El solubilizado se pasó por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300 equilibrada con

amortiguador P a un flujo de 0.5 ml min^{-1} . Las fracciones obtenidas en esta y las siguientes cromatografías fueron analizadas por SDS-PAGE y por ensayos de actividad para el sustrato benzonitrilo. La determinación de la actividad se hizo utilizando el método cromatográfico por HPLC y el método colorimétrico. Las fracciones con actividad recolectadas a la salida de esta columna se juntaron y se concentraron con una segunda cromatografía. En este paso, se utilizó una columna de intercambio aniónico Source Q equilibrada con el amortiguador P, aplicando un gradiente de NaCl de 200 mM a 350 mM en 70 min. Una vez terminado el gradiente, se realizó un lavado llevando a 1 M de NaCl el amortiguador de corrida. Con la finalidad de concentrar toda la enzima, a las fracciones con actividad recolectadas durante este paso de purificación se les agregó el mismo volumen de amortiguador P sin NaCl. La muestra se pasó nuevamente por la columna de intercambio iónico equilibrada con amortiguador P. Se cambió la concentración de NaCl de 200 a 500 mM sin gradiente, para despegar la proteína de la columna.

Ensayo cromatográfico de actividad

Se utilizó HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) acoplado a una columna C18 de Waters para seguir la reacción de conversión de benzonitrilo a ácido benzoico, dado que esta columna puede separar estos dos compuestos. No obstante, este método sólo pudo aplicarse para este sustrato, puesto que ni el valeronitrilo ni el ácido valérico absorben en el UV.

La mezcla de reacción incluye benzonitrilo 5 mM y la enzima o muestra a la que se le quiera determinar la actividad de nitrilasa, en un volumen total de 100 μL . Para detener la reacción se tomaron 50 μL de esta mezcla y se le agregaron 50 ml de fase (70% de amortiguador de PO_4 50 mM, pH 3 y 30% de acetonitrilo). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 min para separar la proteína de los demás componentes y así poder detectar estos últimos por cromatografía.

Se utilizó un flujo de 1 ml min^{-1} y se midió la absorbancia a 220 nm a la salida de la columna durante 10 min. En general el perfil cromatográfico que se obtiene presenta hasta tres picos. El primer pico que aparece entre 1 y 2 min corresponde al β -mercaptoetanol que se usa como reductor de la enzima. En muchas ocasiones, este pico es incluso despreciable. El segundo pico sale entre los 3 y 4 min y corresponde al ácido benzoico, mientras que el tercer pico, correspondiente al benzonitrilo, sale entre los 6 y 7 min. El área bajo la curva se utilizó para calcular el porcentaje de transformación total a 10 y 20 min de reacción.

Ensayo de determinación de amonio con L-GDH

Para realizar la cuantificación de amonio se usó un ensayo de actividad acoplado en el que se ocupó a la enzima L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH_b) de Sigma. Cada mezcla de reacción se realizó en amortiguador de trietanolamina 100 mM, pH 7.6 en un volumen total de 1 ml e incluye α -cetoglutarato 13 mM, NADH 200 μ M, benzonitrilo o valeritrilo (para los cuales se probaron diferentes concentraciones dentro del rango de 1 a 20 mM), la enzima o muestra a la que se le quiera determinar la actividad de nitrilasa y 0.1 mg μ l⁻¹ de L-GDH_b. En este ensayo, es importante que la muestra se encuentre libre de (NH₄)₂SO₄, ya que este compuesto interfiere directamente en la medición. Por lo que, todas las muestras fueron previamente dializadas. Para los ensayos a tiempo fijo, las reacciones se dejaron transcurrir de 1.5 a 15 min, al término de los cuales se detuvieron con la adición de HCl. Posteriormente, se neutralizaron las mezclas con la adición de NaOH y se centrifugaron para deshacerse de la nitrilasa. Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro a 340 nm. Se dedujo la diferencia en la absorbancia (Δ Abs) restándole al valor de absorbancia final (la absorbancia al término de la reacción) el valor de la absorbancia inicial (la absorbancia antes de comenzar la reacción).

Ensayo colorimétrico de actividad

Se utilizó el kit comercial para medición de amonio de Merck. El ensayo se probó a escala para manejar volúmenes totales de 1 ml. Para detener la reacción, por cada ml de la mezcla de reacción, se agregaron 120 μ l de una mezcla de los reactivos 1 y 2 (se disuelven 14 mg del reactivo 1 por cada 550 μ l del reactivo 2). El reactivo 1 es hidróxido de sodio (NaOH) y el reactivo 2 es hipoclorito de sodio (NaClO) disuelto en un derivado del fenol. Las reacciones se detuvieron al agregar esta solución, con lo que se alcalinizó la mezcla y la enzima quedó inactiva. Se dejaron incubar por 10 min a 30°C, al término de los cuales se agregaron 14 μ l del reactivo 3 (nitroprusiato). Las mezclas se dejaron durante 5 min más, momento durante el cual se formó el indofenol gradualmente hasta llegar a un máximo, adquiriendo una coloración verdosa. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 580 nm.

Resultados y discusión

Búsqueda de secuencias consenso

Para realizar el diseño de un conjunto de oligonucleótidos que fueran capaces de hibridizar con la secuencia del gen *nitA*, se hizo la búsqueda de secuencias consenso, es decir, secuencias que estuvieran conservadas entre nitrilasas. Como una primera aproximación, se realizó una búsqueda mediante un BLAST de proteínas que mostraran parentesco con secuencias de nitrilasas. El BLAST arrojó como resultado las secuencias de más de 480 proteínas con un intervalo promedio de identidad del 34 al 68%. Dentro de estas secuencias se obtuvieron nitrilasas de organismos conocidos, nitrilasas de organismos no cultivados, nitrilasas putativas, cianuro hidratadas, amidohidrolasas, entre otras. A partir de esta primera búsqueda, se seleccionaron las secuencias de aminoácidos de 25 nitrilasas para las cuales se conoce el organismo del que provienen y se realizó un alineamiento entre estas secuencias (Fig. 9). En este alineamiento, los residuos estrictamente conservados se encuentran marcados en rojo, los menos conservados se encuentran en azul y los residuos variables se encuentran en negro. Es de destacarse que en las partes centrales de la secuencia se encuentran algunas regiones bien conservadas. Sin embargo, las regiones que corresponden a los extremos amino y carboxilo terminal presentan una elevada variabilidad, estos aminoácidos están marcados en negro en la figura 9.

En este alineamiento, también, se observa la triada catalítica conformada por los residuos G70, K166 y C201 marcados con una estrella, los cuales se encuentran estrictamente conservados en las 25 secuencias analizadas. Sin embargo, no se pudo obtener ninguna secuencia consenso para los extremos amino y carboxilo del gen de la nitrilasa.

★

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

1 HVEYNTTFKVAARVQAPVHFDAAKTVOKTVSIIAERARNGCELVAFPEVFPYGPY---HIWVDSPLAG--MAKFAVRYHENSHTDPS---HYVQLLDAARDNHTA

2 MSSNPPELKYTKYVATVQAEVPLDADATIDKRIQFIEERAKNGEFLAFPEVHPIGPY---MAWIGDVKWA--VSDFIPKYHENSHTLGDG---RHRLQLAARQNHIA

3 MKVATVQAEVPLDADATIDKRIQFIEERAKNGEFLAFPEVHPIGPY---MAWIGDVKWA--VSDFIPKYHENSHTLGDG---RHRLQLAARQNHIA

29 MYSYNSKFLAATVQAEVPLDADATIDKSIQIIEERAKNGASLAFPEVFPYGPY---MAWLDSPAG--LS--FTSRYHENSHTLGDG---RHRLQLAARQNHIA

11 MVTYHKQYKVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---HMLDSDPAH--GMQFVQRNFNDLVEGSE---PFERLCARAAQHIA

12 MTTSETAKYKVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---HMLDSDPAH--GMQFVQRNFNDLVEGSE---PFERLCARAAQHIA

18 MGLAHPKYKVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---HMLDSDPAH--GMQFVQRNFNDLVEGSE---PFERLCARAAQHIA

16 MKEPLKYACVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

14 MSHQKQVVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

22 MQDTKFKVVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

23 MQTRKIVRAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

32 MDTTFKAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

35 MTKYRVGAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

17 MTSIYPKFRAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

26 MNAHYPKFAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

24 MKNYPTVVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

27 MSNYPKYVAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FLMLDAPAH--NMPLVQRVYHQSLVLDV---QARRISDAAARHLGLY

4 MLGKIMLNYTKIRAAQAISVPLFSQGGTMEKYLDAIARNAKGVELVFPETFPYGPY---FSFVEPPVL--HGKSHLKLQERYVTPGK---VTQATIAQAARKTHGV

5 MTSIPRIVRAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FSFVEPPVL--HGKSHLKLQERYVTPGK---VTQATIAQAARKTHGV

6 MSOKIRVRAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FSFVEPPVL--HGKSHLKLQERYVTPGK---VTQATIAQAARKTHGV

7 MEAPIVVAAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FSFVEPPVL--HGKSHLKLQERYVTPGK---VTQATIAQAARKTHGV

10 MADKIIVAAARVQAPVFLDLEAGVAKRIGLTAQAAEASLAFPEVHPIGPY---FSFVEPPVL--HGKSHLKLQERYVTPGK---VTQATIAQAARKTHGV

13 MSDSASLSPK-SVAARVQAPVFLDPAATVQKACALIAERAGNGAQLVAFPEVFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

19 MDSQFVFRRAARVQAPVFLDPAATVQKACALIAERAGNGAQLVAFPEVFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

37 MPAKSFLLAAQVPEVYHDKGEGTLDKTCRYIEQAGRDGADIVVPEFTFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

8 MSSTKDMSTVQNAATPFNGVA--PSTIVRYTIVQSSVYNDTPATIDKRAEKIYEAASKAGELVFPETFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

9 MSTSEN-TPFNGVA--SSTIVRYTIVQSSVYNDTPATIDKRAEKIYEAASKAGELVFPETFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

33 MALVPSRSDSEALPEVEHNAAGADQATTARVYVQASSVYDTPATIDKRAEKIYEAASKAGELVFPETFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

15 MKTDLRVAVVQAGAPVFDVQVSGVSKRCLDARAAKGAELVAFPEVFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

34 MKYKAGAVVQAVPFDVQVSGVSKRCLDARAAKGAELVAFPEVFPYGPY---MMLMTPIE--GAEWHMLYRARSVYDGP---EQALRAARVKAQLT

21 MTTHRIAVIQDGPVQDAMATREKMSLRASAKAQGRLALFPEAFVGGYKGDHIFLGGRTPQGRQYRYAETAIVVPGP---VTERIGQIAEAGDMF

31 MSCHRVAVIQAGTSLDFTEKTLDRMEALCRQAQONVELAVPEYIGYKGLDFGARMGTRTEAGREDFLYRKAIVVPGK---ETARIGSFAAKNHAY

36 MPKIAIVQAGTSLDFTEKTLDRMEALCRQAQONVELAVPEYIGYKGLDFGARMGTRTEAGREDFLYRKAIVVPGK---ETARIGSFAAKNHAY

20 MMSVIAALQIGASPLGTRATLDTLGYETAIRDSGASLVLPPEARVLLGKGEITGTRLYRPEGRDARYRYAQAIDVPGP---ETDELAAALSORGTGAS

30 MTKIATIQRPVLLDRGATITRAVQVMEARAAASLIVPESEFIPGYSHI--MRLAAGRDGAVHGLHARLLANAVDLGGG---DLAELCEARAKNHAY

28 MIVKVAITQKPPVLLDLKSSLNRAVEIMNEYSNDGQALVFPPEAFIPGYSHI--MRLAAGRDGAVHGLHARLLANAVDLGGG---DLAELCEARAKNHAY

25 MRLTQEGVHMLRNPLVRAAQVAPITFLNRDKTYEAKRACVIAERAGNGAQLVFPPEAFIPGYSHI--MRLAAGRDGAVHGLHARLLANAVDLGGG---DLAELCEARAKNHAY

ConsensusvaavQa.pv..d..at..k.....i.eAa..Ga.lv.FPE.f.pgYP.....f.....ry..na.....gp.....l..aa.....

