



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de mutantes en las superficies de interacción de las nitrilasas de bacteria y planta.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Hugo Alberto Larrañaga Ramírez

Georgina Garza Ramos Martínez  
Facultad de Medicina

Carmina Montiel Pacheco  
Facultad de Química

Laura Domínguez Dueñas  
Facultad de Química

Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Facultad de Medicina

Claudia Rodríguez Almazán  
Instituto de Biotecnología

Alejandro Sosa Peinado  
Facultad de Medicina

Ciudad de México. 02, 2023



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 institucionales**

Agradezco al CONACyT por la beca de posgrado brindada.

Este proyecto contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT IN218318 y con el apoyo de Conacyt a través del proyecto A1-S-7853.

## **Agradecimientos académicos**

Quiero agradecer a la doctora Georgina Garza Ramos Martínez por ser mi asesora durante la tesis de licenciatura y maestría. Le agradezco enormemente haberme permitido ser parte de este laboratorio y asesórame en el desarrollo de estos proyectos.

Agradezco a los miembros del jurado por la dedicación y paciencia para leer y revisar la presente tesis. Sus comentarios y correcciones han sido útiles para la elaboración de la versión final de esta tesis.

Agradezco a los miembros del comité tutorial por asesorarme en el desarrollo del proyecto de investigación. Las sugerencias y ayuda brindadas por ellos fueron claves para la obtención de varios de los resultados obtenidos.

Agradezco el apoyo técnico brindado por la M. en C. Eugenia Flores Robles, la M. en C. Laura Iliana Álvarez Añorve y la Dra. María Isabel Velázquez López.

## Agradecimientos personales

Antes que nada, quiero agradecer a mi familia que han estado en todos mis proyectos y me han apoyado enormemente a cumplir mis sueños. En especial quiero agradecer profundamente a las dos personas que más me han apoyado a lo largo de mi vida, mis padres. Agradezco enormemente todo el amor, cariño y apoyo que me han brindado. Estoy orgulloso de ser su hijo. Agradezco a mi hermano por toda la ayuda que me has dado en estos años y por ser un gran compañero y amigo. Agradezco a mi sobrino por estar conmigo e interesarse en mis cosas. Los valoro enormemente y estoy agradecido de tenerlos en otro paso de mi vida.

Dra. Georgina. Le debo enormemente la formación y todo el apoyo que he recibido a lo largo de estos años. Gracias a usted pude introducirme en el mundo de las proteínas y hacer una tesis durante la pandemia. Gracias a esta experiencia me he formado como biólogo y bioquímico.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, LFQIP, por todos los momentos y ayuda que me han dado. Este trabajo fue posible gracias a su ayuda, sin la cual no se hubieran realizado los experimentos durante la pandemia. En especial quiero agradecer a mis compañeros Hector y Erendira. Gracias a Hector fue posible refinar las estructuras y realizar las dinámicas de las distintas mutantes. Gracias a Erendira por la ayuda y enseñanzas a lo largo de este proyecto. Tus enseñanzas y consejos fueron claves para realizar varios de los experimentos de este trabajo.

Gracias a Alberto, Angeles, Axel, Elizabet, Ibrahim, Isaí, Luis, Saulo, Silvana y Viridiana por estar conmigo desde la preparatoria. Después de tantos años ya son más que amigos y son una segunda familia para mí. Aunque cada uno ya tiene una vida completamente diferente, nos seguimos viendo. Espero seguir viéndolos seguir su camino y alcanzar sus sueños. En especial Saulo te debo haber podido inscribirme a la maestría desde el extranjero.

Anaís, Angélica, Yesenia y Zabdiel desde que los conocí en la carrera han sido grandes amigos. Todavía extraño todas las aventuras que tuvimos durante la carrera. Sigo sin saber cómo terminamos en la mitad de las situaciones.

Luis y Ana los conocí de la manera más extraña, pero son unas personas increíbles. Amo las noches de juegos con ustedes. He conocido tantos juegos gracias a ustedes.

Arcelia, Emilio, Karina, Rafael y Yina son unos grandes compañeros. Me encanto estudiar ruso con ustedes. Me ayudaron mucho a recuperarme de la pandemia y poder tener mi mente fuera en otro lugar por un momento.

AstroCamp. Jamás me imaginé encontrarme un grupo como ustedes. Ha sido un placer trabajar con ustedes. Gracias a ustedes volví a acampar. Me enseñaron todo lo que puedo enseñar en un curso. Les agradezco toda la confianza y flexibilidad.

Cesar, Danny, Emma, Ian, Irving y Saulo. A la mayoría los conocí hace poco, pero han sido un super grupo. Me encanta estar con ustedes y han sido un gran apoyo en varios momentos.

Jag vill tacka Hola Folkhögskola för efarenhet. Jag vill också tacka vänner som jag träffades där. Алиса, det är alltid spännande att tala med dig. Du har hjälpt mig att lära mig ryska och svenska och har stöttat mycket mig utifrån.

# Índice

Agradecimientos institucionales .....	i
Agradecimientos académicos .....	i
Agradecimientos personales .....	ii
Índice .....	1
Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	6
Glosario .....	7
Resumen .....	9
Introducción .....	11
Marco teorico .....	13
Nitrilos .....	13
La superfamilia de las nitrilasas .....	14
Clasificación de las nitrilasas .....	16
Función biológica de las nitrilasas .....	17
Mecanismo de reacción .....	19
Estructuras resueltas de las nitrilasas .....	21
Cavidad del sitio activo de las nitrilasas resueltas .....	23
C-terminal de las nitrilasas resueltas .....	25
Oligómeros .....	27
Superficies de interacción .....	30
Función del C-terminal en las nitrilasas .....	33
Métodos <i>in silico</i> en las nitrilasas .....	35
Antecedentes .....	38
Justificación .....	40
Hipótesis .....	41
Objetivo principal .....	41
Objetivos particulares .....	41
Metodología .....	42
Evaluación de las estructuras .....	42
Refinamiento de la estructura de AtNit4 .....	43
Red de interacciones de residuos .....	43
Acoplamiento molecular con AutoDock Vina flexible .....	44
Acoplamiento molecular AutoDock4 hidratado .....	44
Selección de conformaciones .....	44
Estimación de la afinidad la superficie A y la superficie C por acoplamiento Proteína-Proteína .....	45

Dinámicas moleculares de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 con β-ciano alanina.....	45
Cálculo la energía de unión proteína-ligando con MM/PBSA y MM/GBSA.....	46
Transformación bacteriana de células quimiocompetentes .....	47
Purificación de DNA por lisis alcalina .....	47
Subclonación .....	48
Sobreexpresión de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ64, NitCRspΔ66, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 .....	49
Lisis por sonicación de las células BL21-pGro7 .....	49
Purificación de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74.....	49
Purificación de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66.....	50
Sobreexpresión de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. ....	50
Lisis por sonicación de las células Rosetta™(DE3)pLysS.....	50
Purificación de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. ....	51
Caracterización cinética .....	51
Dicroísmo Circular.....	52
Estimación de la estructura secundaria .....	52
Desplegamiento térmico .....	52
Medición del radio hidrodinámico por dispersión dinámica de luz .....	53
Microscopia electrónica con tinción negativa .....	53
Resultados.....	54
Evaluación de las estructuras de las nitrilasas RsV51BNit y AtNit4.....	54
Refinamiento y evaluación de las estructuras resultantes de RsV51BNit y AtNit4.....	58
Diseño y evaluación de las mutantes de RsV51BNit y AtNit4 por redes de interacción .....	62
Comparacion de las mutantes truncas de AtNit4 y RsV51BNit .....	68
Acoplamiento proteína-proteína.....	69
Mutantes <i>in vitro</i> .....	71
Subclonación de las mutantes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74.....	71
Sobreexpresión de las mutantes truncas de RsV51BNit.....	72
Sobreexpresión de las mutantes truncas de AtNit4 .....	74
Purificación de las mutantes de RsV51BNit NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74.....	75
Purificación de las mutantes de RsV51BNit NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66.....	76
Purificación de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34 .....	77
Caracterización cinética de las mutantes de RsV51BNit y de AtNit4.....	77
Dicroísmo circular de las mutantes de RsV51BNit y de AtNit4 .....	79
Desplegamiento térmico de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34 .....	80
Estimación del radio hidrodinámico de las mutantes de AtNit4 por dispersión dinámica de luz .....	82
Microscopia electrónica de transmisión de las mutantes de AtNit4 .....	84

Acoplamiento Proteína ligando con RsV51BNit .....	86
Acoplamiento molecular proteína-ligando de AtNit4 con ligando hidratado .....	88
Dinámica molecular con AtNit4 y sus mutantes.....	91
Medición de la distancia de $D_{C-S}$ durante la dinámica molecular .....	94
Residuos en la cercanía de $\beta$ -ciano alanina durante la dinámica .....	97
Interacciones de la $\beta$ -ciano alanina con AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29. ....	99
Interacciones de los residuos de los residuos del sitio activo en las dinámicas moleculares de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29.....	101
Cálculo de energía de unión proteína-ligando en las dinámicas de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 .....	105
Discusión .....	106
Refinamiento y evaluación de las estructuras.....	106
Actividad de las mutantes .....	108
Oligómeros.....	110
Agregación y plegamiento de las mutantes.....	111
Conclusiones .....	113
Perspectivas .....	114
Referencias .....	115



## Índice de figuras

Figura 1. Principales vías en la síntesis y en la degradación de los nitrilos en la naturaleza. ....	13
Figura 2. Aminoácidos del sitio catalítico de las nitrilasas. ....	16
Figura 3. Estructuras de la nitrilasas obtenidas hasta el momento. ....	22
Figura 4. Alineamiento de las nitrilasas cuyas estructuras están resueltas. ....	24
Figura 5. Monómeros de las nitrilasas resueltas. ....	25
Figura 6. Estructura y representación de la estructura de AtNit4. ....	26
Figura 7. Espirales cortas de la nitrilasa de <i>R. rhodochrous J1</i> . ....	28
Figura 8. Filamentos de la nitrilasa de <i>R. rhodochrous J1</i> . ....	29
Figura 9. Superficies de interacción en la familia de las superfamilias de las nitrilas. ....	31
Figura 10. Reconstrucciones tridimensionales de los filamentos de algunas nitrilasas y CynD. ....	32
Figura 11. Valores de QMEAN por residuo a lo largo de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4. ...	57
Figura 12. Construcción de la región faltante en la estructura de Atnit4. ....	59
Figura 13. Valores de QMEAN por residuo a lo largo de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4. ...	61
Figura 14. Red de interacciones de la prolina doscientos noventa y cuatro y la asparagina doscientos noventa y tres. ....	63
Figura 15. C-terminal de RsV51BNit. ....	64
Figura 16. Red de interacciones de la valina trescientos tres y la prolina trescientos uno de RsV51BNit. ....	65
Figura 17. Red de interacciones de la glicina trescientos veintidós de AtNit4. ....	66
Figura 18. C-terminal de la AtNit4. ....	67
Figura 19. Representación del C-terminal de las nitrilasas de AtNit4, R. y RsV51BNit. ....	68
Figura 20. Digestion doble de pGEM-T/NitCRspΔ73, pGEM_T/NitCRspΔ74 y pET24b(+)/NitWT. ...	71
Figura 21. Digestion doble de pET24b(+)/NitCRspΔ73 y pET24b(+)/NitCRspΔ74. ....	72
Figura 22. Inducción y solubilización de las mutantes truncas de RsV51BNit en la cepa BL21-pGro7. ....	73
Figura 24. Purificación de las nitrilasas NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74. ....	75
Figura 25. Purificación de la nitrilasa NitCRspΔ64. ....	76
Figura 26. Purificación de las nitrilasas NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. ....	77
Figura 27. Efecto de la concentración de β-ciano alanina en la velocidad inicial de AtNit4 WT. ...	78
Figura 28. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de RsV51BNit, AtNit4 y sus mutantes. 79	
Figura 29. Transiciones térmicas de desplegamiento de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. ....	81
Figura 30. Radio hidrodinámico representativo de las distintas poblaciones. ....	82
Figura 31. Microscopia electrónica de transmisión con tinción negativa. ....	84
Figura 32. Resultados del acoplamiento molecular en RsV51BNit. ....	86
Figura 33. Gráficas de las tres variables medidas. ....	88
Figura 34. Resultados del acoplamiento molecular en la nitrilasa AtNit4. ....	89

Figura 35. Diagrama bidimensional de las interacciones de $\beta$ -ciano alanina con AtNit4.....	90
Figura 36. Root-mean-square fluctuation (RMSF) después de los 10 ns de simulación. ....	92
Figura 37. Root-mean-square deviation (RMSD) de AtNit4 y sus mutantes. ....	93
Figura 38. Distancia del sustrato a la cisteína catalítica a lo largo de la simulación.....	94
Figura 39. Fotogramas de la dinámica molecular de AtNit4 y sus mutantes con $\beta$ -ciano alanina. .	95
Figura 40. Frecuencia relativa de los los residuos a 3 Å del sustrato. ....	98
Figura 41. Posiciones e interacciones de $\beta$ -ciano alanina en AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 a los 19.7 ns de dinámica. ....	100
Figura 42. Interacciones de los residuos de la tétrada catalítica y la frecuencia de estas.....	102
Figura 43. Interacciones del aspartato trescientos diecisiete. ....	104
Figura 44. Comparación de la estructura publicada y la estructura refinada de AtNit4. ....	107
Figura 45. Representación del C-terminal de las nitrilasas de AtNit4, R. rhodochrous J1 y RsV51BNit. ....	111
Figura 46. Potencial electrostático en la superficie de AtNit4 y RsV51BNit calculado por PyMol. ....	112

## Índice de tablas

Tabla I. Clasificación de la superfamilia de las nitrilasas en trece familias distintas. ....	15
Tabla II. Concentración de reactivos para la digestión .....	48
Tabla III. Concentración de los reactivos para la ligación. ....	48
Tabla IV. Evaluación de las estructuras de RsV51BNit y de AtNit4.....	55
Tabla VI. Afinidad de las superficies A y C de RsV51BNit y de AtNit4 .....	70
Tabla VII. Actividad específica de AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29 con 3 mM β-ciano alanina. ....	78
Tabla VIII. Parámetros cinéticos de AtNit4 y NitAtCΔ16 con β-ciano alanina. ....	78
Tabla IX. Porcentaje de estructura secundaria de las mutantes. ....	80
Tabla X. Radio hidrodinámico medido por DLS de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. ....	83
Tabla XI. Diámetro de los oligómeros formados por AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. .	85
Tabla XII. Resultado del acoplamiento molecular de RsV51BNit. ....	87
Tabla XIII. Resultado del acoplamiento molecular de AtNit4 hidratado y con solvente implícito. .	89
Tabla XIV. Energías de unión de AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29 a β-ciano alanina.....	105

## Glosario

**AtNit4:** Nitrilasa 4 de *Arabidopsis thaliana*

**C $\alpha$ :** Carbono Alfa

**CB:** Carbono Beta

**CaBLAM:** C-Alpha Based Low-resolution Annotation Method

**CD:** Dicroísmo Circular

**Cryo-EM:** Criomicroscopía electrónica

**C-terminal:** extremo carboxilo terminal

**CynD:** Cianuro dihidratasa

**D<sub>n-o</sub>:** La distancia entre el nitrógeno del grupo ciano y el oxígeno del grupo ácido del glutamato con la menor distancia

**D<sub>c-s</sub>:** La distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano

**D<sub>sus-cys</sub>:** La distancia entre el centro de masa de la cisteína catalítica y centro de masa del sustrato

**DLS:** Dispersión dinámica de luz

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**D.O.:** Densidad óptica

**MM/PBSA:** Dinámica molecular y cálculos de área superficial con el método Poisson Boltzmann

**MM/GBSA:** Dinámica molecular y cálculos de área superficial con el método Born Generalizado

**HCN:** Cianuro de hidrógeno

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Luria Bertani

**min:** Minuto

**Nit6803:** Nitrilasa *Syechocystis sp.* PCC6803

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

**N-terminal:** Extremo amino terminal de una proteína

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDB:** Protein Data Bank

**PTA:** Ácido fosfotúngstico

**RIN:** Red de interacciones de residuos

**REU:** Rosetta Energy Units

**RMSD:** Desviación del valor cuadrático medio

**RMSF:** Fluctuación del valor cuadrático medio

**RsV51BNit:** Nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B

**R<sub>h</sub>:** Radio hidrodinámico

**S-300:** Superdex 300

**s:** Segundo

**TEM:** Microcopia electrónica de transmisión

**T<sub>m</sub>:** Temperatura media de fusión

## Resumen

Las nitrilasas son un grupo de enzimas que catalizan la conversión de los nitrilos a sus ácidos carboxílicos correspondientes y liberan amonio en el proceso. Las nitrilasas forman parte de la rama 1 de la superfamilia de las nitrilasas junto con otras doce ramas. A pesar de la baja similitud entre las distintas ramas de la superfamilia de las nitrilasas, los miembros de esta superfamilia comparten un plegamiento característico  $\alpha\beta\beta\alpha$  y una tétrada catalítica formada por una cisteína, dos glutamatos y una lisina (Thuku *et al.*, 2009). Anteriormente, se ha reportado que algunas nitrilasas pueden oligomerizarse y formar filamentos helicoidales de tamaño variable (Thuku *et al.*, 2009). Recientemente, se resolvió la estructura de dos nitrilasas, la nitrilasa cuatro de *Arabidopsis thaliana* (AtNit4) y la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B (RsV51BNit), por criomicroscopía electrónica (Cryo-EM). A diferencia de las dos estructuras obtenidas anteriormente por cristalografía de rayos X, estas nuevas estructuras permiten visualizar a nivel atómico las superficies de interacciones que permiten la formación de filamentos helicoidales. En especial, se puede observar las interacciones con las que el C-terminal contribuye a estas superficies de interacción. Esto abre la posibilidad de estudiar las interacciones que estabilizan a los filamentos helicoidales y diseñar mutantes racionalmente.

