



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTRUCTURACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA NITRILASA DE
Rhodococcus sp. V51B INDUCIDAS POR MODIFICACIONES EN EL
EXTREMO C-TERMINAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

QFB. AGUSTÍN GÓMEZ AGUILAR

Tutor Principal:

Dra. Georgina Garza Ramos Martínez
de Facultad de Medicina – UNAM

Comité Tutor:

Dra. Marcela Ayala Aceves
de Instituto de Biotecnología – UNAM

Dr. Ismael Bustos Jaimes
de Facultad de Medicina – UNAM

Ciudad de México, Mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca de posgrado.

Al PAPIIT por el apoyo al proyecto IN-216413-2.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) Por el apoyo para la asistencia al XXX congreso nacional de Bioquímica de Guadalajara 2014.

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez, por la oportunidad que me brindo de participar en su grupo de investigación y por el apoyo recibido durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Fernando García Hernández, por su asesoría durante la preparación de muestras y la obtención de las micrografías electrónicas.

A los miembros del comité académico por sus observaciones y aportaciones a este trabajo.

Al jurado del examen por aceptar el nombramiento y también por sus observaciones y sugerencias.

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE TRABLAS Y FIGURAS	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ENZIMAS Y BIOCÁTALISIS	7
NITRILASAS	9
MECANISMO DE REACCIÓN	12
ESTRUCTURA	14
OLIGOMERIZACIÓN	15
ANTECEDENTES	19
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
HIPÓTESIS	23
METODOLOGÍA	24
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	24
TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES	24
PURIFICACIÓN DE ADN POR FENOL CLOROFORMO	25
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS GENES	25
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	26
CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN EN LOS VECTORES pGEM-T Y PET-24A	27
SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	28
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	29
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	29
ENSAYO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA. DETERMINACIÓN DE AMONIO	30
DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA	30
DICROÍSMO CIRCULAR	30
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	31
RESULTADOS	32
CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES DE LA NITRILASA DE <i>R. sp</i> V51B ..	32
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	35
MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS	40
DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA	46
DICROÍSMO CIRCULAR	48
TRANSICIONES TÉRMICAS	50
EFECTO DE LA AGREGACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	60

PERSPECTIVAS.....	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. SUPERFAMILIA DE LAS NITRILASAS.	10
FIGURA 2. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LAS TRECE RAMAS QUE FORMAN LA SUPERFAMILIA DE LAS NITRILASAS.	11
FIGURA 3. (A) SITIO CATALÍTICO PUTATIVO DE LAS NITRILASAS. (B) REPRESENTACIÓN DEL DOMINIO NIT DE LA PROTEÍNA NITFHIT DE <i>C. ELEGANS</i>	11
FIGURA 4. MECANISMO PROPUESTO PARA LA REACCIÓN CATALIZADA POR LAS NITRILASAS.....	13
FIGURA 5. SUPERPOSICIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE LAS NITRILASAS DE <i>P. ABYSSI</i> (COLOR AMARILLO, PDB 3IVZ) VS <i>SYECHO CYSTIS</i> SP. PCC6803 (AMARILLO, PDB 3WUY)	14
FIGURA 6. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS CON TINCIÓN NEGATIVA DE LA CIANURO DIHIDRATASA DE <i>B. PUMILLUS</i> C1 A PH 8.0 (A) Y 5.4 (B).....	16
FIGURA 7. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS CON TINCIÓN NEGATIVA DE LA NITRILASA DE <i>R. RHODOCHROUS</i> J1.....	16
FIGURA 8. (A) IMAGEN ESTEREOSCÓPICA DE UN MODELO ESTRUCTURAL DEL DÍMERO DE LA NITRILASA DE <i>R. RHODOCHROUS</i> J1.....	17
FIGURA 9. OLIGOMERIZACIÓN DE LA DMBAS.....	18
FIGURA 10. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ENTRE LA NITRILASA SILVESTRE DE <i>R. SP</i> V51B Y LA CYND DE <i>B. PUMILLUS</i> GMA1.....	20
FIGURA 11. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE LA NITRILASA TRUNCADA DE <i>R. SP</i> V51B.....	21
FIGURA 12. OLIGONUCLEÓTIDOS QUE INCORPORAN CODONES DE TÉRMINO.....	33
FIGURA 13. INSERTOS AMPLIFICADOS POR PCR.....	34
FIGURA 14. ENSAYOS DE DOBLE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA VISTOS EN UN GEL DE AGAROSA AL 1%.....	34
FIGURA 15. REGIÓN DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA NITRILASA DE <i>R. SP</i>. V51B DONDE SE INSERTARON LOS CODONES DE TÉRMINO.	35
FIGURA 16. SDS-PAGE AL 12% DEL SEGUIMIENTO DE LA EXPRESIÓN Y SOLUBILIDAD DE LA NITΔ330.....	36
FIGURA 17. (A) CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA S-300. (B) SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES ELUÍDAS DE LA COLUMNA S-300..	37
FIGURA 18. (A) PERFIL DE ELUCIÓN DE LA MUTANTE Δ359 POR LA COLUMNA S-300. (B) PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LA ENZIMA Δ359.....	38
FIGURA 19. (A) CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO A PH 7.0. (B) SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES ELUÍDAS DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.	38
FIGURA 20. (A) CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO A PH 7.8. (B) SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES ELUÍDAS.....	39

FIGURA 21. SDS-PAGE AL 12% DE LAS MUTANTES PURAS ..	40
FIGURA 22. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN, TINCIÓN NEGATIVA	46
FIGURA 23. ESPECTROS DE CD EN EL UV LEJANO DE LAS VARIANTES DE LA NITRILASA DE <i>R. SP V51B</i>	49
FIGURA 24. TRANSICIONES TÉRMICAS DE DESPLEGAMIENTO SEGUIDAS POR CD A 280 NM.....	51
FIGURA 25 . TRANSICIONES TÉRMICAS RELATIVAS SIGUIENDO EL CAMBIO DE ELIPTICIDAD A 208 NM	51
FIGURA 26. COMPARACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE LAS MUTANTES DE TÉRMINO	52

TABLA 1. SECUENCIA REVERSA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA INTRODUCIR CODONES DE TÉRMINO.....	24
TABLA 2. TEMPERATURA DE FUSIÓN PROMEDIO (T_m) DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS QUE INCORPORAN CODONES DE TÉRMINO Y Ande1.....	26
TABLA 3. CICLO DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS MUTANTES DE TÉRMINO.....	27
TABLA 4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUTACIONES DE TÉRMINO EN EL C-TERMINAL DE LA NITRILASA DE <i>R. sp V51B</i>	32
TABLA 5. ESTRUCTURAS Y DIMENSIONES DE LAS MUTANTES DE TÉRMINO	42
TABLA 6. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA.	47
TABLA 7. ELEMENTOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	50

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

BCA : Ácido bicinconírico

BrEt: Bromuro de etidio

CD: Dicroísmo Circular

CHT: Cianuro hidratasa

CynD : Cianuro dihidratasa

D.O: Densidad óptica

DLS: Dispersión de luz dinámica

DNA: Ácido desoxiribonucleico

dNTPs: Dinucleótidos trifosfatados

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

kDa: Kilodalton

kV: Kilovolts

LB: Luria Bertani

ME: Microscopia Electrónica

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

%Pd: Porcentaje de Polidispersidad

PDB: Protein Data Bank

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

PMSF: Fluoruro de

fenilmetilsulfonilfluoruro

PTA: Ácido fosfotúngstico

R_h: Radio hidrodinámico

RNasaA: Ribonucleasa A

S-300: Superdex 300

SOC: Super Optimal broth with

Tris: Tris (hidroximetil)aminometano

Tm: Temperatura media de fusión

Wt: Tipo silvestre

RESUMEN

Las nitrilasas catalizan la transformación directa de nitrilos orgánicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos y la liberación de amonio. Pertenecen a la superfamilia Nitrilasa que agrupa en trece ramas distintas a las hidrolasas carbono-nitrógeno, cuyos miembros catalizan reacciones hidrolíticas de enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos. Estas proteínas poseen un plegamiento característico $\alpha\beta\alpha$ y una triada catalítica conservada que está formada por los residuos Glu-Lys-Cys, además, son capaces de hidrolizar enlaces carbono nitrógeno no peptídicos. Durante los últimos 20 años las nitrilasas han despertado gran interés en la producción de ácidos carboxílicos a partir de nitrilos.

Recientemente, se ha reportado que algunas nitrilasas pueden oligomerizarse y formar estructuras en forma de filamentos helicoidales. Se sabe que la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* C1 se oligomeriza formando una estructura helicoidal de 18 subunidades a pH 8 y que, a pH 5.4, esta estructura se reorganiza formando filamentos alargados (Jandhayala *et al.*, 2003); a su vez, la nitrilasas de *Rhodococcus rhodochorus* J1 después de experimentar una pérdida de 39 residuos en el extremo C-terminal puede formar filamentos helicoidales alargados que poseen actividad catalítica (Thuku *et al.*, 2007).

En este trabajo se estudió el efecto de acortar la longitud del extremo C-terminal sobre la oligomerización, la estabilidad y actividad de la nitrilasa de *Rhodococcus sp* V51B. Se diseñaron y amplificaron por PCR once mutantes con codones de paro entre las posiciones 328 y 366, de estas solo $\Delta 330$, $\Delta 332$, $\Delta 340$, $\Delta 345$, $\Delta 349$, $\Delta 352$ y $\Delta 359$ se sobreexpresaron en células de *Escherichia coli* y se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y en algunos casos intercambio aniónico. Para determinar las características cinéticas y estructurales de las proteínas purificadas, se utilizaron las técnicas de microscopía electrónica de transmisión, dispersión de luz dinámica (DLS), dicroísmo circular (CD) y la actividad enzimática. Por microscopía electrónica se encontró que de $\Delta 328$ a la $\Delta 340$ las mutantes se agregan formando filamentos helicoidales largos; en $\Delta 345$ se encontraron filamentos cortos; para $\Delta 349$, $\Delta 352$ y $\Delta 359$ se vieron partículas en forma de rosetas y estructuras que asemejan una "C". A partir de los datos obtenidos se analizó la posible correlación entre el estado de agregación y la activación enzimática, encontrando que a medida que se hace más corto el extremo C-terminal, se ve incrementado el grado de agregación, el radio hidrodinámico, el nivel de estructura secundaria, la estabilidad térmica y la actividad específica para la mayoría de las construcciones.

Los resultados indican que al eliminar residuos en el extremo C-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B, también se elimina un impedimento fisicoquímico que evita la agregación de la enzima en filamentos helicoidales. El truncamiento favorece cambios conformacionales que modifican las superficies de interacción proteína-proteína y que lleva a una estructura de la enzima más estable y activa.

INTRODUCCIÓN

El avance continuo de la investigación científica ha permitido el desarrollo de sistemas cada vez más eficientes en el campo de la síntesis química. Sin embargo, dificultades en algunos procesos de síntesis y su elevado costo económico ha llevado a dirigir nuestra atención hacia los sistemas biológicos, en donde ocurren reacciones químicas con características de velocidad, especificidad y rendimiento superiores a las alcanzadas por la industria química. Estas reacciones son posibles gracias a las enzimas.

ENZIMAS Y BIOCATÁLISIS

Las enzimas son moléculas biológicas de naturaleza proteica capaces de catalizar reacciones bioquímicas esenciales en todos los seres vivos. Las enzimas participan en prácticamente todos los procesos del metabolismo celular, entre los que se pueden destacar, la digestión de nutrientes para obtener energía, la síntesis de proteínas, ADN y tejidos (Murray *et al.*, 2010).

Durante mucho tiempo se ignoró la naturaleza y modo de acción de las enzimas. Hubieron grandes discusiones sobre si eran carbohidratos, lípidos o proteínas. No fue sino hasta 1926 que el químico James B. Sumner a partir de la semilla de un tipo de frijol (*Canavalia ensi formis*) que se sabía era capaz de degradar la urea purificó la molécula responsable de tal actividad. La enzima se obtuvo en forma de cristales octaédricos con actividad de ureasa (Sumner, 1926). Desde entonces, se han aislado y cristalizado muchas enzimas mediante diferentes métodos. Con el desarrollo de técnicas de biología molecular e ingeniería de proteínas fue posible determinar la naturaleza proteica de las enzimas. Quizá una de las características más destacables de estas moléculas sea su elevada especificidad para un determinado tipo de reacción y hacia uno o un pequeño grupo de sustratos estrechamente relacionados entre sí (Murray *et al.*, 2010).

Una parte fundamental en la estructura de las enzimas es el sitio activo, región en forma de hendidura o ranura donde las moléculas de sustrato se encuentran

alineadas estrechamente y en orientación óptima a los grupos funcionales de aminoácidos, grupos prostéticos o cofactores encargados de su transformación química. Para llevar a cabo su función catalítica, las enzimas se valen de algunos mecanismos generales como son la catálisis por efecto de proximidad y orientación, modificación del potencial molecular electrostático, catálisis por unión preferencial de estado de transición, catálisis ácido base, catálisis redox y catálisis covalente, en ocasiones pueden combinar estos mecanismos (Murray *et al.*, 2010).

Actualmente, es posible extraer enzimas de las células para aprovechar sus propiedades catalíticas, de especificidad por su sustrato y estereoespecificidad en las industrias textil, papelera, alimentaria, farmacéutica, química, energética y de biorremediación.

Debido a su importancia global, la producción de sustancias y reactivos químicos resulta ser de gran interés para un amplio sector industrial; sin embargo, su obtención en la mayoría de los casos es compleja. Es precisamente en esta área donde las enzimas están cobrando interés gracias a que actúan bajo condiciones de reacción suaves (pH y temperatura fisiológicas), no producen contaminación medioambiental y presentan su mayor actividad en medios acuosos. Otra característica destacable es su capacidad para diferenciar entre sustratos enantioméricos. La biocatálisis se emplea a nivel industrial en la resolución cinética de mezclas racémicas y la síntesis asimétrica a partir de sustratos proquirales (Singh *et al.*, 2006). Algunas de las primeras aplicaciones biocatalíticas fueron la producción de aminoácidos ópticamente puros mediante el uso de acilasas, hidantoinasas y aminopeptidasas, así como la producción de acrilamida a partir del acrilonitrilo por la nitrilo hidratasa (Kamphusi *et al.*, 1990).

Entre las enzimas que actualmente se estudian con mayor interés se encuentran las nitrilasas; enzimas que en un solo paso convierten nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos. Los nitrilos se encuentran ampliamente

distribuidos en la naturaleza, representados como cianoglucósidos y cianolípidos en las plantas, aminonitrilos y cianhidrinas en los hongos y mandelonitrilos en los artrópodos, entre otros. Muchos de ellos son importantes intermediarios en la síntesis de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, compuestos carbonilo y compuestos heterocíclicos. Por esta razón, las nitrilasas se consideran catalizadores con gran potencial biotecnológico. Su uso resulta interesante porque rompe con los procesos tradicionales que emplean ácidos, bases y elevadas temperaturas para hidrolizar nitrilos. Dichos procesos son demasiado agresivos cuando están involucradas moléculas lábiles o compuestos quirales. Otros inconvenientes importantes son la generación de productos secundarios y bajos rendimientos de producción (Singh *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2012).

NITRILASAS

Las nitrilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se les puede encontrar en plantas, hongos, bacterias y animales. Pertenecen a la superfamilia de las Nitrilasas, cuyos miembros catalizan una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces carbono-nitrógeno principalmente de tipo no peptídico. Con base en el análisis de secuencias y considerando la especificidad de la reacción, los miembros de esta superfamilia se clasifican en trece ramas distintas. La rama 1 está representada por las nitrilasas, las cianuro dihidratasas y las cianuro hidratasas, las cuales hidrolizan sólo nitrilos; mientras que en las ramas restantes están representadas, entre otras, las amidasas, carbamilasas y *N*-aciltransferasas (Fig. 1).

Resumen de la actividad enzimática de la superfamilia nitrilasa.					
Rama	Nitrilasa	Amidasa	Amidasa reversa	Carbamilasa	Sustrato Protéico
	$R-C\equiv N$	$R-C(=O)NH_2$	$R-C(=O)NHR'$	$R-NH-C(=O)NH_2$	
1- Nitrilasa	Si				
2- Amidasa alifática		Si			
3- Amidasa amino terminal		Si			Si
4- Biotinidasa		Si	Si		Algunas veces
5- β -Ureidopropionasa		Si		Si	
6- Carbamilasa		Si		Si	
7- NAD sintetasa de procariontes		Supuesta			
8- NAD sintetasa de eucariontes		Supuesta			
9- Apolipoproteína N-aciltransferasa			Si	Si	Si
10- Nit y NitFhit					
11- NB11					Supuesta
12- NB12					
13- Elementos no fusionados					

Figura 1. Superfamilia de las nitrilasas. En el cuadro se enlistan las trece ramas de la superfamilia nitrilasa y se indica su actividad específica (Modificado de Pace y Brenner, 2001).

A partir del análisis de un gran número de secuencias disponibles, y de las estructuras cristalográficas de algunos miembros de la superfamilia, como las de la *N*-carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium* sp (PDB 1ERZ, Nakai *et al.*, 2000) y la proteína NitFhit de *Caenorhabditis elegans* (PDB 1EMS. Pace y Brener, 2001) se ha determinado que las nitrilasas conservan una triada catalítica formada por los aminoácidos glutamato, lisina y cisteína (Fig. 2 y 3A) y una conformación multimérica que presenta en su plegamiento un motivo estructural único formado por cuatro capas α - β - β - α (ABBA “sándwich”) (Fig. 3B) (Pace y Brener, 2001; Yeom *et al.*, 2008).

1- Nitrilasa	f P E a f	h R K I . p T	I . C W E n . . p
2- Amidasa alifática	F P E Y S	Y R K i P W c	i l C d D G n y P
3- Amidasa amino terminal	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- β -Ureidopropionasa	. Q E A W	. R K N H I P	N i C Y G R H H P
6- Carbamilasa	F p E L A	Y R K i H L P	f l C N D R R W P
7- NAD sintetasa Proc.	f P E L .	. . K . . L P	. l C E D . w . p
8- NAD sintetasa Euk.	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 I F	. i C Y D . R F p
11- NB11	. q E l f	Y R K . H I P	. i C w D q w f p
12- NB12	F P E i F	Q y K I H i T	q l C Y D i E F P
13- Elementos no fusionados	i P E . .	y r K . h L f	. i C y d . r F p

Figura 2. Alineamiento de secuencias de las trece ramas que forman la superfamilia de las nitrilasas. Los residuos estrictamente conservados en todas las ramas están en letras rojas; los residuos conservados en por lo menos nueve ramas, se encuentran en letras azules; mientras que las letras negras denotan aquellos residuos conservados en 6-8 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% (Modificado de Pace y Brenner, 2001).