★ ★

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

1 VVYGISE-RDG--GSLYNTQLVIDADGQLVARRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--PFARL GALLNCEHFQTLTKYAHYSMEQVHYASMPGNSLYQ--PEV---PAFGVDAQLT---ATRYA

2 LVHGYSE-KDG--ASRYLSQVFIQDQGDIVANRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

3 MVYGYSE-KDG--ASRYLSQVFIQDQGDIVANRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

29 LVHGYSE-REA--GSRYLQVFIQDQGDIVANRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

11 VVLGFTE-RSG--GTLYLAQALIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

12 VVLGFCE-RDG--GTLYLAQALIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

18 AVLGLSE-RDG--GSLYLAQALIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

14 VVLGYSE-RNK--ASLYIGQIIDDHGETVGRVRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

16 VMHGYSE-IDG--GSIYMAQSFISSEGEILFHRKRLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

22 VLVHGYSE-IDG--GTLYLSQVFIQDQGDIVANRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

23 IALGYSE-RSG--GSLYLQVFIQDQGDIVANRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

32 LSFVGYSE-RAG--RTLYMSQMLIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

35 IVLGYSE-RDA--GSIYMAQSFISSEGEILFHRKRLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

17 VCISSCE-KDG--GSLYLAQALIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

26 VCISSCE-KDG--GSLYLAQALIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERSVYGEENGSIDISYVDH--TLGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

24 VCVSYSE-KDN--ASLYLQLWFDQPNGLIGKRRKFKPTSSERAVHGDGDSHAPVFKT--EYGNL GGLQCEHFLPLNIAARHNSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

27 FCVSYTE-KDG--GSLYLTQLWFDQPNGLIGKRRKFKPTSSERAVHGDGDSHAPVFKT--EYGNL GGLQCEHFLPLNIAARHNSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

4 VLVGYNE-REE--GSLYNTQLIFDADGALVLRKRKLTPTHYERHVMYHGGDGGAGLTVYDT--TVGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

5 VVYVYNE-RDH--GSLYNTQLIFDADGALVLRKRKLTPTHYERHVMYHGGDGGAGLTVYDT--TVGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

6 VLVGYNE-RDH--GSLYNTQLIFDADGALVLRKRKLTPTHYERHVMYHGGDGGAGLTVYDT--TVGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

7 VLLGYNE-RDG--GSLYNAQLLIDDGCRVYVTRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

10 VLLGYNE-RDG--GSLYNTQLLISDQGDILLKRRKLTPTHYERHVMYHGGDGGAGLTVYDT--TVGRL GALLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

13 LVTGNE-RDPVSGTLYNSMLVIGADGSLGRHKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

19 LSVGYTE-RTNISMGCLYNTLFLFAPGTELLNHRKLVPTMAEKLTHAGGDSIRVYDT--EYGNL GGLQCEHFLPLNIAARHNSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

37 LVLGTNETSDRQGETLYNSLFDONTGELMGRHKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

8 LVHGAIEKE--GYTYLCTVLFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

9 LVHGAIEKD--GYTYLCTVLFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

33 LVIGVIERA--GYTYLCTVLFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

15 FVIGVIERD--GTYLCTVLFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

34 VLVGYNERE--LGTMYCTILFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

21 VVYGYERE--GTYLCTVLFSSPQGFQKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

31 VLVGYIERE--EATLYCTALFFAPDGLIGKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

36 IYVGYIERE--ASTLYCSVFFYSPSG--YLKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

38 VLVGYIERG--GSLYCTALFFAPDGLIGKRRKLNPTSLERCINGGGDSTIPYVDT--PIGKLGARICENMPLRYTALYAKGIELYCAPTAD--GSKWEQS--SMLHIA

20 IYVGNEDRDRERGGLTYNTVYVIGADGCRVYVTRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

30 VYVGNEDRDRERGGLTYNTVYVIGADGCRVYVTRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

28 VYVGNEDRDRERGGLTYNTVYVIGADGCRVYVTRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

25 VYVGNEDRDRERGGLTYNTVYVIGADGCRVYVTRRKLKPTHYERTIYGEENGTDFLTHDF--GFRVYVGLNCEHFQPLSKYHMYSLNEQIHYASMPAHFALT--PDV---HQLSVEANDT---VTRSYA

Consensus ..v.g..E.....gt.LY.tql.id..G....khRKL.PT..ER...w.G.#gs.l.v.dt ..G..Gal.CwEh..p.L.r.a\$y...e#lh.a..p..... ..r..a

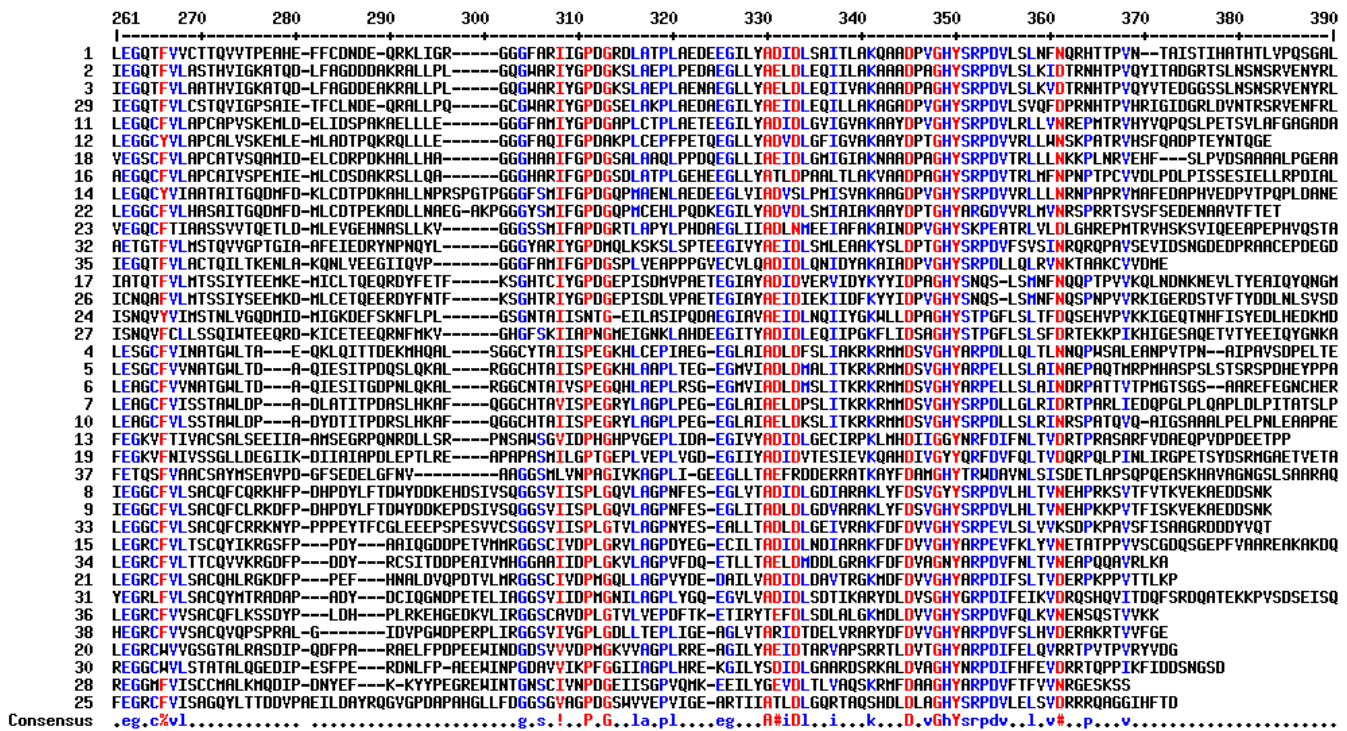


Figura 9. Alineamiento múltiple de 25 secuencias de nitrilasas de especies conocidas.

Inducción de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*

Como no se encontraron secuencias consenso en los extremos a partir de las cuales se pudieran diseñar oligonucleótidos que sirvieran para amplificar el gen de la nitrilasa, hubo un cambio de estrategia. Se buscó obtener una banda de proteína en cultivos inducidos que correspondiera a la nitrilasa de *R. pyridinovorans*, con el fin de secuenciarla, deducir la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *nitA* y diseñar en base a esta los oligonucleótidos necesarios para clonar el gen.

Recordemos que las nitrilasas no son enzimas que se expresen de forma constitutiva y que, generalmente, requieren de la presencia de sustrato para hacerlo. La nitrilasa de *R. pyridinovorans* no es la excepción, esta enzima se ha logrado expresar utilizando benzonitrilo, valeronitrilo y caprolactama. Aún cuando la caprolactama no es sustrato de esta enzima, ha mostrado ser un inductor eficiente, además de ser muy barato, estable y seguro. Se piensa que la forma en la que actúan estas

moléculas sería afectando el control transcripcional del gen *nitA*. Este gen se encuentra bajo el control de un regulador transcripcional llamado *nitR*. Se piensa que cuando el sustrato o la caprolactama están presentes en el medio, éstas forman un complejo con *nitR*, este complejo se une a un sitio específico dentro de la región del promotor de *nitA* (*PnitA*) y estimula la transcripción de *nitA* (Komeda et al., 1996).

Aunque el proceso de inducción de la nitrilasa utilizando caprolactama tarda 60 h, presenta la ventaja de que generalmente se obtiene más biomasa y, por lo tanto, un poco más de proteína.

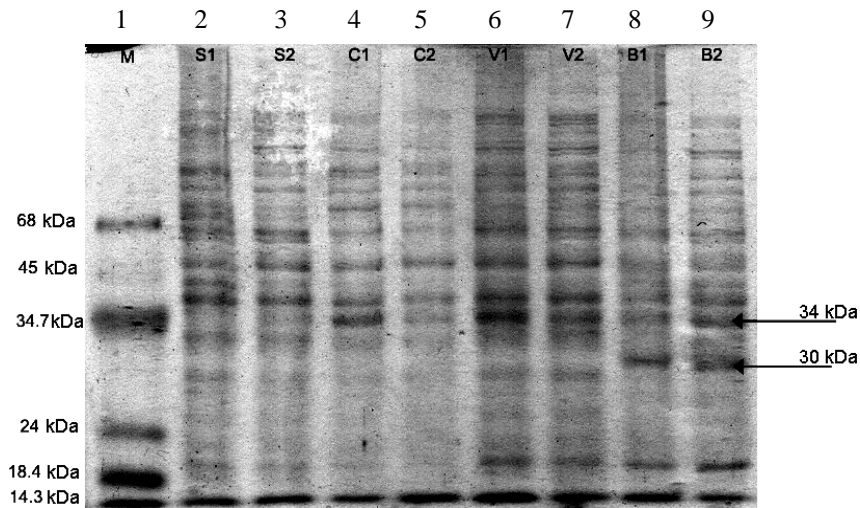


Figura 10. Inducción de la nitrilasa en células de *R. pyridinovorans*. (1) Marcador de peso molecular. (2) y (3) Cultivos sin inductor. (3) y (4) Cultivos inducidos con caprolactama. (6) y (7) Cultivos inducidos con valeronitrilo. (8) y (9) Cultivos inducidos con benzonitrilo. En las inducciones realizadas con valeronitrilo, benzonitrilo y caprolactama podemos observar la aparición de una banda de aproximadamente 34 kDa.

En la figura 10 se puede ver que en las muestras inducidas con caprolactama y valeronitrilo aparece una banda de proteína en los cultivos inducidos de aproximadamente 34 kDa. La misma banda aparece con benzonitrilo como inductor, con la diferencia de que en este último aparece una segunda banda de 30 kDa. En el gel se muestra el patrón de bandas de dos cultivos diferentes. Esto significa que la inducción es reproducible. El peso molecular aparente, 34 kDa, corresponde al peso promedio reportado para el monómero de la nitrilasa de otras especies.

Obtención de la secuencia por espectrometría de masas

A partir de la banda de proteína del cultivo inducido con valeronitrilo fue posible obtener la secuencia de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* como se describe a continuación. Se corrió un gel preparativo de la fracción al 45% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de un cultivo inducido con valeronitrilo (Fig. 11, carril 1), el gel fue transferido con éxito a una membrana de PVDF. Ya en esta membrana se tiñó y se identificó la banda correspondiente a la nitrilasa utilizando el gel analítico como referencia. El gel analítico muestra la aparición de una banda con un peso aproximado de 35 kDa, tanto para la muestra inducida con caprolactama, como para aquella en la que se usó valeronitrilo (Fig. 11 carriles 3 y 4). En estas muestras inducidas al igual que en el gel preparativo, apareció una segunda banda de aproximadamente 34 kDa. Esta banda no se había podido apreciar durante las inducciones realizadas anteriormente, puesto que se sobreponía con la banda de 35 kDa por la matriz de los geles utilizados.

La banda de 35 kDa se cortó y se digirió con tripsina para secuenciar los péptidos resultantes por espectrometría de masas, en colaboración con el Dr. Guillermo Mendoza. Se realizaron dos corridas en el espectrómetro de masas, durante las cuales se secuenciaron 9 péptidos (Tabla 3). Cada péptido obtuvo un mouse score mayor a 54, lo que indica identidad ($p < 0.05$). Estos péptidos fueron analizados con el programa Mascot® con el fin de identificar homólogos de nuestra nitrilasa. Mascot es una herramienta de cómputo que utiliza los datos de la espectrometría de masas para identificar proteínas por comparación con espectros de masas calculados para las secuencias primarias depositadas en las bases de datos de secuencia.

Los resultados obtenidos con los péptidos de la primera corrida indicaron que la proteína más parecida era la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi et al., 1992). Sin embargo, durante la segunda corrida del espectrómetro de masas se lograron identificar más péptidos, lográndose una cobertura de la secuencia del 37.16 %, lo que le concedió el puntaje global más alto a la secuencia CAC88237 de *R. rhodochrous* (> 90%). Esta proteína tiene un pI de 5.21 y una masa teórica de 40 587 Da. En la figura 12 se pueden ver las partes de la secuencia de esta proteína que coinciden con los péptidos identificados en el espectrómetro de masas.