En este trabajo se buscó la unidad mínima de los oligómeros de las nitrilasas AtNit4 y RsV51BNit con el objetivo de entender las interacciones que permiten la formación de los oligómeros. Debido a que en las estructuras recientemente resueltas por Cryo-EM muestran que el C-terminal estabiliza la formación de oligómeros por medio de hebras  $\beta$  entre distintas subunidades, se propone que modificaciones en esta región pueden alterar el largo de los filamentos sin alterar el resto de la enzima. Se esperaba que se disminuyera el tamaño de los filamentos, pero se mantuviera el plegamiento y la actividad de la enzima.

Para alterar el tamaño de los oligómeros formados, se diseñaron mutantes que introducen codones de paro a lo largo del C-terminal. Los sitios se escogieron con base en las redes de interacciones de residuos de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4. Las posiciones escogidas tienen pocos contactos y eliminan elementos de estructura secundaria completos que estabilizan la formación de filamentos, por lo que se esperaba que solo alterara el tamaño de los filamentos. Se propusieron las mutantes NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34 de AtNit4, las cuales eliminan dieciséis, veintinueve y treinta y cuatro residuos del C-terminal respectivamente. También se propusieron las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64, NitCRsp $\Delta$ 66, NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 de RsV51BNit, las cuales eliminan sesenta y cuatro, sesenta y seis, setenta y tres, y setenta y cuatro residuos del C-terminal respectivamente.

Las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 se purificaron por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio aniónico, mientras que las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64 y NitCRsp $\Delta$ 66 cromatografía de intercambio aniónico. Las mutantes NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34 se sobreexpresaron en células de *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)pLysS y se purificaron por cromatografía de afinidad y una etiqueta de polihistidinas en el C-terminal.

La caracterización estructural de las mutantes se realizó por medio de dicrosimo circular, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los datos de dicroísmo circular indican que las mutantes de RsV51BNit no se pliegan correctamente, por lo que no se siguieron estudiando. Mientras, las mutantes de AtNit4 se pliegan correctamente. Los datos de DLS indican que las mutantes todavía forman estructuras de gran tamaño, pero la técnica no permite discernir el tipo de estructuras que forman. De acuerdo a las imágenes de transmisión electrónica, dejan de formar filamentos, aunque tienden a formar agregados de gran tamaño.

La actividad específica de las mutantes de AtNit4 disminuye conforme se disminuye el largo de C-terminal. La mutante más corta, NitAtC $\Delta$ 34, es inactiva, mientras que las mutantes NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 retienen parte de su actividad específica. Para explicar estas diferencias se realizaron acoplamientos moleculares y dinámicas moleculares. En las dinámicas moleculares, la distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano del sustrato ( $D_{C-S}$ ) es menor en las mutantes más activas. Esto concuerda con lo reportado anteriormente en la literatura.

Los resultados obtenidos en este proyecto indican que eliminar el C-terminal puede disminuir el tamaño de los oligómeros formados. No obstante, este enfoque altera el plegamiento y la actividad de las mutantes. Todas las mutantes de RsV51BNit fueron inactivas debido a la pérdida de estructura. Por el otro lado, las mutantes de AtNit4 parecen plegarse correctamente y dejan de formar filamentos helicoidales. Por último, la distancia  $D_{C-S}$  parece correlacionar con la actividad de las mutantes durante las dinámicas moleculares y podría ser un predictor robusto de la actividad.

En el caso de AtNit4, se pudo generar una mutante activa y con oligómeros de menor tamaño. No obstante, tiene una actividad disminuida y es más propensa a agregarse.

## Introducción

Las reacciones que se llevan a cabo en los organismos vivos están mediadas por grupo de biomoléculas denominadas enzimas. La gran mayoría de las enzimas son proteínas, aunque existen enzimas formadas por RNA (Nelson, Cox & Lehninger, 2013). Estos catalizadores son capaces de distinguir entre distintos sustratos y actuar de manera regioselectiva y enantioselectiva. Estas características junto con la capacidad de trabajar a temperatura y presión ambientales han permitido que tengan una amplia variedad de aplicaciones en la industria (Singh *et al.*, 2016).

Las nitrilasas son enzimas capaces de formar espirales cortas a hélices de tamaño variable y catalizan la hidrólisis de los nitrilos a sus respectivos ácidos carboxílicos (Thuku *et al.*, 2009). Estas enzimas se han estudiado debido a sus aplicaciones en la síntesis de compuestos químicos. Se han usado exitosamente en la síntesis del ácido mandélico, del ácido nicótico y del ácido acrílico (Gong *et al.* 2012). A su vez, las nitrilasas también son usadas en la síntesis de precursores de algunos fármacos como la atorvastatina (Bergeron *et al.*, 2006) y el clopidogrel (Zhang *et al.*, 2012).

La mayor limitante para manipular y aplicar a las nitrilasas es la falta de estructuras (Thuku *et al.*, 2009; Gong *et al.* 2012). Hasta la actualidad solo se cuenta con cuatro estructuras resueltas (Raczynska *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Mulelu *et al.*, 2019). Recientemente, la criomicroscopía electrónica permitió resolver la estructura de las estructuras de las nitrilasas de *Rhodococcus sp.* V51B (Sampieri, 2021) y la NIT4 de *Arabidopsis thaliana* (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019). Aunque los avances en criomicroscopía han permitido obtener la estructura de complejos proteicos, sigue sin ser la opción más asequible.

Se ha propuesto que la simetría pentagonal de los oligómeros formados por las nitrilasas es la responsable de impedir la formación cristales (Thuku *et al.*, 2007). Únicamente dos de las cuatro estructuras resueltas se obtuvieron por cristalografía de rayos X y por diversos motivos no tienen esta simetría pentagonal (Mueller *et al.*, 2006; Woodward *et al.*, 2018). Por lo tanto, la eliminación de las interacciones que estabilizan la formación de las hélices se ha propuesto como una estrategia viable para cristalizar a las nitrilasas (Thuku *et al.*, 2007).

Las estructuras recientemente obtenidas de las nitrilasas de *Rhodococcus sp.* V51B (Sampieri, 2022) y la NIT4 de *Arabidopsis thaliana* (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019) por criomicroscopía muestran por primera vez las interacciones que estabilizan la formación de los oligómeros. En especial, el C-terminal extendido de las nitrilasas es importante para estabilizar a los oligómeros y no forma parte del sitio activo. Por lo tanto, es un blanco ideal para ser mutado sin alterar el resto de la proteína.



En el presente proyecto se estudia los efectos de la eliminación de las regiones del C-terminal que estabilizan la formación de oligómeros de las nitrilasas de *Rhodococcus sp.* V51B y la NIT4 de *A. thaliana*. Dado que se cuentan con las estructuras es posible crear mutantes racionalmente. Se espera que la eliminación de secciones del C-terminal disminuya el tamaño de los oligómeros formados, generando mutantes activos y cristalizables. Esta estrategia podría implementarse en otras nitrilasas cuya estructura se desconoce y con ello incrementar el número de estructuras conocidas con una técnica más asequible.

## Marco teorico

### Nitrilos

Los nitrilos ( $\text{RC}\equiv\text{N}$ ) son los derivados orgánicos del ácido cianhídrico ( $\text{HC}\equiv\text{N}$ ) y junto a las sales del ácido cianhídrico forman parte de los cianuros. Los nitrilos se encuentran distribuidos a lo largo de todo el árbol de la vida, especialmente en plantas, bacterias y hongos, y en menor medida en algas y artrópodos.

En la naturaleza, los nitrilos se sintetizan principalmente por dos vías. La primera vía de síntesis es a través de una aldoxima deshidratasa, la cual elimina una molécula de agua de una aldoxima y da la formación del nitrilo correspondiente. La segunda vía es a través de una hidroxinitrilo liasa, la cual condensa un aldehído y cianuro y da la formación de la cianohidrina correspondiente. A su vez, existen dos rutas enzimáticas distintas, por las cuales se pueden degradar los nitrilos: la ruta de la nitrilasa y la ruta de la nitrilo hidratasa-amidasa (Fig. 1). Ambas rutas terminan con la formación del ácido caboxílico correspondiente al nitrilo. Las nitrilasas (EC 3.5.5.1) catalizan la transformación directa de nitrilos orgánicos a sus ácidos carboxílicos correspondientes y liberan amonio. La hidrólisis del nitrilo es catalizada también por la acción concertada de una nitrilo hidratasa (EC 4.2.1.84), que produce un intermediario amida y de una amidasa (EC 3.5.1.4), la cual completa la transformación al ácido carboxílico correspondiente (Bhalla *et al.*, 2018).

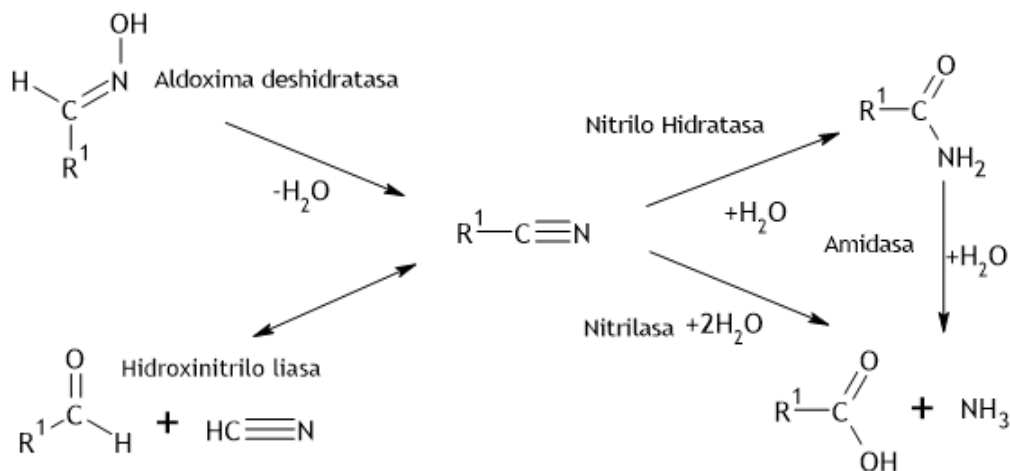


Figura 1. Principales vías en la síntesis y en la degradación de los nitrilos en la naturaleza. Tomado y editado de (Bhalla, Kumar, Kumar, Thakur & Savitri, 2018).



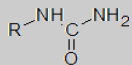
## La superfamilia de las nitrilasas

Las nitrilasas (EC 3.5.5.1) hidrolisan los nitrilos a sus correspondientes ácidos carboxílicos y liberan amonio en el proceso. Mientras, las cianuro dihidratasa (EC 3.5.5.1) hidrolizan el cianuro en formiato y también liberan amonio en el proceso. Las cianuro hidratasa (EC 4.2.1.66) transforman el cianuro en formamida, sin la liberación de amonio (Pace *et al.*, 2000). Las nitrilasas, las cianuro dihidratasa (CynD) y las cianuro hidratasa forman una sola familia y a su vez esta familia es una rama de la superfamilia de las nitrilas (Pace & Brenner, 2001; Thuku *et al.*, 2009).

Las enzimas de la superfamilia de las nitrilasas son hidrolasas que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno, por lo que se les suele denominar la superfamilia de las hidrolasas carbono-nitrógeno. Con base en la similitud de las secuencias y los patrones de fusión de dominios, las enzimas de la superfamilia de las nitrilasas se han clasificado en trece ramas, diez de las cuales tienen actividades conocidas o predichas de amidasa o amidotransferasa (Tabla I). Únicamente en la rama 1 se encuentran las verdaderas nitrilasas. Cada una de las trece ramas tiene una función biológica y especificidad de sustrato diferentes (Pace & Brenner, 2001).

Los eventos de fusión son frecuentes en esta superfamilia, en siete de las trece ramas hay eventos de fusión y en tres ramas es una característica constitutiva. La rama 10 contiene dos proteínas, Nit1 y Nit2, y se predijo que ambas tenían actividad de amidasa (Liu *et al.*, 2013). En las moscas de la fruta y los nematodos, Nit1 está presente como una proteína de fusión con la proteína Fhit (fragile histidine triad) mientras que, en los mamíferos, Nit1 y Fhit son dos proteínas independientes y son codificadas por genes diferentes y cromosomas diferentes (Huebner *et al.*, 2011).

Tabla I. Clasificación de la superfamilia de las nitrilasas.

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

En los renglones se indica la familia y en las columnas se indica el tipo de reacción catalizada por cada familia. Tomado y editado de (Pace & Brenner, 200). \* (Liu *et al.*, 2013)

A partir del análisis de las secuencias disponibles, y de las estructuras de la N-carbamil-D-aminoácido-amidohidrolasa (DCase) de *Agrobacterium sp.* KNK712 (PDB: 1ERZ; Nakai *et al.*, 2000) y la proteína de fusión de NitFhit de *Caenorhabditis elegans* (PDB: 1EMS; Pace *et al.*, 2000), Pace and Brenner (2001) infieren que las enzimas de la superfamilia de las nitrilasas presentan una triada catalítica formada por un glutamato, una lisina y una cisteína, E-K-C, y tienen un plegamiento único  $\alpha\beta\alpha$  “sándwich”. A la fecha se han depositado más de cuarenta estructuras en el PDB, encontrando la misma arquitectura en los distintos miembros de la superfamilia (Kumari and Poddar, 2019).

La posición de un segundo residuo de glutamato en el sitio activo (el glutamato ciento cuarenta y dos en la amidasa de *G. pallidus*, PDB 2plq, glutamato ciento cuarenta y seis en la DCase de *Agrobacterium radiobacter*, PDB 1FO6, glutamato ciento cuarenta y seis en la formamidasa de *Helicobacter pylori*, PDB), muestra que el nitrógeno amídico del sustrato está a distancia de puente de hidrógeno. En las estructuras mencionadas, la cadena lateral de este glutámico está en una posición adecuada para actuar como una base general, por lo que se ha implicado en el mecanismo de reacción (Fig. 2; Thuku *et al.*, 2009). Este glutamato se conserva en todas las enzimas de la superfamilia, y su posición se mantiene en todas las estructuras resueltas, por lo tanto, la propuesta actual es una tétrada catalítica.