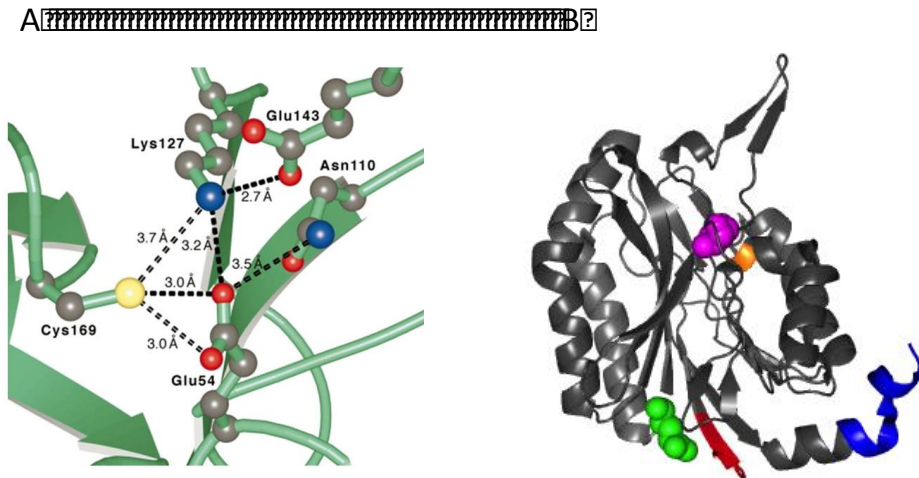


Figura 3. (A) Sitio catalítico putativo de las nitrilasas. Se muestran los residuos E54, K127 y C169 que conforman la triada catalítica, tomado de Gong *et al.*, 2012. (B) **Representación del dominio Nit de la proteína NitFhit de *C. elegans*** (Modificado de Pace *et al.*, 2000, PDB 1EMS). El monómero presenta el motivo estructural $\alpha\beta\alpha$, el cual contiene dos α -hélices seguidas por dos hojas- β de seis hebras cada una. Se indican los extremos N- (rojo) y C- (azul) terminales, así como la posición de los residuos E (verde), K (magenta) y C (anaranjado).

A la fecha, se han caracterizado más de 25 nitrilasas provenientes de diferentes organismos, en su mayoría bacterias, hongos y plantas (Gong *et al.*, 2012). Aunque su papel fisiológico no es claro aún, se reconoce su participación en la síntesis del ácido 3-indolacético, una auxina (Thimann y Mahadevan, 1964) y de cianolípidos, o en la hidrólisis de la β -cianoalanina, intermediario en la vía de detoxificación del cianuro en plantas (Piotrowski *et al.*, 2001). Las propiedades bioquímicas de las nitrilasas varían dependiendo de la especie. Las diferencias más significativas están en la especificidad por sus sustratos, su estructura cuaternaria y propiedades de agregación y pH óptimos.

De acuerdo a la especificidad por su sustrato se clasifican en tres categorías: aquellas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, que son la mayoría; las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos, y las que actúan sobre arilacetónitrilos. Se ha reportado para algunas nitrilasas la capacidad de hidrolizar ambos tipos de nitrilos: las nitrilasas alifáticas de *Acidovorax facilis* 72W, *Acinetobacter* sp AK226, *Syechocystis* sp PCC6803 y *Rhodococcus rhodochrous* K22 y *R. rhodochrous* ATCC33278 presentan actividad para benzonitrilo que representa entre el 5 y 94% de la actividad relativa al sustrato alifático correspondiente, mientras que la arilacetónitrilasa de *Pseudomonas putida* presenta el 23% (Thuku *et al.*, 2007; Yeom *et al.*, 2008).

Las cianuro dihidratasas (CynD) y las cianuro hidratasas (CHT) comprenden a un grupo de enzimas producidas por bacterias y hongos que catalizan la hidrólisis específica del cianuro inorgánico. Las CynD lo hidrolizan en ácido fórmico y amonio, mientras que las CHT lo convierten a formamida.

MECANISMO DE REACCIÓN

Se sabe que algunas nitrilasas aisladas de plantas y bacterias poseen la propiedad de convertir los nitrilos en ácidos carboxílicos o amidas. Como hasta la fecha no se ha cristalizado ninguna nitrilasa con algún sustrato u homólogo, solo se cuenta con un mecanismo propuesto, donde la reacción de hidrólisis inicia con el ataque nucleofílico del grupo tiol de la cisteína catalítica sobre el carbono del

grupo ciano del nitrilo, formándose un intermediario tioimidato (Fig.4 I). En el siguiente paso una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono imídico formando un intermediario tetraédrico y, posteriormente, un tioéster (IIa) que se hidroliza produciendo una acilenzima y la liberación de amonio (Fig.4 III). El ataque nucleofílico de una segunda molécula de agua produce la liberación del ácido carboxílico correspondiente y la enzima regenerada (Raczynska *et al.*, 2011). Por el contrario, si la posición o el impedimento estérico producido por el grupo R favorecen que una carga positiva se encuentra sobre la lisina, se esperaría el rompimiento del enlace C-S con la liberación del grupo tiol llevando la reacción a la formación de amidas (IIb). (Fig.4) (Raczynska *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2010).

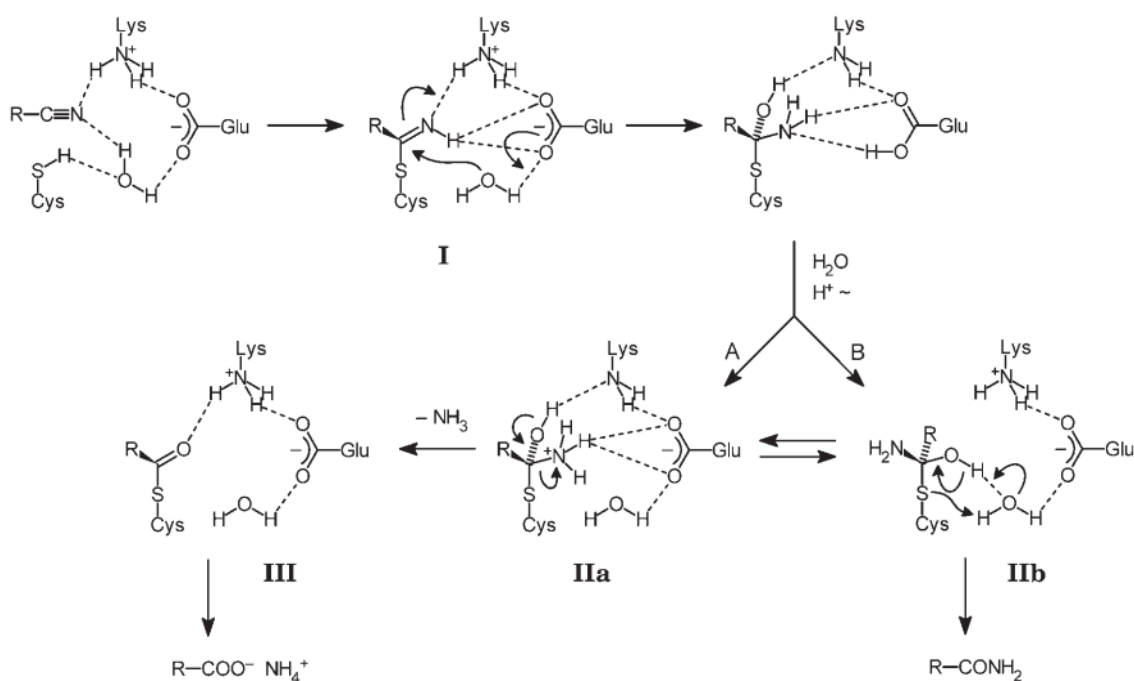


Figura 4. Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por las nitrilasas. Se representa la vía para la formación del ácido carboxílico y la liberación de amonio (A) y una posible vía para la formación de la amida (B) (Tomado de Fernandes *et al.*, 2006).

ESTRUCTURA

A la fecha, se conoce la estructura tridimensional de las nitrilasas de *Pyrococcus abyssi* (Raczynska *et al.*, 2011) y de *Syechocystis* sp. PCC6803 (Zhang *et al.*, 2014). Los monómeros presentan el plegamiento $\alpha\beta\alpha$, característico de la superfamilia (Fig. 5). La comparación entre ambas estructuras muestra una gran similitud estructural no sólo a nivel de los monómeros, sino también, de los dímeros. Las diferencias más importantes se observan alrededor del sitio activo putativo y en las interacciones del extremo C-terminal. Las diferencias en el volumen de la cavidad del sitio activo podrían explicar la especificidad diferente por el sustrato. La nitrilasa de *P. abyssi* hidroliza dinitrilos pequeños, mientras que la de *Syechocystis* tiene preferencia por nitrilos alifáticos de cadena larga. En la nitrilasa de *P. abyssi*, el carboxilo terminal de cada subunidad penetra al interior de la otra subunidad, estableciendo interacciones específicas que participan en la dimerización. En el caso de *Syechocystis*, no se observó densidad electrónica de un segmento del extremo C-terminal, debido a que durante el proceso de cristalización, un corte proteolítico eliminó los últimos 56 residuos.

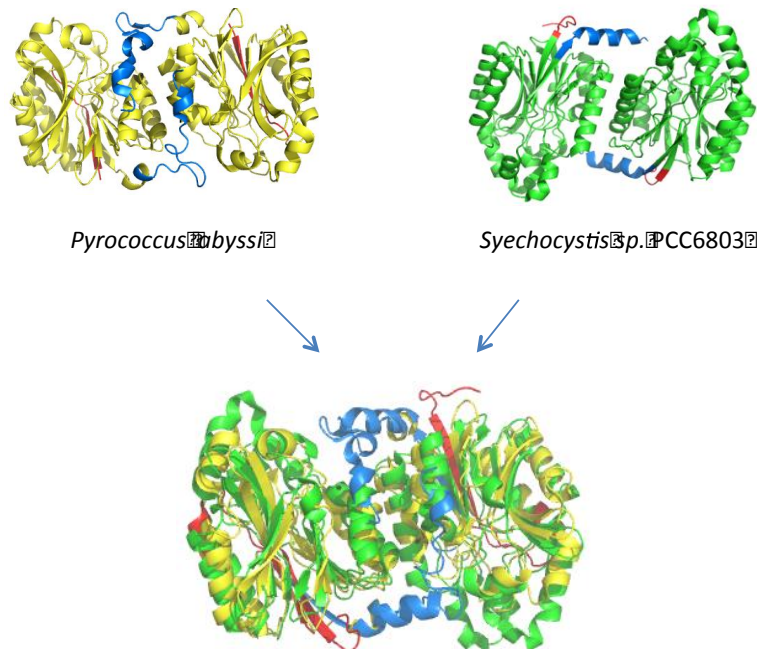


Figura 5. Superposición de las estructuras cristalográficas de las nitrilasas de *P. abyssi* (amarillo, PDB 3IVZ) vs *Syechocystis* sp. PCC6803 (verde, PDB 3WUY). Se muestra la asociación entre subunidades mediada por el extremo C-terminal (azul) y la ubicación del extremo N-terminal (rojo).

OLIGOMERIZACIÓN

Las nitrilasas están conformadas por subunidades de aproximadamente 30 a 45 kDa, que se asocian en homo-oligómeros de diferentes tamaños, entre 2 y 22, dando la forma activa de la enzima. Las nitrilasas aisladas de varias especies del género *Rhodococcus* son dímeros inactivos; la presencia de altas concentraciones de sustrato, como benzonitrilo o sales como el sulfato de amonio, inducen su asociación formando decámeros o dodecámeros, catalíticamente activos (Nagasawa *et al.*, 2000) mientras que, las nitrilasas de *Klebsiella ozaenae* y *P. abyssi* mantienen una estructura dimérica funcional (Stalker *et al.*, 1988; Thuku *et al.*, 2009).

Los monómeros de las CynD de *Pseudomonas stutzeri* AK61 y *B. pumilus* C1 se asocian en una estructura oligomérica espiral con un tamaño definido, 14 y 18 subunidades, respectivamente. En el caso de la CynD de *B. pumilus* C1, las espirales cortas pueden crecer formando filamentos helicoidales regulares de mayor tamaño, en un proceso dependiente de pH (Fig. 6). El modelo estructural revela que cada vuelta de hélice comprende 4.9 dímeros. Estructuras similares en forma de filamentos helicoidales se observaron también en las cianuro hidratadas de *G. sorghi*, *N. crassa* y *A. niger* K10 (Woodward *et al.*, 2008; Vejvoda *et al.*, 2008). Las fibras son de mayor tamaño, en las que se acomodan 5.5 dímeros por vuelta de hélice.

La nitrilasa de *R. rhodochorus* J1 puede formar filamentos helicoidales similares a los de la CynD. Para esta nitrilasa ha sido posible determinar estados oligoméricos diferentes, desde un dímero inactivo, un dodecámero y filamentos helicoidales activos (Fig. 7). Estos filamentos se observaron cuando, tras almacenar a la enzima por un largo periodo, se produjo un proceso autoproteolítico en el que se eliminaron 39 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Thuku *et al.*, 2007). En este reporte la estructura cuaternaria de los distintos ensamblajes se determinó por reconstrucción tridimensional a partir de micrografías electrónicas de las fibras teñidas negativamente.

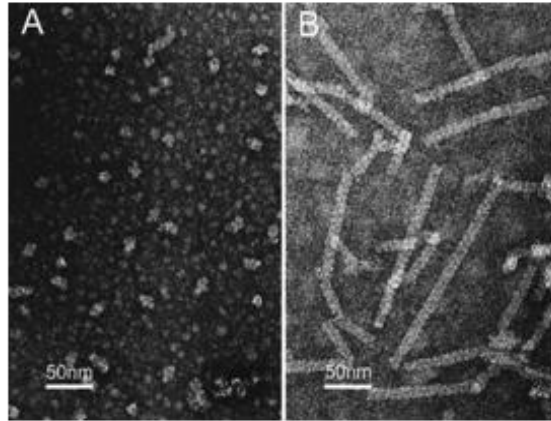


Figura 6. Micrografías electrónicas con tinción negativa de la cianuro dihidratasa de *B. pumillus* C1 a pH 8.0 (A) y 5.4 (B). Se muestra la transición de partículas cortas e irregulares a fibras helicoidales regulares, inducidas por el cambio de pH (Tomado de Jandhyala *et al.*, 2003).

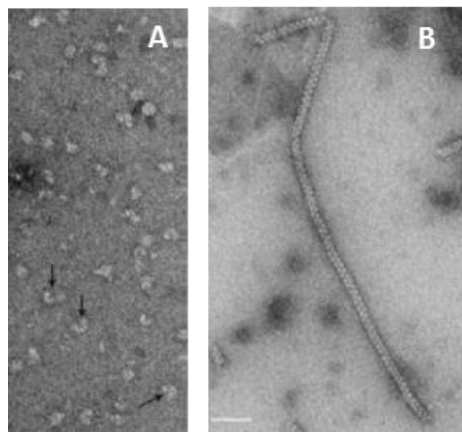


Figura 7. Micrografías electrónicas con tinción negativa de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1. (A) Se observan formas compactas heterogéneas del oligómero de 480 kDa (las flechas indican las estructuras en forma de “C”). (B) **Espirales helicoidales formadas por la reducción en 39 residuos del extremo C-terminal** (Tomado de Thuku *et al.*, 2007).

Los modelos estructurales se generaron por reconstrucción tridimensional a partir de las estructuras de algunos homólogos cristalizados de las nitrilasas y han permitido comprender mejor cómo las subunidades se ensamblan en filamentos helicoidales. Se han identificado diferentes superficies de interacción entre subunidades, referidas como A, C, D, y E, las cuales participan en la formación de los filamentos helicoidales (Fig.8). En la región A se localiza el extremo C-terminal, y es a través de esta superficie que los monómeros de las nitrilasas se asocian

para formar dímeros. Se ha reportado que las interacciones en la superficie A son necesarias para posicionar la cisteína catalítica en el sitio activo. Por otra parte la asociación entre dímeros lleva a la formación de la superficie C, la cual es clave en la formación de espirales. La superficie C esta posicionada a 90° respecto de la superficie A, lo que favorece el ensamble de dímeros y oligómeros. Sólo cuando se arma un giro completo de dímeros surge la superficie D que permite la elongación espiral de los filamentos (Thuku *et al.*, 2009).

Las nitrilasas y cianuro dihidratasas formadoras de espirales, contienen un segmento C-terminal de entre 40-100 residuos más largo con respecto a las secuencias de otros homólogos estructurales como, la N-carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium sp*, las amidasas de *Geobacillus pallidus* (2plq, Kimani *et al.*, 2007) y *P. aeruginosa* (2qxy, Andrade *et al.*, 2001), el dominio Nit-Fit de *C. elegans* o la nitrilasa dimérica de *P. abyssi*. Este segmento extendido se localiza en el interior de las espirales formando parte de la superficie de interacción entre los monómeros. Por lo que, se ha resaltado la importancia de este segmento C-terminal en la oligomerización y activación de las nitrilasas (Thuku *et al.*, 2009).