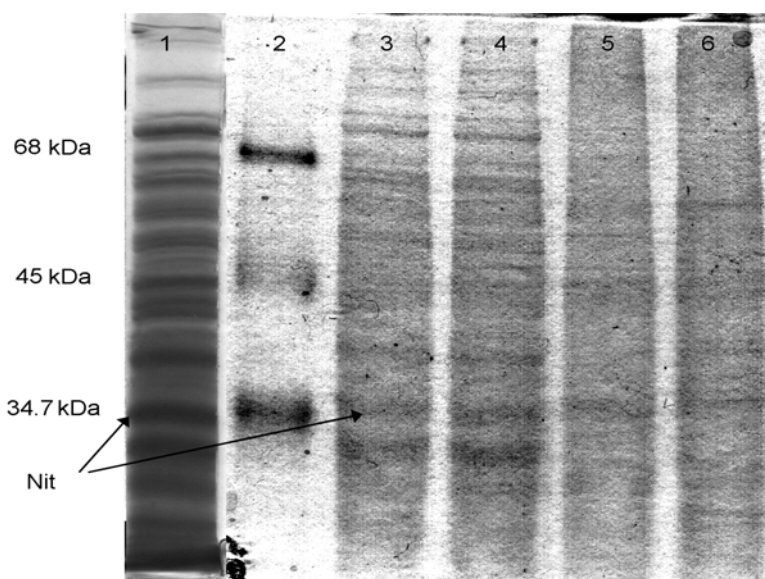


Figura 11. Inducción de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*. (1) Gel preparativo que se utilizó en la transferencia a la membrana de PVDF para la espectrometría de masas. (2) Marcador de pesos moleculares. (3) Muestra inducida con caprolactama. (4) Muestra inducida con valeronitrilo. (5) y (6) Muestras sin inductor.

Tabla 3. Péptidos identificados por espectrometría de masas

Secuencia	Inicio-final	Score mouse
MVEYTNTEFK	1-9	58
VAAVQAQPWFDAAK	10-24	94
YHENSLTMDSPHVQR	74-88	62
LKPTHVERSVYGEGNGSDISVYDMPFAR	132-159	101
LGALNCWEHFQTLTK	160-174	72
QAADPVGHYSRPDVLSLNFNQR	290-311	86
TTPVNTPLSTIHATHTFVPQFGALDGVR	313-340	75
ELNGADEQR	341-349	67
ALPSTHSDEDTDR	350-361	89

Amplificación y clonación a partir de ADN total

Debido a que los oligonucleótidos Amipa y Carparv tienen una T_m distinta (más de 10°C de diferencia), se realizaron varias reacciones de PCR para encontrar las condiciones necesarias para aislar el producto correspondiente al gen completo de la nitrilasa. Se encontraron las condiciones para alcanzar la mejor amplificación del gen de la nitrilasa (Fig. 13, carril3). En esta reacción se utilizó una concentración final de ADN genómico de $3.35 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, una menor proporción del oligonucleótido Amipa con respecto al oligonucleótido Carparv y se utilizó Taq polimerasa con el siguiente ciclado ($2'$ a 95°C , $30''$ a 50°C y $1'20''$ a 68°C) x 30 veces.

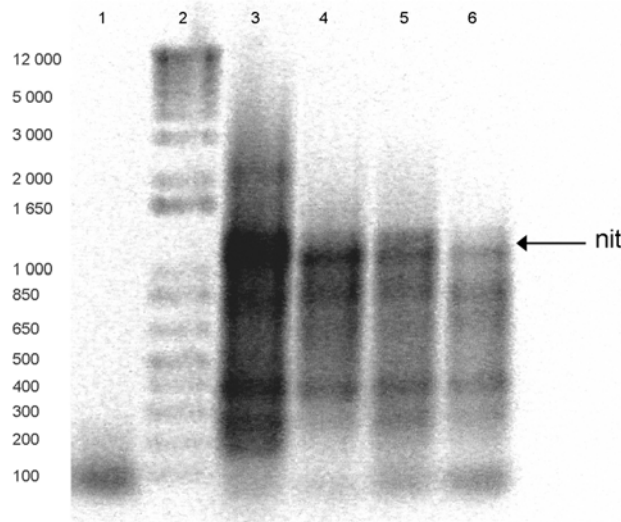


Figura 13. Reacciones de PCR que se llevaron a cabo para obtener el gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*. (1) Reacción sin ADN genómico (2) Marcador de pesos moleculares. (3), (4), (5) y (6) amplificaciones del gen *nitA* utilizando diferentes concentraciones de oligonucleótidos y ADN genómico.

Se realizó una purificación de la banda correspondiente a la nitrilasa (aproximadamente 1 100 pb), a partir de un gel preparativo. Una vez purificado, este fragmento se ligó al vector pGEM-T Easy Vector y se transformaron células DH5 α . Las cepas que contenían el plásmido con el inserto se seleccionaron por color. Se obtuvo el plásmido de estas colonias y, posteriormente, se realizó una digestión con *EcoRI*. El vector tiene sitios de restricción para *EcoRI* en ambos extremos del sitio de clonación, razón por la que se decidió hacer uso de esta enzima para comprobar la presencia del gen de la nitrilasa. Aunque en el gel de agarosa no se observó ningún fragmento del tamaño que se esperaba (1 100 pb) para ninguna de las digestiones, en una aparecieron bandas en los 900 y 200 pb. Por lo que, se buscaron

sitios de restricción para *EcoRI* dentro de la secuencia del gen de la proteína CAC88237. Se encontró 1 sitio en la posición 229, lo que significaba que, muy probablemente, el gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* también tenía este sitio. Entonces, durante la digestión el gen no sólo estaba liberándose del plásmido, sino que también sufría un corte dentro de la secuencia del gen. Dado que el tamaño de los fragmentos observados coincidía con esta hipótesis, se procedió a secuenciar el DNA recuperado en este plásmido.

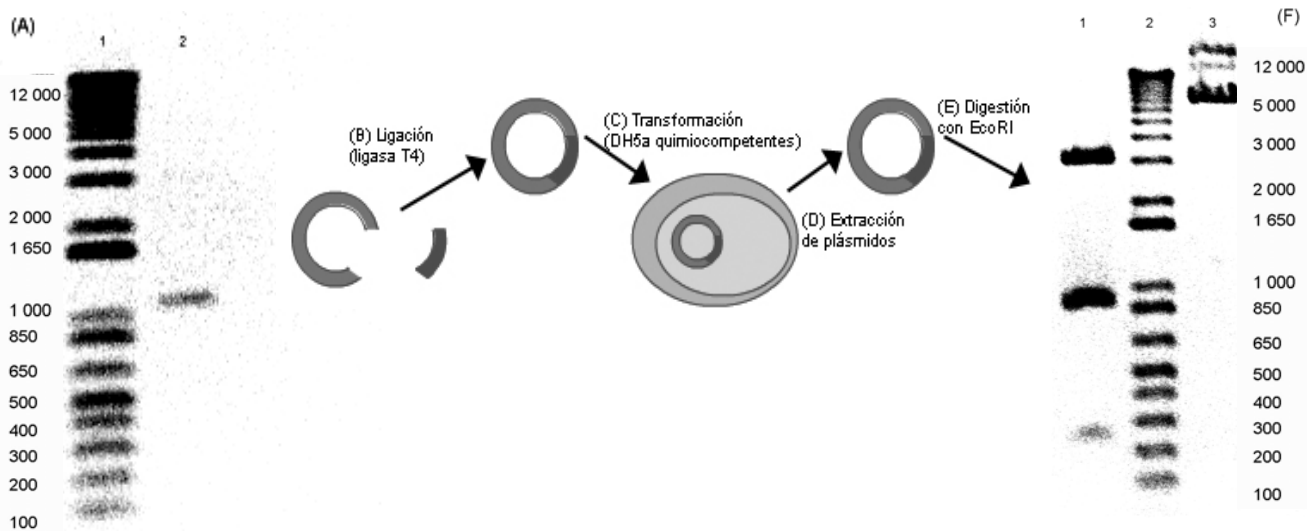


Figura 14. Clonación del gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*. (A) 1. Marcador de pesos moleculares. 2. Amplificado del Gen de la nitrilasa previamente purificado. (B) Ligación del producto de PCR con el vector pGEM-T Easy Vector (C) Transformación del vector con el inserto en células quimiocompetentes DH5α (D) Extracción de plásmidos (QIAprep Miniprep kit) (E) Digestión de los plásmidos con *EcoRI*. (F) 1. Se pueden ver tres bandas: una en 5 000 pb que corresponde al plásmido linealizado y otras dos en los 900 y 200 pb que aparecen porque el gen de 1 100 pb es digerido dos veces por *EcoRI*. 2. Marcador de pesos moleculares. 3. Plásmido sin digerir.

Subclonación de *nitA* en el vector de expresión pET-24a+

Obtención de *nitA* con sitios de restricción

Se realizó una PCR para introducir los sitios de restricción en el gen *nitA*. En esta reacción se utilizó el gen *nitA* clonado dentro del pGEM-T como molde y los oligonucleótidos AndeI y ChindIII. El ciclo fue de 2' a 95°C, 30'' a 55°C y 1' 20'' a 68°C. Se usó la Taq polimerasa con el fin de subclonar este amplificado de nueva cuenta en el vector pGEM-T. Una vez obtenido el amplificado (de

aproximadamente 1 100 pb) se procedió a purificar por gel. Se realizó una ligación con una relación 3:1 de inserto:vector. Al mismo tiempo, se llevó a cabo una reacción de ligación con el inserto incluido dentro del kit para usarla como control positivo. El producto de la ligación se transformó en células DH5 α en cajas con Ampicilina [10 $\mu\text{g ml}^{-1}$], 0.5 mM de IPTG y 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de X-Gal. Se utilizó nuevamente el criterio de colonias blancas y azules para distinguir aquellas colonias que contenían vector con inserto. La eficiencia de la ligación fue muy baja ya que en el control positivo se obtuvieron varias colonias blancas, mientras que en la otra caja tan sólo se obtuvo una colonia.

Se extrajo el plásmido de esta colonia y se analizó mediante dos reacciones de digestión. En la primera se utilizó *EcoRI*, ya que previamente se había observado que esta enzima no sólo era capaz de liberar el inserto al cortar en los sitios de restricción que se encuentran rodeando el sitio de clonación, sino que también realizaba un corte del gen generando dos fragmentos de, aproximadamente, 900 y 200 pb. La segunda reacción de digestión fue una doble digestión con *NdeI* y *HindIII*, la cual tenía la intención de liberar el inserto y comprobar la funcionalidad de los sitios de restricción recién ligados. Las digestiones arrojaron resultados acordes a los esperados, tal y como se puede ver en la figura 15. Para la digestión con *EcoRI* se obtuvieron dos fragmentos de 900 y 200 pb y para la doble digestión se obtuvo uno de 1 100 pb.

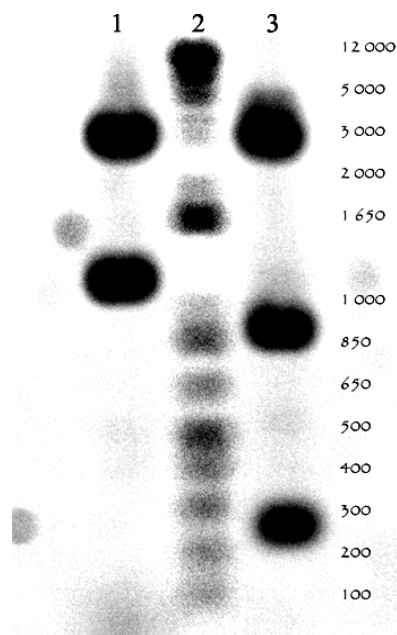


Figura 15. El gen *nitA* con los sitios de restricción para *NdeI* y *HindIII* en pGEM-T. Electroforesis en gel de agarosa en el que se muestra: (1) Doble digestión con *NdeI* y *HindIII* (2) Marcador de pesos moleculares. (3) Digestión con *EcoRI*.

El sitio de clonación múltiple de este vector cuenta también con un sitio de restricción para *NdeI* en su extremo 5'. Dado que el gen de la nitrilasa con los sitios de restricción (*nitA_{res}*) es simétrico, el gen podría haber quedado en dos posibles direcciones dentro del vector. En un caso el gen quedaría en el mismo sentido que el gen *lacZ* (Fig. 16 a) y en el otro, el gen queda en dirección opuesta al gen *lacZ* (Fig. 16 b).

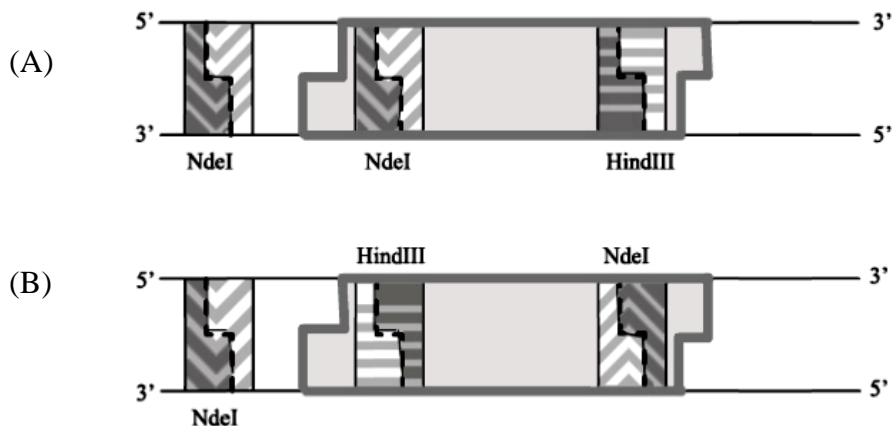


Figura 16. Orientación de *nitA* con sitios de restricción en pGEM-T. Se puede observar en gris la región correspondiente a *nitA*, en blanco el vector y los sitios de restricción denotados con distintos patrones de bandeado (A) Gen en la misma dirección que *lacZ*. (B) Gen en dirección opuesta a *lacZ*.