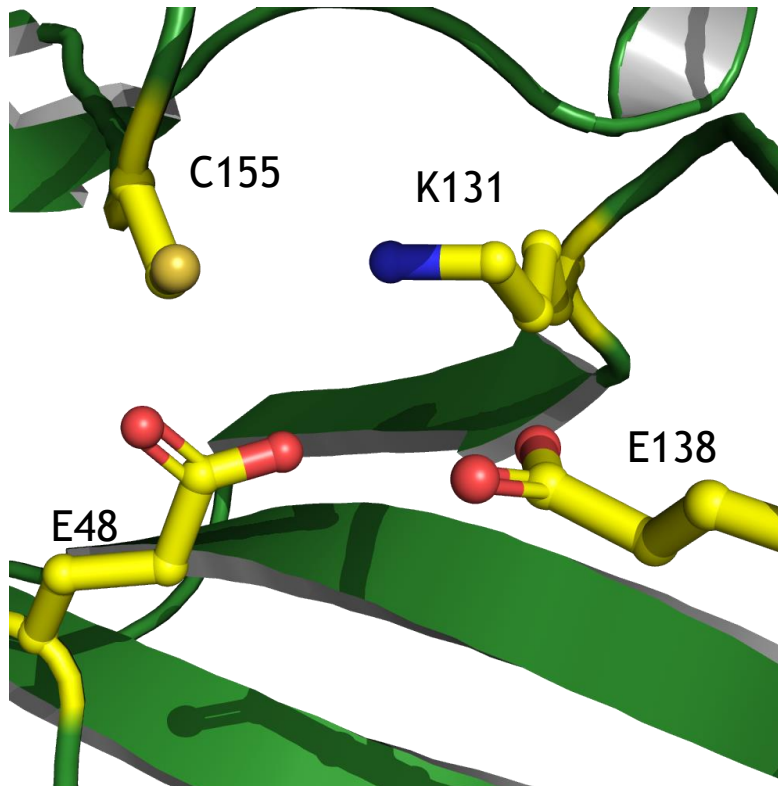


Figura 2. Aminoácidos del sitio catalítico de las nitrilasas. Estructura de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (Sampieri 2022). En amarillo se marcan los cuatro residuos del sitio catalítico: el glutamato cuarenta y ocho, la lisina ciento treinta y uno y la cisteína ciento sesenta y cinco de la triada catalítica y el glutamato ciento treinta y ocho el cual es homólogo al glutamato de la amidasa de *G. pallidus* RAPc8 que se ha implicado en el mecanismo de reacción (Kimani *et al.*, 2007). Imagen hecha en Pymol de RsV51BNit.

### Clasificación de las nitrilasas

Los análisis filogenéticos de las nitrilasas han permitido clasificarlas en subfamilias o clados y hacer inferencias de su actividad, origen y función. En uno de los trabajos pioneros se aislaron ciento treinta y siete nitrilasas de una biblioteca de DNA ambiental de muestras provenientes de todo el mundo y se construyó un árbol filogenético con las nitrilasas recién descubiertas y nueve nitrilasas previamente caracterizadas, cuyas secuencias ya eran conocidas. Dos de estas nitrilasas, las de *Orzya* y *Arabidopsis*, quedaron como grupos externos. En este trabajo, las distintas secuencias de nitrilasas se clasificaron en seis clados y en cada uno se identificaron propiedades enzimáticas de quimioespecíficas y regioespecíficas distintas. No se encontraron relaciones filogenéticas entre los genes y la distribución geográfica de las muestras. Casos de enzimas con secuencias similares provenientes de regiones geográficas distantes son comunes. En varios clados se encontraron agrupaciones de genes similares en regiones tropicales. Se ha propuesto que este fenómeno pudiera deberse a eventos de rápida evolución en ambientes tropicales (Robertson *et al.*, 2004).

Las nitrilas de plantas se han dividido en dos familias dependiendo a cuál, de las cuatro nitrilasas de *Arabidopsis thaliana* son homólogas. La familia NIT1 incluye a las NIT1, NIT2 y NIT3 de *Arabidopsis thaliana* y la familia NIT4 contiene únicamente a NIT4. Hasta el momento, la familia NIT1 solamente se han encontrado en la familia Brassicaceae. La mayoría de las nitrilasas de plantas conocidas son homólogas a la NIT4 de *Arabidopsis thaliana* y parecen ser ubicuas en plantas superiores (Piotrowski 2008).

En Basidiomycota, los análisis filogenéticos han identificado dos clados con porcentajes de similitud altos a nitrilasas fuera de la división. Uno de los clados, tiene una alta similitud a las nitrilasas de plantas y el segundo grupo tiene una alta similitud a las nitrilasas de Ascomycota, lo cual sugiere eventos de transferencia horizontal de genes (Rucká *et al.*, 2019).

### **Función biológica de las nitrilasas**

La función biológica de las nitrilasas es desconocida en la mayoría de los organismos y solamente se ha estudiado a profundidad en las plantas. No obstante, se han propuesto algunas funciones probables de estas enzimas como la participación en procesos de reciclaje del nitrógeno, la protección frente a herbívoros, la participación en el metabolismo de los cianoglucósidos y glucosinolatos, o en la destoxificación del cianuro de hidrógeno (HCN).

En bacterias, las nitrilas les proporciona la capacidad de utilizar a los nitrilos como fuente de nitrógeno (Layh *et al.*, 1998). Sin embargo, las nitrilasas son relativamente raras en bacterias, en diez de los ciento cincuenta genomas bacterianos secuenciados en el estudio de (Robertson *et al.*, 2004) contienen genes de nitrilasa. O bien, en datos de minería genómica se encontraron ciento treinta y ocho nitrilasas entre dos mil genomas bacterianos, lo que implica que solo 6.8 % de las bacterias expresan nitrilasas (Chhiba-Govindjee *et al.*, 2019).

Podar *et al* (2005) realizan un análisis genómico y bioquímico de las familias de las nitrilasas microbianas tratando de entender los eventos evolutivos que pudieron dar forma a la organización de sus genomas y si la función de las nitrilasas podría estar asociada a la naturaleza de los genes que la flanquean. Se encontró que algunas de las nitrilasas de la subfamilia 1 se agrupan en una especie de operón bastante conservado, formado por siete genes y nombrado Nit1C (Podar *et al*, 2005). Se encontró que el grupo de genes Nit1C está asociado con la asimilación de cianuros y nitrilos, particularmente 2-hidroxinitrilos (Jones *et al*, 2018). Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia experimental que demuestre la participación de este operón en alguna función biológica.

La nitrilasa de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* es altamente específica para el herbicida bromoxinil (3,5-dibromo-4 hidroxibenzonitrilo). El gen de la nitrilasa se encontró asociado con genes de enzimas capaces de metabolizar el bromoxinil: una deshalogenasa reductora, una 4-hidroxibenzoato<sup>3</sup>-monooxigenasa y una protocatecuato 4,5-dioxigenasa (Chhiba-Govindjee *et al.*, 2019).

En Basidiomycota el clado con alta similitud a las nitrilasas de Ascomycota, sugiere que hubo eventos de transferencia horizontal por coinfección del mismo hospedero, probablemente una planta. Se caracterizó una enzima del grupo, y se encontró que tiene la capacidad de degradar cianuro. Aunado a la naturaleza patógena de los organismos estudiados, se propone que estas nitrilasas ayudan al hongo a combatir los mecanismos de defensa de su huésped, los cuales liberan cianuro (Rucká *et al.*, 2019).

En plantas, tradicionalmente se ha asociado a las nitrilasas con la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) a partir de indol-3-acetonitrilo (IAN), debido a que la primera enzima descrita, con la capacidad de metabolizar compuestos de tipo nitrilo, y que catalizó esta reacción, se aisló de hojas de cebada (Thimann y Mahadevan, 1964). Esta reacción, intermediaria de la biosíntesis de auxinas, también se ha observado en extractos enzimáticos obtenidos de diversas plantas, principalmente de la familia Brassicaceae. A la fecha está claro que las nitrilasas son ubicuas en el reino vegetal y se dividen en dos familias, NIT1 y NIT4.

La familia NIT4 está presente en todas las plantas y tiene una función enzimática en la detoxificación de cianuro endógeno producido por el catabolismo de glucósidos cianogénicos, y durante la biosíntesis de la hormona etileno. NIT4 cataliza la hidrólisis de la  $\beta$ -ciano alanina a ácido aspártico y asparagina (Piotrowski, 2008). Por lo tanto, las funciones enzimáticas de las nitrilasas en plantas son de defensa, detoxificación, utilización y reciclaje de nitrógeno, siendo la síntesis de auxina de menor importancia (Howden *et al.*, 2009).

La familia NIT1 se ha relacionado con la vía de biosíntesis de la auxina AIA, a partir de IAN. No obstante, se observó que NIT1 y sus homólogos, NIT2 y NIT3, muestran muy baja actividad con el IAN como sustrato tanto *in vivo* como *in vitro* (Agerbirk *et al.*, 2008). La presencia restringida de las NIT1-3 en la familia Brassicaceae, sugiere que están involucradas en la degradación de nitrilos liberados a partir de glucosinolatos, los cuales son compuestos de defensa de la planta y que se encuentran en altas concentraciones en la familia Brassicaceae. Por último, se ha encontrado que NIT1 de *Arabidopsis thaliana* está asociada a filamentos de tubulina *in vivo* y al silenciar la expresión de los genes Nit1, Nit2 y Nit3, se observan defectos en la citocinesis (Doskočilová *et al.*, 2013). Esto sugiere que todavía se desconoce partes importantes de la función biológica de las nitrilasas.

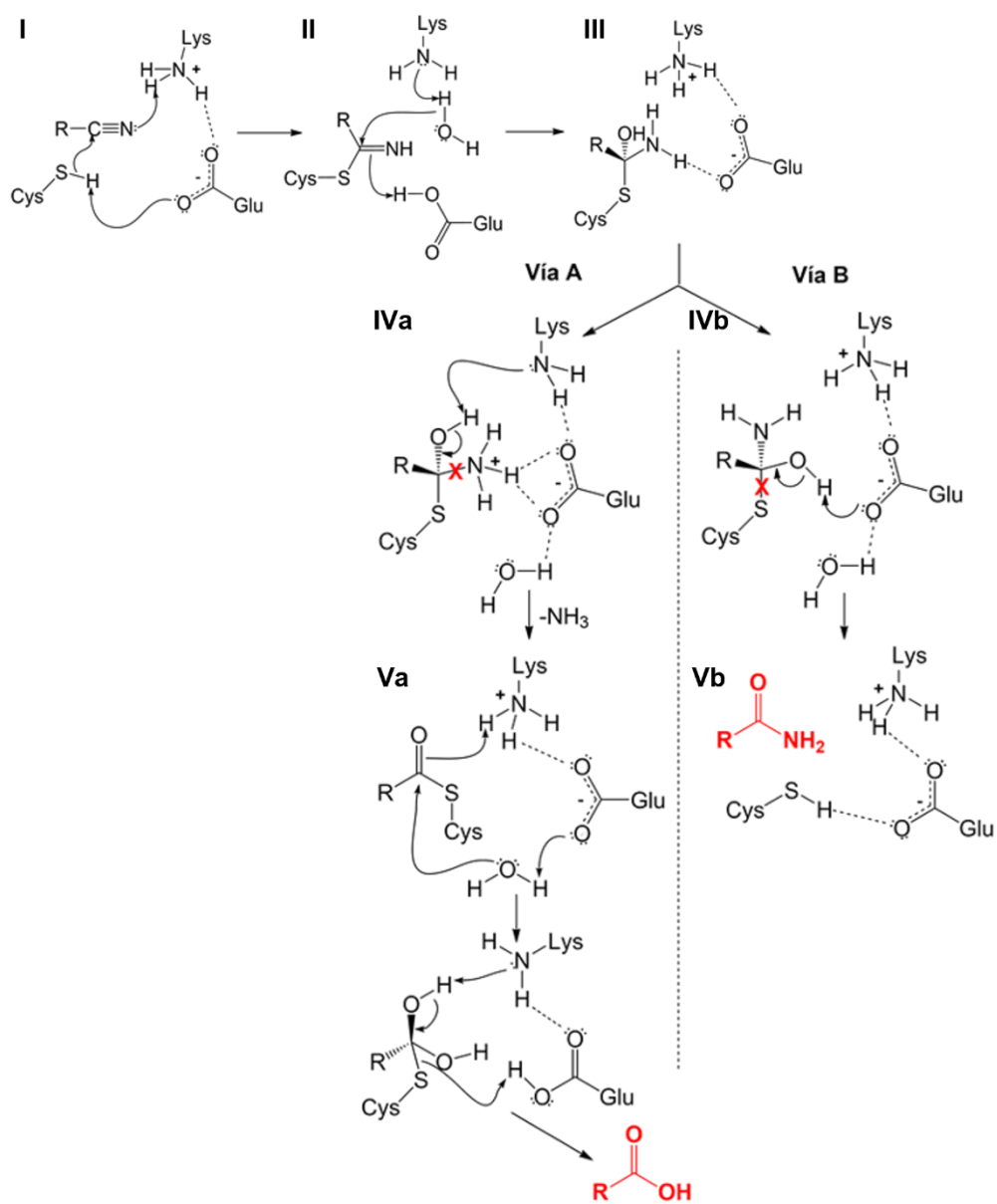
## Mecanismo de reacción

Hasta hoy, no se cuenta con una estructura de nitrilasa con algún análogo de sustrato o intermediario en el sitio activo. El mecanismo de reacción propuesto se basa en analogías con otros miembros de la superfamilia en las cuales el sustrato, un análogo o un intermediario se encuentran unidos al sitio catalítico. El mecanismo de reacción propuesto también se basa en acoplamientos moleculares proteína-ligando con las estructuras de nitrilasas disponibles hasta el momento, en particular la nitrilasa de *Syechocystis sp.* PCC6803 (PDBD: 3WUY; Zhang *et al.*, 2014).

El mecanismo de reacción propuesto es el siguiente (Esquema 1): El grupo sulfhidrilo de la cisteína catalítica es desprotonado por uno de los glutámicos catalíticos, el cual actúa como base general, activando a la cisteína. La cisteína activada realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo ciano del sustrato y se forma un complejo enzima-sustrato unido covalentemente (I). El ataque de una molécula de agua al carbono del grupo ciano forma un intermediario tetraédrico (II). Este intermediario es estabilizado por el glutamato catalítico y la lisina catalítica (III). El enlace carbono nitrógeno, de lo que era el grupo ciano, se rompe mediado por la lisina catalítica y se libera amonio (IVa). El ataque nucleofílico de una segunda molécula de agua al carbono, de lo que era el grupo ciano, regenera la enzima y libera el ácido carboxílico correspondiente al nitrilo (Va).

También se ha observado la formación de amida por las nitrilasas (Piotrowski *et al.*, 2001). En este caso, el enlace entre el azufre de la cisteína catalítica y el nitrógeno del grupo ciano se rompe, liberando la amida y reconstituyendo la enzima (IVa). Algunos sustratos son más proclives a formar amidas debido a los impedimentos estéricos y a la electronegatividad del sustituyente alfa (Fernandes *et al.* 2006; Williamson *et al.*, 2010). También mutaciones puntuales pueden virar la reacción a la formación de amidas al disminuir la distancia del carboxilo del glutamato catalítico al grupo tiol de la cisteína catalítica y aumentar la distancia del glutamato catalítico al nitrógeno del intermediario tetraédrico (Jiang *et al.*, 2017).



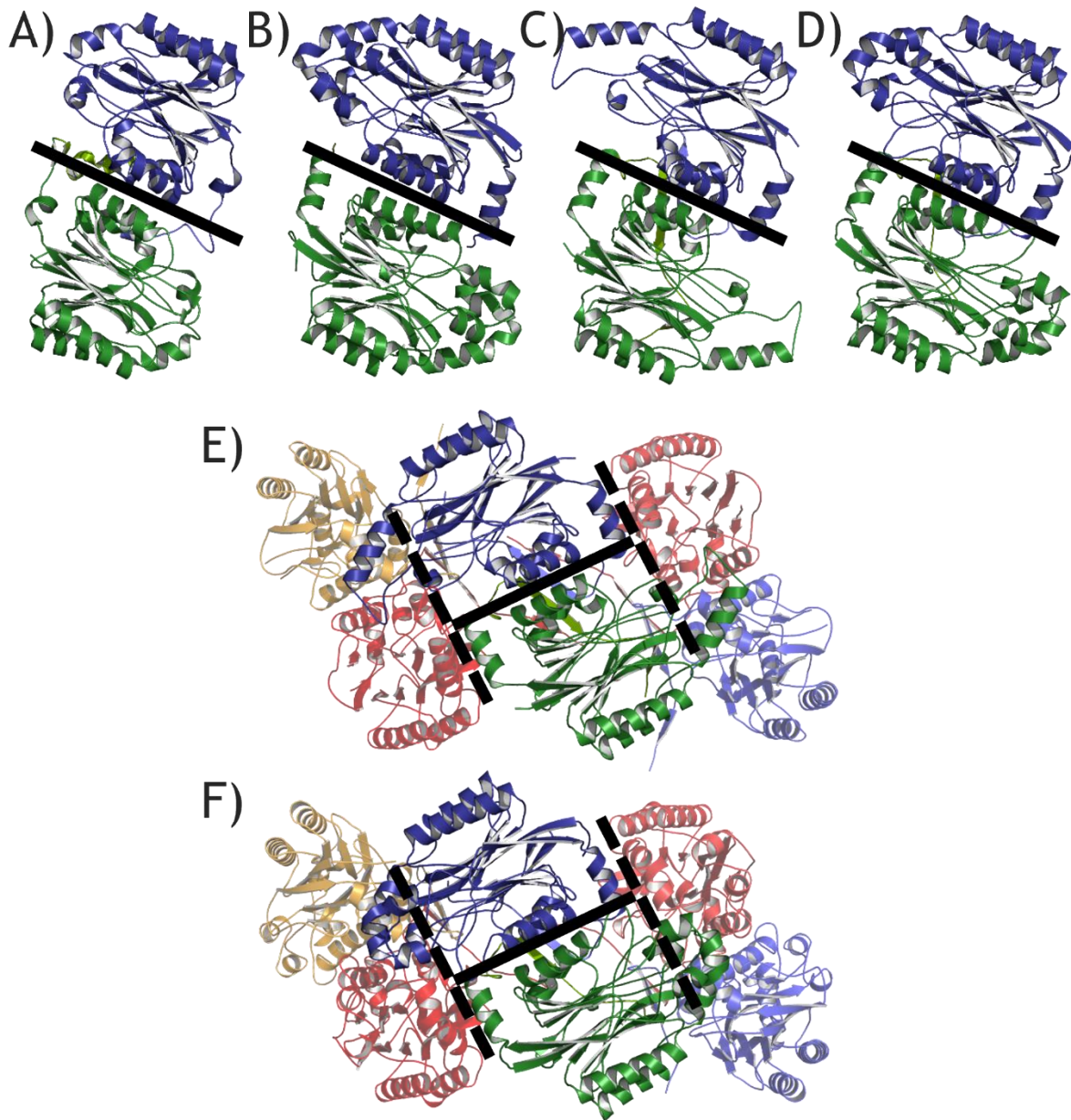


**Esquema 1. Mecanismo de reacción propuesto para las nitrilasas.** Cuando se hidroliza el enlace carbono nitrógeno, la reacción termina en la formación del ácido carboxílico (Vía A). Cuando se hidroliza el enlace carbono azufre, la reacción termina en la formación de amida (Vía B). Modificado de (Jandhyala et al., 2005).