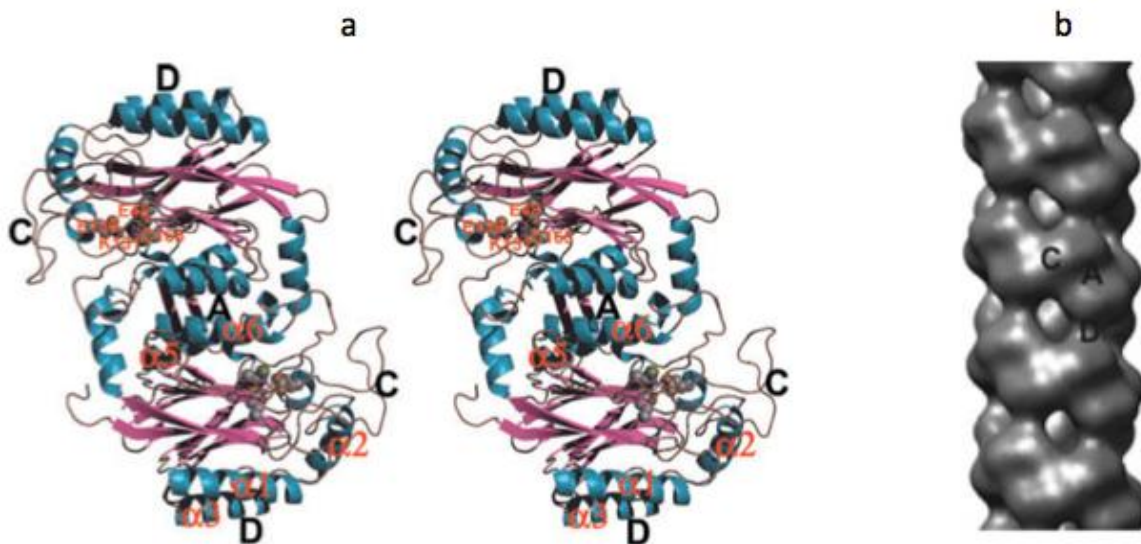


Figura 8. (a) Imagen estereoscópica de un modelo estructural del dímero de la nitrilasa de *R. rhodochrous j1*. Las superficies de asociación se indican en letras negras. Los residuos catalíticos conservados se muestran como esferas. (b) Reconstrucción tridimensional de las microscopías electrónicas de baja resolución de los filamentos helicoidales. Las superficies de interacción A, C y D, que participan en la formación de la espiral se relacionan por un eje de simetría de orden-2 (Tomado de Thuku *et al.*, 2009).

La estructura oligomérica de la β -alanina sintasa de *Drosophila melanogaster* (Dm β AS) representa un caso particular dentro de la superfamilia nitrilasa. La comparación de las secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas muestra un C-terminal extendido en sólo 13 aminoácidos, pero una inserción de 67 residuos en el extremo N-terminal. En la estructura cristalográfica se observa un octámero en forma de vuelta de hélice, que se genera por la asociación de 4 dímeros (Fig. 9). Los monómeros se abrazan entre sí por el extremo C-terminal, mientras que los dímeros se asocian a través de la interacción entre las hélices del extremo N-terminal. Este ensamble particular se propone como prototipo de unidad estructural mínima, a través de la cual pueden generarse oligómeros más grandes y filamentos helicoidales (Lundgren *et al.*, 2008).

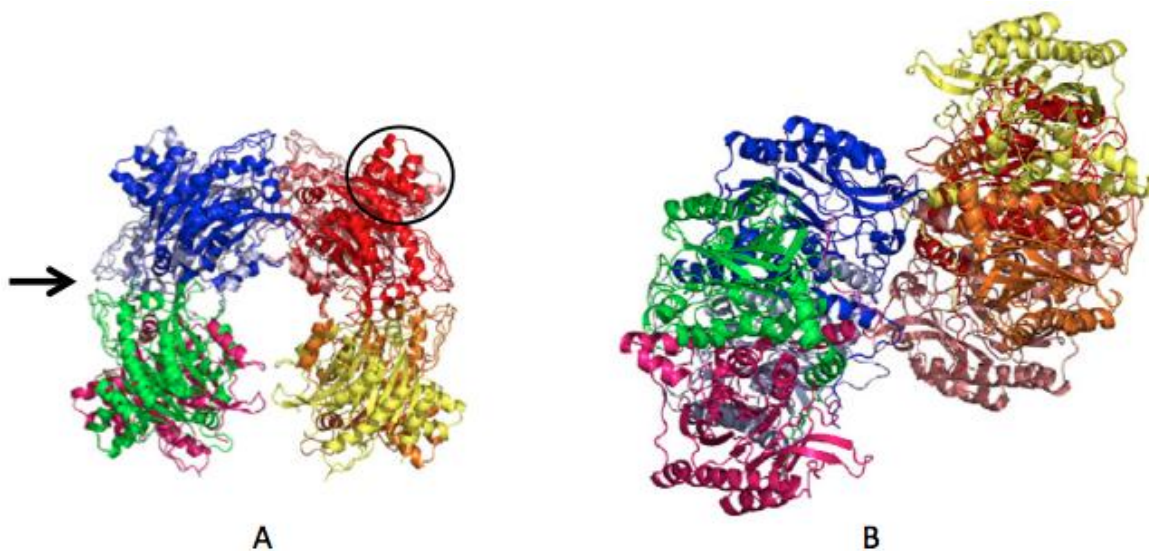


Figura 9. Oligomerización de la Dm β AS. La interacción de los extremos N-terminal forma pequeños subdominios en forma de manojos de 4 hélices (circulo) (A). La asociación de los dímeros se produce a través de la superficie "C" (flecha) que lleva a la asociación de un octámero con giro a la izquierda, que no se cierra o no completa una vuelta de la hélice (B) (Tomado de Lundgren *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

En el laboratorio se clonaron, sobreexpresaron y purificaron la nitrilasa de *Rhodococcus* sp V51B (Leyva, 2009) y la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1 (Granados, 2009). La nitrilasa de *R. sp* V51B recombinante es estable y soluble en presencia de 200 mM de sal; a menor fuerza iónica la enzima tiende a formar agregados insolubles. La característica más importante de esta nitrilasa es que presenta especificidad por el benzonitrilo, nitrilo aromático y por el valeronitrilo, nitrilo alifático; esta propiedad la hace un enzima con gran potencial biocatalítico.

La cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1 recombinante presenta actividad similar a la reportada para otras cianuro dihidratasas. A pH 8.0, la enzima tiene un masa aproximada de 800 kDa lo que sugiere una estructura oligomérica de 22 subunidades. A pH 5.4, donde se reporta la formación de espirales helicoidales, se encontró que esta enzima forma estructuras de tamaño variable, entre 85 y 200 nm, determinado por dispersión dinámica de luz (DLS).

Con la finalidad de obtener y estudiar estructuras helicoidales en forma de espirales a partir de la nitrilasa recombinante de *R. sp* V51B, se generaron dos mutantes con el extremo carboxilo terminal truncado en las posiciones $\Delta 328$ y $\Delta 340$, acortando la secuencia de la enzima en 39 y 27 aminoácidos respectivamente. En el caso de la mutante $\Delta 328$, la eliminación de 39 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal se diseñó considerando el sitio de proteólisis reportado para la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, ya que comparten una identidad del 92%. De esta manera, se pretendía lograr la formación de filamentos helicoidales de manera espontánea por asociación entre monómeros más cortos de forma similar a lo reportado para la nitrilasa de *R. rhodochorus* J1.

Por otra parte, el alineamiento de las secuencias de la nitrilasa de *R. sp* V51B y la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* GMA1 (51.9% en similitud), indica que el extremo C-terminal de la nitrilasa se extiende en 27 aminoácidos (Fig.10). La reducción de este segmento en la nitrilasa silvestre generó una secuencia ($\Delta 340$)

similar en tamaño a la cianuro dihidratasa que forma estructuras helicoidales dependientes de pH.

R. sp. V51B	1	MVEYTNTFKVAAVQAQPVWFDAAKTVDKTVSNIAEAARNGCELVAFP	50
B. p. GMA1	1	MTSIYPKFRAAAVQAAPVYLNLEASVEKSCELIIDEAASNGAKLVAFP	50
R. sp. V51B	51	IPGYPHYIWDVDSPLAGMAKFAVRYHE---NSLTMDSPHVQRLDAAARDHN	97
B. p. GMA1	51	LPGYPWFAFIGHPEYTRKF---YHELYKNAVEIPLSLAIQKISEAAKRNE	96
R. sp. V51B	98	IAVVVGISERDGGSLYMTQLIIDADGQLVARRK	147
B. p. GMA1	97	TYVCISCSEKGGSLYLAQLWFNPNGDLIGKHR	146
R. sp. V51B	148	SDISVYDMPFARLGNL	197
B. p. GMA1	147	SMPVPHFDIGNLGLN	194
R. sp. V51B	198	EVPAFGVDAQLTATRMYALEGQTFVVC	247
B. p. GMA1	195	EI-----SSRYAIATQTFVLM	234
R. sp. V51B	248	GR-GGGFARIIGPDGRDLATPLAEDEEGILYADIDL	296
B. p. GMA1	235	ETFKSGHTCIYGPDGEPISDMVPAETEGIA	284
R. sp. V51B	297	HYSRPDVLNLFNQRRTPVNTPLSTIHATHTFVPQFGALDGVRELNGAD	346
B. p. GMA1	285	HYSNQS-LSMNFHQQPTPVVK-----HLHHQKNEVF-TYEDIQYQHGLL	326
R. sp. V51B	347	EQRALPSTHSDETRATL	366
B. p. GMA1	327	EEKV-----	330

Figura 10. Alineamiento de secuencias entre la nitrilasa silvestre de *R. sp. V51B* y la CynD de *B. pumillus* GMA1. Se indican los residuos que forman la triada catalítica E, K y C.

Al comparar la actividad específica de la enzima silvestre y las mutantes $\Delta 328$ y $\Delta 340$ se observó que la enzima silvestre es capaz de transformar ambos sustratos en una relación 3:1, mostrando preferencia por el benzonitrilo; la mutante $\Delta 328$ también lo hace en una relación 3:1, pero su actividad respecto a la silvestre es 10 veces mayor; mientras que la actividad de la mutante $\Delta 340$ respecto a la enzima silvestre es 6 veces mayor. Por análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), bajo las mismas condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de proteína, fue posible determinar el tamaño estimado de cada enzima. Para la nitrilasa silvestre se obtuvo un diámetro de 16-19 nm, correspondiente con un oligómero de 12 a 14 subunidades. El diámetro promedio de la mutante $\Delta 328$ es de 170 nm y el de la mutante $\Delta 340$ fue de 35 nm (Cáliz, 2016 ; Quintana, 2015)

Por microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa se observó que las mutantes $\Delta 328$ y $\Delta 340$ se ensamblan en filamentos helicoidales. La mutante $\Delta 328$ (fig. 11A) forma filamentos homogéneos con un diámetro de 11 nm, pero de longitudes variables, entre 50-400 nm. En el caso de la mutante $\Delta 340$ (fig. 11B) se observa una población heterogénea, en la que se pueden distinguir algunos filamentos helicoidales con un diámetro promedio de 13 nm y una longitud máxima de 50 nm. La nitrilasa silvestre forma estructuras compactas en forma de C (“C-shape”) similares a las reportadas para la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku *et al.*, 2007).

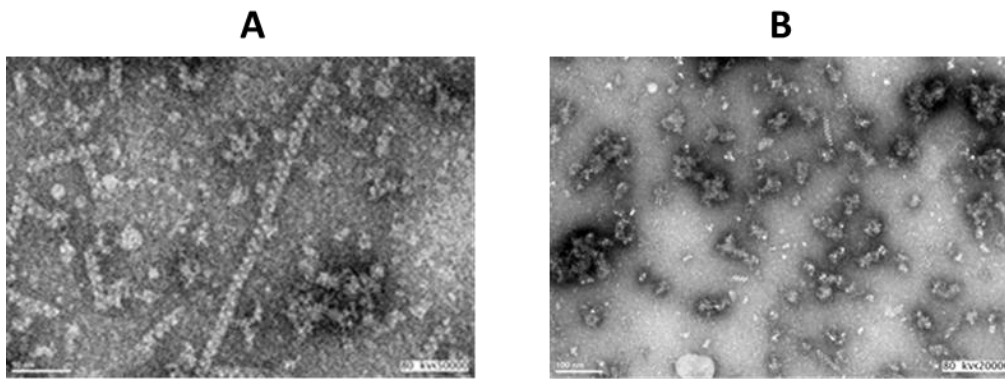


Figura 11. Micrografías electrónicas de la nitrilasa truncada de *R. sp* V51B. (A) Para la Nit $\Delta 328$ T se observan filamentos helicoidales de 11 nm de diámetro y 50 a 400 nm de longitud. **(B)** En la Nit $\Delta 340$ R los agregados son heterogéneos y se puede observar algunos filamentos helicoidales cortos.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los modelos estructurales que se han generado se sugiere que en las nitrilasas, la región del C-terminal está involucrada en las interacciones de las intercaras entre subunidades que participan en la formación de las formas espirales de la enzima. Los resultados obtenidos con la mutante truncada en el C-terminal $\Delta 328$ indican que hasta esta posición, las interacciones proteína-proteína favorecen la formación de estructuras filamentosas con actividad catalítica aumentada, respecto a la enzima silvestre. Se propone que mediante mutaciones truncadas desde el extremo C-terminal hacia la posición 328 se podrá determinar la longitud mínima de C-terminal necesaria para generar estructuras helicoidales estables.

En el mismo contexto esperamos que este proyecto ayude a entender mejor el papel que desempeña el extremo C-terminal en las interacciones proteína-proteína que llevan a la formación de dímeros, oligómeros o filamentos helicoidales y cómo se correlaciona con el proceso de activación enzimática, que parece ser un fenómeno común a este grupo de enzimas.

OBJETIVO GENERAL

Modificar por mutagénesis la superficie de interacción proteína-proteína en el extremo C-terminal de la nitrilasa de *R. sp* V51B.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar mutantes con codones de término entre las posiciones 328 y 366.
- Purificar las enzimas mutantes
- Determinar su actividad catalítica
- Determinar por métodos hidrodinámicos y dispersión de dinámica de luz el tamaño de las estructuras formadas.
- Determinar por microscopía electrónica la estructura que adquieren las mutantes.

HIPÓTESIS

Si los residuos que determinan el grado de agregación de la nitrilasa de *R. sp* V51B se encuentran entre las posiciones 328 y 366 del extremo C-terminal, entonces, mediante mutaciones dirigidas hacia esta región, podremos encontrar la longitud mínima que favorece la agregación.

METODOLOGÍA

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen silvestre de la nitrilasa de *R. sp* V15B. Se utilizó el programa OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator para obtener la secuencia reversa de los oligonucleótidos (Tabla 1) y las correspondientes temperaturas de fusión (T_m) y el programa SnapGene Viewer para verificar que las construcciones diseñadas solo tuvieran afinidad por la región donde se deseaba introducir el codón de término para cada mutante.

Tabla 1. Secuencia reversa de los oligonucleótidos utilizados para introducir codones de término.

Nombre	Secuencias	T _m (°C)
Δ330V	5'-GAACAAGCTTCAGAACGTGTG-3'	55.2
Δ332Q	5'-CCAAGCTTCACGGCACGAAC-3'	55.9
Δ334G	5'-CCGTCGAAGCTTCAGAACTGC-3'	56.3
Δ336L	5'-AAGCTTCATGCCCCGAACTGC-3'	55.4
Δ338G	5'-GCTCAAAGCTTCAGTCGAGTG-3'	54.4
Δ340R	5'-GAACGTTTCAGACGCCGTCGA-3'	55.7
Δ345A	5'-CTGTAAGCTTCATCCGTTGAG-3'	52.4
Δ347E	5'-AAGCTTCATTCGTCCGCTCCG-3'	56.3
Δ349R	5'-AAGCTTCAGCGCTGTTTCGTCC-3'	56.3
Δ352P	5'-ATGTAAGCTTCACAATGCGCG-3'	52.4
Δ359T	5'-CCAAGCTTCACTCGTCGGAA-3'	53.8

Δ, codón de término introducido en la posición indicada

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

La transformación de células de *E. coli* electrocompetentes (DH5α o BL21 (DE3) pLys) se hizo mezclando de 1 a 3 μL de DNA plasmídico (pET24a(+)) o pGEM-T con 50 μL de células. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación con un ancho de ranura de 2 mm, previamente enfriada a 4 °C. El pulso eléctrico se generó utilizando un equipo electroporador Micro Pulser (BioRad). La mezcla se resuspendió en 1 mL de medio de recuperación y se incubó por 1 hora a 37 °C en agitación continua (200 rpm). La selección de transformantes se realizó mediante siembra en placas suplementadas con kanamicina o ampicilina.

PURIFICACIÓN DE DNA POR FENOL CLOROFORMO

Se inoculó una sola de las transformantes en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) y se dejó crecer 12 horas a 37 °C con agitación continua (250 rpm). Se centrifugaron 5 mL de medio de cultivo a 13000 rpm durante 5 minutos, la pastilla se resuspendió en 100 µL de solución 50 mM glucosa, Tris-HCL 25mM pH 8 y 10 mM de EDTA; se agregaron 10 mg/ml de lisozima y se dejó incubar 1 hora a 37 °C. A continuación, se agregaron 200 µL de la solución NaOH 0.2 M, SDS 4% y se dejó incubar en hielo por 10 minutos. Se adicionaron 150 µL de una disolución de acetato de potasio 5M pH 5 y se incubó en hielo 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 13000 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le adicionaron 400 µL de fenol saturado de amortiguador y un volumen igual de cloroformo, se mezcló por inversión. Se centrifugó, se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 750 µL de isopropanol, la mezcla se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se centrifugó y la pastilla se lavó 10 veces con etanol al 70% hasta que ya no se percibió olor a fenol. Las muestras se resuspendieron en amortiguador con RNAasa.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS GENES

El gen silvestre (*nitA*) y las variantes generadas se encuentran flanqueados por los sitios de restricción HindIII y NdeI. Para obtenerlos se hicieron cultivos de 10 mL, a partir de los cuales se hizo la extracción de plásmidos por el método de fenol cloroformo. Una vez que se obtuvo el DNA, este fue sometido a un ensayo de doble restricción enzimática que se incubó toda la noche a 37 °C. Las digestiones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Como estándar de peso molecular se usó el marcador de escalera 2Log DNA (New England BioLabs). Los geles se revelan con bromuro de etidio (BrEt) al 1%. Las bandas correspondientes al DNA digerido se cortaron del gel y se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (Gel Extraction Kit de QUIAGEN).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La introducción de un codón de término en la posición correspondiente se llevó a cabo mediante reacciones de PCR tomando como templado el gen *NitA*. Se utilizaron los oligonucleótidos con el respectivo codón de término (reverso) los cuales integran en su secuencia el sitio de restricción HindIII (Tabla 1) y el oligonucleótido directo, llamado Ande1, complementario a la secuencia del gen silvestre y que contiene el sitio de restricción NdeI:

5'-CATATGGTCTGAATACACAAACACATTC-3'.