Clonación de *nitA_{res}* en el pET-24a+

Se procedió a realizar una digestión sencilla con *HindIII* del pET-24a+ y del pGEM-T con *nitA_{res}* por 12 h (se utilizó este tiempo debido a los problemas que se habían presentado previamente). Se revisó en un gel analítico que todo el ADN estuviera linealizado y se agregó *NdeI* a las mezclas de reacción. Se dejó proseguir durante otras 6 h y se hizo otro gel analítico para confirmar la liberación del inserto. Posteriormente, se realizó un gel preparativo para aislar y purificar a *nitA_{res}* y al pET-24a+. Se revisó la concentración final de ambos mediante un gel analítico y por absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro. Finalmente, se realizó la ligación probando con las relaciones 1:3 y 3:1 de inserto:vector.

El producto de estas ligaciones fue transformado en células quimiocompetentes Top10 y electrocompetentes DH5 α . Todas las células fueron plaqueadas en cajas con kanamicina para

seleccionar a las que tuvieran al pET-24a+.

Se extrajo el plásmido de las colonias que crecieron en las cajas con kanamicina y se analizó mediante dos pruebas. La primera consistió de una doble digestión con NdeI y HindIII y la segunda consistió en realizar un PCR con los oligonucleótidos que se utilizaron para introducir los sitios de restricción (AdeI y ChindIII). En la PCR se usó el siguiente ciclo: 2' a 95°C, 30'' a 55°C y 1' 20'' a 68°C. El resultado de la digestión fue una banda de 5 000 pb que corresponde al vector pET-24a+, seguida por otra de 1 100 pb que es del gen *nitA* (Fig. 17, carril 3). La prueba de PCR también dio positivo y generó un amplificado de 1 100 pb (Fig. 17, carril 4). Con esto se comprobó que el gen *nitA* había sido clonado dentro del vector pET-24a+.

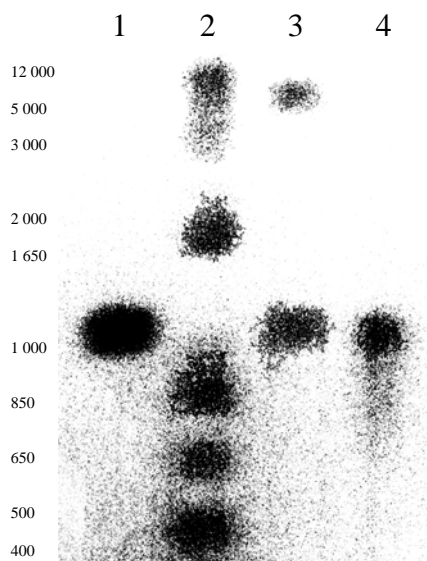


Figura 17. Pruebas de la presencia de *nitA* dentro de pET-24a+. Electroforesis en gel de agarosa en el que se muestra: (1) Fragmento puro de *nitA*_{res} que se utilizó en la reacción de ligación. (2) Marcador de pesos moleculares. (3) Digestión con *NdeI* y *HindIII*. (4) Amplificado del PCR en el que se usaron los oligonucleótidos AdeI y ChindIII.

Secuencia del Gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*

En cada paso de la clonación, el ADN se mandó a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM con los oligonucleótidos universales SP6_{pro} y T7_{ter}. Ambos oligonucleótidos hibridan con el vector pGEM-T Easy vector, el oligonucleótido T7_{ter} hibrida a la izquierda al sitio múltiple de clonación, mientras que el oligonucleótido SP6_{pro} hibrida a la derecha de este sitio. De esta manera, se obtuvo la secuencia del gen *nitA* por ambos extremos, de las dos clonas que se mandaron a secuenciar. Para la primer clona, el gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* resultó de la misma longitud (1 101 pb) que el gen de la proteína CAC88237, mostró cinco diferencias a nivel de la secuencia de nucleótidos que se ven reflejadas como cinco aminoácidos distintos en la secuencia de aminoácidos (Fig. 18).

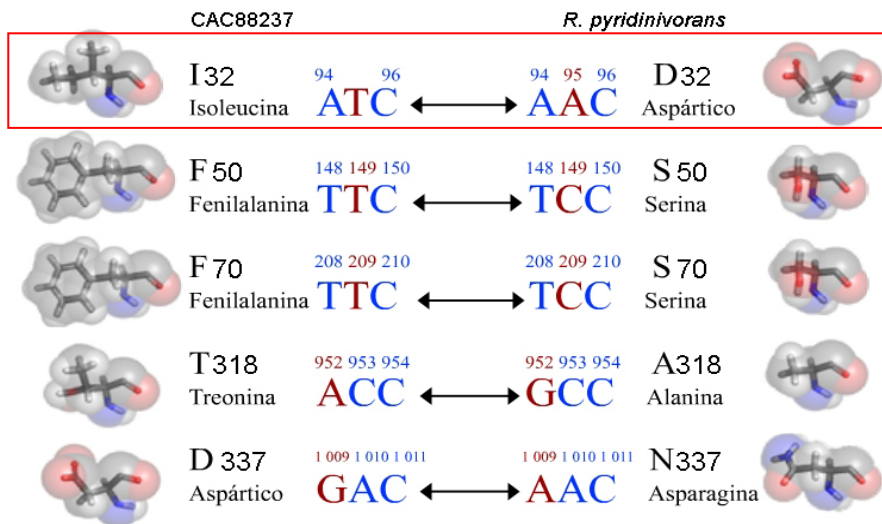


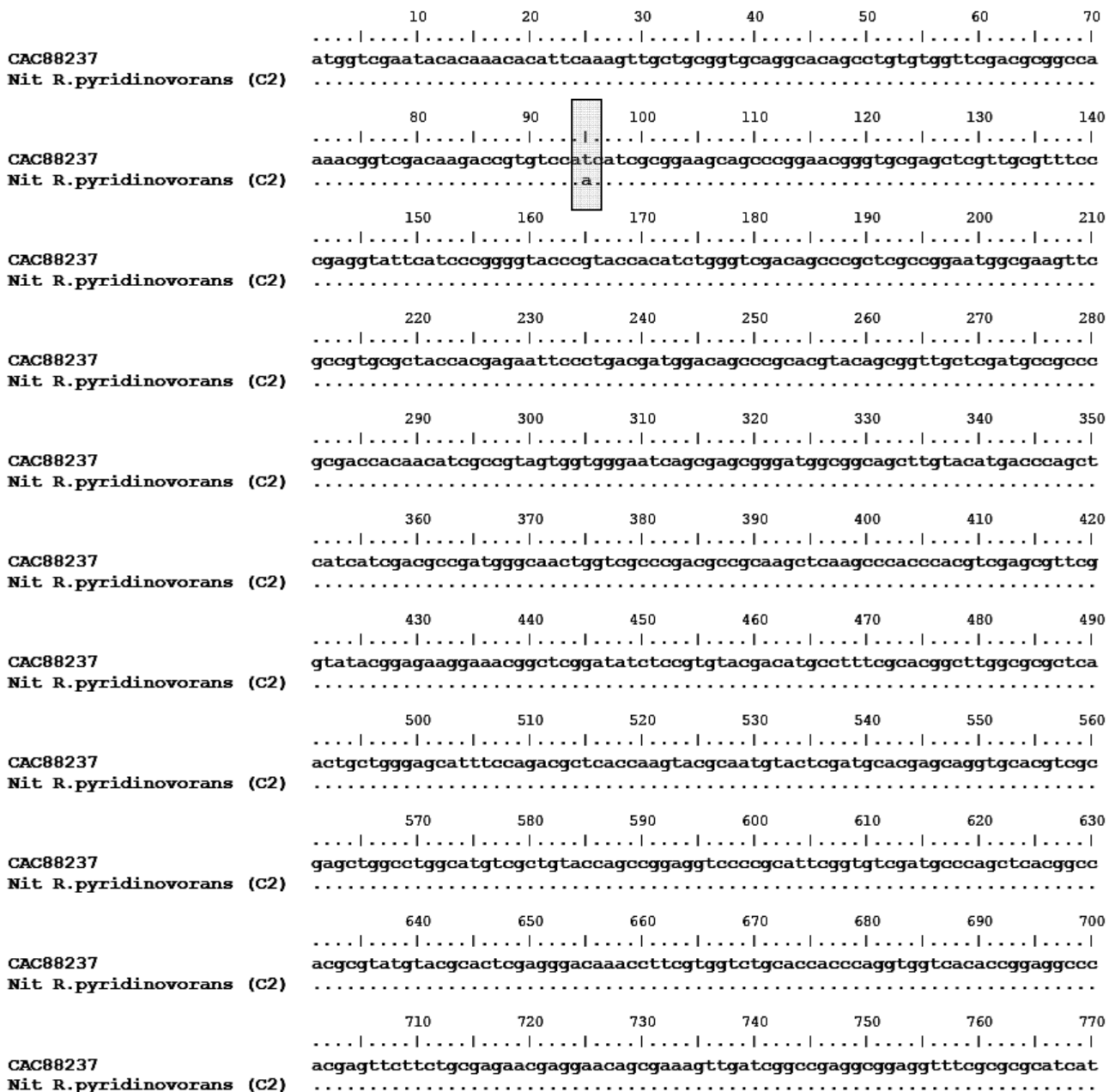
Figura 18. Diferencias entre la nitrilasa de *R. pyridinivorans* y la proteína CAC88237. Se muestran los cambios a nivel de nucleótidos y de aminoácidos que presentó la primera clona con respecto a la proteína CAC88237. De acuerdo a la secuenciación del producto de PCR y de la segunda clona, en realidad sólo la que está encerrada en el cuadro rojo resultó ser una diferencia verídica entre ambas secuencias.

La segunda clona también presentó un gen de una longitud de 1 101 pb y mostró solo una diferencia a nivel de la secuencia de nucleótidos con respecto al gen de CAC88237. Presentando una adenina en la posición 95 en lugar de una timina, lo que cambia el aminoácido isoleucina de la posición 32 por un aspártico en la secuencia de la proteína (Fig. 18).

Para comprobar que la secuencia de la nitrilasa clonada correspondía al de la enzima silvestre, se mandó a secuenciar de manera directa el producto del PCR con el que se amplificó el gen a partir del DNA genómico de la bacteria. Se ocuparon los oligonucleótidos Amipa y Carparv. La secuencia obtenida mostró sólo una diferencia a nivel de nucleótidos, la cual fue la misma que para la segunda clona. Esta evidencia apoya la idea de que el gen *nitA* de *R. pyridinivorans* difiere únicamente por un nucleótido del gen de CAC88237.

A pesar de que con esto se demuestra que no se introdujeron mutaciones durante la clonación, no se puede estar seguro de que el 100% de la secuencia del gen clonado sea exactamente la misma que la del gen silvestre. Esto se debe a que de los dos oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el gen, el que híbrida en el extremo 3' se hizo en base a la suposición de que los últimos cinco aminoácidos eran los mismos que para la proteína CAC88237 (Ala, Thr, Ala, Thr y Leu). Por lo que si esta suposición no es correcta, el gen clonado no sería exactamente idéntico al gen silvestre.

Se realizó un alineamiento entre el gen de CAC88273, y la segunda clona de *nitA* de *R. pyridinovorans* obtenida en este trabajo (Kobayashi et al., 1992). En este alineamiento se puede observar la única diferencia entre estos genes (Fig. 19). A nivel de la secuencia de aminoácidos, la diferencia entre la nitrilasa de *R. pyridinovorans* y la proteína de CAC88273 solo presentan una diferencia como se puede observar en el alineamiento de la figura 20. La identidad entre el gen *nitA* de *R. rhodochrous* J1 y el gen de la proteína CAC88273 es del 97.28%, mientras que entre el gen de la proteína CAC88273 y *nitA* de *R. pyridinovorans* es del 99.9%. Por lo que, en un futuro, resultaría interesante saber si estas pequeñas diferencias entre las secuencias de estas enzimas tienen peso sobre su actividad.



Expresión del gen *nitA*

Cinética de inducción

Aunque cronológicamente se utilizó primero a la primera clona, los resultados mostrados de esta sección en adelante, corresponden a los que se realizaron con la segunda clona. Se transformaron células BL21 (DE3) pLys con el gen de *nitA* de *R. pyridinovorans* dentro del vector pET-24a+, para comprobar la funcionalidad de la construcción. Se utilizaron estas células debido a que el gen de la nitrilasa se encuentra bajo el control del promotor T7 y las células BL21 pueden expresar la RNA polimerasa de T7 al inducirse con IPTG. Se llevaron a cabo los ensayos de expresión tal y como vienen descritos en la metodología. Se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos, antes y después de la inducción a los 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 24 h, se analizaron los extractos completos con SDS-PAGE al 12% (Fig. 21). En esta cinética se puede observar la inducción de una banda de aproximadamente 34.7 kDa, que corresponde al peso observado en la inducción de *nitA* en *R. pyridinovorans*.