## Estructuras resueltas de las nitrilasas

Hasta la fecha, se han resuelto las estructuras atómicas de cuatro nitrilasas. Los monómeros de las nitrilasas resueltas presentan el plegamiento característico de la superfamilia, es decir, el plegamiento  $\alpha\beta\alpha$  sándwich (Fig. 3). Las estructuras de la nitrilasa de *Pyrococcus abyssi* (PDB: 3IVZ; Raczynska *et al.*, 2011) y la nitrilasa de *Syechocystis* sp. PCC6803 (PDB: 3WUY; Zhang *et al.*, 2014) se obtuvieron por medio de cristalografía de rayos X. Mientras que, las estructuras de las nitrilasas de *Rhodococcus* sp. V51B (Sampieri, 2021) y la NIT4 de *A. thaliana* (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019) se obtuvieron por medio de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM). Las nitrilasas de *P. abyssi* (PaNit) y de *Syechocystis* sp. PCC6803 (Nit6803) cristalizaron como dímeros y permitieron ver la superficie de interacción a nivel atómico. En las estructuras de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (RsV51BNit) y la NIT4 de *A. thaliana* (AtNit4), las cuales se resolvieron por Cryo-EM, permitieron ver la superficie de dimerización y otra superficie implicada en la formación de oligómeros (Fig. 3). En tres de las cuatro estructuras, el C-terminal se extiende hacia el otro monómero y en las dos estructuras resueltas por Cryo-EM, el C-terminal se extiende a los dímeros aledaños (Fig. 3).

Es importante notar que tres de las cuatro estructuras hay regiones de la estructura que no se pudieron resolver por distintas razones. La estructura de RsV51BNit no corresponde a la estructura de la nitrilasa silvestre de *Rhodococcus* sp. V51B completa. La estructura es de la mutante trunca NitRspC $\Delta$ 39, la cual elimina treinta y nueve residuos del C-terminal lo que promueve su ensamble en filamentos helicoidales de gran tamaño. Aparte de esos treinta y nueve residuos eliminados, no se pudieron resolver los diez últimos residuos del C-terminal. En la estructura de AtNit4 no se observaron los últimos diez residuos del C-terminal más la etiqueta de histidinas y una región que va del residuo doscientos cincuenta y dos al residuo doscientos cincuenta y seis. Tampoco se observaron los primeros treinta y cuatro residuos del N-terminal. En la estructura de la nitrilasa de Nit6803 no se observa los últimos residuos de C-terminal debido a que un corte proteolítico eliminó los últimos cincuenta y seis residuos del C-terminal y modificó la forma en la que se interaccionan los monómeros (Zhang *et al.*, 2014; Woodward *et al.*, 2018).



**Figura 3. Estructuras de la nitrilasas obtenidas hasta el momento.** Cada monómero se marca en un color diferente. La línea continua marca la superficie A y las rayas marca la superficie C. A) Estructura de la nitrilasa de *Pyrococcus abyssi* (PDB: 3IVZ; Raczynska *et al.*, 2011). B) Estructura de la nitrilasa de *Syechocystis* sp. *PCC6803* (PDB: 3WUY; Zhang *et al.*, 2014). C) Estructura de la NIT 4 de *A. thaliana* (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019). D) Estructura de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (Sampieri, 2022). E) Estructura de seis subunidades de NIT 4 de *A. thaliana* (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019). F) Estructura de las seis subunidades de la estructura previo de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (Sampieri, 2022). Imagen hecha en Pymol.

## Cavidad del sitio activo de las nitrilasas resueltas

En las cuatro nitrilasas, la cavidad del sitio activo está formada principalmente por residuos hidrofóbicos, y contiene los residuos de la tétrada catalítica CEEK (Raczynska *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Mulelu *et al.*, 2019). No obstante, la forma en que cada una de las cavidades está delimitada varía enormemente y tiene implicaciones en su actividad catalítica. Esto se debe a que las cuatro nitrilasas poseen varias inserciones y deleciones en esta región, las cuales alteran la geometría o accesibilidad a los sitios activos (Fig. 4).

En contraste con las otras nitrilasas, la cavidad del sitio activo de AtNit4 contiene varios residuos cargados aparte de la tétrada catalítica y no está delimitada en un único monómero. Un asa proveniente de otro monómero se proyecta al sitio activo de la subunidad adyacente y cierra la cavidad del sitio activo (Fig. 5C). Esta asa se ubica entre las posiciones ochenta y dos, y noventa y siete con respecto al alineamiento (Fig. 4), funcionando como una bisagra que limita el tamaño máximo del sustrato al que puede unir. Mutaciones en esta asa modifican la especificidad por los sustratos que acepta AtNit4, pasando de ser específica por  $\beta$ -ciano alanina a transformar cianuro, 2-cianopiridina y 2-furonitrilo (Mulelu *et al.*, 2019).

La nitrilasa de PaNit presenta un asa corta, que va del residuo doscientos veinticuatro al residuo doscientos veintinueve, denominada “Binding loop” la cual está entre una hebra beta y una alfa hélice y es importante para la unión del sustrato. En el cristal, esta asa se encuentra unida a iones acetato o bromuro, a pesar de no contar con ningún residuo básico. La carga positiva proviene del momento dipolar de la hélice  $3_{10}$  al final del “Binding loop” (Raczynska *et al.*, 2011).

En Nit6803, el asa correspondiente al “binding loop” es más larga, del residuo doscientos veinticuatro al residuo doscientos treinta y cuatro. Contrario a lo que podría pensarse, el sitio activo de esta enzima queda más expuesto al solvente y se ha propuesto que es la razón de la amplia gama de sustratos que Nit6803 es capaz de hidrolizar (Zhang *et al.*, 2014). De acuerdo con el alineamiento, la Nit6803 cuenta con dos inserciones más. La primera inserción va del residuo ochenta y tres al cien y la segunda inserción va del residuo doscientos sesenta y uno al residuo doscientos noventa, los cuales se han propuesto como “binding loops” (Zhang *et al.*, 2014).

El sitio activo de RsV51BNit presenta varias inserciones al igual que Nit6803. Sin embargo, el sitio activo de RsV51BNit se encuentra contenido en un solo monómero. Además, presenta varios residuos aromáticos como el triptófano ochenta y seis, la fenilalanina doscientos uno y la fenilalanina doscientos treinta y cuatro de acuerdo con el alineamiento. A su vez, cuenta con una gran inserción entre el residuo doscientos veintisiete y el residuo doscientos cuarenta, la cual corresponde al “Binding loop” de PaNit.

- 1. PanIt (3VZ)
- 2. SsnIt (3WUY)
- 3. AnIt4 (6I00)
- 4. RsnIt (V51B)

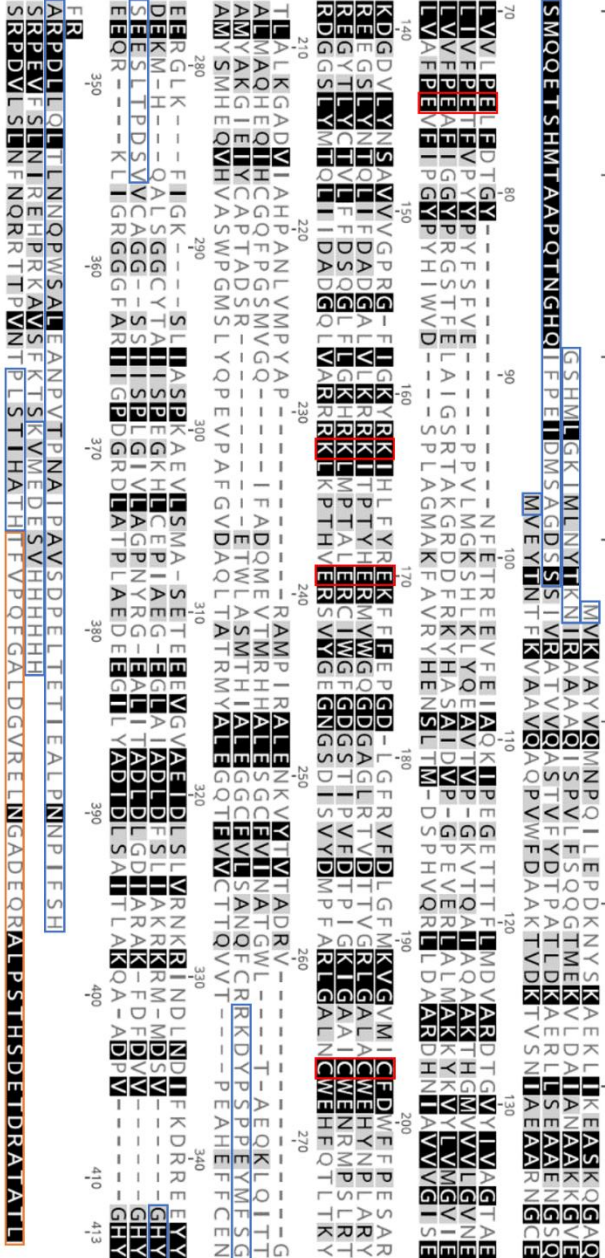
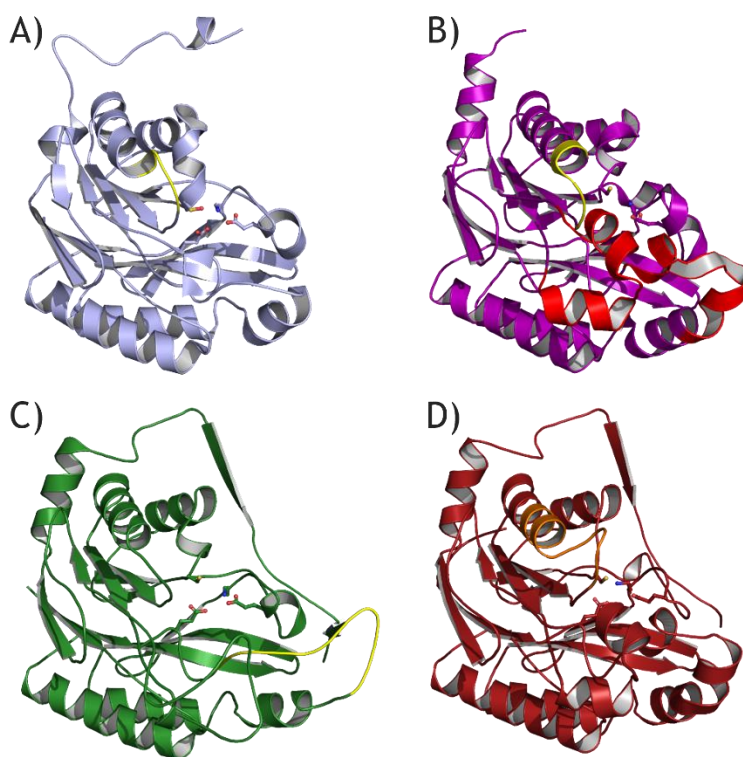


Figura 4. Alineamiento de las nitrilasas cuyas estructuras están resueltas. En tonos de blanco a gris la conservación del sitio. En cuadros verde se marcan los residuos de la tétrada catalítica. En recuadros azules las regiones que no se pudieron resolver de las estructuras. En recuadro naranja se indica la sección del C-terminal que se eliminó en la mutante trunca NitRspCΔ39.

## C-terminal de las nitrilasas resueltas

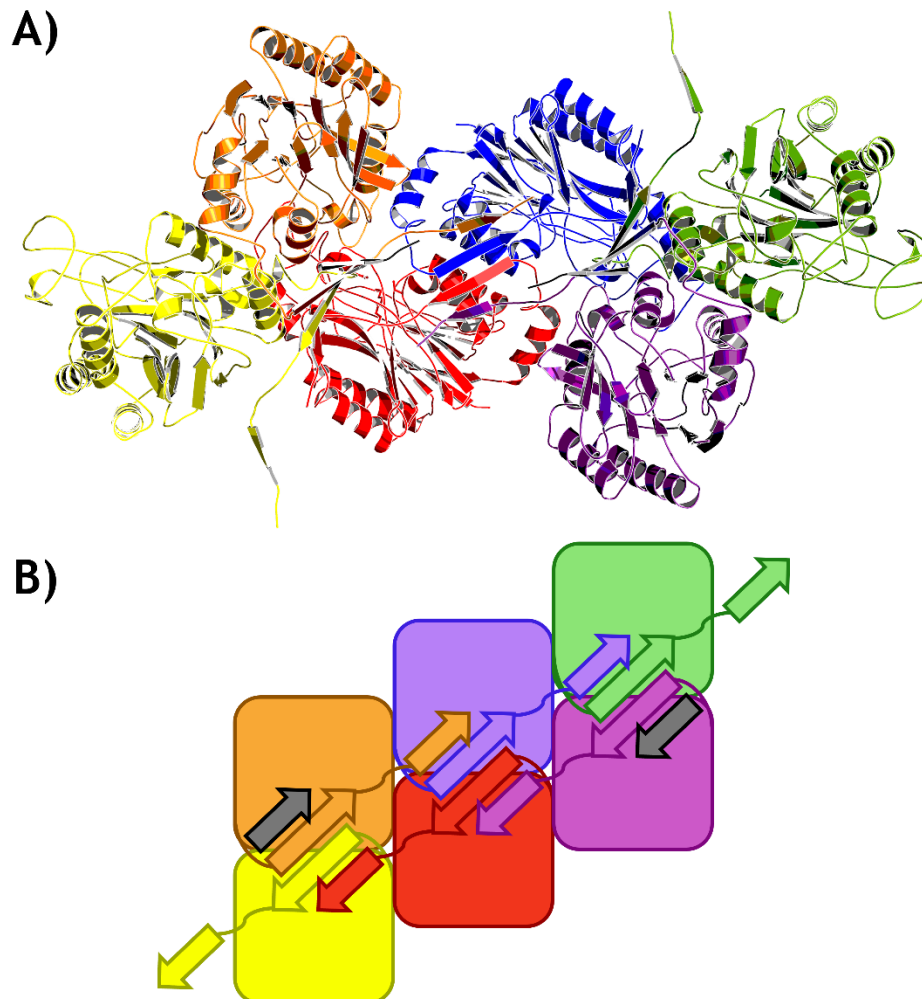
Antes de contar con las estructuras atómicas de las nitrilasas, se reconocía la importancia del carboxilo terminal (C-terminal) en la formación de las superficies de interacción entre los monómeros para estabilizar las estructuras oligoméricas y mantener la actividad catalítica (Thuku *et al.*, 2009).