Promediando las temperaturas de fusión, T_m , de los oligonucleótidos directo y reverso (Tabla 2) se determinó que la temperatura de alineamiento óptima era cercana a los 54°C, por lo que se empleó un gradiente de temperatura, en el rango de 50-59°C, para incorporar las mutaciones respectivas y amplificar las secuencias.

Tabla 2. Temperatura de fusión promedio (T_m) de los oligonucleótidos que incorporan codones de término y Ande1.

Oligonucleótido	T_m promedio (°C)
$\Delta 330$	53.8
$\Delta 332$	55.5
$\Delta 334$	55.7
$\Delta 336$	55.3
$\Delta 338$	54.8
$\Delta 340$	55.2
$\Delta 345$	53.8
$\Delta 347$	54.3
$\Delta 349$	54.3
$\Delta 352$	54.5
$\Delta 359$	53.8

Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el sistema de la Taq DNA polimerasa (Roche). La mezcla de reacción, con un volumen final de 50 μ L, contenía el amortiguador de PCR suministrado por el proveedor, 125 ng del gen *NitA*, 125 ng de los oligonucleótidos directo y reverso, 125 ng de la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) y 1 U de Taq polimerasa. Las

variantes del gen silvestre se amplificaron por PCR bajo las condiciones de termociclado indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Ciclo de PCR para la amplificación de las mutantes de término.

Temperatura (°C)	Tiempo
94	1 min
94	50 seg
40	1 min
72	20 min
Repetición	5 ciclos
95	3 min
95	1 min
Tm (50-59)	1 min
Repetición	25 ciclos
72	20 min
4	Conservación

CLONACIÓN Y SUBCLONACIÓN EN LOS VECTORES pGEM-T y pET-24a(+)

Los productos de PCR se separaron del resto de los elementos contenidos en la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez purificado, el fragmento de interés se ligó en el vector de transporte pGEM-T (3015pb). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo incubando mezclas con diferentes relaciones inserto:vector (1:1, 1:3 y 1:5) y T4 DNA Ligasa (4U/μL), durante 24 h a 16°C. Posteriormente, estos productos se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5α que se sembraron en placas con medio LB suplementado con ampicilina. Se comprobó la presencia de los genes haciendo análisis de fragmentos de restricción por electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Los genes fueron liberados del pGEM-T y se ligaron en el vector de expresión pET-24a(+)(5000pb) al cual, previamente, se le generaron los sitios de restricción Ndel y HindIII. Con los productos de las ligaciones se transformaron células de *E. coli* DH5α que se sembraron en placas con medio LB y kanamicina.

Las clonas positivas se crecieron en 10 mL de medio LB con ampicilina o kanamicina, respectivamente. La purificación de los plásmidos se llevó a cabo por lisis alcalina y columnas con membrana de silicatos con el QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). La secuenciación del DNA se realizó en la Unidad de Biología

Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM o en la compañía Laragen Inc. (USA). Se utilizaron los oligonucleótidos universales SP6_{pro}, T7_{pro} para las clonas en pGEM-Y y T7_{pro} T7_{ter} para las del vector pET-24a(+).

SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Células de *E. Coli*, de la cepa BL21 (DE3) pLysS, se transformaron con el vector de expresión pET24a, el cual tenía integrado a su secuencia los genes mutados y se crecieron en placas de medio LB-agar-kanamicina, a 37°C.

Para inducir la expresión de las mutantes, 50 mL de medio líquido LB complementado con kanamicina se inocularon con una colonia fresca del cultivo en medio sólido de las células BL21 (DE3) pLys transformadas con los genes de interés y se creció durante 12 horas a 37 °C con agitación constante (200 rpm).

Los 50 mL del precultivo, se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB y con éste se inoculó 1 L del mismo medio complementado con kanamicina, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ ≈ 0.1. Se dejó crecer a 37 °C, con agitación constante hasta que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial del cultivo, D.O.₆₀₀ ≈ 0.6. La sobreproducción de la proteína se promovió con la adición del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. Se utilizaron dos protocolos de inducción, el primero de ellos consistió en incubación a 27 °C y agitación constante (200 rpm) por 8 horas (protocolo A); el segundo fue de 4 horas de incubación a 37 °C y agitación constante (200 rpm) (protocolo B). Transcurrido el tiempo se cosecharon las células, centrifugando los cultivos a 5000 rpm durante 20 minutos. La biomasa se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (Tris 100 mM, KCl 150 mM y EDTA 1 mM) adicionado con 0.2 mM PMFS. Las células se rompieron por el método de sonicación a 4 °C con 10 pulsos a 40 % de amplitud y 1 minuto de duración, dejando intervalos de dos minutos entre cada pulso. También, se utilizó el método mecánico de la prensa de French para romper células, con resultados muy similares al método de ruptura por sonicación. El extracto total se centrifugó a 15 000 rpm durante 20 minutos. Se realizó una precipitación por fraccionamiento con sulfato de amonio a 4 °C del extracto celular

soluble, obteniéndose algunas de las mutantes en la fracción entre el 0 y el 20 % de saturación y otras entre el 20 y 45 % de saturación de sulfato de amonio.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los sobrenadantes precipitados con sulfato de amonio se centrifugaron a 15 000 rpm durante 20 minutos, las pastillas se resuspendieron en 1mL de amortiguador KH_2PO_4 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM y β -mercaptoetanol 14.25 mM, pH 7 (amortiguador de corrida A). El solubilizado se filtró y se inyectó a una columna Sephacryl S-300 equilibrada con el amortiguador de corrida a un flujo de 0.5 mL/min, controlada por un equipo HPLC (Waters). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las de mayor pureza se juntaron y concentraron en filtros Amicon® Ultra (Millipore). Las fracciones se sometieron a una segunda cromatografía donde se utilizó una columna de intercambio aniónico SourceQ previamente equilibrada con el amortiguador de corrida A y se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0.2 a 1M. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las de mayor pureza se juntaron y concentraron. Aquellas proteínas que aun mostraban contaminantes se concentraron y dializaron en amortiguador de corrida B (pH 8.0) para pasarlas nuevamente por la columna de intercambio iónico equilibrada con amortiguador de corrida B. Las fracciones recolectadas con la nitrilasa pura se juntaron y concentraron para su caracterización posterior.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA). El ácido bicinconínico en la forma de su sal soluble en agua, es altamente sensible y específico para el ion Cu^+ . La cuantificación por BCA combina la reacción de Biuret (reacción de la proteína con Cu^{+2} en un medio alcalino para producir Cu^+) con un reactivo altamente específico para la detección de Cu^+ denominado ácido bicinconínico. El producto de la reacción presenta un color púrpura, formado por la interacción de dos moléculas de BCA con el ión Cu^+ , es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm (García y Vázquez., 1998). A partir de una curva estándar con concentraciones conocidas (4-40 $\mu\text{g/mL}$)

de albúmina sérica bovina (BSA) se obtiene la concentración de proteína de las muestras problema.

La concentración de las proteínas puras se determinó también a partir de medidas de absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro tipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y un coeficiente de extinción molar teórico del monómero de: $\xi_{0.1\%_{280}} = 1.024$.

ENSAYO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA. DETERMINACIÓN DE AMONIO

Para los ensayos de actividad se utilizó un reactivo comercial Spectroquant (MERCK®) para la detección de amonio. Las muestras se mezclan con hipoclorito y un derivado fenólico, los cuales reaccionan con el amonio presente, también, se adiciona nitroprusiato que actúa como catalizador de la reacción. Se desarrolla una coloración azul proporcional a la cantidad de amonio presente.

La reacción se llevó a cabo en 1 mL de solución amortiguadora de actividad pH 7.8 (K-Fosfatos 100 mM), 1 mM de benzonitrilo y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de enzima. Después de 10 minutos de reacción a 30°C se añadieron 100 μL de HCl 2N y se afora a 5 mL con agua. Se añaden los reactivos y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 690 nm. Se realiza una curva estándar de amonio a concentraciones de 0.25-2 mM. Los ensayos para cada mutante se hicieron al menos por triplicado.

DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Las muestras se dializaron en amortiguador de K-Fosfatos 100 mM pH 7.8 y KCL 100 mM, después se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se filtraron a través de membranas de tamaño de poro de 0.22 μm . 400 μL de cada muestra a una concentración de 0.2 mg mL^{-1} se transfirieron a celdas de cuarzo rectangulares y se leyeron en un equipo Zetasizer® (Malvern™) manteniendo la temperatura a 25°C.

DICROÍSMO CIRCULAR

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO™ J-715 equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura. La concentración de las soluciones de las distintas nitrilasas fue de

0.2 mg mL⁻¹, previamente equilibradas en amortiguador de K-Fosfatos 100 mM pH 7.8 y KCL 100 mM, en una celda de 0.1 cm de recorrido óptico para el UV lejano (200-260 nm). Cada espectro fue el promedio de 5 barridos consecutivos y fueron corregidos restándoles la señal del amortiguador. La elipticidad molar $[\theta]$ por residuo se calculó utilizando una masa promedio de 110-111 gramos por mol de aminoácido. La misma muestra se usó para obtener las transiciones de desplegamiento térmico siguiendo los cambios de elipticidad a 208 nm. La temperatura de la muestra se incrementó a una velocidad de 1 °C min⁻¹.

El análisis de deconvolución de los espectros de CD, para conocer la contribución de los elementos de estructura secundaria se realizó con la paquetería de CDPro (disponible en <http://lamar.colostate.edu/Bsreeram/CDPro/ListPro.htm>), con los programas CONTINLL, CDSSTR y SELCON3

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las enzimas se dializaron en una solución amortiguadora TRIS 100 mM pH 7.8 y, posteriormente, se filtraron a través de membranas de tamaño de poro de 0.22 µm. Se utilizaron rejillas de cobre cubiertas con una capa de grafito. Sobre las rejillas se colocaron 5 µl de las proteínas, y sobre éstas se colocaron 5 µl del agente de contraste, ácido fosfotúngstico 2% (PTA, en inglés). La mezcla se dejó reposar un minuto a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de muestra con papel filtro y se dejó secar las rejillas por 3 minutos a temperatura ambiente. Las micrografías fueron hechas con un microscopio electrónico JEM-1200EX II a 80 000 volts, en la unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

RESULTADOS

CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES DE LA NITRILASA DE *R. sp* V51B.

Considerando la importancia del extremo C-terminal para la formación de los diferentes arreglos estructurales observados en las nitrilasas y buscando encontrar la distancia mínima que detona el equilibrio oligomérico entre las diversas estructuras, se diseñaron 11 mutantes truncadas de diferente longitud entre las posiciones 328 y 366 del gen silvestre de la nitrilasa de *R. sp* V51B. Para ocho de ellas se hizo una caracterización enzimática y estructural completa (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de los resultados de las mutaciones de término en el C-terminal de la nitrilasa de *R. sp* V51B.

Nombre	# de residuos eliminados	PCR	pGEM-T	pET24a(+)	Expresión Y Purificación	Actividad
Δ 328	39	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 330	37	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 332	35	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 334	33	Si	Si	No	No	ND
Δ 336	31	Si	Si	No	No	ND
Δ 338	29	Si	Si	No	No	ND
Δ 340	27	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 345	22	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 347	20	Si	Si	Si	No	ND
Δ 349	18	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 352	15	Si	Si	Si	Si	Si
Δ 359	8	Si	Si	Si	Si	Si

ND: No determinado

En el diseño de oligonucleótidos se consideró una longitud promedio de 21 residuos, de los cuales, al menos 12 fueran complementarios a la secuencia, puesto que el codón de término y el sitio de restricción HindIII implican una extensión de 8 residuos que no son complementarios a la secuencia del gen nativo (Fig. 12).

Una vez diseñadas las sondas, se hizo el análisis de complementariedad a lo largo de los 1100 pb del gen silvestre encontrando que solo tenían afinidad por las regiones hacia las que fueron originalmente diseñadas.

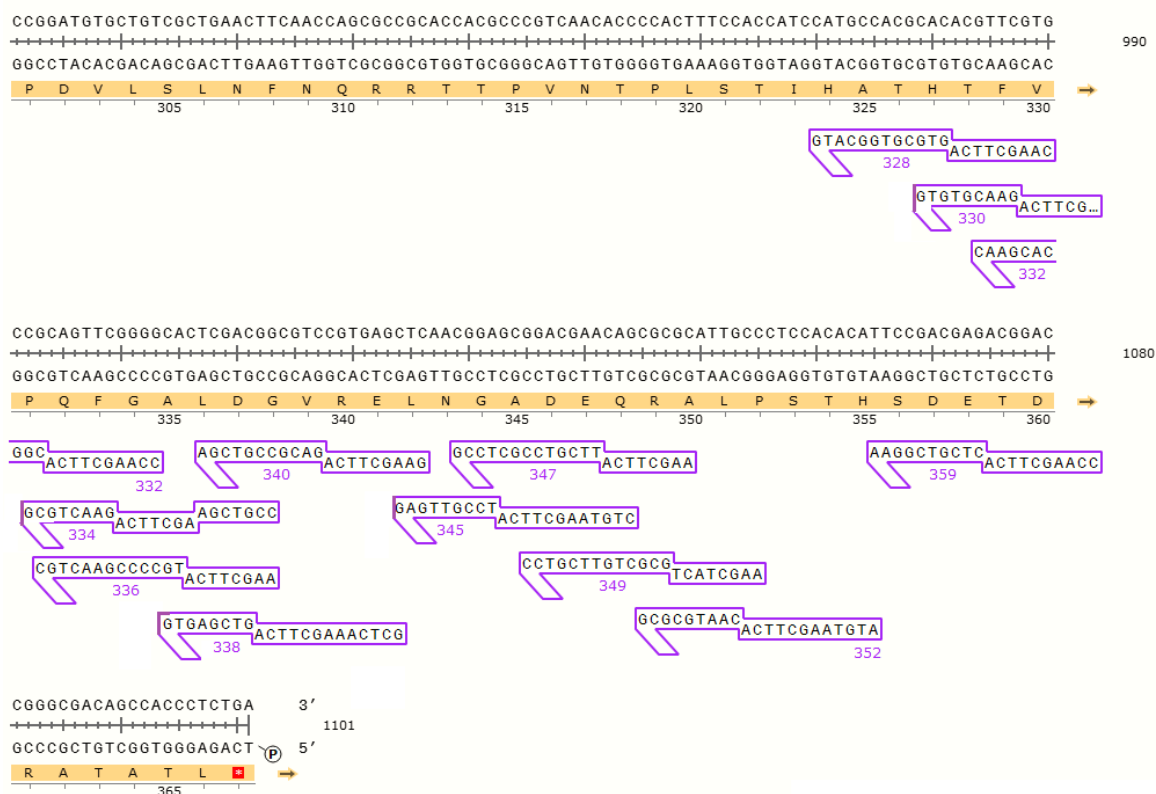


Figura 12. Oligonucleótidos que incorporan codones de término. Se indica la posición y complementariedad de cada oligonucleótido en la secuencia del gen silvestre.

Siguiendo condiciones particulares de PCR se consiguió amplificar las 11 mutantes diseñadas. Por los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto se escogieron 8 mutantes para subclonaras en el vector de expresión pET24a(+).

La figura 13 muestra la electroforesis en gel de agarosa de algunos productos de PCR obtenidos para las mutantes generadas; donde se corrobora que los productos de PCR amplificaron en el peso esperado (≈ 1000 pb), menor al producto del gen silvestre *NitA* (1100 pb). Los insertos se clonaron en el plásmido de transporte pGEM-T y posteriormente se subclonaron al vector de expresión pET-24a(+). En la figura 14, se muestra el monitoreo de las clonas transformantes, digeridas con *NdeI* y *HindIII*. En todos los casos se distinguen claramente dos bandas, una de 5000 pb que corresponde al pET24a(+) y la otra de

aproximadamente 1000 pb correspondiente a los insertos liberados. Con estos ensayos se comprueba la liberación de insertos y la funcionalidad de los sitios de restricción.

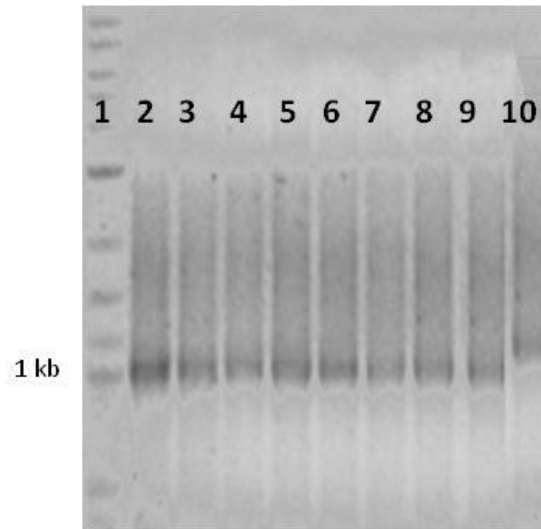


Figura 13. Insertos amplificados por PCR. (1) Marcador de peso molecular (0.1-10.0 Kb), (2) $\Delta 330$, (3) $\Delta 332$, (4) $\Delta 334$, (5) $\Delta 340$, (6) $\Delta 347$, (7) $\Delta 349$, (8) $\Delta 352$, (9) $\Delta 359$ y (10) WT. La tinción se hizo con BrEt al 1%.

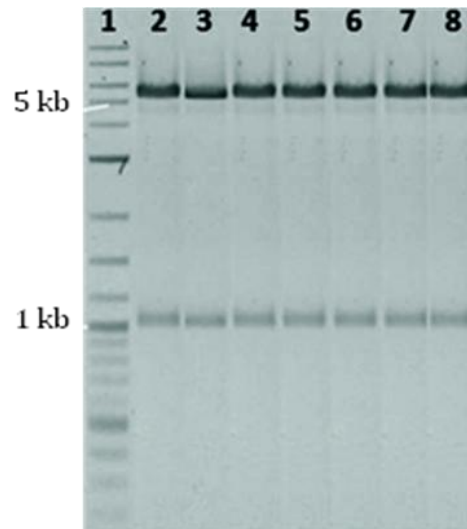


Figura 14. Ensayos de doble digestión enzimática vistos en un gel de agarosa al 1%. Se demuestra la liberación de los insertos flanqueados por los sitios de restricción HindIII y NdeI. (1) Marcador de peso molecular (0.1-10.0 Kb), (2) $\Delta 330$, (3) $\Delta 332$, (4) $\Delta 340$, (5) $\Delta 345$, (6) $\Delta 349$, (7) $\Delta 352$, (8) $\Delta 359$. La tinción se hizo con BrEt al 1%.