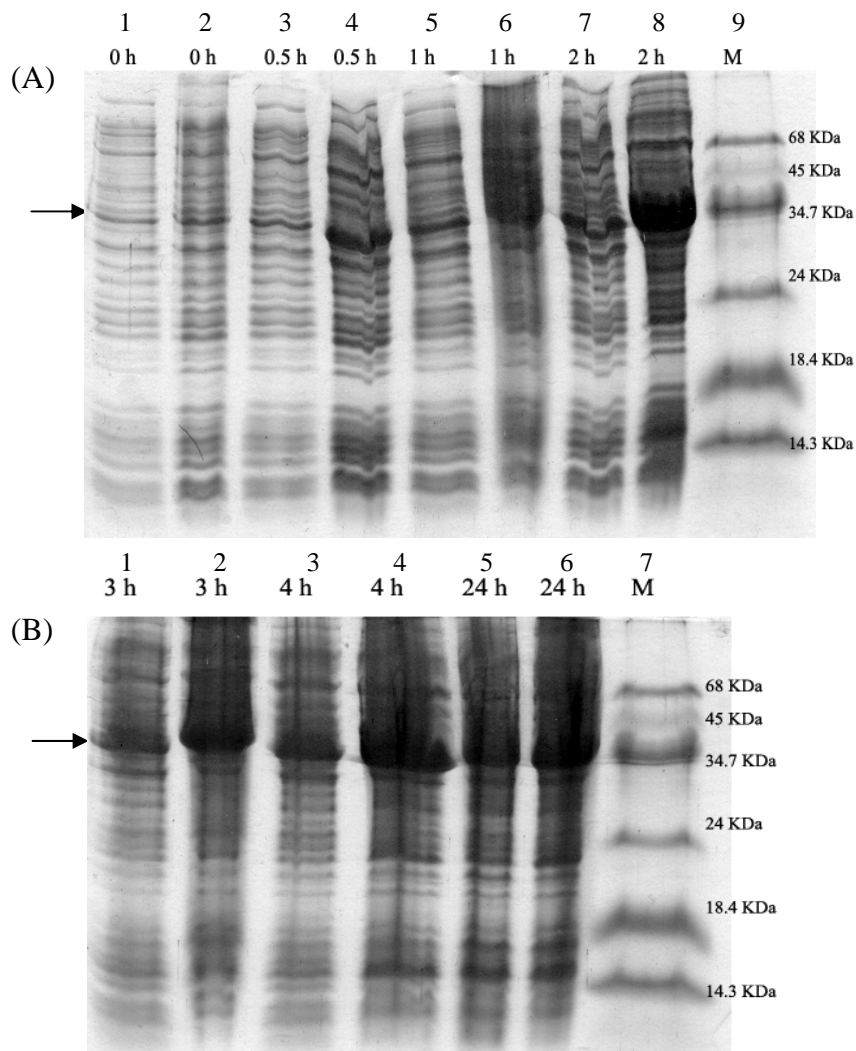


Figura 21. Cinética de inducción de *nitA*. Cada uno de los tiempos de inducción se puede ver por duplicado ya que el primer carril corresponde a la cinética realizada a 30°C y el segundo a la realizada a 37°C. (A) Antes de inducir, 30 min, 1 h y 2 h después de la inducción. El marcador de pesos se observa a la derecha (B) 3 h, 4 h y 24 h después de la inducción. El marcador de peso molecular se observa a la derecha.

Expresión y solubilidad

Dado que los ensayos de expresión con IPTG 0.5 mM a 37°C durante 3 h resultaron favorables, se procedió a romper las células para purificar la enzima a partir de la fracción soluble. Después de lisar y centrifugar las transformantes (previamente inducidas), se observó que una gran parte de la proteína se iba al precipitado en forma de cuerpos de inclusión, aunque quedaba una porción significativa de esta en la fracción soluble. Se probaron diferentes condiciones en las que se cambió tanto la concentración de IPTG (0.5 y 0.05 mM) como la temperatura (25, 30 y 37°C) para intentar obtener mayores proporciones de la proteína en la fracción soluble. Lamentablemente, aun bajo aquellas condiciones en las que se observó una disminución significativa en la expresión de la proteína recombinante (valores de temperatura y concentración de IPTG más bajos), la mayor parte de esta seguía quedando atrapada dentro de la fracción insoluble. La adición de 2 M de NaCl y el reajuste del pH del amortiguador que se había estado utilizando durante la sonicación (de 7.7 a 8.0) tampoco sirvieron para mejorar esta situación.

También se probó con el gen que se obtuvo dentro del vector pGEM-T. Formalmente, el pGEM-T es un vector de clonación, pero aun cuando tal vez no sea el mejor vector de expresión, puede ser utilizado como tal. El pGEM-T presenta dos promotores, el *plac* y el pT7 (Promega, Technical Manual No. 042). Por lo que, se trató de aprovechar que en esta segunda clona se había obtenido el gen *nitA* bajo el control de pT7. Este es un promotor específico para la RNA polimerasa de T7 por lo que no puede ser reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* (Ikeda y Richardson, 1986). Por ello, se pensó que se podría realizar la expresión de la enzima utilizando la cepa BL21, ya que esta tiene clonada a la polimerasa de T7 en su genoma y puede inducirse con la adición de IPTG. Sin embargo, en todos los ensayos de expresión no se logró inducir la nitrilasa y éste resultó ser un sistema inadecuado para la obtención de esta enzima.

Se siguió entonces trabajando con el gen dentro del vector pET24-a+. Finalmente se decidió utilizar aquellas condiciones en las que se había observado una mayor expresión (temperatura de 37°C y una inducción con 0.5 mM de IPTG durante 3 h). Aunque se perdió proteína en la fracción insoluble, una porción significativa de la enzima permaneció en la fracción soluble permitiendo su posterior purificación (Fig. 22).

Purificación de la nitrilasa recombinante

Inducción y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Bajo las condiciones determinadas en los ensayos de solubilidad, se realizó una inducción a las transformantes (BL21 DE3 pLys). Una vez que se rompieron las células, el sobrenadante del extracto crudo fue sometido a una precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se dio un seguimiento completo al proceso de inducción, así como a la precipitación analizando las fracciones por SDS-PAGE al 12%. Los resultados pueden observarse en la figura 22. En el carril 5 de este gel, se tiene la fracción soluble o sobrenadante resultado de centrifugar el extracto crudo. Los siguientes carriles muestran las fracciones solubles e insolubles resultado de las precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20 y al 45%, respectivamente. A pesar de que gran parte de la proteína expresada se pierde en la fracción insoluble durante la primera centrifugación, la cantidad de proteína soluble y su posterior proceso de precipitación al 45% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cumple con concentrar la proteína lo suficiente como para permitir su purificación.

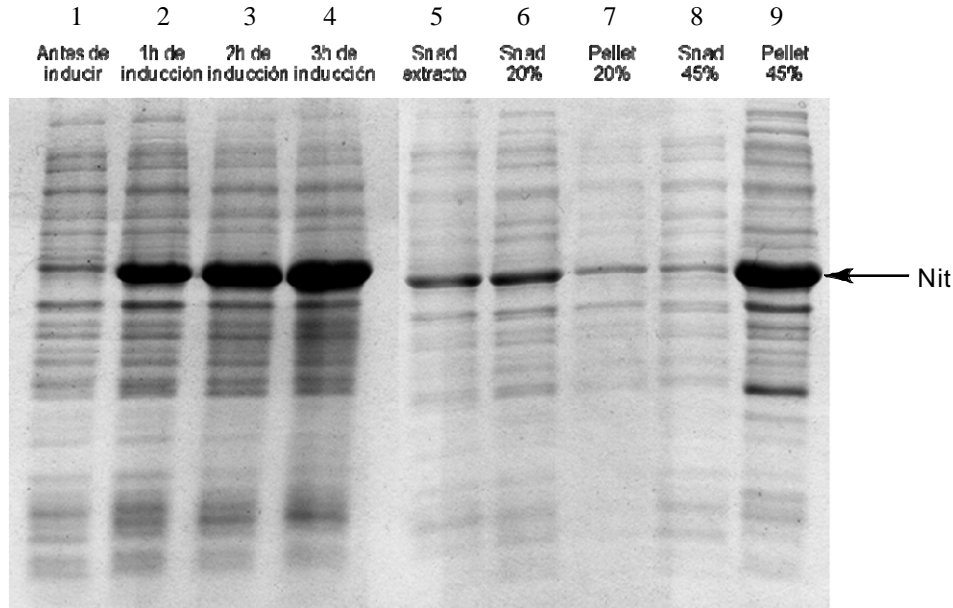


Figura 22. Inducción y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizados en la purificación de la nitrilasa recombinante. La flecha indica la banda correspondiente a la nitrilasa. En los primeros cuatro carriles tenemos la inducción realizada a 37°C y 0.5 mM de IPTG a lo largo de 3 h. Del carril 5 en adelante se observa la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Cromatografía

La pastilla del precipitado al 45% se solubilizó en el menor volumen posible y se pasó por una columna de filtración en gel (Sephacryl S-300). Utilizando una longitud de onda de 280 nm para registrar la salida de proteína de la columna, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 23. En este se pueden ver tres picos, el primero de los 120 a los 150 min, el segundo de los 160 a los 200 min y el tercero de los 220 a los 320 min.

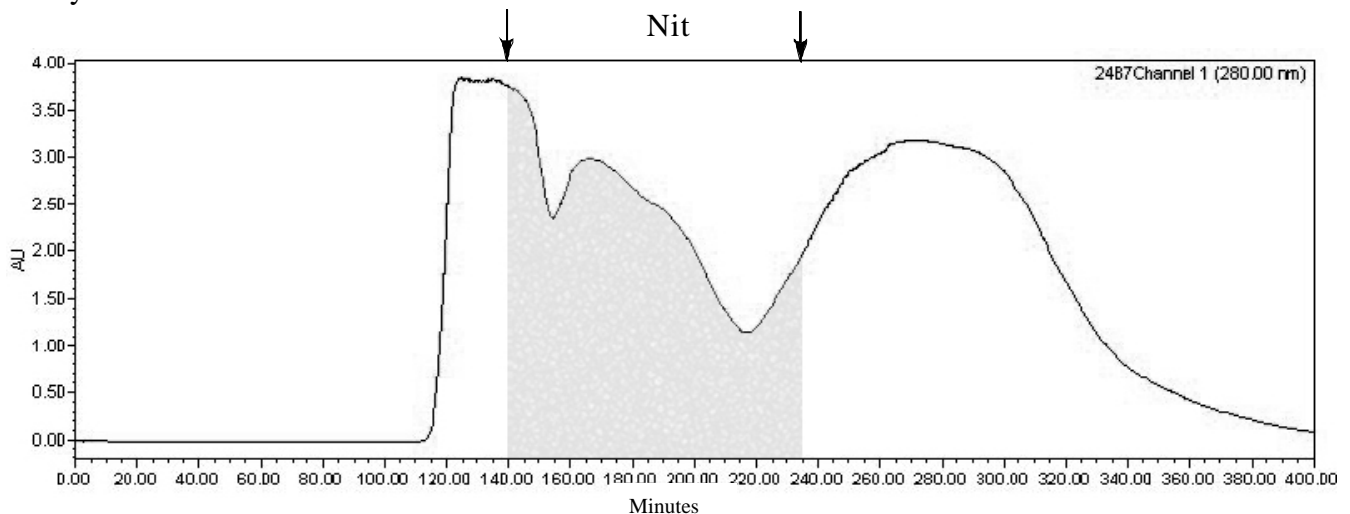


Figura 23. Cromatograma de la columna Sephacryl S-300. La presencia de nitrilasa se identificó dentro de la zona que comprende el segundo pico y parte de los picos aledaños, desde los 140 min hasta los 235 min.

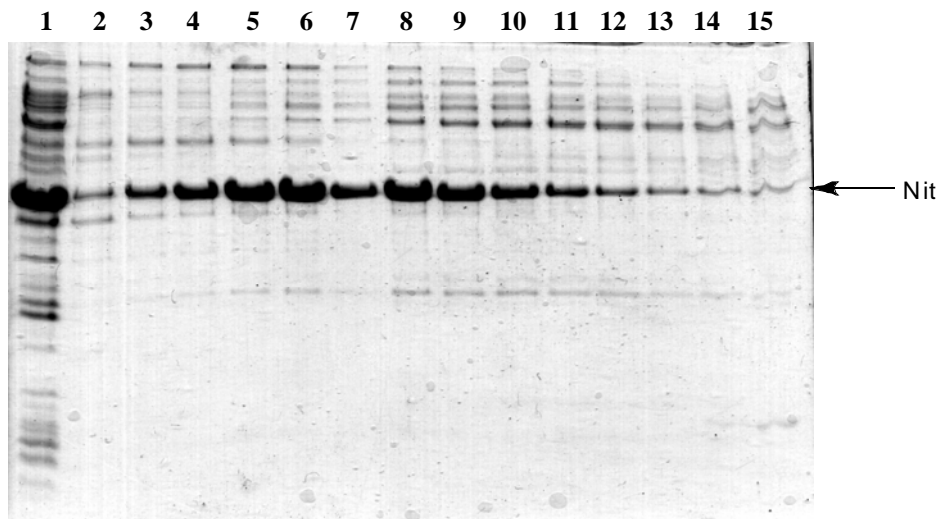


Figura 24. SDS-PAGE 12% de las fracciones eluidas de la columna Sephacryl S-300. El primer carril corresponde a la muestra introducida a la columna y que además sirve de marcador para identificar la banda correspondiente a la nitrilasa (a la altura de la flecha). El resto de los carriles corresponde al sondeo realizado a las fracciones cuyo tiempo de elución coincide con la aparición de picos en el cromatograma. La nitrilasa aparece principalmente del carril 3 al 12.