La primera estructura en la que se observó el C-terminal de las nitrilasas fue PaNit (Fig. 3A y 5A). En esta estructura, el C-terminal de cada monómero se proyecta al exterior e interacciona con el C-terminal del otro monómero, estabilizando el dímero (Raczynska *et al.*, 2011). En la estructura de la Nit6803, 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 cincuenta y seis residuos (Fig.5 y 6B; Zhang *et al.*, 2014).



**Figura 5. Monómeros de las nitrilasas resueltas.** A) Nitrilasa de *Pyrococcus abyssi* (PDB: 3IVZ). En amarillo se marca el “Binding loop” y en varillas se marca la tétrada catalítica. B) Nitrilasa de *Synechocystis sp.* (PDB: 3WUY). En amarillo se marca el “Binding loop” extendido, en rojo otras inserciones implicadas en la unión a sustrato y en varillas se marca la tétrada catalítica. C) Nitrilasa 4 de *Arabidopsis thaliana* (PDB: 6I00). En amarillo se marca el loop que termina de formar el sitio activo y en varillas se marca la tétrada catalítica. D) Nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B (en proceso de publicación). En naranja se marca la inserción correspondiente al “Binding loop” de PaNit y en varillas se marca la tétrada catalítica. Imagen hecha en Pymol.

En los C-terminales de AtNit4 y de RsV51BNit se proyectan al exterior e interaccionan con el C-terminal del otro monómero, pero, a diferencia de PaNit, los C-terminales de AtNit4 y de RsV51BNit forman dos hebras betas (Fig. 5C y 5D). Las hebras betas río arriba del C-terminal de cada monómero interactúan entre sí, formando una hoja beta antiparalela y estabilizando el dímero (Fig. 3C y 3D). El dímero formado, a su vez, proyecta sus dos hebras betas río arriba de sus C-terminales a las hojas beta de los dímeros aledaños e interactúa para formar una hoja beta de cuatro cadenas (Fig. 3E y 3F; Mulelu *et al.*, 2019). Como se observa en la figura 6, los C-terminales de cada subunidad interactúan con los C-terminales de las subunidades aledañas. Esto confirma la importancia del C-terminal en la estabilización de los oligómeros.



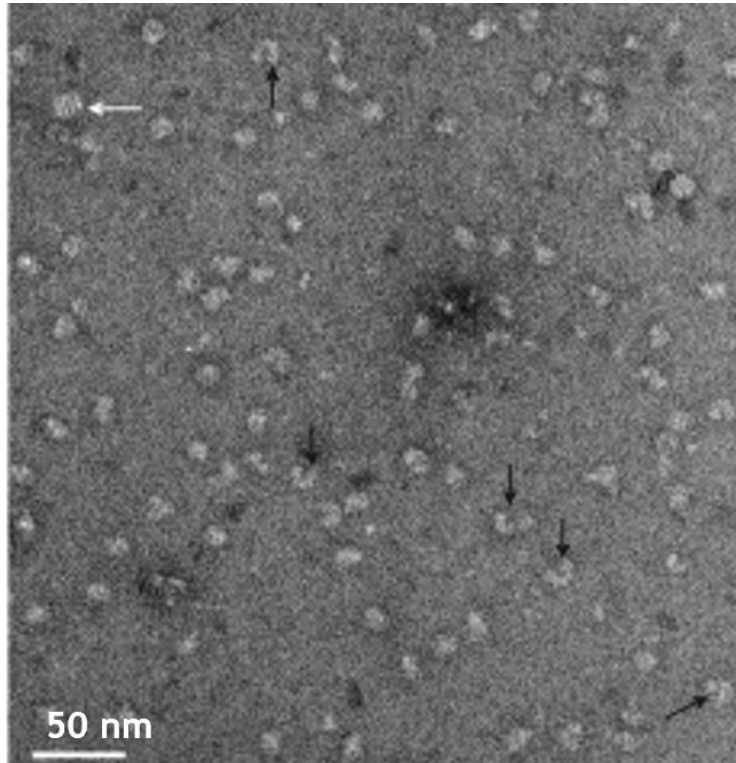
**Figura 6. Estructura y representación de la estructura de AtNit4.** En la imagen se aprecia la forma en que los C-terminales de cada monómero interactúan entre sí, formando una hoja beta y luego interactúan con las hojas beta de los dímeros aledaños. Imagen hecha en PyMol.

## Oligómeros

*In vitro*, la mayoría de las nitrilasas forman espirales cortas que constan de ocho a veintidós subunidades o filamentos largos de tamaño variable en solución (Thuku *et al.*, 2009). Las unidades básicas de estos complejos supra moleculares son dímeros inactivos en los que, los monómeros se asocian a través de una interfaz conservada en la mayoría de los miembros de la superfamilia, superficie A (ver adelante; Woodward, *et al.*, 2018). La oligomerización de estos dímeros conduce a la formación de espirales o fibras helicoidales y parece ser un prerequisite importante para la actividad de las nitrilasas (Thuku *et al.*, 2009; Woodward, *et al.*, 2018).

Existen varios ejemplos de miembros de la rama de las nitrilasas capaces de formar espirales cortas. Las nitrilasas de *Fusarium solani* O1 y *F. solani* IMI196840 se han estudiado por medio de filtración en gel y se determinó que forman oligómeros de alrededor de catorce subunidades (Vejvoda *et al.*, 2010). A partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se encontró que la CynD de *Pseudomonas stutzeri* y CynD de *Bacillus pumilus* C1 forman espirales de catorce subunidades y dieciocho subunidades respectivamente (Sewell *et al.*, 2003; Jandhyala *et al.*, 2003). Experimentos de exclusión molecular de Nit6803 sugieren que forma un decámero en solución y a partir del análisis de la estructura simétrica del cristal, se determinó que forma una espiral corta en forma de “C” (Zhang, *et al.*, 2014). La nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 purificada a partir de la cepa silvestre, se estudió por filtración en gel y se determinó que forma dímeros inactivos. Al agregar benzonitrilo, su sustrato, o sales como el sulfato de amonio, se agrega para formar decámeros activos (Nagasawa *et al.*, 2000). Los oligómeros activos se han observado por TEM y se presentan como estructuras en forma de C, las cuales se han interpretado como espirales cortas que no completan una vuelta (Fig. 7; Thuku *et al.*, 2007).

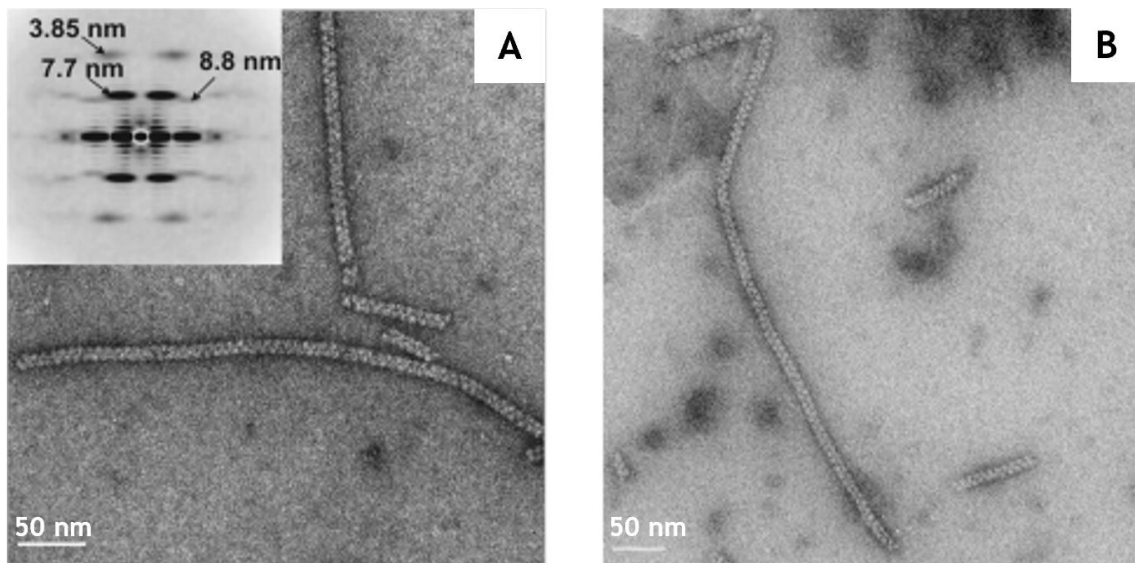




**Figura 7.** Espirales cortas de la nitrilasa de *R. rhodochrous J1*. En la imagen se observan los distintos oligómeros formados por la nitrilasa por microscopía electrónica de transmisión. Con flechas negras se marca los oligómeros en forma de “C” y en flechas blancas se marca un contaminante identificado como GroEL. Tomado de (Thuku, *et al.*, 2007).

Las enzimas de la rama de las nitrilasas también forman filamentos largos de tamaño variable. Imágenes de TEM han encontrado que la CynD de *Neurospora crassa* (Dent *et al.*, 2009), las Nit1 y Nit2 de *Capsella rubella* y Nit1 y Nit3 de *A. thaliana*, las cuales pertenecen a la familia NIT1 forman filamentos largos (Woodward *et al.*, 2018). En estas nitrilasas se ha asociado el tamaño del sustrato catalizado con el giro helicoidal o “helical twist”. A mayor ángulo de giro, menor es el tamaño del sustrato (Woodward *et al.*, 2018), aunque hay otros determinantes para la especificidad de las nitrilasas (Mulelu *et al.*, 2019).

Bajo ciertas condiciones, algunas enzimas de la rama de las nitrilasas son capaces de formar tanto espirales cortas, como filamentos largos. Por ejemplo, la CynD de *B. pumilus* C1 forma espirales a un pH entre seis y ocho, al disminuir el pH a 5.4 la CynD forma filamentos largos de tamaño variable entre cincuenta nanómetros a trescientos nanómetros. La formación de filamentos por cambios en el pH es un proceso reversible y está acompañado de un ligero incremento en la actividad (Jandhyala *et al.*, 2005). El rango en el que se da la formación de filamentos corresponde al pKa del grupo imidazol de las histidinas, por lo que se ha propuesto que varias histidinas en el C-terminal son las responsables de este cambio (Thuku *et al.*, 2009). En la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 los filamentos se forman al perder los últimos treinta y nueve residuos del C-terminal, ya sea por corte auto proteolítico o al crear una mutante trunca que elimina este tramo del C-terminal (Fig. 8; Thuku *et al.*, 2007). En RsV51BNit el tamaño de los filamentos formados se incrementa al ir recortando el C-terminal y a su vez, incrementa la actividad de la enzima (Gómez, 2016). La formación de filamentos también se puede inducir al agregar el sustrato benzonitrilo. En la mutante trunca NitRspCΔ49, la cual forma filamentos más cortos que NitRspCΔ39, al agregar benzonitrilo se induce la formación de filamentos largos, aunque sin sustrato forme filamentos relativamente cortos.



**Figura 8. Filamentos de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1.** Filamentos observados por microscopía electrónica de transmisión. A) En la imagen se observan los filamentos formados por la nitrilasa que sufrió un corte autoproteolítico. B) En la imagen se observan los filamentos formados por la mutante trunca. Tomado de (Thuku, *et al.*, 2007).

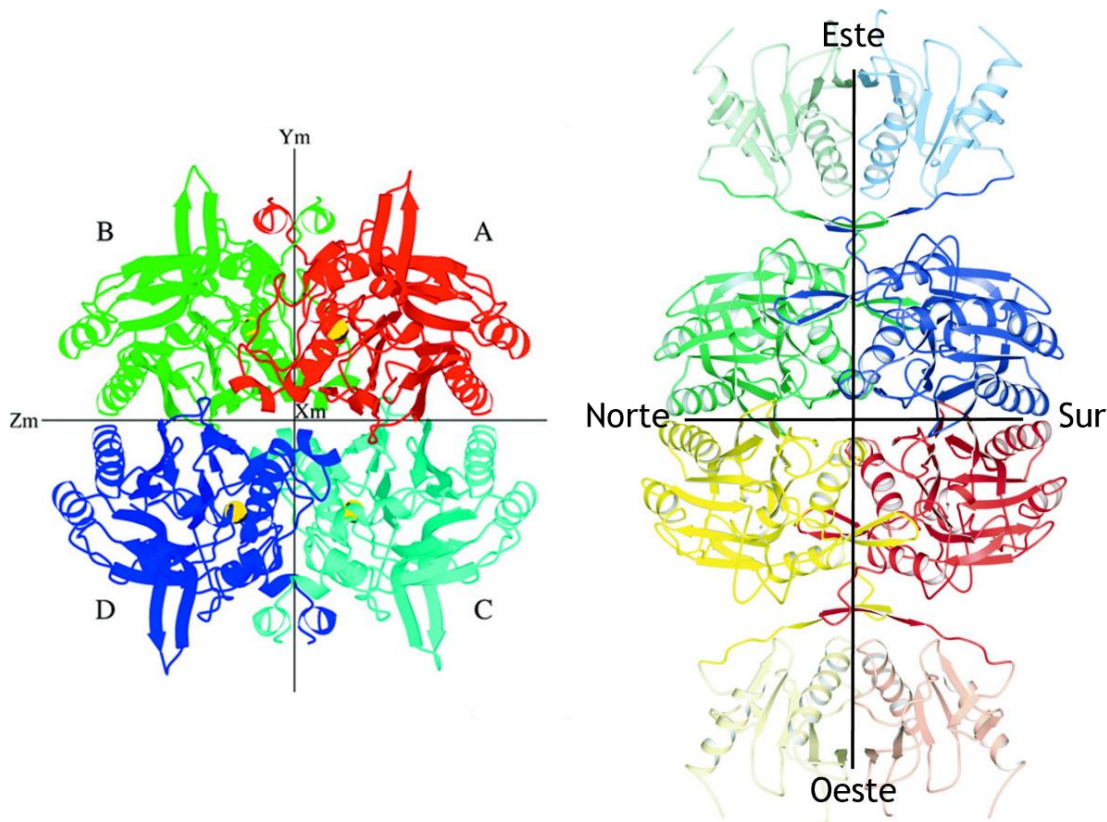
## Superficies de interacción

A partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión y un modelo por comparación de la CynD de *Pseudomonas stutzeri* AK61, se identificaron las superficies de la proteína que permitían la formación de estructuras helicoidales en la rama de las nitrilasas (Sewell *et al.*, 2003). Algunas de estas superficies se han observado a nivel atómico en las estructuras resueltas hasta el momento (Fig. 3). Otras superficies solo se han observado por microscopía electrónica de transmisión a baja resolución y, por lo tanto, su existencia queda en duda.

Las superficies A y B fueron las primeras en ser descritas. Ambas superficies se observaron a nivel atómico en las estructuras de la DCase (PDB: 1ERZ; Nakai *et al.*, 2000) y la NitFhit (PDB: 1EMS; Pace *et al.*, 2000). La superficie A corresponde al eje  $Y_m$  de la DCase y a la superficie este-oeste de NitFhit, y la superficie B corresponde al eje  $Z_m$  de la DCase y a la superficie norte-sur de NitFhit (Fig. 9). En ambas enzimas la superficie A tiene una mayor extensión que la superficie B (Pace *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2000). En el caso de la NitFhit, los residuos de la superficie B no están conservados, mientras que los residuos de la superficie A sí (Pace *et al.*, 2000).

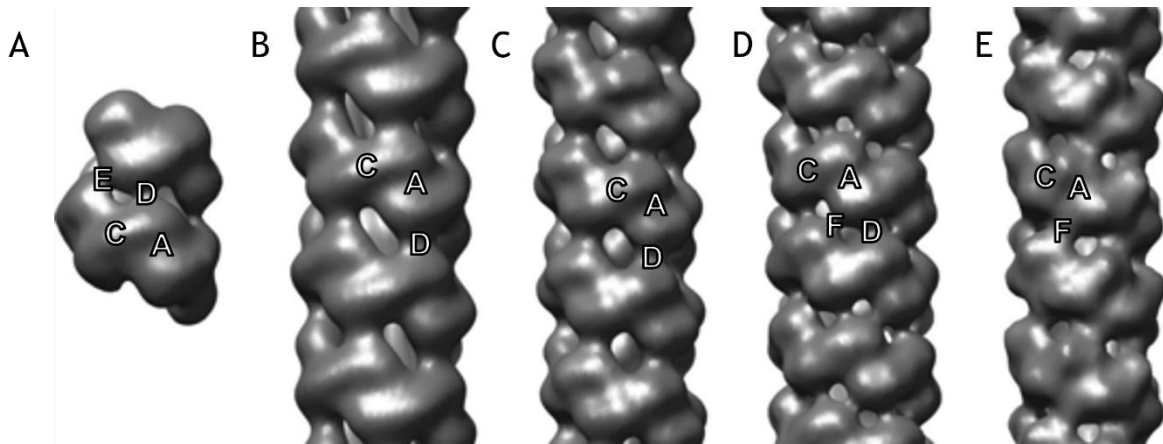
La superficie A se ha observado a nivel atómico tanto en las estructuras de las nitrilasas PaNit (3IVZ; Raczynska *et al.*, 2011), de Nit6803 (3WUY; Zhang *et al.*, 2014), AtNit4 (6I00; Mulelu *et al.*, 2019) y RsV51BNit (Sampieri, 2021; Fig. 4) como en otros miembros de la superfamilia como, las formamididasas de *Bacillus cereus* (PDB: 5G30; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2019) y de *Helicobacter pylori* 26695 (PDB: 2DYU; Hung *et al.*, 2007); la  $\beta$ -alanina sintetasa de *Drosophila melanogaster* (PDB: 2VHH; Lundgren *et al.*, 2008). Por lo tanto, parece que la formación de un dímero a través de la superficie A es una característica conservada en la superfamilia e implica que el bloque básico de construcción en la superfamilia de las nitrilasas es un homodímero con una estructura  $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$  (Thuku *et al.*, 2009).