Se seleccionaron 10 clonas de cada mutante y se purificó el DNA por lisis alcalina a partir del cual se llevaron a cabo pruebas de amplificación por PCR, con los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para introducir los codones de término y realizar las secuenciaciones respectivas. La secuenciación confirmó que de las 11 construcciones amplificadas, solo ocho ($\Delta 330$, $\Delta 332$, $\Delta 340$, $\Delta 345$, $\Delta 347$, $\Delta 349$, $\Delta 352$ y $\Delta 359$) incorporaron el codón de término. Utilizando los programas de bioinformática BioEdit, Expassy translate y Embos Needle se hizo un cuidadoso análisis a la secuencia de los genes amplificados. No se encontraron mutaciones adicionales a las esperadas, por lo tanto, se procedió a sobreexpresar las enzimas.



Figura 15. Región del extremo C-terminal de la nitrilasa de *R. sp. V51B* donde se insertaron los codones de término. Se muestran los últimos 39 residuos del C-terminal, en verde se señala el residuo sustituido por el codón de término, las flechas indican el nombre de cada mutante y número de residuos eliminados respecto al gen silvestre.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se transformaron células electrocompetentes BL21 (DE3) pLys con los genes de término dentro del vector pET24a(+). Todas las proteínas se expresaron adecuadamente, sin embargo, para las mutantes $\Delta 330$ a $\Delta 352$ la inducción se promovió a 27 °C durante 8 horas, para así, aumentar la cantidad de proteína en el sobrenadante obtenido de la lisis celular. En la figura 16 se muestran los resultados para la mutante $\Delta 330$, representativos de todas las mutantes.

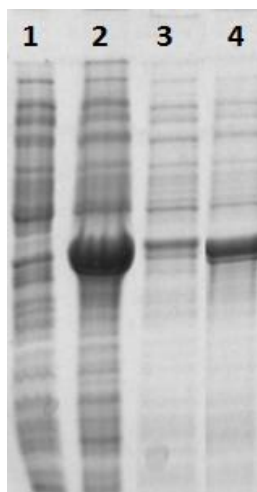


Figura 16. SDS-PAGE al 12% del seguimiento de la expresión y solubilidad de la Nit Δ 330. (1) Antes de inducir, (2) Después de inducir, (3) Extracto total y (4) Sobrenadante.

A partir de la fracción soluble se hicieron precipitaciones diferenciales con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 20, 20 a 35 y 35 a 45% de saturación. El protocolo de purificación, previamente establecido para la nitrilasa recombinante silvestre, indica que la enzima precipita principalmente en la fracción del 35 al 45% (Leyva, 2009), mientras que la mutante T328 en la fracción del 0 al 20% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Cáliz, 2016). En el caso de las mutantes de término, se hizo un seguimiento completo de cada paso durante la precipitación diferencial. Se encontró que las mutantes más cortas, Δ 330 a Δ 352, precipitan en su mayoría al 20 %, mientras que la mutante Δ 359 al 45% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Como siguiente paso de purificación, las proteínas precipitadas se centrifugaron, las pastillas se resuspendieron en 1 mL del amortiguador de corrida A y se pasaron a través de una columna de exclusión molecular, Sephacryl S-300 (55 x 3.5 cm). La figura 17A muestra el perfil cromatográfico de elución de la mutante Δ 330, representativo de las mutantes Δ 330 a Δ 352. Las fracciones enriquecidas eluyen entre los 110 y 140 minutos; si consideramos que un volumen de columna eluye en 100 min, entonces podemos inferir que las mutantes son oligómeros de tamaño muy grande, similar al de la mutante Δ 328 que forma filamentos helicoidales. El perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE al 12% reveló que las proteínas se obtuvieron con una pureza mayor al 95% (Fig. 17 B).

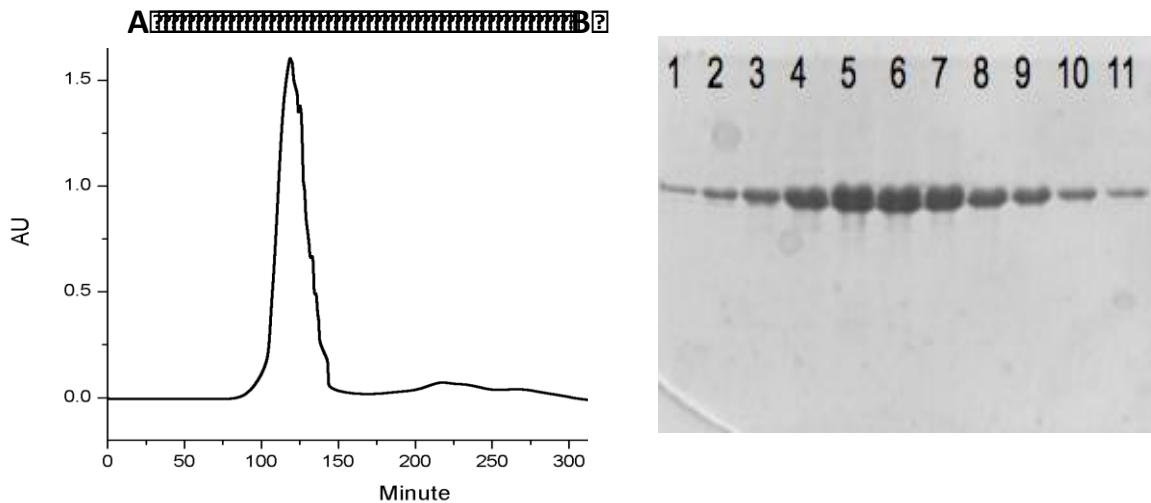


Figura 17. (A) Cromatograma de la columna S-300. Las fracciones con nitrilasa eluyen entre los 110 y 140 minutos. **(B) SDS-PAGE al 12% de las fracciones eluidas de la columna S-300.** Se muestra el perfil electroforético de las fracciones correspondientes al primer pico.

El perfil cromatográfico de la mutante $\Delta 359$ es similar al de la enzima silvestre. Se obtiene un pico muy ancho, entre el min 120 y 250, con 3 hombros (Fig. 18A), sugiriendo que hay heterogeneidad en el tamaño de las proteínas eluidas. Sin embargo, como se observa en la figura 18B las fracciones enriquecidas con nitrilasa que eluyen entre los 160 y 210 min van acompañadas de varios contaminantes. Las muestras se concentraron y dializaron en el amortiguador de corrida A (pH 7.0) para pasarlas a través de una columna de intercambio aniónico (SourceQ). Los resultados se muestran en la figura 19.

En el cromatograma se observa un primer pico que corresponde a la muestra que no se pega a la columna y eluye antes de aplicar el gradiente de sal, y un segundo pico que eluye entre 270-302 mM NaCl, correspondiente a las fracciones enriquecidas con la mutante $\Delta 359$ (Fig. 19A). Sin embargo, la presencia de contaminantes siguió siendo mayor al 10% en estas fracciones (Fig. 19B), por lo que, se decidió realizar una tercera cromatografía y se pasaron nuevamente por una columna SourceQ a pH 7.8.

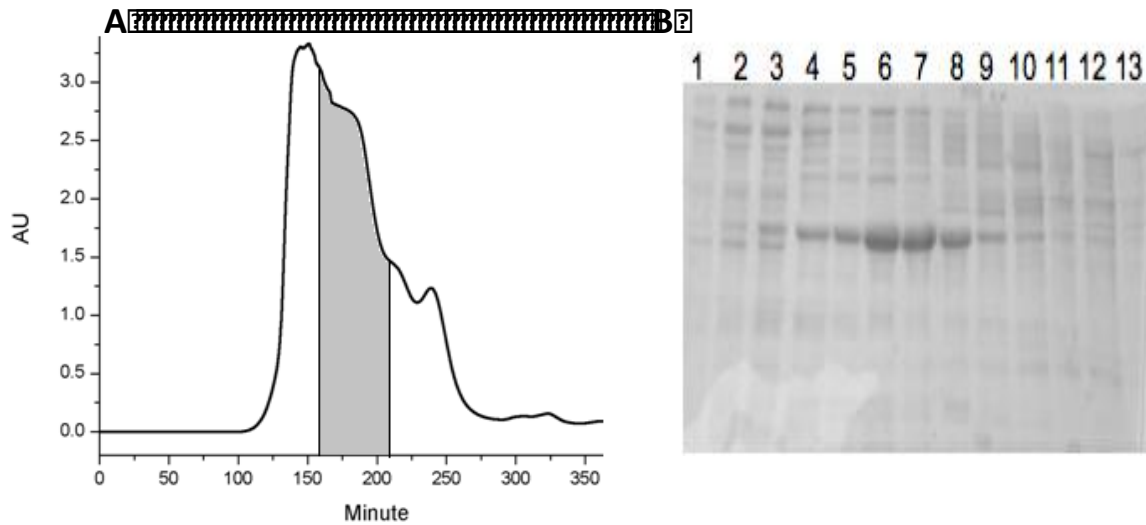


Figura 18. (A) Perfil de elución de la mutante $\Delta 359$ por la columna S-300. El área sombreada representa las fracciones donde se obtiene a la proteína en mayor concentración. **(B) Perfil electroforético de la enzima $\Delta 359$.** Los carriles 5-8 corresponden a las fracciones eluidas entre los 160 y 210 min.

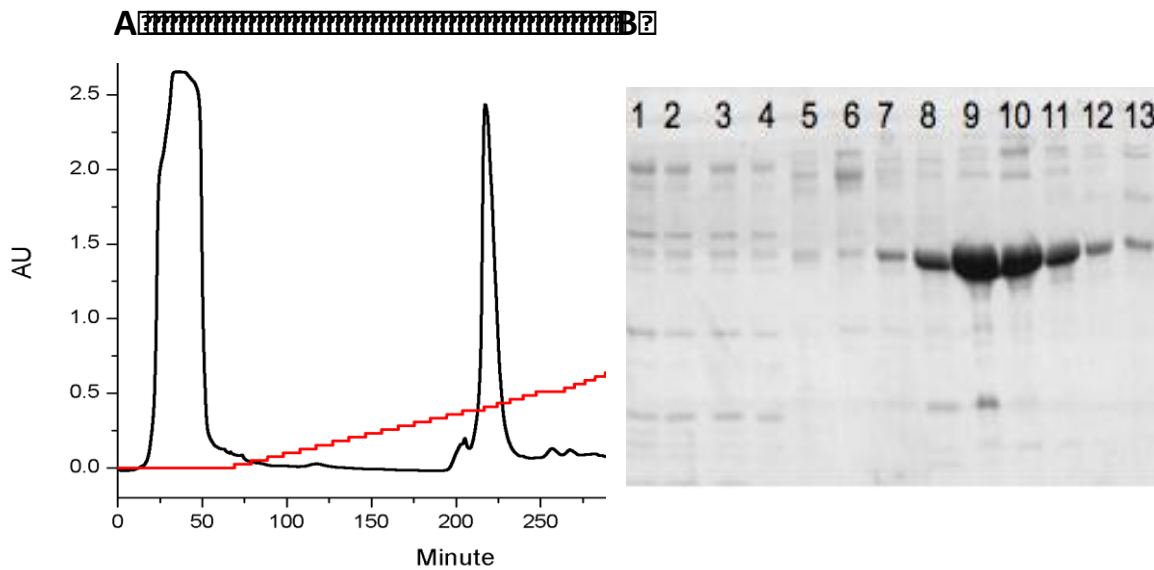


Figura 19. (A) Cromatograma de la columna de intercambio aniónico a pH 7.0. La mutante $\Delta 359$ eluye en el segundo pico a 290 mM de NaCl. **(B) SDS-PAGE al 12% de las fracciones eluidas de la columna de intercambio aniónico.** En los carriles 7-12 se observan fracciones donde eluye la mutante $\Delta 359$.

Con esta tercera cromatografía se consiguió reducir casi por completo la presencia de contaminantes y obtener a la proteína con un alto grado de pureza (Figura 20). Este mismo protocolo se siguió para purificar a la nitrilasa silvestre con un mejor grado de pureza.

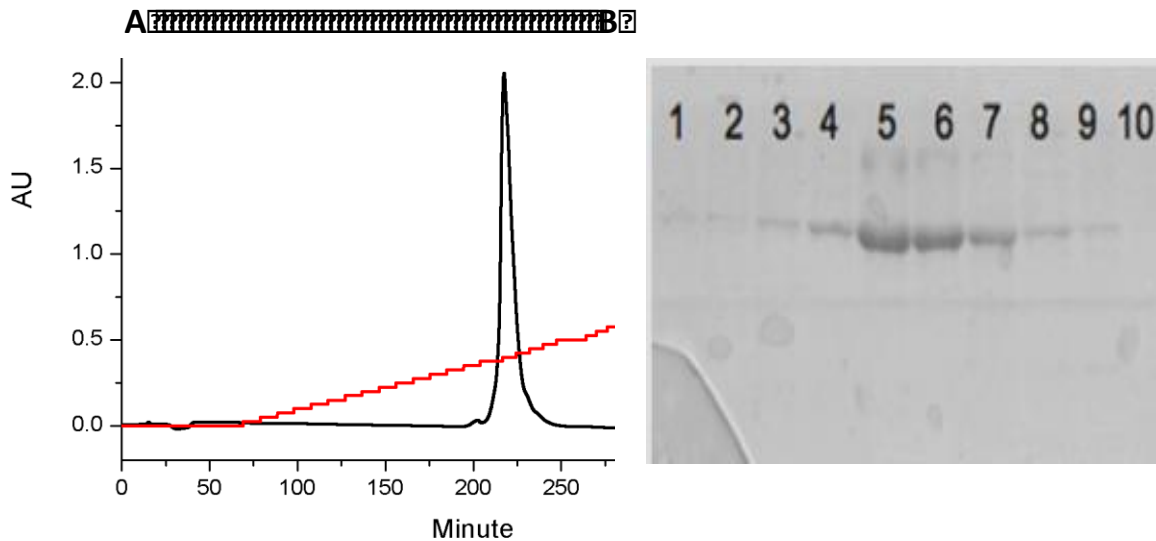


Figura 20. (A) Cromatograma de la columna de intercambio aniónico a pH 7.8. La mutante $\Delta 359$ eluye en 290 mM de NaCl. (B) SDS-PAGE al 12% de las fracciones eluidas. En los carriles 4-8 se muestran las fracciones colectadas donde se encuentra más concentrada la mutante $\Delta 359$.

En la figura 21 se muestra el patrón electroforético de todas las mutantes de término, $\Delta 328$ - $\Delta 359$, comparado con el de la nitrilasa silvestre. Los pesos moleculares aparentes de las mutantes que van desde 36 hasta 40 kDa, corresponden a los pesos moleculares esperados de acuerdo a las secuencias de ADN respectivas.

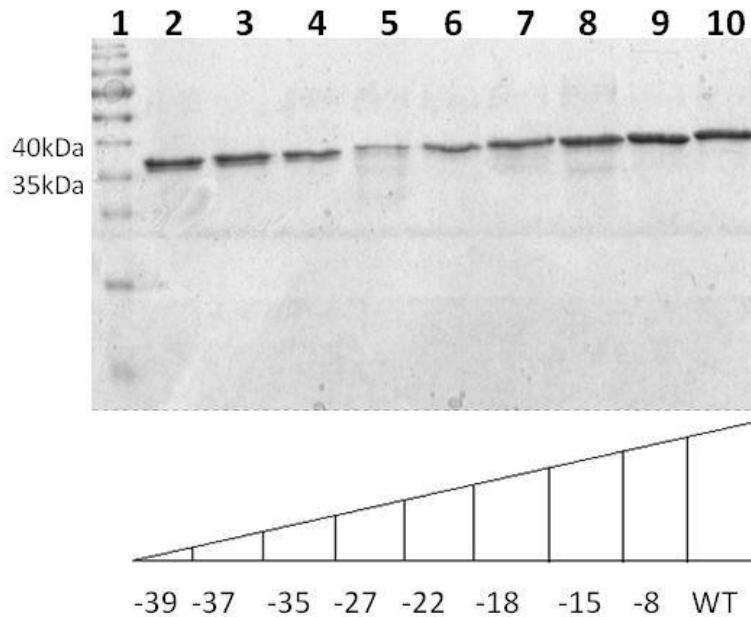


Figura 21. SDS-PAGE al 12% de las mutantes puras (Laemmli, 1970). (1) Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa (2) $\Delta 328$, (3) $\Delta 330$, (4) $\Delta 332$, (5) $\Delta 340$, (6) $\Delta 345$, (7) $\Delta 349$, (8) $\Delta 352$, (9) $\Delta 359$ y (10) WT. En cada carril se aplicaron $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de enzima. Se muestra el número de aminoácidos eliminados para cada mutante.

MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS

Las mutantes se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión (con la técnica de tinción negativa) para tratar de determinar el estado de agregación que adopta la enzima de acuerdo a la longitud del extremo C-terminal. Este análisis permitió identificar poblaciones heterogéneas de estructuras con diferentes formas y tamaños que incluyen filamentos helicoidales largos, filamentos cortos, rosetas y estructuras en forma de “C”. En la tabla 5 se presenta un resumen de los tamaños y las formas principales para cada una de las mutantes.

En la mutante más corta, $\Delta 328$ (Fig. 22A) se observa la población más homogénea, en su mayoría filamentos que parecen estar conformados por bloques estructurales similares que se asocian entre sí formando una estructura helicoidal. El resultado es un filamento helicoidal con una longitud promedio de 60

nm y un diámetro de 11.5 nm, aunque se llegan a observar filamentos de 100 a 400 nm de largo. En el caso de las mutantes $\Delta 330$ (Fig. 22 B) y $\Delta 332$ (Fig. 22 C), dos y cuatro residuos más largos, se observaron filamentos helicoidales de tamaño similar a los de la mutante $\Delta 328$. En la micrografía electrónica de la mutante $\Delta 340$ (Fig. 22D) se observa la presencia de agregados amorfos de proteína esparcidos sobre el campo analizado, pero también, se encontraron algunos filamentos de longitud variable; que a diferencia de los arreglos observados para las mutantes más cortas, son más gruesos y parecen tener una forma en “zig-zag” como de una trenza. Por las diferencias en la forma y en el grosor de los diámetros, respecto a las otras construcciones, parecería que en la mutante $\Delta 340$ el giro de la hélice se volvió más laxo.