Se analizaron estos picos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y ensayos de actividad (ensayo cromatográfico y colorimétrico). El perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE al 12% (Fig. 24) reveló que la proteína estaba presente en las fracciones comprendidas entre los 140 min y los 235 min, cubriendo por completo lo que corresponde al segundo pico y un poco más tanto a su izquierda como a su derecha.

Las fracciones con mayor actividad de nitrilasa se encontraron a la mitad de este pico, lo que corresponde con la cantidad de proteína observada en el gel para esta región. Se juntaron estas fracciones para pasarlas por una columna de intercambio aniónico (Source Q). El perfil cromatográfico que se obtuvo en esta segunda columna (Fig. 25) muestra un primer pico que sale antes de que comience el gradiente salino y que corresponde al frente o porción de la muestra que no se pega a la columna. Durante el gradiente de 200 a 350 mM de NaCl que empieza a partir de los 80 min y termina a los 150 min, aparecieron otros dos picos. Posteriormente, empieza la fase de lavado, donde aparecen otra serie de picos que corresponden al conjunto de moléculas que quedan unidas inespecíficamente a la columna tras el gradiente y que sólo se despegan a elevadas concentraciones de sal. De acuerdo al perfil electroforético, se encontró a la nitrilasa en las fracciones comprendidas dentro del segundo pico que aparece durante el gradiente (Fig. 26). Aunque prácticamente pura, la enzima había quedado muy diluida. No se concentró por ultrafiltración, puesto que ya se había visto que la enzima tendía a agregar, por lo que se optó por la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para su conservación. Sin embargo, no fue posible estabilizar a la nitrilasa con la adición de esta sal, puesto que el cambio en la fuerza iónica provocó la agregación de la proteína. La única forma de deshacer esta agregación fue la adición de glicerol a una concentración final de 25%. Pero, aún cuando gran parte de la enzima vuelve a quedar soluble, la actividad decae con respecto a la original.

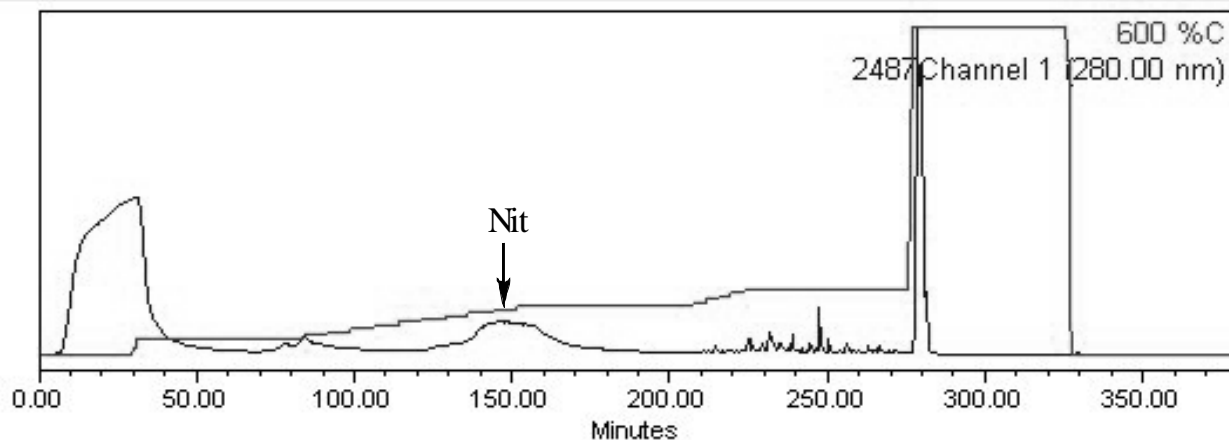


Figura 25. Cromatograma de la columna de intercambio iónico. La nitrilasa se encontró en el segundo de los dos picos que aparecieron durante el gradiente salino de 200 a 350 mM de NaCl. El gradiente empieza a los 80 min y termina a los 150 min. Después permanece constante hasta los 210 min, momento en el que se incrementa la concentración de NaCl a 1 M para lavar la columna.



Figura 26. SDS-PAGE 12% de las fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico. El carril 1 y 11 contienen la muestra introducida a la columna y sirven de marcador. El resto de los carriles muestran fracciones comprendidas dentro del gradiente de 200 a 350 mM de NaCl. La banda correspondiente a la nitrilasa (a la altura de la flecha) aparece principalmente del carril 7 al 20.

Por esta razón, se realizó una tercera cromatografía en la que se ocupó la columna de intercambio iónico Source Q para concentrar la proteína. Se juntaron las fracciones obtenidas en la primer columna de intercambio que presentaron mayor concentración y actividad de nitrilasa. Esta muestra se pasó a través de la columna y se utilizó un solo pulso de 200 a 500 mM de NaCl para despegar a la proteína. Con esto, la nitrilasa salió en un volumen de aproximadamente 6 ml que corresponde al pico de mayor absorbancia del cromatograma (Fig. 27a). De nueva cuenta, se revisó la presencia de la proteína con SDS-PAGE al 12% (Fig. 27b) y se midió la actividad para confirmar que no hubiera una pérdida significativa de actividad. Este último paso mostró ser apropiado, puesto que la proteína queda concentrada, se eliminan muchas de las otras proteínas al quedar unidas a la columna y no se pierde actividad durante el proceso. Al no poderse apreciar otras bandas en el gel de poliacrilamida, se puede decir que queda pura. La enzima se guardó en la misma solución en la que salió (amortiguador P con NaCl 500 mM), agregando 0.1 mM de azida de sodio y 14 mM de β -mercaptoetanol para mantener el estado reducido de la enzima. Bajo estas condiciones la actividad de la enzima permaneció constante para los sustratos benzonitrilo y valeronitrilo.

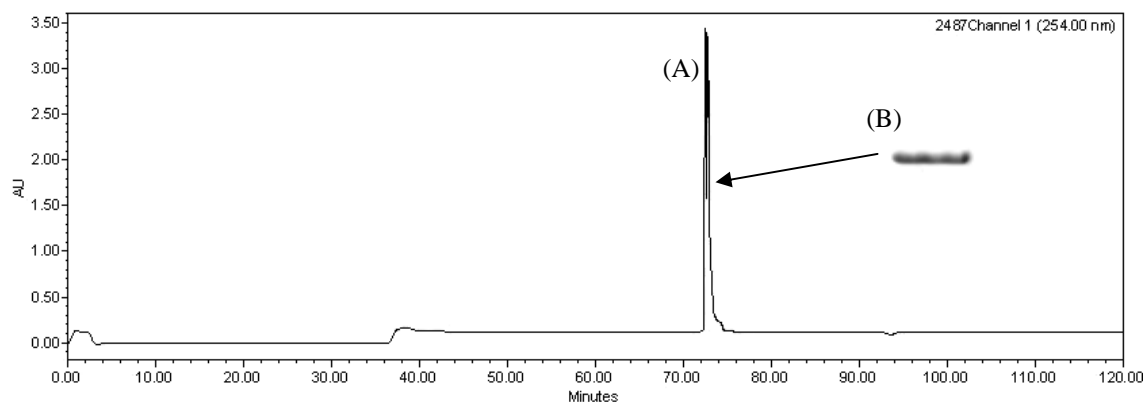


Figura 27. Cromatograma de la columna de intercambio iónico que se utilizó para concentrar la nitrilasa. (A) Pico correspondiente a la salida de la nitrilasa de la columna mediante el pulso de 200 a 500 mM de NaCl. (B) SDS-PAGE 12% de las fracciones comprendidas dentro de este pico. La banda tiene un peso que coincide con el de la nitrilasa y no se observan otras bandas, lo que muestra que se obtiene a la proteína pura y concentrada.

Actividad de la nitrilasa recombinante

Uno de los principales objetivos de este proyecto fue clonar una enzima que fuera capaz de convertir tanto nitrilos aromáticos como alifáticos, por esta razón la nitrilasa expresada en células de *R. pyridinovorans* se mostró desde un principio como un candidato perfecto para este propósito. Por lo mismo, una de las prioridades era confirmar la funcionalidad de la enzima recombinante una vez obtenida, demostrando que puede utilizar los mismos sustratos que convirtió satisfactoriamente la enzima silvestre de *R. pyridinovorans*.

El método de HPLC se utilizó para darle seguimiento a la actividad de la nitrilasa recombinante utilizando benzonitrilo como sustrato durante la purificación (Fig. 28), aunque posteriormente, también se puso en funcionamiento el método colorimétrico para realizar esta prueba. A lo largo de este proceso, la enzima se mantuvo capaz de utilizar a este nitrilo aromático como sustrato.

Con la proteína pura y también utilizando el método cromatográfico, se hizo una primera aproximación de las constantes catalíticas de esta enzima. En estos ensayos se probaron diferentes concentraciones de benzonitrilo (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.3, 0.7, 1, 2 y 5 mM) y una concentración de proteína constante de $1.2 \mu\text{g ml}^{-1}$. La mezcla de reacción se detuvo tomando alícuotas a diferentes tiempos (0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 y 9 min) y mezclándolas volumen a volumen con la mezcla de elución para HPLC en fase reversa que se encuentra a pH 3. El área bajo la curva de los picos en el cromatograma permitieron la determinación de la concentración de ácido benzoico producido, así como la cantidad de benzonitrilo remanente a cada uno de los diferentes tiempos. Los valores de las pendientes que se obtuvieron con estos datos (Antonio Anaya, tesis de maestría, UNAM), demostraron que la velocidad no cambia mucho de $25 \mu\text{M}$ de benzonitrilo en adelante. Por lo que, bajo estas condiciones, a partir de esta concentración de benzonitrilo se alcanza la velocidad máxima y que para poder calcular otras constantes cinéticas era necesario utilizar concentraciones de benzonitrilo por debajo de $25 \mu\text{M}$. Sin embargo, dada la sensibilidad del equipo, el cálculo de las áreas de los picos utilizando concentraciones de benzonitrilo por debajo de esta concentración se mostró inexacto. Por lo que, la determinación de las constantes cinéticas no pudo llevarse a cabo utilizando el método cromatográfico.

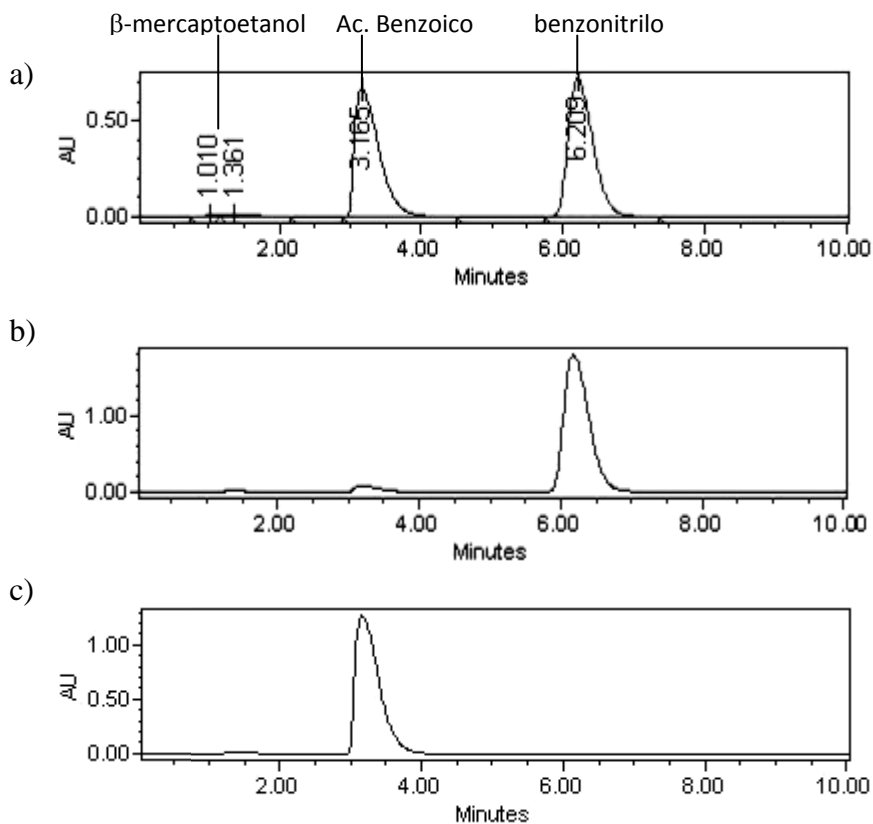


Figura 28. Cromatogramas obtenidos con el método de HPLC para detección de actividad de la nitrilasa. (a) Perfil cromatográfico en el que se observan los tres picos que se pueden llegar y que corresponden al β -mercaptoetanol, ácido benzoico y benzonitrilo, respectivamente. (b) Cromatograma de una mezcla de reacción sin nitrilasa. (c) Cromatograma de una mezcla de reacción con nitrilasa, una vez que se ha convertido todo el sustrato.