Aparte de las superficies A y B, se han descrito otras superficies en diferentes nitrilasas. Esas superficies son las responsables de la formación de espirales cortas y filamentos. La superficie más importante para la formación de las espirales cortas y los filamentos es la superficie C. La superficie C es perpendicular a las superficies A y B y es a través de esta superficie que los dímeros interactúan entre ellos (Fig. 9; Sewell *et al.*, 2003). La superficie C se ha observado a nivel atómico en la  $\beta$ -alanina sintetasa de *D. melanogaster* (2VHH; Lundgren *et al.*, 2008), en AtNit4 (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019) y en RsV51BNit (Sampieri, 2021; Fig. 3).



**Figura 9. Superficies de interacción en la familia de las superfamilias de las nitrilas.** Estructuras de los homotetrámeros de la N-carbamil-D-aminoácido amidohidrolasa (DCase) y de NitFhit. En la figura se marcan los ejes  $Y_m$ ,  $Z_m$ , este-oeste y norte-sur. A) Homotetrámero DCase con los ejes  $Y_m$  y  $Z_m$  (PDB: 1ERZ; Nakai *et al.*, 2000). B) Homotetrámero de la proteína de fusión de NitFhit de *Caenorhabditis elegans* con los ejes norte-sur y este-oeste (Pace *et al.*, 2000). Tomado y editado de (Nakai *et al.*, 2000; Pace *et al.*, 2000).

Las mutaciones en la superficie C tienen efecto sobre el estado oligomérico y la actividad. Por ejemplo: se han generado mutantes inactivas al eliminar secciones de dichas regiones en la CynD *P. stutzeri* AK61 y *B. pumilus* C1 (Sewell *et al.*, 2005). Se ha realizado “cysteine scanning” en dos regiones diferentes de la superficie C de la CynD de *B. pumilus* C1. La mayoría de las mutaciones tienen efectos sobre el estado oligomérico y la actividad de la enzima (Park *et al.*, 2016). En AtNit4, las paredes que delimitan el sitio activo no provienen de la misma subunidad. Un asa entre el residuo ochenta y dos y el residuo noventa y siete proveniente de la subunidad adyacente, forma una de las paredes (Fig. 3C). La formación de oligómeros a través de la superficie C es importante, ya que completa el sitio activo. Las mutaciones R95T L169A S224Q, las cuales se ubican en la superficie C, permiten que Nit4 obtenga actividad a una gama más amplia de sustratos (Mulelu *et al.*, 2019). La superficie C se ha observado a nivel atómico en la β-alanina sintetasa de *D. melanogaster* (2VHH; Lundgren *et al.*, 2008), en AtNit4 (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019) y en RsV51BNit (Sampieri, 2022; Fig. 4).



**Figura 10. Reconstrucciones tridimensionales de los filamentos de algunas nitrilasas y CynD.** En la figura se marcan las superficies de interacción. Tomado de (Thuku *et al.*, 2007). A) Espiral de CynD *Pseudomonas stutzeri* AK61 (Sewell *et al.* 2003). B) Filamento de la CynD de *Bacillus pumilus* C1 (Scheffer, 2006). C) Filamento de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku *et al.*, 2007). D) Filamento de la CynD de *Neurospora crassa* (Dent *et al.*, 2009). E) Filamento de la CynD de *Gloeocercospora sorghi* (Woodward *et al.*, 2008). En la imagen se indican la ubicación de las superficies de interacción A, C, D, E y F. Tomado de (Thuku *et al.*, 2007).

Al completarse una vuelta de la espiral o de un filamento, da la posibilidad de formar interacciones a través del surco de la espiral o del filamento (Fig. 10; Thuku *et al.*, 2009). La primera de estas superficies es la superficie D, la cual permite que interactúen las hélices alfas de los extremos del dímero  $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$ . La superficie D solo se ha observado en las reconstrucciones tridimensionales de los filamentos a partir de las imágenes de TEM de la CynD de *P. stutzeri* AK61 (Sewell *et al.*, 2003), la CynD de *Bacillus pumilus* C1 (Scheffer, 2006), la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku *et al.*, 2007) y la CynD de *Neurospora crassa* (Dent *et al.*, 2009; Fig. 10 A-D).

La otra superficie de interacción a través del surco de la espiral o filamento es la superficie F. Esta superficie solo se ha observado en las reconstrucciones tridimensionales de los filamentos de la CynD de *Neurospora crassa* (Dent *et al.*, 2009) y la CynD de *Gloeocercospora sorghi* (Woodward *et al.*, 2008). En las otras reconstrucciones de los filamentos, solo se aprecia un agujero en esta ubicación (Fig. 10 D-E).

A diferencia del resto de las superficies mencionadas anteriormente, la superficie E no tiene simetría rotacional. Es decir, la superficie E está formada por dos regiones diferentes, mientras que el resto de las superficies es la misma región que interactúa consigo mismas. La superficie E solo se ha observado en la de CynD *Pseudomonas stutzeri* AK61 (Sewell *et al.* 2003; Fig. 10 A). La presencia de esta superficie impide el crecimiento de los filamentos y genera una espiral corta con un número determinado de unidades (Park *et al.*, 2016).

En la estructura de un dodecámero de AtNit4, se ha visto a nivel atómico las interacciones a través de las superficies A y C (Fig. 3). Sin embargo, no se observan interacciones en las superficies D, E y F (Mulelu *et al.*, 2019). Se espera que el análisis de la estructura de RsV51BNit permita confirmar o negar la existencia de estas superficies. En caso de no existir las interacciones a través de la superficie D o F, la formación de filamentos largos dependería únicamente en las superficies A y C. En este sentido, el C-terminal tiene una contribución importante a las superficies A y C y adquiere mayor relevancia en estabilizar los filamentos.

### **Función del C-terminal en las nitrilasas**

Antes de contar con las estructuras de las nitrilasas, ya se sabía que el C-terminal tiene un papel importante en aspectos tan diversos como el estado oligomérico, la actividad enzimática, la estabilidad o el rango de pH al que la enzima es activa. Un primer indicativo de la importancia del C-terminal son los efectos en la enzima de las deleciones de diferentes secciones del C-terminal. Al eliminar cincuenta y cinco residuos del C-terminal la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, cincuenta y seis residuos del C-terminal de Nit6803, cincuenta y un residuos del C-terminal de la CynD de *Bacillus pumilus* C1 y treinta y cuatro residuos del C-terminal de la CynD de *Pseudomonas stutzeri*, se generan mutantes inactivas (Sewell *et al.*, 2005; Thuku *et al.*, 2007; Mulelu *et al.*, 2019). La eliminación de secciones más pequeñas del C-terminal puede generar mutantes activas con distintos efectos.

En el caso de la nitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* EBC191, la eliminación de secciones cada vez más largas del extremo C-terminal disminuye la actividad de la enzima con mandelonitrilo y 2-fenil propionitrilo y también disminuye la termoestabilidad de las mutantes. Además, se altera la proporción de ácido y amida formado y la enantioselectividad de la enzima con mandelonitrilo y 2-fenil propio nitrilo (Kiziak, Klein & Stolz, 2007).

La eliminación de fragmentos del C-terminal también puede aumentar la actividad y el estado oligomérico. Al eliminar los últimos treinta y nueve residuos del C-terminal de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, pasa de formar dodecámeros a filamentos activos de tamaño largo variable (Fig. 8; Thuku *et al.*, 2007). Al realizar cortes cada vez más largos sobre el C-terminal nitrilasa de RsV51BNit, se ha visto el aumento gradual del tamaño de los filamentos formados y de la actividad de las enzimas (Gómez, 2016). En este proyecto se logró eliminar hasta treinta y nueve residuos del C-terminal y formar una enzima activa (Gómez, 2016). Experimentos posteriores en el laboratorio generaron una enzima activa al eliminar cuarenta y nueve residuos del C-terminal. Al eliminar cincuenta residuos del C-terminal se generó una enzima activa, por lo que el límite es de cuarenta y nueve residuos.

También, existen ejemplos en los que se ha implicado al C-terminal sin ser el objetivo del estudio. En el caso de la CynD de *B. pumilus* C1 al cambiar el pH de 7.8 a 5.4, la enzima pasa de formar espirales cortas a formar filamentos largos (Jandhyala *et al.*, 2003). En este proceso se ha implicado a varias histidinas del C-terminal debido al pKa del grupo imidazol. Al disminuir el pH los residuos se protonan y adquieren una carga positiva. La cercanía de estas cargas genera repulsión en la luz de la espiral, expandiendo su diámetro, lo que evita se den las interacciones de la superficie E que llevan a la formación de las espirales cortas (Fig. 10) y provocando el alargamiento de la espiral (Thuku *et al.*, 2009). En experimentos de evolución dirigida en la nitrilasa de *Acidovorax facilis* ZJB09122 para encontrar mutantes con una mayor termoestabilidad, sin perder la regioselectividad, dos de las tres mutaciones obtenidas ocurrieron en el C-terminal (Xu *et al.*, 2018).

Una propuesta interesante, ya conociendo la importancia del C-terminal, es crear mutantes trucas con la intención de mejorar alguno de estos parámetros. Un buen ejemplo son las quimeras de la CynD de *Pseudomonas stutzeri* AK61 y *Bacillus pumilus* C1. Al intercambiar el C-terminal de la CynD de *B. pumilus* C1 en la CynD de *P. stutzeri* AK61 se generan mutantes inactivas; mientras que el C-terminal de *P. stutzeri* AK61 en la CynD de *B. pumilus* C1 genera mutantes activas (Sewell *et al.*, 2005). Un caso interesante es el resultado de cambiar el C-terminal de la CynD de *B. pumilus* C1 por el C-terminal de *P. stutzeri* AK61. Aunque no se alteran los parámetros cinéticos, el rango de pH en el que la enzima es activa aumenta, así como la termoestabilidad (Crum *et al.*, 2015). Las quimeras de la nitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* EBC191 con el C-terminal de las nitrilasas de *R. rhodochrous* o *A. faecalis* tienen parámetros similares a la nitrilasa silvestre. Cuando el fragmento del C-terminal intercambiado es muy largo, la nitrilasa se comporta como las mutantes trucas mencionadas anteriormente (Kiziak, Klein & Stolz, 2007). Esto parece indicar que hay secciones del C-terminal que son importantes para la actividad, la enantioselectividad y la termoestabilidad (Kiziak, Klein & Stolz, 2007).

## Métodos *in silico* en las nitrilasas

El aumento del poder de cómputo y la cantidad de información biológica depositada, han permitido el desarrollo de técnicas computacionales para estudiar problemas biológicos. En la actualidad se presenta un incremento en el uso de técnicas computacionales como el acoplamiento molecular y la dinámica molecular y se refleja en el número de publicaciones en las que son usadas (Chen, 2015; Hollingsworth & Dror, 2018). Además, en la era post-genómica se cuenta con una gran cantidad de secuencias depositadas, aunque la función y actividad de las proteínas codificadas de estas secuencias depositadas se desconoce. No obstante, al unir esta información con la información de las estructuras resueltas y las enzimas caracterizadas es posible encontrar enzimas con alguna actividad en específico.

Uno de los métodos computacionales más empleados en la actualidad es la minería de genomas, la cual permite encontrar y anotar un gran número de secuencias y suele ser más rápida que los métodos tradicionales, como los medios selectivos, para descubrir nuevas enzimas. Por ejemplo, con la finalidad de encontrar nitrilasas con actividad por mandelonitrilo, Seffernick *et al.* (2009) usaron técnicas de minería de genomas y encontraron doscientas doce nitrilasas. Posteriormente, se seleccionaron tres nitrilasas con base a los motivos de secuencia en cinco regiones claves para la actividad de las nitrilasas. Dos de las tres nitrilasas seleccionadas tienen una alta actividad por mandelonitrilo, demostrando la eficacia de esta técnica (Seffernick *et al.*, 2009).

También se han usado la minería de datos y los motivos de secuencia para agrupar a las nitrilasas. Sharma & Bhalla (2012) diseñaron y validaron motivos de secuencia de aminoácido específicos para nitrilasas aromáticas y nitrilasas alifáticas con base en la secuencia de nitrilasas ya caracterizadas. Con estos motivos de secuencia, se identificaron ciento treinta y ocho nuevas nitrilasas en dos mil genomas bacterianos. Seleccionaron nueve de las ciento treinta y ocho secuencias y las caracterizaron. Las nitrilasas descubiertas presentan tendencias por nitrilos aromáticos y alifáticos. No obstante, las nitrilasas son capaces de hidrolizar más de un tipo de nitrilo, a pesar de pertenecer a otro grupo (Sharma *et al.*, 2017).

Recientemente, la diferencia entre la cantidad de secuencias depositadas y las enzimas caracterizadas se ha incrementado con el surgimiento de nuevas técnicas de secuenciación “Next-generation sequencing”. Una de las propuestas es usar métodos computacionales como el “Machine learning” para anotar las secuencias. En el caso de las nitrilasas, este método tiene una tasa de éxito del 95 % para diferenciar nitrilasas aromáticas de alifáticas. Estas nuevas técnicas pueden ser usadas para predecir las características y funciones de las secuencias obtenidas (Sharma *et al.*, 2018).



Otras técnicas computacionales han sido importantes en el estudio de las nitrilasas. Las dinámicas moleculares y los acoplamientos proteína ligando han permitido explicar y predecir la actividad de algunas nitrilasas con un éxito considerable. Una dinámica molecular en USCF Chimera permitió explicar la función de la inserción entre las posiciones ochenta y nueve y noventa y dos de acuerdo con el alineamiento y por qué la modificación de la arginina noventa y cinco por treonina altera la actividad de AtNit4 (Fig. 4; Mulelu *et al.*, 2019). Los resultados indican que esta inserción funciona como una puerta para el sitio activo. Modificaciones en esta región abren o cierra el sitio activo al solvente y alteran su tamaño.

Debido a que el primer paso del mecanismo de reacción implica el ataque nucleofílico del tiol de la cisteína catalítica al carbono del grupo nitrilo, se ha propuesto que la distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano ( $D_{c-s}$ ) podría ser un indicativo de la actividad. A menor distancia entre el tiol de la cisteína catalítica y el carbono del grupo nitrilo, es más probable que se dé un ataque nucleofílico (Zhang *et al.*, 2014). La distancia  $D_{c-s}$  en conjunto con la orientación del grupo ciano en la cavidad catalítica, se han usado para estudiar la actividad catalítica de varias nitrilasas de los basidiomycota *Trametes versicolor*, *Armillaria gallica* y la cianuro hidratasa de *Stereum hirsutum*. El análisis no predijo con exactitud la actividad de estas con distintos sustratos. No obstante, predijo la actividad de *Stereum hirsutum* y *Armillaria gallica* con cianuro de hidrógeno. La actividad por cianuro de la cianuro hidratasa de *Stereum hirsutum*, era esperada, mientras que la actividad de la nitrilasa de *Armillaria gallica* fue inesperado (Rucká *et al.*, 2019).

En la nitrilasa de *Syechocystis sp.* PCC6803 (Nit6803) se realizó dinámica molecular con la enzima silvestre y algunas mutantes contra dos sustratos, fumaronitrilo y 3-cianopiridina. Se encontró que la distancia  $D_{c-s}$  correlacionaba bien con los parámetros cinéticos de esta enzima con fumaronitrilo. Al usar 3-cianopiridina, se encontró que permitía distinguir la baja actividad de la enzima silvestre y la mayor actividad de las mutantes. Incluso, se probó la dinámica con un control, una mutante inactiva, y se encontró una distancia mayor a la silvestre (Zhang *et al.*, 2014).