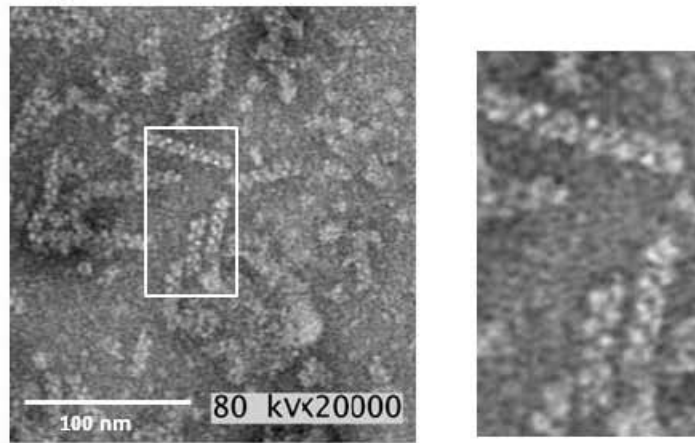
A partir de la mutante $\Delta 345$ las poblaciones se vuelven mucho más heterogéneas, sugiriendo que los bloques estructurales van perdiendo las características que les permiten asociarse de forma estable y organizada. En la imagen correspondiente a la mutante $\Delta 345$ (Fig. 22E) se identificaron agregados amorfos de proteínas y filamentos cortos sin una estructura regular y cuyas dimensiones promedio se estimaron en 35×10.3 nm, así como estructuras en cerradas que forman una especie de roseta con 15 nm de diámetro. Esta mutante podría representar el punto de transición hacia la formación de filamentos helicoidales. Para las mutantes $\Delta 349$, $\Delta 352$ y $\Delta 359$ (Fig. 22 F, G y H) aunque la resolución de las micrografías no fue suficientemente buena, se pueden ver agregados amorfos y estructuras en formas de “C” y de roseta de 9.7 y 15 nm de diámetro, respectivamente. En lo concerniente a la enzima silvestre, la principal partícula visible que se distingue en la micrografía (Fig. 22I) corresponde a estructuras en forma de “C”, similares a las reportadas por Thuku y col. (2007).

Tabla 5. Estructuras y dimensiones de las mutantes de término. Se utilizó el software de análisis de imagen FIJI, ImageJ, para la obtención de las dimensiones.

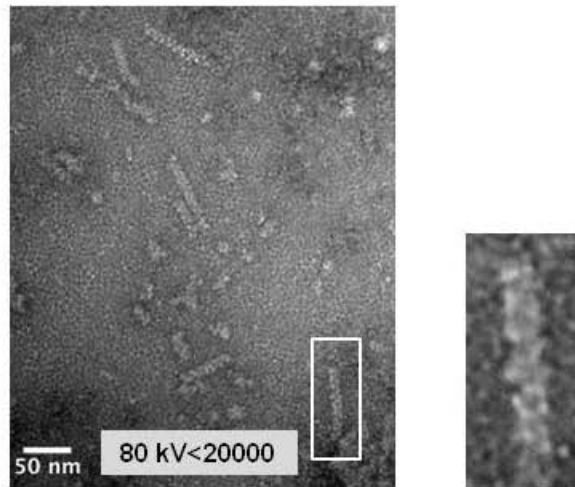
Mutante	Forma	Diámetro(nm)	Longitud (nm)	n
Δ328	Filamentos helicoidales	11.4 ± 1.07	60.2 ± 17.3	30
Δ330	Filamentos helicoidales	10.4 ± 0.69	58.1 ± 14.9	20
Δ332	Filamentos helicoidales	10.0 ± 1.04	53.4 ± 17.4	2
Δ340	Filamentos helicoidales y agregados amorfos	13.0 ± 1.02	50.2 ± 15.6	3
Δ345	Filamentos cortos y agregados amorfos Rosetas	10.3 ± 1.2 15.4 ± 2.0	35.7 ± 10.2	1 15
Δ349	Rosetas Formas en C	14.1 ± 1.6 9.7 ± 1.5		9 10
Δ352	Rosetas	15.8 ± 2.6		10
Δ359	Rosetas Formas en C	14.8 ± 1.3 9.7 ± 0.5		13 10
WT	Formas en C	9.6 ± 0.2		20

A partir de las observaciones y las mediciones obtenidas de las micrografías electrónicas (Tabla 5) podemos separar a las mutantes en dos grupos, el primero correspondería a las mutantes Δ328-Δ345, las cuales se estructuran en filamentos helicoidales regulares y un segundo grupo que incluye a las mutantes Δ349-Δ359 y la enzima silvestre las cuales se agregan formando en estructuras heterogéneas de menor tamaño.

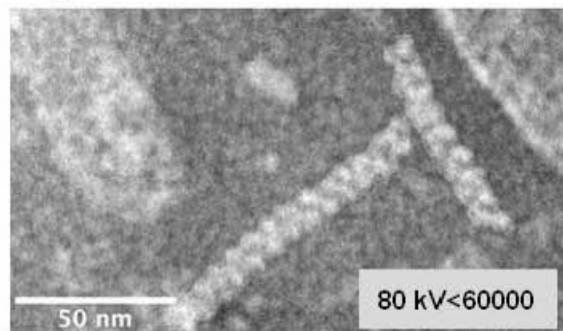
A) $\Delta 328$



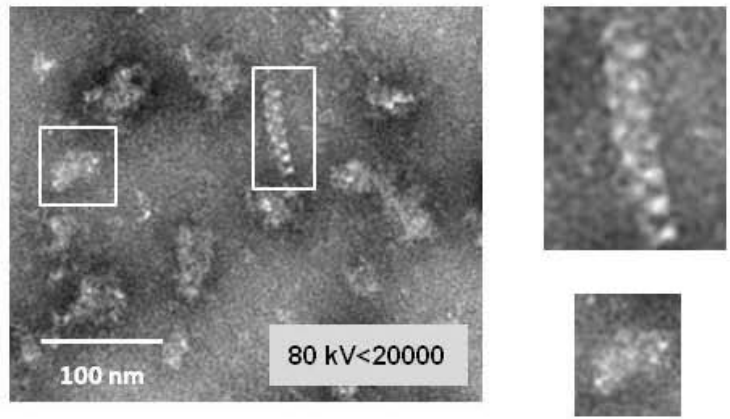
B) $\Delta 330$



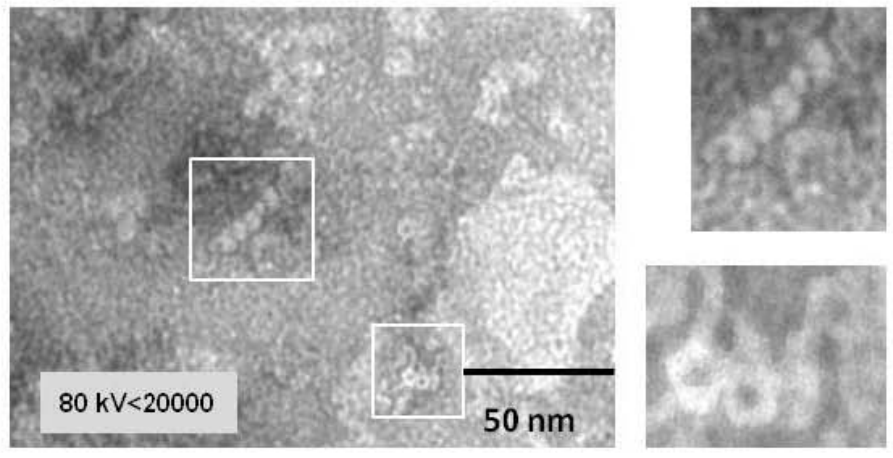
C) $\Delta 332$



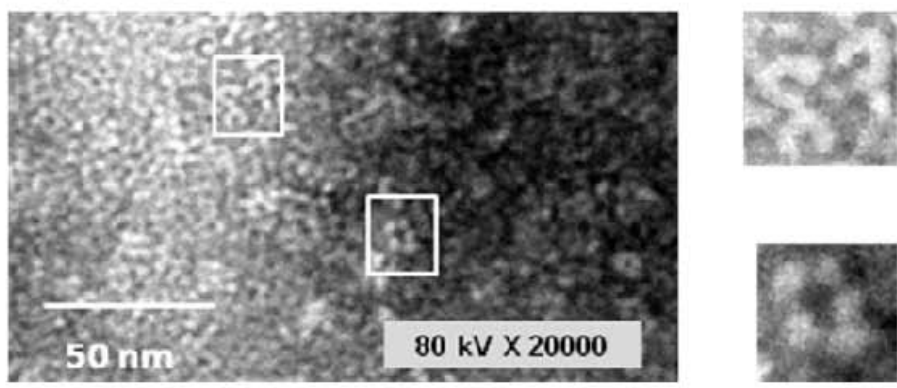
D) $\Delta 340$



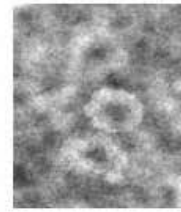
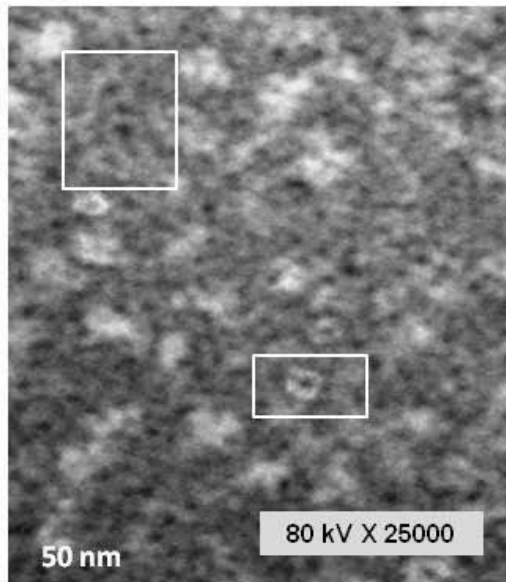
E) $\Delta 345$



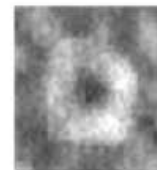
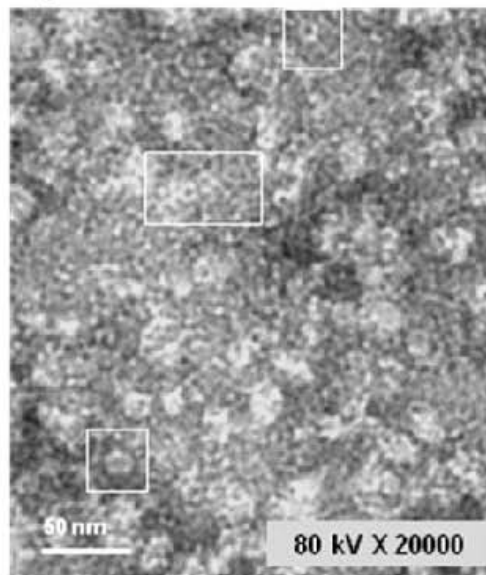
F) $\Delta 349$



G) $\Delta 352$



H) $\Delta 359$



I) WT

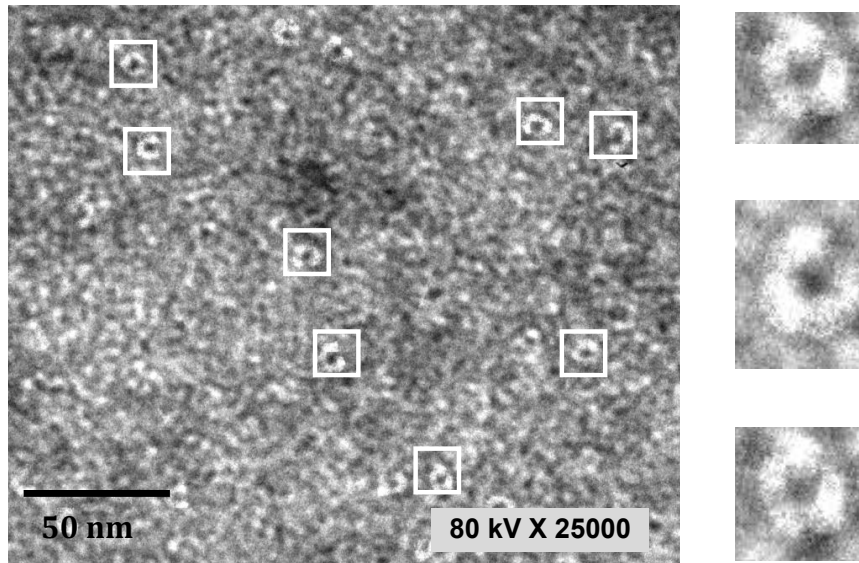


Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión, tinción negativa. Se aprecian las diferentes formas que adquiere cada construcción. Micrografía (A) Mutante $\Delta 328$, (B) Mutante $\Delta 330$, (C) Mutante $\Delta 332$, (D) Mutante $\Delta 340$, (E) Mutante $\Delta 345$, (F) Mutante $\Delta 349$, (G) Mutante $\Delta 352$, (H) Mutante $\Delta 359$ y (I) Enzima silvestre con 366 residuos de longitud. Las proteínas se dializaron en amortiguador TRIS 100 mM pH: 7.8. El agente de contraste fue PTA al 2%. El balance de brillo y contraste de las micrografías se hizo con el programa de procesamiento de imagen digital GIMP versión 2.8.

DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

Esta técnica permite estimar la distribución de los tamaños (0.3nm - 0.5 μ m) de partículas o macromoléculas en solución dentro de un amplio rango de concentraciones. La muestra es irradiada con un haz de luz; el movimiento browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada. La frecuencia de las fluctuaciones en la intensidad de luz es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Las partículas más pequeñas y que se mueven más rápidamente presentan fluctuaciones de mayor frecuencia y viceversa.

Con este ensayo se estimaron los tamaños de las mutantes de término y se correlacionaron con las estructuras observadas por microscopía electrónica. Se encontró un aumento gradual en el radio hidrodinámico (R_h) de las mutantes a

medida que disminuye la longitud del extremo C-terminal (Tabla 6). Cabe resaltar que la mutante más corta da un tamaño mucho mayor, 170 nm, con respecto a las otras mutantes formadoras de filamentos helicoidales ($\Delta 330$ - $\Delta 340$). Aún cuando una partícula no sea esférica, el radio hidrodinámico se calcula como el de una esfera rígida. Si la forma de una partícula cambia de una manera que afecta a la velocidad de difusión, el tamaño hidrodinámico también cambiará. Los resultados de la ME muestran que el largo promedio de los filamentos helicoidales es variable, pero el diámetro es similar (Tabla 6) lo que explicaría las diferencias en el R_h .

Tabla 6. Dispersión de luz dinámica. La concentración de proteína de las muestras se ajustó a 0.2 mg/mL, las mediciones se realizaron a 25 °C.

Mutante	R_h (nm)	Pd %	Masa %
$\Delta 328$	194.13 \pm 37.5	13.2	100
$\Delta 330$	57.14 \pm 16.3	12.3	85
$\Delta 332$	52.42 \pm 2.8	8.2	88
$\Delta 340$	30.44 \pm 6	16.4	98
$\Delta 345$	31.71 \pm 14.4	5.4	98
$\Delta 349$	17.01 \pm 1.6	9.7	99
$\Delta 352$	22.16 \pm 6	16.4	99
$\Delta 359$	20.27 \pm 0.7	20.4	100
WT	16.5 \pm 1.35	10.7	98

En la mayoría de las muestras analizadas las gráficas de distribución, por intensidad y masa, muestran la presencia de dos picos (datos no mostrados). En la Tabla 6 se muestran los datos analizados del pico con el mayor porcentaje de masa. La distribución de tamaños que se obtiene de las mediciones por DLS siempre da un grado de polidispersidad, aun cuando la muestra sea monodispersa. El porcentaje de polidispersidad (%Pd) del pico en todas las mutantes es $\leq 20\%$ lo que indica que las poblaciones de las partículas analizadas son bastante homogéneas (Tabla 6). Como en el caso del análisis hecho por microscopía electrónica, los análisis de la DLS muestran la misma tendencia de

formar estructuras de mayor radio hidrodinámico cuando el extremo C-terminal es más corto.

DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica de absorción que en el caso de las proteínas provee información sobre su estructura secundaria, es decir, nos permite saber si una proteína expresada y purificada está correctamente plegada o si ciertas mutaciones modifican su conformación o estabilidad. Para analizar la estructura secundaria de las proteínas, el CD mide las diferencias en la absorción de la luz circularmente polarizada a la izquierda y a la derecha por el enlace peptídico cuando los espectros se obtienen en la región del UV lejano 170-250 nm.

El propósito de este experimento fue analizar si las modificaciones en el extremo C-terminal generan cambios en la estructura secundaria de las mutantes. En la figura 23 se muestran los espectros de CD de las mutantes y la nitrilasa silvestre. Se observan dos mínimos negativos en 208 nm y 220 nm característicos de estructura α -hélice; la banda a 208 nm tiene una intensidad mayor que la banda alrededor de 220-222 nm, característico de proteínas que presentan un plegamiento $\alpha+\beta$ (Fig. 23).

El espectro de la nitrilasa silvestre es similar al reportado para las nitrilasas de *R. rhodochrous* J1 (NR Thuku., 2006), *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10 (Zhi-Qiang *et al.*, 2011) y las nitrilasas de *Fusarium solani* IM1196840 y *Fusarium solani* O1 que también forman filamentos (Vejvoda *et al.*, 2010).

Los espectros de las mutantes de término poseen la misma forma, los mínimos a 208 y 220 nm, pero la intensidad de la señal aumenta a medida que se acorta el extremo C-terminal. Los valores de elipticidad alrededor de estos mínimos son mayores en las mutantes $\Delta 328$ - $\Delta 345$ con respecto a la nitrilasa silvestre, indicando que la formación de estructuras helicoidales va acompañada de una estructuración de la enzima, que se refleja como un aumento en la estructura de α -hélice.