La incapacidad de utilizar HPLC a concentraciones micromolares de benzonitrilo, o de detectar el valeronitrilo y el ácido valérico, dejó a la determinación del amonio producido como una de las posibilidades para poder darle seguimiento a la reacción. El amonio (NH_4^+) es el otro producto resultante de la conversión del benzonitrilo y el valeronitrilo a sus correspondientes ácidos en la reacción catalizada por la nitrilasa, por lo que la estequiometría de ésta nos permite determinar que por cada molécula de amonio producida, también se forma un ácido carboxílico y se pierde un nitrilo.

El primer método que se intentó utilizar fue el ensayo acoplado con la L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH_b) como enzima acoplante, en el que se midió indirectamente la producción de amonio (NH_4^+) mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm (Fig. 29). La L-GDH_b cataliza la aminación del alfa-cetoglutarato (α -KG) convirtiéndolo en glutamato (Glu). La estequiometría de esta reacción

describe que una molécula de amonio se une a otra de α -KG para formar una sola molécula de glutamato. Esta reacción utiliza como cofactor al NADH y oxida únicamente una molécula de este compuesto por cada Glu producido. El NADH presenta absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, pero deja de absorber al pasar a su estado oxidado (NAD). La diferencia en la absorbancia (Δ Abs) es entonces proporcional a la cantidad de amonio producido, o lo que es lo mismo, al nitrilo consumido durante la reacción.

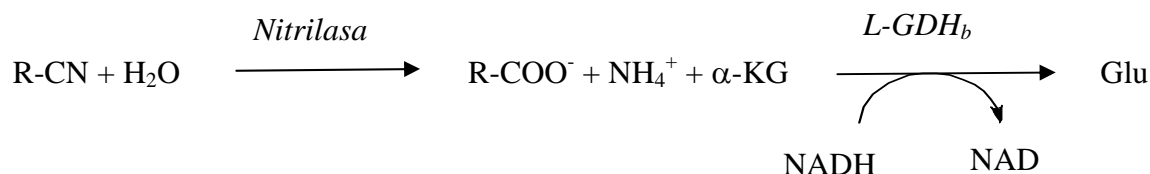


Figura 29. Reacción general del ensayo acoplado. De acuerdo a este esquema, la nitrilasa hidroliza al nitrilo produciendo su ácido carboxílico y amonio. Este es a su vez utilizado por la L-GDH_b para transaminar el α -KG con la subsecuente oxidación de una molécula de NADH.

El ensayo acoplado se utilizó de dos formas. En la medición de actividad a tiempo fijo y en la medición de actividad en tiempo real. Para el primer caso, la reacción de la nitrilasa se dejó transcurrir a tiempos fijos (de 1.5 a 15 min), al término de los cuales se frenaba la reacción con la adición de HCl. Posteriormente, se neutralizaba esta mezcla y se eliminaba cualquier traza de nitrilasa, para así poder determinar con el ensayo acoplado la cantidad de amonio producido mediante el cambio en la absorbancia (Δ Abs = Abs_{inicial} - Abs_{final}). El ensayo mostró, efectivamente, un Δ Abs significativo para todas las reacciones que se llevaron a cabo en presencia de nitrilasa. Encontrando los Δ Abs más grandes para aquellos casos en los que se dejó transcurrir la reacción por más tiempo. Sin embargo, la precisión del método no mostró ser lo suficientemente buena como para utilizarla en la determinación de constantes cinéticas.

En la medición de actividad en tiempo real, el α -KG, el NADH y la L-GDH_b se agregaron de manera conjunta con los otros componentes (nitrilo y agua) y se disparaba la reacción con la adición de nitrilasa. En principio, el cambio de absorbancia debería de ocurrir a la par de la reacción de la nitrilasa, por lo que a una concentración fija de enzima aparecerían pendientes completamente rectas

para cada una de las diferentes concentraciones de sustrato. No obstante, las rectas obtenidas mostraron cierta curvatura que se atribuye a un mal acoplamiento entre la producción de amonio y velocidad con que este es utilizado por la L-GDH_b. La responsable en este caso es la L-GDH_b, tras corroborar esta aseveración con la observación de trazos más rectos al agregar el doble de enzima acoplante.

Aparentemente, la elevada Km de la L-GDH_b para el NH₄⁺ y que el valeronitrilo tiene un efecto inhibitor sobre la enzima, hace que el método no sea confiable.

Fue entonces que se adaptó un método colorimétrico comercial que sirve para determinar la concentración de amonio producido durante la reacción catalizada por la nitrilasa, el cual está basado en el método original desarrollado por Berthelot (Patton y Crouch, 1977). En este método los iones amonio reaccionan con fenol e hipoclorito de sodio (NaClO) bajo condiciones alcalinas. Una vez en presencia del catalizador nitroprusiato de sodio (Na₂[Fe(CN)₅NO]), se produce un indofenol verde que puede medirse perfectamente a una longitud de onda de 580 nm (Fig. 30).

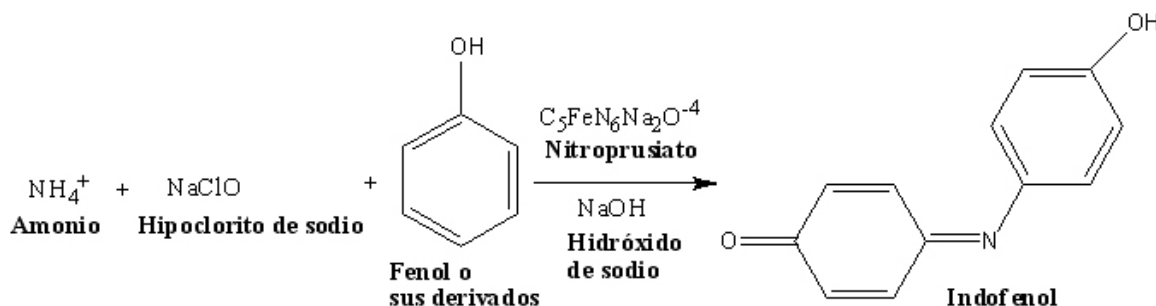


Figura 30. Reacción del ensayo colorimétrico. De acuerdo a este esquema, la mezcla de derivado de fenol e hipoclorito de sodio reaccionan con el amonio en presencia del catalizador nitroprusiato. El producto de la reacción es el indofenol, que es cuantificable en el espectrofotómetro a 580 nm.

La aplicación de este método fue crucial para comprobar que la enzima recombinante era capaz de utilizar tanto al benzonitrilo como al valeronitrilo como sustrato y en la determinación de sus constantes cinéticas. El método colorimétrico se mostró preciso en la determinación de amonio utilizando concentraciones micromolares de benzonitrilo y valeronitrilo, sin mostrar interferencia por alguno de los compuestos de la mezcla de reacción (sustratos, productos o compuestos como el β -mercaptoetanol). Se utilizó entonces para determinar las constantes cinéticas mediante experimentos a

tiempo fijo. Para trazar el comportamiento cinético de la enzima se utilizaron concentraciones de 0 a 0.2 M para benzonitrilo, mientras que para el valeronitrilo se utilizaron concentraciones mayores de sustrato que van de 0 a 3 M. Se utilizó el programa Origin® v 5.0 para realizar el ajuste de los datos, se usó la ecuación de Michaelis-Menten ($Y = V_{\text{máx}} * X / (K_m + X)$) para los datos de valeronitrilo y una ecuación de inhibición por sustrato ($Y = V_{\text{máx}} * X / (K_m + X * (1 + X/K_I))$) para los datos de benzonitrilo. Se obtuvieron ajustes satisfactorios con valores de R^2 de 0.99 para el valeronitrilo y de 0.96 para el benzonitrilo. En el caso del nitrilo alifático valeronitrilo, se obtuvo una cinética de tipo Michaelis – Menten, ya que en la gráfica de velocidad contra concentración de sustrato se observa una hipérbola bien definida (Fig. 31b). La K_m de la nitrilasa para este compuesto fue de 68.75 μM , mientras que su $V_{\text{máx}}$ fue de 0.62 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Este comportamiento no se repite para el nitrilo aromático benzonitrilo, en donde a simple vista la gráfica denota una inhibición por sustrato (Fig. 31a). La K_m de la nitrilasa recombinante para este compuesto fue de 26.52 μM y su $V_{\text{máx}}$ fue de 16.8 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Se calculó la k_{cat} por sitio para cada uno de estos sustratos y se obtuvo una k_{cat} de 11.2 seg^{-1} para el benzonitrilo y una k_{cat} de 0.41 seg^{-1} para el valeronitrilo.

De acuerdo a estas constantes cinéticas, la nitrilasa recombinante tiene una actividad 2.5 veces mayor con benzonitrilo que con valeronitrilo. Como se mencionó en los antecedentes, los resultados obtenidos en ensayos de biotransformación en células enteras de la cepa de origen, indicaban que esta nitrilasa transformaba ambos sustratos indistintamente. De acuerdo a la cinéticas obtenidas, la nitrilasa recombinante de *R. pyridinovorans* tiene una actividad 25 veces mayor con benzonitrilo que con valeronitrilo. Estas diferencias se han observado para otras nitrilasas, como la de *R. rhodochrous* J1. Los autores (Nagasawa et al, 2000) muestran que la enzima inducida por caprolactama, en células enteras, tiene mayor actividad por el acilonitrilo que por el benzonitrilo. Una vez purificada la enzima, ésta pierde actividad por acilonitrilo, manteniendo solo la actividad por benzonitrilo. Si se adiciona sulfato de amonio y glicerol a la enzima pura se recupera la actividad por el acilonitrilo. En paralelo determinan el estado oligomérico de la enzima en presencia de estos agentes estabilizadores y se observa que estos inducen una asociación entre las subunidades formando un décamero activo para ambos sustratos. Las nitrilasas aisladas de varias especies del género *Rhodococcus* son dímeros inactivos; la presencia de altas concentraciones de sustrato, como benzonitrilo también inducen su asociación formando decámeros o dodecámeros catalíticamente activos. Sólo la nitrilasa de *Klebsiella ozaenae* mantiene una estructura dimérica funcional (Stevenson et al, 1992). Estos resultados sugieren que la actividad y la especificidad por los sustratos esta en función del estado oligomérico de la

nitrilasa. Desconocemos el estado oligomérico activo de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*, y una de las perspectivas de este trabajo es estudiar cómo el estado de oligomerización afecta la actividad de esta enzima y cuáles son las determinantes fisicoquímicas de este proceso.

En un trabajo reciente (Soo-Jin et al, 2008) con la nitrilasa de *R. rhodochrous* ATC 33278, que hidroliza sustratos alifáticos y aromáticos, obtienen mutantes de la tirosina 142, por alanina, valina o leucina haciendo a la enzima específica por benzonitrilo. Este es el primer reporte en el que se demuestra que un residuo que no forma parte de la tríada catalítica se requiere para la actividad de la enzima. La tirosina 142 esta presente en la secuencia de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* por lo que resultaría interesante realizar mutantes en esta posición y en los residuos de la interfase que nos proporcionen información sobre esta aparente activación por oligomerización

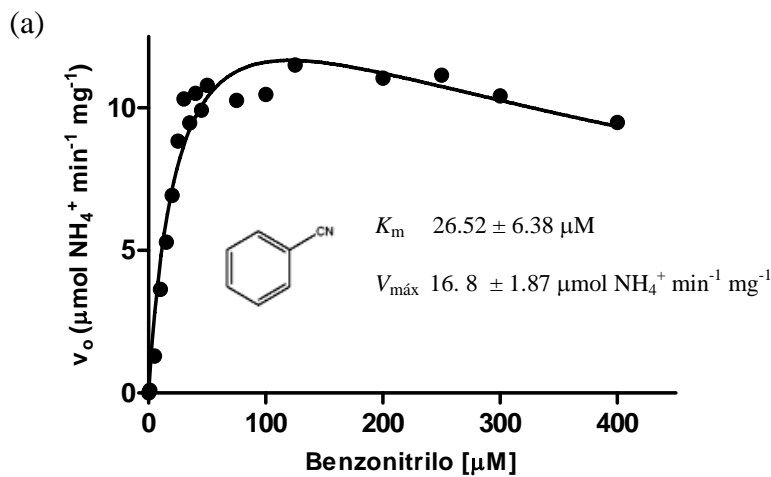
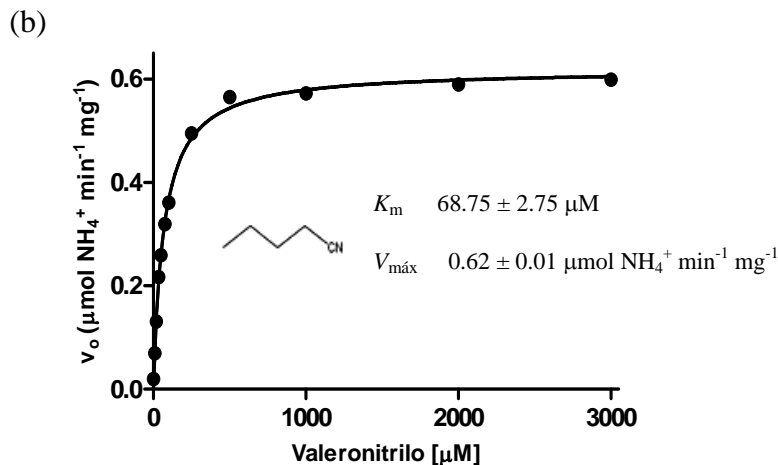


Figura 31. Comportamiento cinético de la nitrilasa. (a) Utilizando el sustrato benzonitrilo la nitrilasa presenta inhibición por sustrato. (b) En presencia de valeronitrilo se obtiene una cinética clásica de tipo Michaelis-Menten.