Las dinámicas moleculares también se han utilizado para alterar la actividad de la nitrilasa Nit6803 para formar amida como producto de la reacción enzimática. (Jiang *et al.*, 2017) realizó dinámicas moleculares en un complejo enzima sustrato con Nit6803. Al realizar las dinámicas con distintos mutantes de Nit6803 se encontró que si la diferencia  $D_{s-o} - D_{n-o}$  es menor a cero, la enzima tendía a la formación de amina y si la diferencia era mayor a cero, se daba la formación del ácido carboxílico. En esta prueba,  $D_{s-o}$  es la distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el oxígeno más cercano del grupo ácido del glutamato cincuenta y tres, uno de los residuos catalíticos y  $D_{n-o}$  es la distancia entre la distancia entre el nitrógeno del grupo ciano y el oxígeno más cercano del grupo ácido del glutamato cincuenta y tres. Estos ejemplos parecen indicar que las técnicas computacionales podrían hacer buenas predicciones de la actividad de alguna nitrilasa ante cierto sustrato.

## Antecedentes

En el laboratorio se trabaja con tres nitrilasas como modelos experimentales: la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B; y NIT2 y NIT4 de *Arabidopsis thaliana*.

La enzima más estudiada en el laboratorio es la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B (RsV51BNit), la cual fue aislada en el laboratorio (Leyva, 2009) y ha sido ampliamente estudiada. RsV51BNit puede hidrolizar benzonitrilo, acrilonitrilo, propionitrilo, adiponitrilo y valeronitrilo. Se estimó el tamaño de RsV51BNit por filtración en gel y dispersión dinámica de luz (DLS). El peso estimado por filtración en gel de RsV51BNit corresponde a un oligómero formado entre diez a doce subunidades. Mientras, por DLS se estimó un  $R_h$  de 15 nm y un peso de  $406.1 \pm 68.2$  kDa que corresponde a diez subunidades (Cáliz, 2015). Ambos concuerdan en el número de subunidades que forma el oligómero de RsV51BNit.

Se ha estudiado el efecto de las modificaciones del C-terminal de RsV51BNit en la actividad y en la capacidad para formar filamentos. Anteriormente, se encontró que al eliminar treinta y nueve residuos de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, esta forma filamentos (Thuku, *et al.*, 2007). En él, se estudió sistemáticamente el efecto de eliminar progresivamente secciones cada vez más grandes del C-terminal de RsV51BNit. Se encontró que al ir recortando el C-terminal se incrementa la actividad y el tamaño de los oligómeros hasta eliminar treinta y nueve residuos, NitRspC $\Delta$ 39 (Gómez, 2015). Al eliminar cuarenta y nueve residuos del C-terminal, NitRspC $\Delta$ 49, el tamaño de los oligómeros se reduce, aunque la enzima es activa. Si se elimina un residuo más del C-terminal, NitRspC $\Delta$ 50, genera una mutante inactiva lo que sugiere que cuarenta y nueve residuos es el límite de residuos que se pueden eliminar.

Mutaciones a lo largo del C-terminal pueden alterar el tamaño de los oligómeros y la actividad de las enzimas. La inserción de una lisina en la posición trescientos treinta y nueve, y la mutación de la glicina trescientos treinta y ocho por un glutamato aumentan ligeramente la actividad y el tamaño de los oligómeros. La mutación de la prolina trescientos treinta y uno por una tirosina o una alanina provoca que las enzimas pierdan estructura. Como consecuencia, las enzimas resultantes pierden actividad y son proclives a formar agregados (Larrañaga, 2019).

La formación de filamentos de RsV51BNit también se puede inducir con la adición de benzonitrilo, un sustrato. Al eliminar secciones cada vez más largas del C-terminal, el efecto es más marcado. La nitrilasa silvestre no presenta un cambio significativo en el tamaño tras la adición del benzonitrilo, mientras que la NitRspCΔ39 forma agregados con un  $R_h$  en el orden de miles de nanómetros. Aunque NitRspCΔ49 no forma oligómeros tan grandes, al agregar benzonitrilo es capaz de formar agregados del mismo orden que NitRspCΔ39.

Como se mencionó anteriormente, *Arabidopsis thaliana* cuenta con cuatro nitrilasas divididas en dos familias. La familia NIT1 está formada por NIT1, NIT2 y NIT3 y la familia NIT4 está formada exclusivamente por NIT4 (Piotrowski, 2008). En el grupo de trabajo se ha caracterizado la actividad de NIT2 por 2-metilglutaronitrilo, 3-fenilpropionitrilo, 4-fenilbutironitrilo, acrilonitrilo, adiponitrilo, cianuro de alilo, cinamonitrilo, crotononitrilo, octanonitrilo, propionitrilo y valeronitrilo y la actividad de NIT4 a β-ciano alanina, 2-metilglutaronitrilo, 3-fenilpropionitrilo, 4-fenilbutironitrilo, adiponitrilo, cianuro de alilo y valeronitrilo. Además, en el caso de NIT4 se estudia el efecto de mutaciones en la actividad y en la capacidad de formar filamentos.

Recientemente, se publicó la estructura de NIT4 de *Arabidopsis thaliana*, AtNit4, (Mulelu *et al.*, 2019) y en el grupo de trabajo se obtuvo la estructura de la mutante trunca NitRspCΔ39 de la nitrilasa *Rhodococcus sp.* V51B. La estructura, no se ha publicado, pero se cuenta con una estructura previa. Ambas estructuras amplían el conocimiento que se tiene de las estructuras de las nitrilasas y permite visualizar por primera vez la superficie C a nivel atómico. Se espera que el análisis de estas estructuras abra la posibilidad de comprender las interacciones responsables de la formación de filamentos y la posibilidad de crear mutantes racionalmente que afecten el estado oligomérico y la actividad.

## Justificación

De acuerdo con las estructuras de AtNit4 y RsV51BNit el C-terminal ayuda a estabilizar las superficies de interacción A y C por medio de dos hebras betas que interactúan con los C-terminales de las subunidades aledañas. Esto sugiere que estas dos regiones podrían ser importantes para la afinidad de estas superficies de interacción y, en consecuencia, alterar el número de subunidades que conforman los oligómeros. Además, en las nitrilasas la formación de oligómeros es un proceso ligado a la actividad de estas. Dado que el C-terminal se proyecta fuera de la parte globular de la enzima y no forma parte de la cavidad del sitio activo, las modificaciones del C-terminal pueden alterar el estado oligomérico de las enzimas con el menor impacto posible en el sitio activo. Son estas razones las que convierten al C-terminal en un blanco interesante para ser modificado.

Se propone que el conocimiento brindado por las estructuras obtenidas permita crear mutantes racionalmente que alteraren estado oligomérico. Se espera que los conocimientos obtenidos de este proyecto puedan ser aplicados en otras nitrilasas.

## Hipótesis

Dado que las estructuras tridimensionales resueltas de las nitrilasas de *Arabidopsis thaliana* y *Rhodococcus sp.* V51B muestran que el C-terminal es crucial para estabilizar los filamentos helicoidales, se espera que la eliminación de secciones del C-terminal modifique las interacciones entre subunidades, con lo cual se modifica la estructura de las proteínas.

## Objetivo principal

Generar mutantes en las nitrilasas de *Rhodococcus sp.* V51B y *A. thaliana* que eliminen las interacciones que estabilizan los filamentos helicoidales y obtener una unidad oligomérica mínima, activa y cristalizable.

## Objetivos particulares

- Diseñar mutantes en las nitrilasas de *Rhodococcus sp.* V51B y *A. thaliana* que eliminen las interacciones de las superficies de interacción
- Determinar el efecto de las mutaciones en la actividad de las enzimas
- Estimar la estructura secundaria de las mutantes con dicroísmo circular para conocer el efecto de las mutaciones en el plegamiento
- Medir los radios hidrodinámicos de las mutantes por dispersión dinámica de luz para estimar el estado oligomérico
- Conocer los estados oligoméricos de las mutantes por medio de TEM
- Estudiar el sitio activo de las mutantes por medio de acoplamiento molecular y dinámica molecular para conocer el efecto de las mutaciones en el sitio activo

## Metodología

### Evaluación de las estructuras

Antes de realizarse cualquier análisis con las estructuras de la nitrilasas de AtNit4 (PDB: 6I00; Mulelu *et al.*, 2019) y de RsV51BNit, ambas estructuras se evaluaron en los servidores MolProbity y SWISS-MODEL (Chen *et al.*, 2009). En MolProbity se evaluaron los contactos, las distancias y ángulos de los enlaces covalentes, la probabilidad de los rotameros y la concordancia de los valores de  $\phi$  y  $\psi$  con los valores teóricos posibles. Además, se analizaron las estructuras con los puntajes de CaBLAM y Z-score. Estos puntajes se incluyeron en el servidor MolProbity para evaluar específicamente estructuras resueltas por Cryo-EM (Prisant *et al.*, 2019; Sobolev *et al.*, 2020).

El Z-score compara todos los valores  $\phi$  y  $\psi$  de una estructura con los valores  $\phi$  y  $\psi$  de una biblioteca de estructuras resueltas por cristalografía de rayos x a alta resolución. El Z-score indica que tan probable es encontrar la distribución de los valores de  $\phi$  y  $\psi$  de una estructura (Sobolev *et al.*, 2020). CaBLAM (C-Alpha Based Low-resolution Annotation Method) calcula una serie de valores a partir del carbono  $\alpha$  de cada aminoácido y los compara con una biblioteca de estructuras a alta resolución. El cálculo se extiende a una ventana de cinco aminoácidos y permite inferir la posición del carbono del enlace peptídico (Prisant *et al.*, 2019). En el servidor de SWISS-MODEL se obtuvo el score de MolProbity, el cual es una combinación ponderada del logaritmo de otros puntajes. Entre los puntajes que incluye se encuentra el clashscore, porcentaje de aminoácidos en posiciones no favorecidas en el gráfico de Ramachandran y el porcentaje de rotameros no favorecidos (Chen *et al.*, 2009).

También se reporta el valor de QMEAN por residuo en el servidor de SWISS-MODEL. El puntaje va de cero a uno, en el cual uno indica un aminoácido es ideal y cero no es ideal. Valores menores a seis décimas se consideran problemáticos. El puntaje usa la interacción átomo, interacción entre los CB, el empaquetamiento alrededor del residuo en cuestión, los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  del residuo en cuestión y los dos aledaños, la concordancia en la accesibilidad al solvente de la estructura y la calculada por ACCpro, la concordancia en la estructura secundaria y la calculada por PSIPRED, la accesibilidad al solvente en calculado  $\text{\AA}^2$  por DSSP, el empaquetamiento de CB, Clash score y el número de C $\alpha$  a 15  $\text{\AA}$  (Studer *et al.*, 2019).

Aparte de estos dos servidores se usó Rosetta para evaluar la calidad de la estructura. Se usó la función score de Rosetta, la cual evalúa la energía de una molécula al asignarle un puntaje. Este puntaje tiene la misma convención que la energía libre de Gibbs, por lo que valores negativos, indican estructuras favorables y valores positivos indican estructuras desfavorables. Por último, se usó el protocolo Rd.HMM, el cual se basa en la obtención de la secuencia de aminoácidos a partir de la estructura de la cadena principal de una proteína (Martínez-Castilla & Rodríguez-Sotres, 2010). A partir de las secuencias obtenidas se genera un modelo oculto de Markov y se busca la secuencia de una base datos. En el trabajo se tomaron dos monómeros y se generaron diez secuencias por monómero. Cada secuencia al azar se reconstruyó diez veces. Por lo tanto, se generaron cien secuencias a partir del cual se generó un modelo oculto de Markov. En AtNit4 se usaron las cadenas F y G y en RsV51BNit se usó las cadenas C y D.

#### **Refinamiento de la estructura de AtNit4**

Los resultados de la evaluación de la estructura de AtNit4 indicaron que la estructura contenía problemas, por lo que se decidió refinar. Antes de refinar la estructura se reconstruyó una región no resuelta en Coot. Esta región se encuentra entre el residuo doscientos cincuenta y dos y el residuo doscientos setenta y cinco. El primer paso de relajamiento consistió en relajar la estructura en Rosetta. El segundo paso fue ajustar la estructura al mapa de potencial de Coulomb publicado con Refmac. Se volvió a evaluar la estructura y se refinaron problemas puntuales a mano con Coot. El proceso se repitió hasta que la estructura dejó de mejorar. En ese momento los puntajes indicaban que la calidad de la estructura había mejorado y se mantuvo un buen ajuste al mapa de potencial de Coulomb.

#### **Red de interacciones de residuos**

Se construyó una red de interacciones de residuos de las estructuras de AtNit4 y de RsV51BNit en el servidor Ring 2.0, para decidir que posiciones mutar por codones de paro. Se usaron las distancias dadas por defecto del servidor para calcular el tipo de interacciones entre los aminoácidos. Se indicó que la red no tuviera interacciones redundantes. Las redes de interacciones generadas se descargaron y analizaron en el programa Cytoscape.

De este proceso se plantearon las posiciones doscientos noventa y tres, doscientos noventa y cuatro, trescientos y trescientos tres de RsV51BNit para ser mutadas por un codón de paro y generar las mutantes truncas NitCRsp $\Delta$ 74, NitCRsp $\Delta$ 73, NitCRsp $\Delta$ 66 y NitCRsp $\Delta$ 64 respectivamente. También se plantearon las posiciones trescientos veintidós, trescientos veintisiete y trescientos cuarenta para ser mutadas por un codón de paro y generar las mutantes truncas NitAtC $\Delta$ 34, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 16 respectivamente.



### **Acoplamiento molecular con AutoDock Vina flexible**

Se realizó acoplamiento molecular flexible de RsV51BNit con una lista de sustratos estudiados anteriormente en el laboratorio en el programa AutoDock Vina. Los residuos de la cavidad catalítica se ubicaron manualmente en PyMol y se marcaron como residuos flexibles. La lista de sustratos provino de un trabajo anterior en la que se probó una lista de sustratos (Romero, 2018). Los sustratos se descargaron de PubChem y se prepararon en Babel. Se realizaron acoplamientos moleculares con un máximo de ciento cincuenta modelos, con una exhaustividad de veinte, y un rango de energía de 7 kcal/mol.

### **Acoplamiento molecular AutoDock4 hidratado**

Se realizó acoplamiento molecular flexible de nitrilasa AtNit4 con el sustrato,  $\beta$ -ciano alanina, hidratado en el programa AutoDock4. Los residuos de la cavidad catalítica se ubicaron manualmente en PyMol y se marcaron como residuos flexibles. Se realizó un acoplamiento molecular con la  $\beta$ -ciano alanina y como control se realizó acoplamiento molecular con la  $\beta$ -ciano alanina sin hidratar. El sustrato se descargó de PubChem y se preparó en el programa Avogadro. Se realizó una búsqueda con un algoritmo genético con una población de trescientos, veinticinco millones de evaluaciones, veintisiete mil generaciones y cien resultados. Debido a la forma en la que se reportan los resultados del acoplamiento molecular AutoDock4 hidratado solo se reportó el resultado con la mayor afinidad. Por lo tanto, del control solo se reportó el resultado con mayor afinidad.

### **Selección de conformaciones**

Los resultados de acoplamiento molecular se guardaron como un archivo pdb y se analizaron en PyMol. Se usaron dos argumentos para seleccionar los resultados reportados. El primer argumento fue la menor distancia entre el carbono del grupo ciano y el azufre de la cisteína de la tétrada catalítica, ya que esta distancia se ha correlacionado con la actividad de una enzima en dinámica molecular (Zhang *et al.*, 2014). El segundo argumento fue la conformación con la mayor afinidad calculado por el programa de acoplamiento molecular.

## Estimación de la afinidad la superficie A y la superficie C por acoplamiento Proteína-Proteína

Se estimó la afinidad de las superficies de interacción A y C en la nitrilasa AtNit4 y sus mutantes truncas NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34; y RsV51BNit y sus mutantes truncas NitCRsp $\Delta$ 64, NitCRsp $\Delta$ 66, NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 al realizar acoplamiento molecular proteína-proteína en el servidor ClustPro. Las mutantes truncas se generaron al eliminar los residuos del C-terminal correspondientes a cada mutante en PyMol. La energía reportada proviene de la energía de la conformación más cercana a la posición original de la proteína seleccionada como ligando, la cual se conoce debido a que tanto AtNit4 como RsV51BNit se resolvieron como oligómeros. La función de energía de ClustPro tiene cuatro factores: fuerza de atracción, fuerza de repulsión, interacciones de Van der Waals y una energía de desolvatación (Kozakov *et al.*, 2017). La superficie A de RsV51BNit se evaluó al usar la cadena C como receptor y la cadena D como ligando. La superficie C de RsV51BNit se evaluó al usar las cadenas C y D como receptor y las cadenas A y B como ligando. La superficie A de la AtNit4 se evaluó al usar la cadena E como receptor y la cadena F como ligando. La superficie C de AtNit4 se evaluó al usar las cadenas C y D y como receptor y las cadenas E y F como ligando. La energía reportada es la energía de la conformación más poblada.