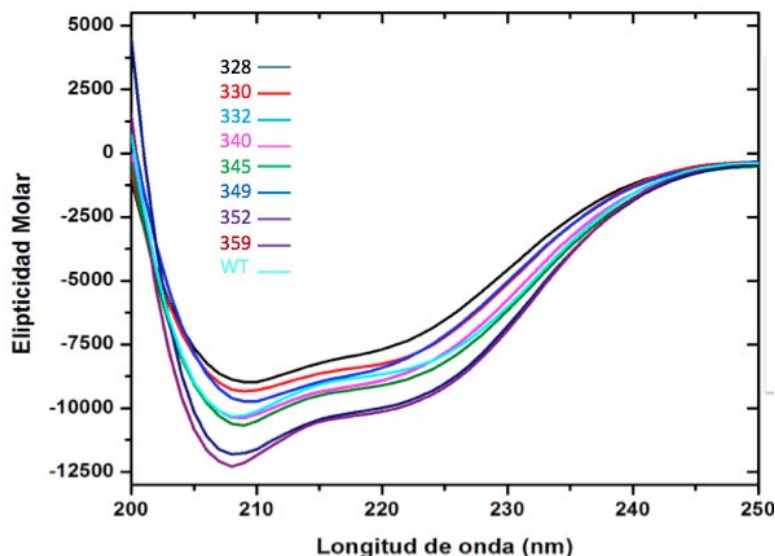


Figura 23. Espectros de CD en el UV lejano de las variantes de la nitrilasa de *R. sp V51B*. Los espectros mantienen la misma forma, aunque presentan diferente grado de intensidad. Cada espectro es el promedio de 5 barridos consecutivos.

El contenido de estructura secundaria se estimó a partir de la deconvolución de los espectros de CD con el programa CDPPro (Sreerama and Woody, 2000) (Tabla 7), que usa como referencia espectros de proteínas cuya estructura cristalográfica ha sido resuelta. La enzima silvestre y las mutantes largas $\Delta 359-345$ mostraron un contenido de estructura secundaria similar: 30% de α -hélices, 21 % de hojas β , 20 % de giros y 27 % de estructura desordenada, datos que correlacionan con lo reportado para las nitrilasa de *Synechocystis sp.* (30% de α -hélices, 21% de de hojas y 49% de giros y estructura desordenada), *Fusarium solani* IM1196840 y *F. solani* O1 (36% de α -hélices, 16 % de hojas β , 46 % de giros y estructura desordenada). Conforme acortamos en número de residuos la longitud del extremo C-terminal, se observa un aumento de estructura secundaria como se describe a continuación: la proporción de hélices α aumenta; la cantidad de hojas β , así como la de los giros son variables, y finalmente la cantidad de estructura desordenada disminuye. Estos datos confirman que las mutantes que forman filamentos helicoidales largos son las que presentan mayor grado de estructura secundaria.

Tabla 7. Elementos de estructura secundaria. Datos obtenidos a partir de la deconvolución de los espectros de CD utilizando el paquete CD Pro. Se hizo un promedio de los tres resultados (CONTINLL, CDSSTR y SELCOM3) que arroja el programa. Se incluye los valores reportados en el PDB para la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC680 (3WUY)

Mutante	Alfa	Beta	Otras*
Δ328	0.364 ± 0.016	0.162 ± 0.015	0.468
Δ330	0.336 ± 0.015	0.181 ± 0.013	0.475
Δ332	0.347 ± 0.031	0.177 ± 0.019	0.470
Δ340	0.338 ± 0.016	0.180 ± 0.012	0.475
Δ345	0.304 ± 0.011	0.203 ± 0.010	0.478
Δ349	0.264 ± 0.008	0.260 ± 0.006	0.482
Δ352	0.321 ± 0.008	0.193 ± 0.006	0.480
Δ359	0.312 ± 0.008	0.197 ± 0.006	0.483
WT	0.303 ± 0.006	0.202 ± 0.006	0.476
3wuy	0.300	0.210	0.490

*Giros y estructura desordenada

TRANSICIONES TÉRMICAS

Con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica para cada una de las mutantes y la enzima silvestre, se sometieron a desnaturalización térmica y se monitoreó la pérdida de estructura secundaria a 208 nm. Bajo todas las condiciones ensayadas, la desnaturalización térmica de las enzimas fue irreversible, impidiendo un análisis termodinámico al equilibrio de las transiciones. En la figura 24 se muestran los datos obtenidos de las transiciones térmicas, como hay variaciones en la elipticidad a 208 nm, los datos se normalizaron y las transiciones se ajustaron a una función sigmoideal de Boltzman para hacer más evidentes las diferencias en las pendientes de cada curva; a partir de estos datos se obtuvo la temperatura de fusión media (T_m) aparente para cada una de las proteínas analizadas (Fig. 25). Se encontró que las mutantes de término cortas, $\Delta 328$ - $\Delta 345$, con mayor grado de α -hélice, son las que presentan valores mayores de estabilidad a la desnaturalización por temperatura. Sin embargo, los valores de las T_m aparentes de las enzimas $\Delta 359$ y WT son mayores (71 y 65 °C, respectivamente) comparadas con las demás mutantes. Se distingue claramente que la pendiente de estas dos curvas tiene una inclinación más abierta que el resto de las mutantes. Esto se explica cuando recordamos que la estabilidad de la nitrilasa silvestre depende de la concentración de proteína, al parecer la

concentración a la que se hicieron los barridos es lo suficientemente baja (0.2 mg mL^{-1}) para que éstas se agreguen de manera inespecífica antes de haber completado la transición entre el estado nativo y el desnaturalizado.

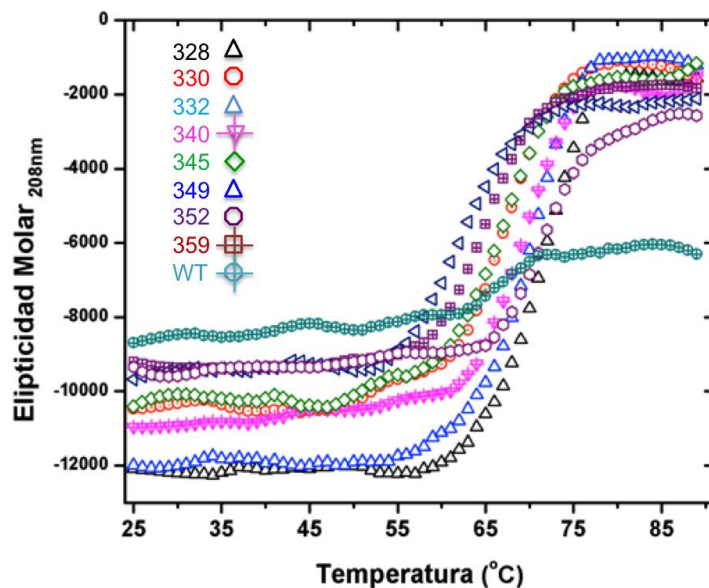


Figura 24. Transiciones térmicas de desplegamiento seguidas por CD a 280 nm. El barrido de temperatura se hizo calentando de 25-90°C a una velocidad de calentamiento constante de 1°C min^{-1} .

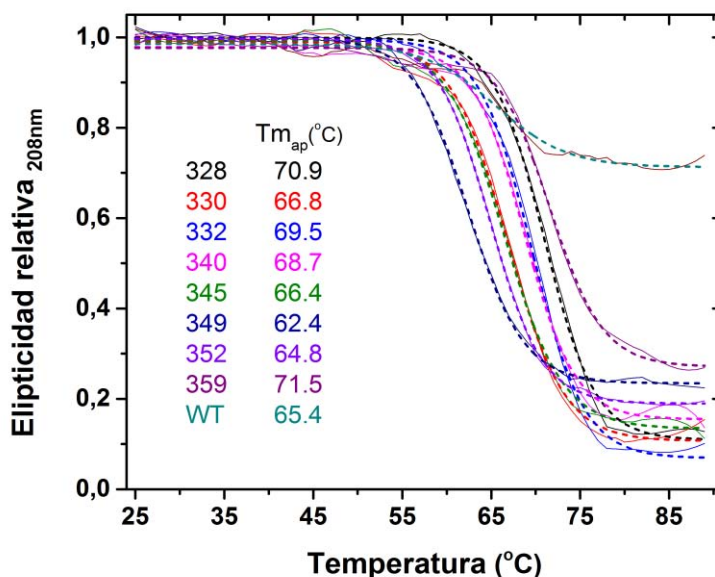


Figura 25 . Transiciones térmicas relativas siguiendo el cambio de elipticidad a 280 nm. Se indican las temperaturas de fusión (T_m) aparentes obtenidas para cada construcción. Las líneas punteadas representan el ajuste a la función sigmoide de Boltzmann.

EFFECTO DEL FENÓMENO DE AGREGACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Otro objetivo importante de este trabajo fue correlacionar los cambios estructurales de las mutantes de término con la actividad enzimática. Resultados previos con las mutantes $\Delta 328$ y $\Delta 340$ indican un fenómeno de activación enzimática asociado a la estructuración en filamentos helicoidales. Como se mencionó en los antecedentes la actividad enzimática de las mutantes $\Delta 328$ y $\Delta 340$ está aumentada casi 10 y 6 veces con respecto a la de la enzima silvestre.

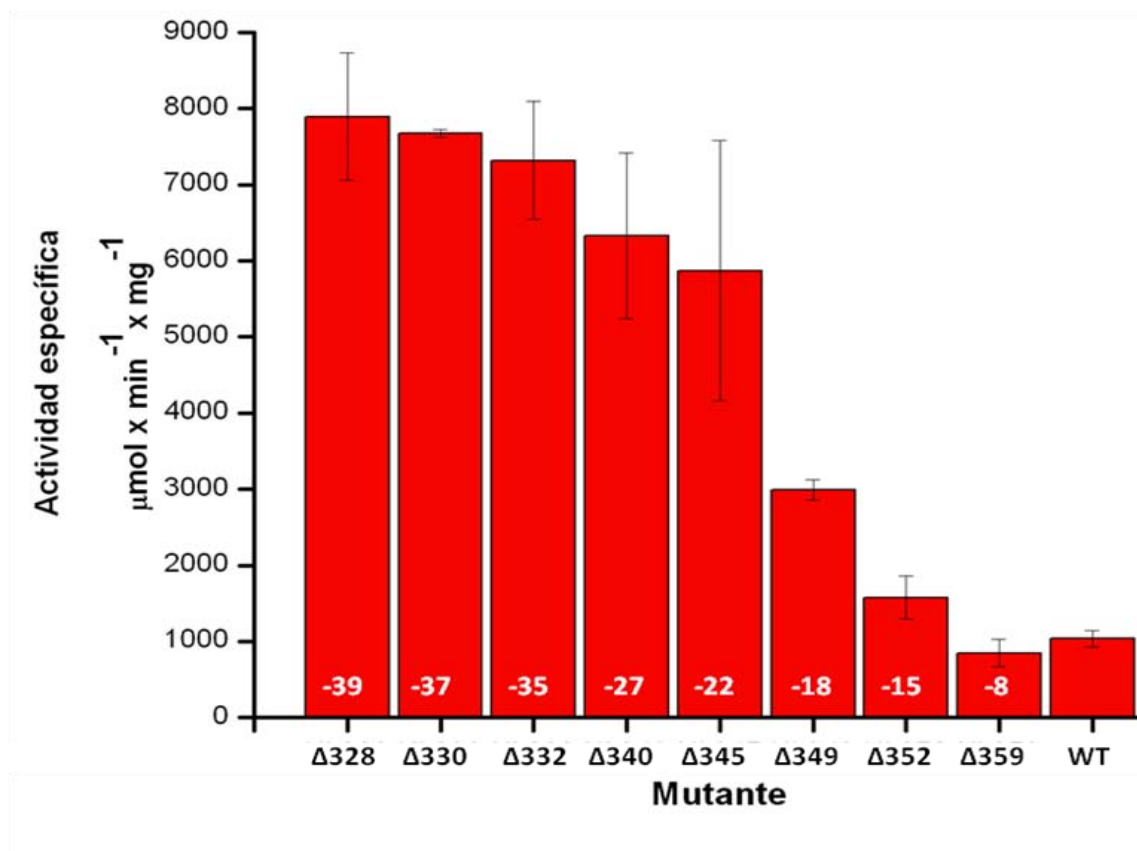


Figura 26. Comparación de las actividades específicas de las mutantes de término. Los ensayos de actividad se realizaron con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enzima, en 1 mL de solución amortiguadora de actividad y 1 mM de benzonitrilo como sustrato. La reacción se incubó a 30°C por 10 minutos. Los experimentos se hicieron por triplicado.

La actividad se determinó por ensayo colorimétrico para la detección de amonio, uno de los productos de la reacción. Los resultados obtenidos (Fig. 26) indican que las enzimas que se agregan para formar filamentos helicoidales son aquellas que presentan mayor actividad, de estas las mutantes $\Delta 328$, $\Delta 330$, y $\Delta 332$ son ≈ 8 veces más activas que la enzima silvestre. A medida que se alarga la longitud del extremo C-terminal la actividad específica va disminuyendo. Las mutantes $\Delta 340$ y $\Delta 345$ muestran una disminución gradual, respecto a $\Delta 328$. La disminución en la actividad, o pérdida de activación se hace más evidente a partir de la mutante en la que se eliminaron 17 residuos ($\Delta 349$), y las mutantes $\Delta 352$ y $\Delta 359$ mismas que corresponden a las mutantes que se asocian en forma de estructuras de menor tamaño. De este experimento concluimos que para el caso específico de la nitrilasa de *R. sp. V51B* el efecto resultante de ir eliminando los residuos del extremo C-terminal hasta en 39 residuos se manifiesta como una activación enzimática asociada a una estructuración de las enzimas en filamentos helicoidales.

DISCUSIÓN

El análisis estructural de varias nitrilasas mediante microscopía electrónica con tinción negativa (3DEM) ha demostrado que son activas como oligómeros grandes en forma de espirales (Jandhyala *et al.*, 2003; Sewell *et al.*, 2003; Thuku *et al.*, 2007; Woodward *et al.*, 2008; Williamson *et al.*, 2010). La estructura en espiral se ha relacionado con la activación y la especificidad por el sustrato de las nitrilasas. Por el ejemplo, la nitrilasa *R. rhodochrous* J1 se purificó como un dímero inactivo. Estos dímeros forman decámeros cuando se incubaron con el sustrato benzonitrilo. Una vez activada por oligomerización, la nitrilasa es capaz de reconocer sustratos diferentes incapaces de activar a la enzima (Nagasawa *et al.*, 2000).

En el laboratorio se clonó y caracterizó la nitrilasa de *Rhodococcus sp V51B*, es un oligómero de 10-12 subunidades, similar a la de *R. rhodochrous* J1. Sin embargo,

la enzima es inestable a la dilución y su actividad específica depende de la concentración de proteína. A partir de la nitrilasa silvestre recombinante se generaron las mutantes acortadas en el C-terminal, $\Delta 328$ (-39) y $\Delta 340$ (-27), ambas con la capacidad de asociarse para formar filamentos helicoidales estables con actividad catalítica aumentada. La caracterización enzimática de ambas mutantes muestra que las curvas de velocidad vs benzonitrilo para la mutante $\Delta 340$ siguen un comportamiento sigmoideal, es decir, exhiben un fenómeno de activación inducido por la concentración de sustrato. En contraste, la mutante $\Delta 328$ presenta cinéticas clásicas del tipo Michaelis–Menten, de las cuales se han intentado obtener los parámetros cinéticos, pero como la K_m para benzonitrilo está en el rango nM, no ha sido posible determinarlos con el método colorimétrico para cuantificar amonio. En las nitrilasas y cianuro dihidratasas formadoras de espirales, el segmento C-terminal se extiende en ≈ 50 residuos con respecto a la secuencia de las nitrilasas diméricas termófilas. De acuerdo a los modelos estructurales que se han generado se sugiere que la región del C-terminal está involucrada en las interacciones de las intercaras entre subunidades que participan en la formación de las formas espirales de la enzima. Los resultados de este trabajo confirman la importancia de la extensión del C-terminal en la adquisición de una estructura oligomérica estable y demuestran que al eliminar hasta 22 residuos de este segmento se induce la formación de filamentos helicoidales activos.

En un principio se diseñaron 11 variantes del gen silvestre con codones de término cada 2 residuos entre las posiciones 328 y 340, y cada 4 a 7 residuos entre las posiciones 340 y 366 del C-terminal. Por experimentos preliminares en los que se determinó la actividad específica de las mutantes en los pasos iniciales de la purificación, se encontró que la actividad de las mutantes $\Delta 330$ y $\Delta 332$ fue similar a la de la $\Delta 328$; mientras que la actividad de la mutante $\Delta 345$ era similar a la de la mutante $\Delta 340$. Estos resultados sugerían que entre las posiciones 328 y 345 las mutantes podrían tener características estructurales similares; por lo cual las mutantes $\Delta 334$, $\Delta 336$ y $\Delta 338$ ya no se subclonaron en el pET24a⁺ y se procedió a

purificar y caracterizar a las mutantes $\Delta 330$, $\Delta 332$, $\Delta 340$, $\Delta 345$, $\Delta 349$, $\Delta 352$ y $\Delta 359$ (Fig. 14).

Después de purificar las mutantes por cromatografía de exclusión molecular y en el caso de las que aún presentaban contaminantes por intercambio aniónico, se llevó a cabo la caracterización enzimática y estructural de las proteínas. Con estos resultados se analizó una probable correlación entre las estructuras observadas por ME y la activación enzimática. Se encontró que conforme se reduce la longitud del C-terminal de la nitrilasa de *R. sp* V51B, esta experimenta cambios conformacionales que se reflejan en las diferentes formas observadas por microscopía electrónica, desde oligómeros en forma de "C", arreglos que asemejan rosetas, filamentos helicoidales cortos, hasta filamentos helicoidales de gran tamaño. A partir del análisis de las micrografías se estableció que las mutantes con mayor longitud en su extremo C-terminal (349-WT) son las que presentan mayor variedad de formas pequeñas; por el contrario las mutantes donde se eliminó un mayor número de residuos (328-345) muestran estructuras con mayor homogeneidad en forma y tamaño. Resultados con la misma tendencia se obtuvieron por DLS, de ambos experimentos se dedujo que mientras menor es la longitud del C-terminal, el nivel de agregación va aumentando hasta formar filamentos helicoidales alargados correspondientes a las estructuras con mayor radio hidrodinámico (Tabla 6).