Conclusiones

Hasta el momento se ha logrado clonar satisfactoriamente el gen *nitA* de *R. pyridinovorans*. No sólo se cuenta con el gen dentro del vector pGEM-T, sino también dentro del vector de expresión pET24-a+. Con la obtención y comparación de las secuencias de las dos clonas obtenidas, junto con la secuencia del amplificado de PCR, podemos decir con seguridad que durante el proceso de clonación no se incorporaron mutaciones a la secuencia. Lamentablemente, la evidencia disponible no es suficiente para confirmar que los últimos 18 nucleótidos del gen clonado sean idénticos a los del gen de la enzima silvestre. Esto se debe a que los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el gen se diseñaron bajo la suposición de que la secuencia de los extremos del gen *nitA* era la misma que la del gen de CAC88237.

Se logró expresar satisfactoriamente la nitrilasa recombinante en células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformadas con la segunda clona del gen *nitA* dentro del vector pET24-a+. Para esto, se utilizó una inducción con 0.5 mM de IPTG a 37°C durante 3 h. Con este sistema de expresión y con una precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20 y 45%, se recuperó una porción significativa de la enzima. Se logró purificar y concentrar la enzima a partir del precipitado al 45% tras realizar tres cromatografías de manera consecutiva. Las columnas que se utilizaron en la purificación fueron una de exclusión molecular (Sephacryl S-300), seguida por una de intercambio aniónico (Source Q) con un gradiente de 200 a 350 mM de 70 min de duración. Para concentrar la enzima se utilizó de nueva cuenta la columna de intercambio, pero con un solo pulso de 300 a 500 mM. La enzima se conservó en el mismo amortiguador en el que salió de la última cromatografía (amortiguador P con NaCl 500 mM), con la adición de azida de sodio 0.1 mM para evitar la contaminación microbiana.

La adaptación del método colorimétrico sirvió para determinar la actividad de esta enzima a partir de la cuantificación de amonio producido durante la reacción. Se pudieron determinar las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para el benzonitrilo y el valeronitrilo. Los valores de estas constantes indican que la enzima presenta una actividad mucho mayor para el nitrilo aromático benzonitrilo que para el nitrilo alifático valeronitrilo.

Los logros mencionados han facilitado la obtención de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*, lo cual abre un campo de posibilidades para el estudio de esta enzima en aspectos como su asociación y capacidad de conversión de diferentes tipos de nitrilos bajo distintas condiciones. De manera más específica, las propiedades que determinan sus selectividades quirales (enantio-) y posicionales (regio-).

Referencias

Agarkar, V.B., Kimani, S.W., Cowan, D.A., Sayed, M.F. y Sewell, B.T. (2006). The quaternary structure of the amidase from *Geobacillus pallidus* RAPc8 is revealed by its crystal packing. *Acta crystallographica, Section F* 62: 1174-1178

Almatawah, Q. A., Cramp, R. Y Cowan D. A. (1999). Characterization of an inducible nitrilasa from a thermophilic bacillus. *Extremophiles*. 3: 283-291.

Anaya, R. A. "Estudio del potencial biocatalítico" (Tesis de Licenciatura, QFB de la Facultad de Estudios Superiores *Zaragoza* de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2005).

Banerjee, A., Sharma, R. Y Banerjee, U. C. (2002). The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:33-44.

Banerjee, A., Kaul, P. Y Banerjee, U. C. (2006a). Purification and characterization of an enantioselective arylacetone nitrilase from *Pseudomonas putida*. *Archives of microbiology*. 184:407-418.

Banerjee, A., Kaul, P. Y Banerjee, U. C. (2006b). Enhancing the catalytic potential of nitrilasa from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:77-87.

Bartel, B. y Fink, G. (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilasa gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:6649-6653.

Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, RC. y Weiler EW. (2007). Molecular characterization of two cloned nitrilasas from *Arabidopsis thaliana*: Key enzymes in biosynthesis of the plant hormone Indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:6021-6025.

Brenner, C. (2002). Catalysis in the nitrilase superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*.

12(6):775-82.

Cheng-Yu, C., Wei-Chun, C., Jai-Shin, L., Wen-Hwei, H. y Weng-Ching, W. (2003). Structural basis for catalysis and substrate specificity of *Agrobacterium radiobacter* N-Carbamoyl-D-amino Acid Amidohydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:26194-26201.

Collins, P.A. y Knowles, C.J. (1983). *The utilization of nitriles and amides by Nocardia rhodochrous*. *Journal of General Microbiology*. 129, 711–718.

Cramp, R. A. y Cowan, D. A. (1999). Molecular characterization of a novel thermophilic nitrile hydratase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1431:249-260.

Daniel, R., Cowan, D., Morgan, H. y Curran, M. (1982). A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. *Biochemical Journal*. 207: 641-644.

Fischer-Colbrie, G., Matama, T., Heumann, S., Martinkova, L., Paulo, A. C., Guebitz, G. (2007). Surface hydrolysis of polyacrylonitrile with hydrolysing enzymes from *Micrococcus luteus* BST20. *Journal of Biotechnology*. 129:62-68.

Goldhust, A. y Bohak, Z. (1989). Induction, purification and characterization of the nitrilasa of *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 11:581-601.

Gübitz, G. M, y Paulo, A. C. (2003). New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Current Opinion in Biotechnology*. 14:577-582.

Harper, D.B. (1977a). Microbial metabolism of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Nocardia* sp. (Rhodochrous group) N.C.I.B. 11216. *Biochemical Journal*. 165(2):309-19.

Harper, D.B. (1977b). Fungal degradation of romatic nitriles: enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*. *Biochemical Journal*. 167(2):685-692.

Harper DB. (1985). Characterization of a nitrilasa from *Nocardia* sp. (Rhodochrous group) N.C.I.B.

11215, Using p-hydroxybenzotrile as sole carbon source. The International Journal of Biochemistry. 17(2):677-683.

Jenrich, R., Trompetter, I., Bak, S., Olsen, C. E., Mller, B. L. y Piotrowski, M. (2007). Evolution of heteromeric nitrilasa complexes in Poaceae with new functions o f nitrile metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104:18848-18853.

Kato, Y., Ooi, R. y Asano, Y. (2000). Distribution of aldoxime dehydratase in microorganims. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2290-2296.

Kobayashi, M., Nagasawa, T. y Yamada, H. (1989a). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Purification and characterization. European Journal of Biochemistry. 182(2):349-56.

Kobayashi, M., Nagasawa, T. y Yamada, H. (1989b). Nitrilase-catalyzed production of p-aminobenzoic acid, from p-aminobenzotrile with *Rhodococcus rhodochrous* J1. Biotechnology Letters. 11: 27-30.

Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H. (1990a). Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles. The Journal of Bacteriology. 172(9): 4807-4815.

Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T. y Yamada, H. (1990b). Nitrilase-catalyzed production of pyrazinoic acid, an antimycobacterial agent, from cyanopyrazine by resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Journal of Antibiotics. 43:1316-1320.

Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T. y Yamada, H. (1992). Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. Journal of Biological Chemistry. 267(29):20746-51.

Kobayashi, M., Goda, M. y Shimizu, S. (1998). Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis. Biochemical Biophysical Research Communications. 253(3):662-6.

Kobayashi, M. y Shimizu, S. (2000). Nitrile hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4:95-102.

Komeda H., Hori Y., Kobayashi, M. y Shimizu, S. (1996). Transcriptional regulation of the *Rhodococcus rhodochrous* J1 *nitA* gene encoding a nitrilase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(20): 10572-10577.

Komeda, H., Kobayashi, M. y Shimizu, S. (1996). Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(9): 4267-4272.

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Gerchman, S.E., Kycia, H., Studier, F.W. y Swaminathan, S. (2003). Crystal structure of a putative CN hydrolase from yeast *Proteins: Struct., Funct., Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 52: 283-291

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15: 680-685.

Layh, N., Parratt, J. y Willets, A. (1998). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 467.

Mahadevan, S. y K. V. Thimann. (1964). Nitrilase: II. Substrate specificity and possible mode of action. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 107: 62-68.

March., J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. 5th Ed., (Wiley: New York, 2001) 1179. 1305.

Matthew, C., Nagasawa, T., Kobayashi, M. y Yamada, H. (1988). Nitrilase-catalyzed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Applied and environmental microbiology*. 54: 1030-1032.

Mylerová, V. y Martínková, L. (2003). Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Current*

Organic Chemistry. 7: 1-17.

Mathew, C. D., Nagasawa, T., Kobayashi, M., y Yamada, H. (1988). Nitrilase-catalized production of nicotinic acid, from 3-cyaanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1030-1032.

Nagasawa, T., Ryuno, K. y Yamada, H. (1986). Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312-- purification and characterization. Biochemical and Biophysical Research Communications. 139(3):1305-1312.

Nagasawa, T., Kobayashi, M. y Yamada, H. (1988a). Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. Archives of microbiology. 150: 89-94.

Nagasawa, T., Nakamura, T. y Yamada, H. (1988b). Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. Applied Microbiology and Biotechnology. 34: 322-324.

Nagasawa, T. y Yamada, H. (1990a). Application of nitrile-converting enzymes for the production of useful compounds. Pure and Applied Chemistry. 62: 1441-1444.

Nagasawa, T., Nakamura, T. y Yamada, H. (1990b). A novel nitrilase, arilacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization. Archives of microbiology. 194(3): 765-762.

Nagasawa, T., Nakamura, T. y Yamada, H. (1990c). ϵ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. Archives of microbiology. 155: 13-17.

Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T. y Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Conversion into the active form by subunit association. European Journal of Biochemistry. 267(1):138-44.

O'Reilly, C y Turner, P. (2003). The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. Journal of Applied Microbiology. 95(6):1161-74.

Pace, H., Hodawadekar, SC, Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C. y Brenner C. (2000). Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Current Biology*. 10(15):907-17.

Pace, H. y Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*. 2(1): 1-9.

Patton, C. y Crouch, S. (1977). *Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia*. *Analytical Chemistry*. 49: 464-469.

Piotrowski, M., Schönfelder, S. y Weiler, E. (2001) The *Arabidopsis thaliana* isogene *Nit4* and its orthologs in tobacco encode β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *The journal of biological chemistry*. 276:2616-2621.

Podar, M., Eads, J. y Richardson, T.. (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study. *BMC Evolutionary Biology*. 5:42.

Pollak, P., Romender, G., Hagedon, F. y Gelbke, H-P. (1991). In: Elyers, B., Hawkins, S. y Schulz, G. (eds). *Ullman's encyclopedia of industrial chemistry*, 5th edn, vol A17. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 363-376.

Regla, J. I. "Estudio tendiente a la preparación químico-enzimática de la D-homofenilalanina I" (Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 2005).

Robertson, D., Chaplin, J., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, DP., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L., Tan, X., Snead, M., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P., Burk, M. y Short, J.. (2004). Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Applied and environmental microbiology*. 70(4):2429-36.

Sakai, N., Tajika, Y., Yao, M., Watanabe, N. y Tanaka, I. (2004). Crystal structure of hypothetical protein PH0642 from *Pyrococcus horikoshii* at 1.6Å resolution. *Proteins* 57: 869-873.

Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali y Rawat, D. (2006). Nitrilase and Its Application as a 'Green' Catalyst. *Chemistry and Biodiversity*. 3: 1279-87.

Soo-Jin, Y., Hye-Jung K., Jung-Kul L., Dong-Eun K., y Deok-Kun O. (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.

Stalker, D., Malyj, L., Tewari, y McBride, K. (1988). Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the *bxn* gene. *Chemistry & Biodiversity*. 263: 6310-6314.

Stevenson, D., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A. y Storer, A. (1992). Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 15(3): 283-302.

Tauber, M. M., Cavaco-Paulo, A., Robra, K. H. y Gübitz, G. M. (2000). Nitrile hidratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles. *Applied and environmental microbiology*. 66:1634-1638.

Thuku, R. N., Weber, B. W., Varsani, A. y Sewell, B. T. (2007). Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilasa from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable active helical form. *FEBS Journal*. 274: 2099-2108.

Tinggang, L., Junxin, L., Renbi, B., Dieudonne-Guy, O. y Fook-Sin, W. (2007). Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitriles degrading microorganisms. *Water research*. 41:3465-3473.

Vejvoda, V., Sveda, O., Kaplan, O., Prikrylova, V., Elisakova, V., Himl, M., Kubac, D., Pelantova, H., Kuzma, M., Kren, V. y Martínková, L. (2007). Biotransformation of heterocyclic dinitriles by *Rhodococcus erythropolis* and fungal nitrilases. *Biotechnology Letters*. 29:1119-1124.

Wieser, M., Heinzmann, K. y Kienen, A. (1997). Bioconversion of 2-cyanopyrazine to 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid with *Agrobacterium* sp. DSM 6336. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48:174-176.

Yu-Guo, Z., Jin, C., Zhi-Qiang, L., Ming-Huo, W., Liang-Ying, X. y Yin-Chu, S. (2007). Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Zhou, Z., Hashimoto, Y. y Kobayashi, M. (2005). Nitrile degradation by *Rhodococcus*: Useful microbial metabolism for Industrial productions. *Actinomycetologica*. 19:18-26.