Thuku y col. (2009) han propuesto que en la enzima silvestre de *R. rhodochrous* J1, el segmento C-terminal es responsable de generar un impedimento fisicoquímico que dificulta la asociación entre dímeros adyacentes que se produce a través de la superficie de interacción C y se considera el elemento primario que evita la formación de filamentos (Sewell *et al.*, 2003). Otra opción es que la densidad de carga en esta región pueda generar un efecto de repulsión. Ambos efectos producirían variaciones en el ángulo, orientación y distancia que determinan el estado de agregación y estabilidad de las formas estructurales. Extrapolando estos datos a nuestro modelo de estudio, podemos considerar que al reducir la longitud del extremo C-terminal de manera secuencial y ascendente,

vamos disminuyendo el impedimento, así como las posibles cargas de repulsión existentes.

Los resultados obtenidos por CD demuestran que en las mutantes que forman filamentos helicoidales alargados, el contenido de estructura secundaria aumenta y son más estables a la desnaturalización térmica, respecto a las mutantes que se asocian formando estructuras más pequeñas. En los modelos estructurales de los monómeros de las nitrilasas (Fig.3 B) siempre se observa la presencia de numerosas asas y estructuras desordenadas, que se reflejan en la estimación de los elementos de estructura secundaria obtenidos por la deconvolución de los espectros (Tabla 7).

En trabajos previos se ha estudiado el efecto que tiene el truncamiento del extremo C-terminal sobre la actividad catalítica y la estabilidad de algunas nitrilasas. En el caso de la CynD de *P. stutzeri* AK61 y de *B. pumilus* C1 y la cianuro hidratasa de *N. crassa* se ha visto que al eliminar 33, 53 y 45 residuos, respectivamente, la actividad enzimática se pierde y la termoestabilidad disminuye (Crum *et al.*, 2014); sin embargo, en estos trabajos no han establecido una correlación ente el fenómeno de agregación y activación. En el caso particular de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp V51B hemos observado que la activación enzimática es un fenómeno que podría estar correlacionado con la agregación, donde las mutantes que forman filamentos helicoidales alargados son las que poseen mayor actividad respecto a las que forman filamentos cortos, rosetas o la enzima silvestre (Fig. 26). La comparación entre los resultados de DLS y actividad enzimática señalan que en la nitrilasa de *R. sp* V51B la región comprendida entre los residuos 328-366 determina el estado de agregación y la activación enzimática. Sin embargo, los datos no aportan evidencia suficiente para establecer una relación de dependencia entre ambos fenómenos. Un cambio significativo en el Rh se presenta al eliminar al menos 37 residuos, mientras que el incremento en la actividad se observa a partir de eliminar 22 residuos, sugiriendo que ambos fenómenos no son causa-efecto uno del otro. No obstante, los resultados de este trabajo demuestran que conforme se reduce la longitud del extremo C-terminal, la

enzima se reestructura favoreciendo la formación de estructuras oligoméricas más complejas y regulares, con mayor grado de estructura secundaria, más estables a la desnaturalización térmica y con mayor actividad específica. El punto donde se ve un cambio drástico en la actividad específica corresponde a la mutante $\Delta 345$ (-22aa) que de acuerdo a las micrografías electrónicas es la mutante más larga donde observamos filamentos helicoidales cortos.

Se ha propuesto que durante el proceso de reestructuración la longitud del C-terminal no solo afecta la asociación entre dímeros, sino también la conformación del sitio catalítico, sugiriendo que este elemento móvil interactúa con otra parte de la subunidad localizada cerca del sitio activo, modificando la actividad de las mutantes (Thuku *et al.*, 2009). Como se mencionó en la introducción el mecanismo catalítico de las nitrilasas no está bien definido hasta la fecha. Se ha propuesto que la triada catalítica de las nitrilasas formada por los residuos Glu, Lys, Cys incluye un Glu adicional que se encuentra estructuralmente conservado en la amidasa de *H. pylori* y la N-carbamoyl-D-aminoácido hidrolasa de *A. radiobacter*, lo que formaría una tétrada catalítica (Thuku *et al.*, 2009; Williamson *et al.*, 2010). Se sugiere que la interacción de ambos glutamatos es importante en el posicionamiento del sustrato. Uno de los dos glutamatos aumenta el carácter nucleofílico de la cisteína y participa en la transferencia de protones que culmina con la liberación de amonio. También, se ha dicho que el intermediario acilenzima que se genera después de liberarse el amonio experimenta un ataque nucleofílico de una molécula de agua generando el ácido carboxílico correspondiente y la enzima regenerada. Sin embargo, en la amidasa de *G. pallidus* se ha visto que el intermediario acilenzima podría impedir que el mismo glutamato que le proporciona carácter nucleofílico a la cisteína catalítica haga lo propio con la molécula de agua, sugiriendo entonces que la hidrólisis puede ser catalizada por el segundo glutamato cuya cadena lateral se encuentra en la posición adecuada para actuar como base catalítica (Thuku *et al.*, 2009). La localización del segundo glutamato ha sido visualizada en una de las dos inserciones que en las nitrilasas forman la superficie de interacción C y que se encuentra como una región desordenada en los dímeros externos del octámero de la Dm β As, lo que podría

explicar la relación entre la oligomerización y activación enzimática en las nitrilasas (Williamson *et al.*, 2010). De hecho, en el oligómero de la Dm β AS (Fig. 9), los monómeros terminales tienen los sitios activos incompletos, por lo que se ha propuesto que la formación de la espiral es prerequisite indispensable para que las nitrilasas conformen un sitio activo completo y funcional (Lundgren *et al.*, 2008).

Los resultados expuestos en este trabajo confirman que los residuos que determinan los diferentes estados de agregación de la nitrilasa de *R. sp.* V51B se encuentran entre las posiciones 328-366 del extremo C-terminal.

Quedan muchas preguntas por responder, una de nuestras principales inquietudes es saber si modificando ciertas condiciones como la concentración de enzima podemos inducir un fenómeno de autoproteólisis en la nitrilasa de *Rhodococcus sp* V51B como ha sucedido en las nitrilasas de *R. rhodochrous* J1 y *Syechosystis sp* PCC6803. Otra pregunta que aún no se ha podido responder es ¿los filamentos helicoidales cumplen una función biológica en las nitrilasas? Sabemos que existe un creciente grupo de enzimas cuya función va más allá de su actividad catalítica. Entre estas se encuentran algunas enzimas bacterianas que son capaces de autoensamblarse en arreglos altamente ordenados. Recientemente se ha reportado que en *Arabidopsis thaliana*, una de las 4 nitrilasas que expresa, la Nit1, es 20 residuos más corta que la nitrilasa *R. sp* V51B y está implicada en el catabolismo del glucocianato. Sin embargo, también se encontró que en situaciones de estrés como el daño mecánico sobre las hojas de la planta o la exposición a pesticidas promueven la formación de estructuras en forma de filamentos, mismos que proveen a la célula de plataformas para que se lleven a cabo las interacciones moleculares implicadas en la regulación y proliferación en balance con la apoptosis celular, así como la citocinesis (Dorskocilova *et al.*, 2013). En otras enzimas se ha podido demostrar la función biológica de la formación de estructuras filamentosas. La glutamina sintetasa, enzima que cataliza la conversión de glutamato en glutamina, se oligomeriza para formar estructuras en

forma de filamentos, principalmente cuando la célula entra en la fase S del ciclo celular o cuando está expuesta a bajos niveles de pH como resultado de una situación de estrés inducida por la falta de su fuente primaria de energía, la glucosa. Se ha propuesto que los filamentos catalíticamente inactivos funcionan como depósitos temporales de proteínas. Probablemente, la formación de estos arreglos representa una adaptación que permite a la levadura recuperarse más rápido de periodos de inanición o entrar en la siguiente etapa del ciclo celular ahorrando recursos energéticos (Petrovska *et al.*, 2014). Otro caso de enzimas con capacidad de formar estructuras filamentosas es el de la piruvato descarboxilasa de *N crassa*, esta enzima se oligomeriza en arreglos filamentosos que poseen actividad catalítica, por cambios en el pH del medio (Huttl *et al.*, 2012). En el caso de las nitrilasas bacterianas que forman filamentos inducidos por disminución del pH (*B. pumillus* C1) o truncamiento en el extremo C-terminal (*R. rhodochrous* J1 y *R. sp.* V51B), aún se desconoce cuál es la función biológica de tales estructuras, sin embargo, como se ha expuesto en los casos anteriores, estos arreglos podrían estar desempeñando un papel determinante en el metabolismo de la célula, ya sea sirviendo como almacén temporal de enzimas metabólicas o como plataformas que faciliten la interacción de otras biomoléculas. Actualmente, se está trabajando en obtener la estructura cristalográfica de la nitrilasa de *R. sp.* V51B, sin embargo la gran heterogeneidad de formas observadas ya sea con el C-terminal intacto o truncado, hacen difícil resolver la estructura de la enzima, que hasta ahora no ha sido reportada. En la búsqueda de la mínima unidad cristalizable y activa, se han identificado, además del C-terminal, dos regiones desordenadas, entre los residuos 59-75 y 246-259, que podrían estar implicadas en la interacción entre las superficies C, que participan en la formación de los filamentos helicoidales (Aguirre, 2015).

CONCLUSIONES

- La longitud del extremo C-terminal determina los diferentes estados oligoméricos de la nitrilasa de *R. sp V51B*.
- Al acortar hasta en 22 residuos la longitud del extremo C-terminal se favorecen las interacciones entre superficies que llevan a la formación de filamentos helicoidales regulares.
- La activación enzimática es un fenómeno correlacionado con la oligomerización a través del truncamiento del C-terminal entre los residuos 328-345.
- La longitud mínima que detona el equilibrio oligomérico en la formación de filamentos se encuentra entre las posiciones 345 y 349.
- El incremento de estructura secundaria entre las mutantes se refleja como mayor estabilidad térmica y actividad catalítica aumentada.

PERSPECTIVAS

Determinar el efecto en la agregación de la enzima truncada hasta en 50 residuos, ya que de acuerdo al alineamiento de secuencias entre la nitrilasa de *R. sp V51B* y algunos homólogos cristalizados, esta región del extremo C-terminal mantienen una estructura desordenada. Determinar si este truncamiento modifica las propiedades catalíticas de la enzima, como ha sido reportado para las CynD de *P. stutzeri* Ak61, *B. pumilus* C1 y la cianuro hidratasa de *N. crassa*.

Las formas truncadas de esta enzima podrían estabilizarse mediante mutaciones puntuales de algunos residuos terminales, en las que se favorezca la formación de puentes salinos.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade. J., Karmali, A., Carrondo, M.A., and Frazao, C. (2007) Structure of amidase from *Pseudomonas aeruginosa* showing a trapper acyl transfer reaction intermediate state. J. Biol. Chem. 282, 19598-19605.

Crum, M.A., Park, J.M, Sewell B.T., and Benedik M.J. (2015). Probing C-terminal interactions of the *Pseudomonas stutzeri* cyanide-degrading CynD proteín. J. Appl Microbiol. 99, 3093-3102.

Dent, K.C., Weber B.W., Benedik M.J., and Sewell B.T. (2009). The cyanide hydratase from *Neurospora crassa* forms a helix which has a dimeric repeat. J. Appl Microbiol. 82, 271-278.

Doskocilova, A., Kohoutova, L., Volc, J., Kourova, H., Benada, O., Chumova, J., Plihal, O., Petrovska, B., Halada, P., Borge, L., and Binarova, P. (2013). NITRILASE1 regulates the exit from proliferation, genome stability and plant development. New Phytol. 198, 685-698.

Fernades, B.CM., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., van Rantwijk, F., Stolz, A., and Sheldon, R.A. (2006). Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. Adv. Synth. Catal. 348, 2597-2603

Gong. J.S., Lu, Z.M., Li, H., Shi, J.S., Zhou Z.M., and Xu, Z.H. (2012). Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progreses and forthcoming research. Microb. Cell Fact. 11, 142.

Granados Hernández Marco Vladimir. (2009) Clonación de la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumillus* GMA1. Tesis de licenciatura. UNAM.

Huttl, S., fiebig, J., Kutter, S., Hause, G., Lilie, H., Spinka, M., and Konig, S. (2012). Catalitycally active filaments – pyruvate decarboxylase from *Neurospora crassa*. pH-controlled oligomer structure and catalytic function. FEBS J. 279, 275-284.

Jandahyala, D., Berman, M., Meyers, P.R., Sewell, B.T., Willson, R.C., and Benedik, M.J. (2003). CynD, the cyanide dihidratasa from *Bacillus pumillus*: gene cloning and structural studies. Appl. Environ. Microbiol. 96, 4794-4805.

Kamphuis, J., Boesten, W.H., Broxterman, Q.B., Hermes, H.F., van Balken, J.A., Meijer, E.M., and Schoemaker, H.E. (1990). New development int the chemo-enzymatic production of amino acids Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 42, 133-186.

Kimani, S.W., Agarkar, V.B., Cowan, D.A., Sayed, M.F., and Sewell, B.T. (2007). Structure of an aliphatic amidase from *Geobacillus Pallidus* RAPc8. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63, 1048-1058.

Laemmli. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T7. *Nature.* 275, 680-685.

Leyva Hernández Eduardo. (2009) Clonación y expresión del gen NitA de *Rhodococcus pyridinovorans*. Tesis de Maestría. Posgrado en ciencias bioquímicas UNAM.

Lundgren, S., Lohkamp, B., Andersen, B., Piskur, J., and Dobritzsch, D. (2008). The crystal structure of beta-alanine synthase from *Drosophila melanogaster* reveals a homooctamer helical turn-like assembly. *J. Mol. Biol.* 377, 1544-1559.

Murray, R.K., et al. 2010. Harper. Bioquímica ilustrada. Veintiochoava edición. McGraw-Hill. México. Páginas 51-55.

Nagsawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., and Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Conversion into the active form by subunit association. *Eur. J. Biochem.* 267, 138-144.

Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Ueki, T., Nanba, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., Sato, M., Tsukihara, T. (2000) Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 8, 729-737.

Pace, H.C., Hodawadekar, S.C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C.M., Brenner, C. (2000) Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr. Biol.* 15, 907-917.

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

Park, J.M., Mulelu, A., Sewell, B.T., and Benedik, M.J. (2016). Probing an Interfacial Surface in the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumillus*, A spiral Forming Nitrilase. *Front. Microbiol.* 6:1479.

Petrovska, I., Nuske, E., Munder, M.C., Kulasegaran, G., Malinovska, L., Kroschwald, S., Richter, D., Fahmy, K., Gibson, K., Verbavatz, J.M., and Alberti, S. (2014). Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation. *Elife*.3, 1-19.

Piotrowski, M., Schonfelder, S., and Weiler, E.R. (2001) The *Arabidopsis thaliana* isogene Nit4 and its orthologs in Tobacco encode β -ciano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J. Biol. Chem.* 276, 2616-2621.

Quintana Rojas Julio Cesar. 2015. Caracterización cinética y estructural de una mutante carboxilo-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans*. Tesis de licenciatura. UNAM.

Raczynska, J.E., Vorglas, C.E., Antranikian, G., and Rypniewski, W. (2011) Crystallographic analysis of a termoactive nitrilase. *J. Struct. Biol.* 173, 294-302.

Sewell, B.T., Berman, M.N., Meyers, P.R., Jandhyala, D., and Benedik, M.J. (2003). The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a two-fold symmetric, 14-subunit spiral. *Structure* 11, 1413-1422.

Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., and Rawat, D.S. (2006). Nitrilase and its applications as a 'green' catalyst. *Chem. Biodivers.* 3, 1279-1287.

Stalker, D.M., Malyj, L.D., and McBride, K.E. (1988). Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the bxn gene. *J. Biol. Chem.* 263, 6310-6314.

Sumner J. (1926) The isolation and characterization of the enzyme urease: Preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 69, 435-441.

Thimann, K.V., and Mahadevan, S. (1964). Nitrilase. I. Occurrence preparation and general properties of enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 133-141.

Thuku, R.N. (2006) The structure of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1: Homology modeling and three-dimensional reconstruction. A thesis in partial fulfillment of the requirements for the degree of Magister Scientiae (Structural Biology) in the Department of Biotechnology, University of the Western Cape.

Thuku, R.N., Brady, D., Benedik, M.J., and Sewell, B.T. (2009). Microbial nitrilase: versatile, spiral forming industrial enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 106, 703-727.

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

Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouska, K., Pompach, P., Sulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnakova, B., Sulc, M., Rinagoleva, A., Lutz-Wahi, S., Fischer, L., Kfren, V and Martinkova, L. (2008). Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium Solani* O1. J. Mol. Catal. B. Enzym, 50, 99-106.

Williamson, D.S., Dent, K.C., Weber, B.W., Varsani, A., Frederick, J., Thuku, N.R., Cameron, R.A., van Heerden, J.H., Cowan, D.A., and Sewell, B.T. (2010). Structural and biochemical characterization of a nitrilase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus pallidus* RAPc8. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88, 143-153.

Woodward, J.D., Weber, B.W., Scheffer, M.P., Benedik, M.J., Hoenger, A and Sewell, B.T. (2008) Helical structure of unidirectional shadowed metal replicas of cyanide hydratase from *Gloeocercospora sorghi*. J Struct. Biol. 161, 111-119.

Yeom. S.J., Kim, H.J., Lee, J.K., Kim, D.E., and Oh, D.K. (2008). An amino acid at position 142 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 ATCC33278 determines the substrate specificity for aliphatic and aromatic nitriles. Biochem. J. 415, 401-407.

Zhang, L.J., Yin, B., Wang, C., Jiang, S.Q., Wang, H.L., Yuan, Y.A., and Wei, D. (2014). Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Synechocystis* sp PCC6803. J. Struct. Biol. 188, 93-101.

Zhi-Qiang, L., Li-Zhu, D., Feng Cheng, Ya-Ping. X., Yuan –Shan, W., Jie-Nv, D., Yu-Guo, Z., Yin-Chu, S. (2011) Gene Cloning, Expression , and Characterization of a Nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10. J. Agric. Food Chem, 59(21) 11560-11570.