## Dinámicas moleculares de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 con $\beta$ -ciano alanina

Antes de iniciar la dinámica, se protonó AtNit4 en USCF Chimera. Las argininas y lisinas están protonadas y los glutamatos y aspartatos están desprotonados. El sustrato  $\beta$ -ciano alanina se preparó en el programa Avogadro. La posición inicial del sustrato provino de un acoplamiento molecular en AutoDock4 Vina en la cadena F. Se usaron seis subunidades, para garantizar que el dímero de en medio tuviera todos los contactos necesarios. Las distintas mutantes truncas, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29, se generaron al eliminar las regiones del C-terminal correspondiente a cada mutante en PyMol. La dinámica molecular se realizó en Amber 14 con el campo de fuerza ff99SB. El campo de fuerza para el ligando fue Generalized Amber Force Field (GAFF). EL complejo enzima sustrato fue solvatado en un octaedro de agua TIP3P y se usaron iones de sodio para neutralizar la carga de la enzima. El sistema se equilibró durante 100 ps a una temperatura de 303.15 k y se corrió una dinámica durante 20 ns a 303.15 k. Los valores de RMSD, RMSF y la distancia entre el carbono del grupo ciano y el azufre de la cisteína de la tétrada catalítica D<sub>C-S</sub> a lo largo de la dinámica se calcularon en cpptraj.

### Cálculo la energía de unión proteína-ligando con MM/PBSA y MM/GBSA

Se calculó la energía de unión entre AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29; y la β-ciano alanina en Amber 14 con los métodos de Dinámica molecular y cálculos de área superficial con el método Poisson Boltzmann (MM/PBSA) y Dinámica molecular y cálculos de área superficial con el método Born Generalizado (MM/GBSA). Se escogió un intervalo 17.5 y 19.5 ns, ya que en esta conformación se encontraron las diferencias más claras en la distancia  $D_{c-s}$ . El cálculo de MM/PBSA se realizó con una fuerza iónica de 0.1, mientras que el cálculo de MM/GBSA se realizó con una concentración de sal de 0.1 e  $igb = 2$ .

$$G = E_{bnd} + E_{el} + E_{vdW} + G_{np} + G_{pol} - TS \quad (1)$$

El cálculo de la energía se hace con la ecuación 1, en la que  $E_{bnd}$  representa la energía de los enlaces (enlaces, ángulos y dihedrales),  $E_{el}$  representa las interacciones electroestáticas,  $E_{vdW}$  representa las interacciones de Van der Waals,  $G_{np}$  representa la contribución nopol a la energía libre de solvatación y  $G_{pol}$  representa la contribución polar a la energía libre de solvatación. La diferencia entre MM/PBSA y MM/GBSA es como se calcula la contribución polar a la energía libre de solvatación ya sea, con el método Poisson Boltzmann (PB) o con el método Born Generalizado (GB). TS es la entropía multiplicada por la temperatura en Kelvin. En este proyecto no se contemplo la entropía por su coste computacional.

$$\Delta G_{bind} = \langle G_{PL} - G_P - G_L \rangle_{PL} \quad (2)$$

Para calcular la energía de unión proteína ligando, se calcula la energía de la proteína ligando unidos ( $G_{PL}$ ), la proteína sola ( $G_P$ ) y el ligando solo ( $G_L$ ) usando la ecuación 1. Posteriormente, la energía de unión se calcula con la ecuación 2 usando los resultados anteriores. Debido a que el cálculo de energía proviene de una única dinámica molecular con el ligando unido a la proteína, el cálculo de  $G_P$  y  $G_L$  se hace con la misma dinámica. En esta condición el término  $E_{bnd}$  se cancelan, ya que no hay una diferencia entre la proteína y el ligando unidos o separados.

## Transformación bacteriana de células quimiocompetentes

Se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ , Rosetta™(DE3)pLysS o BL21-pGro7) al mezclar 50  $\mu$ l de células con 2.5  $\mu$ l de plásmido (pET-22b(+), pET-24b(+)) o pGEM®-T Easy Vector) con el gen de interés. Primero, las células con el plásmido se incubaron 15 min en hielo, para favorecer la mezcla homogénea de ambas. Después, las células con plásmido se pasaron a un baño maría a 42 °C durante 55 s. Posteriormente, se retiraron las células del baño y se incubaron 2 min en hielo. Luego, las células con plásmido se resuspendieron en 1 ml de medio Luria Bertani (LB) Posteriormente, las células se incubaron 1 h a 37 °C y 200 rpm. Por último, las células se sembraron en cajas de medio LB sólido y se dejaron en la incubadora toda la noche a 37 °C. Las células BL21(DE3) pLysS se sembraron en cajas con cloranfenicol. Las células BL21-pGro7 se sembraron en cajas con cloranfenicol y arabinosa. Las células Rosetta™(DE3)pLysS se sembraron en cajas con cloranfenicol.

## Purificación de DNA por lisis alcalina

Antes de empezar la purificación, se inocularon tubos con 10 ml de medio LB con células *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido y gen de interés. Se incubaron a 37 °C a 200 rpm. Al día siguiente se cosecharon las células y la pastilla formada se resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución, 50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, lisozima 10 mg/mL y Tris-HCl a pH 8.0. Posteriormente, se incubaron 45 min a 37 °C. Al acabar la incubación, se agregó 200  $\mu$ l de una solución recién preparada de 0.2 M de NaOH y 4 % SDS y se incubó la mezcla 10 min en hielo. Al terminar, se adicionó 150  $\mu$ l de una solución 5 mM de Acetato de Potasio a pH 5. La mezcla recién hecha se volvió a incubar en hielo y después de 10 min de incubación en hielo, se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 200  $\mu$ l de fenol y 200  $\mu$ l de cloroformo, formando dos fases. La fase superior se recuperó y se le agregó 750  $\mu$ l de 2-propanol y se incubó 3 h a temperatura ambiente. Luego, la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. La pastilla formada se recuperó con cuidado y se desechó la fase acuosa. Por último, se eliminó el fenol restante por medio de lavados con alcohol etílico al 70 %.

## Subclonación

Primero, el plásmido con el gen a ser subclonado y el vector y el receptor ya purificados se digirieron con las enzimas de restricción *HindIII*-HF y *NdeI*, ambas proveídas por NEB, usando el protocolo de la tabla II. La mezcla se incubó 4 h a 37 °C. Al acabar la incubación, los fragmentos linealizados, producto de la digestión, se separaron en un gel de agarosa al 1 %.

Tabla II. Concentración de reactivos para la digestión

Reactivo	Cantidad
DNA	4000 ng
Buffer 10X CutSmart (NEB)	8 µl
<i>HindIII</i> -HF	4 µl
<i>NdeI</i>	4 µl
H <sub>2</sub> O	Completar a 80 µl

Una vez separadas los distintos fragmentos en el gel, se tiñó el gel con Bromuro de etidio. Las bandas de los fragmentos correspondientes al vector receptor y el inserto de interés se cortaron. El inserto y el plásmido linealizado se recuperaron con el kit “Agarose Gel Extraction Kit” de Jena Bioscience. Una parte del DNA recién purificado y linealizado se corrió en un gel de agarosa 1 % para estimar la concentración y confirmar la presencia del inserto.

Para la ligación se usó el kit “T4 DNA Ligase” de Thermofisher. La proporción vector inserto para la ligación se calcularon por medio del programa “NEBioCalculator”. Las concentraciones usadas en la ligación se encuentran en la tabla III. La reacción de ligación se dejó un mínimo de un día y un máximo de tres días a 16 °C.

Tabla III. Concentración de los reactivos para la ligación.

Reactivo	Cantidad
pET-24b(+) : inserto	1:3
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	Completar a 20 µl

## **Sobreexpresión de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ64, NitCRspΔ66, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74**

Antes de la sobreexpresión, se inocularon 10 ml de medio LB con células quimiocompetentes de *Escherichia coli* BL21-pGro7 transformadas con las mutantes de RsV51BNit en el plásmido pET-24b(+) y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se inoculó un litro de medio LB con el medio con células. Tanto el litro de medio como los diez mililitros de medio contienen kanamicina a una concentración de 30 µg/mL y cloranfenicol a una concentración de 25 µg/mL y al litro de medio también se añadió Arabinosa a una concentración de 50 mg/mL. El medio se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica 0.6 a 600 nm y luego, se adicionó Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0.4 mM y se incubó 6 h a 22 o 30 °C a 200 rpm. Al finalizar la inducción, el litro de medio se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y se guardó la pastilla.

### **Lisis por sonicación de las células BL21-pGro7**

Las pastillas se resuspendieron en 40 mL de amortiguador de lisis (100 mM Tris, 150 mM KCl y 1 mM EDTA) o en 40 mL de amortiguador 20 mM Tris, 1 mM EDTA y 0.150 M NaCl pH 7.8 y se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final 0.2 mM. Las células resuspendidas se rompieron por sonicación con un procesador ultrasónico de 500 W de la marca Cole-Parmer ® al aplicar diez pulsos de 35 % de amplitud durante 10 s y descansos de 1 min entre pulso. Las células fragmentadas se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 min. La pastilla se desechó y se recuperó el sobrenadante.

### **Purificación de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74**

En el primer paso de purificación de las mutantes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74, se adicionó al sobrenadante, sulfato de amonio hasta el 20 % de saturación. El sobrenadante se incubó de uno a tres días a 4 °C y después, se centrifugó a 15000 rpm durante 20 min. La pastilla de proteínas precipitadas con sulfato de amonio se resuspendió en 5 ml de amortiguador A.1 (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 14.25 mM B-Mercaptoetanol a pH 7.8) y se dializó una noche en ese mismo buffer. Antes de inyectar la muestra, se filtró la muestra. Luego, se inyectó en la columna S-300 a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE y las fracciones más puras se juntaron y concentraron. Después, las proteínas se inyectaron en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP. Las proteínas se eluyeron en un gradiente de 0.1 a 1 M de NaCl a un flujo de 5 mL/min. Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE y las fracciones más puras se juntaron y concentraron. La muestra se dializó una noche en 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 14.25 mM B-Mercaptoetanol a pH 7.0 (Amortiguador A.2) y por último, se volvió a pasar por la columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP con un gradiente de 0.1 a 1 M de NaCl a un flujo de 5 mL/min.

### **Purificación de las mutantes de RsV51BNit, NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66**

Aunque las mutantes NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66 presipitan con sulfato de amonio, no se pudieron resolubilizar. Por lo tanto, se usó un método diferente. Las células se rompieron por sonicación en un amortiguador 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.150 M NaCl y 0.2 mM PMSF a pH 7.8. Las células fragmentadas se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 min. La pastilla se desechó y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se pasó por una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP. El amortiguador de inicio 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl y 14.25 mM β-mercaptoetanol a pH 7.8 y se incrementó la concentración de sal usando el amortiguador 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl y 14.25 mM β-mercaptoetanol a pH 7.8. Las proteínas eluyeron al 20 % del amortiguador del buffer 1 M de NaCl, es decir eluyó a una concentración de 305 mM de NaCl. Las proteínas se dializaron en amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, 150 mM de NaCl y 1 mM de EDTA a pH 7.0 y se volvieron a pasar por una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP. Las proteínas eluyeron al 40 % de amortiguador 1 M de sal es decir a 490 mM de NaCl. Por último, las fracciones resultantes se concentraron y se pasaron por una columna de filtración en gel S-300.

### **Sobreexpresión de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34.**

Antes de la sobreexpresión, se inocularon 10 ml de medio LB con células quimiocompetentes de *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)pLysS transformadas con las mutantes de AtNit4 en el plásmido pET-22b(+) y se adicionó ampicilina a una concentración de 100 µg/ y cloranfenicol a una concentración de 25 µg/mL. El medio se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se inoculó 250 ml de medio LB con el medio con células. Los 250 ml de medio también tienen ampicilina a una concentración de 100 µg/ y cloranfenicol a una concentración de 25 µg/mL. El medio se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica 0.6. Luego, se adicionó IPTG hasta una concentración final de 0.4 mM y se incubó 8 h a 22 °C a 200 rpm. Al finalizar la inducción, los 250 ml de medio se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min y se guardó la pastilla.

### **Lisis por sonicación de las células Rosetta™(DE3)pLysS**

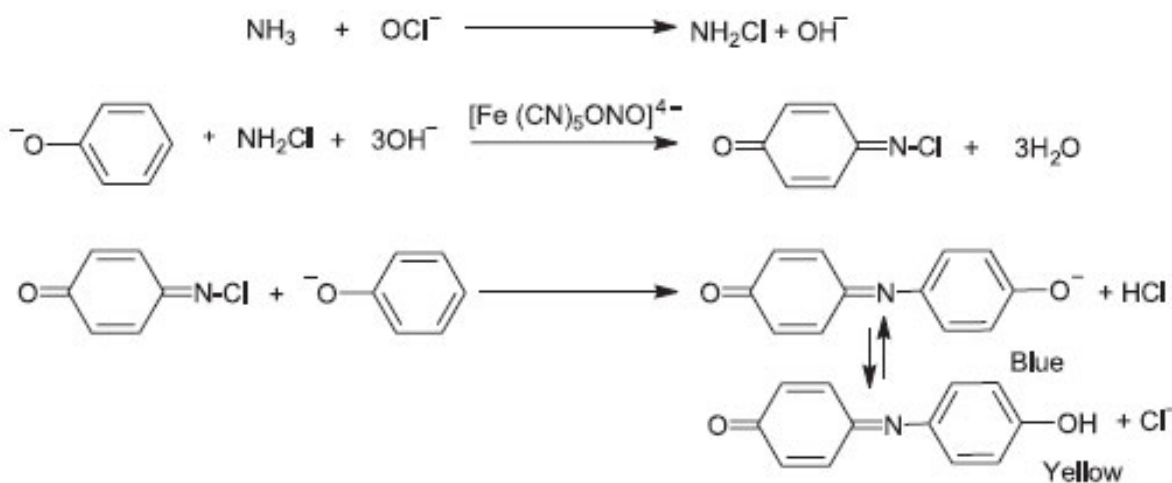
La pastilla se resuspendió en 10 mL de amortiguador A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, Imidazol 5 mM, 500 mM NaCl). Las células resuspendidas se rompieron en el sonicador con procesador ultrasónico de 500 W de la marca Cole-Parmer ® al aplicar 10 pulsos de 35 % de amplitud durante 10 s y descansos de 1 min entre pulso. Las células fragmentadas se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 min. Antes de sonicar se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final 0.2 mM. La pastilla se desechó y se recuperó el sobrenadante.

## Purificación de los mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34.

El sobrenadante se filtró y se inyectó a una columna de afinidad HisTrap HP. La proteína eluyó alrededor del 20 % de amortiguador B (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, Imidazol 500 mM, 500 mM NaCl). Se juntaron las fracciones más puras y se concentró. Inmediatamente, la muestra se dializó en un amortiguador de KCl 100 mM y fosfatos de potasio 100 mM a pH 7. 8.

### Caracterización cinética

La caracterización cinética de la enzima se realizó siguiendo la formación de amonio. Los ensayos se realizaron en un volumen de 1 ml en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM a pH 7. 8. Las reacciones se detuvieron al agregar 100 µl de ácido clorhídrico 2 N. La concentración de amonio se midió con el reactivo comercial Spectroquant (MERCCK®), el cual se basa en la reacción de Berthelot (esquema 2). La actividad específica se reportó como µmol NH<sub>4</sub> formado sobre min de reacción y miligramos de enzima usados ([NH<sub>4</sub>]/min mg (proteína)). En el método de detección de amonio, el amonio reacciona en condiciones alcalinas con el hipoclorito formando una cloramina, la cual a su vez reacciona con un derivado fenólico, en este caso timol, formando una N-cloroimina de quinona y se usa nitroprusiato como catalizador. El nitroprusiato funciona como catalizador en el paso anterior. Por último, la molécula N-cloroimina de quinona reacciona con un derivado fenólico formando indofenol. En condiciones alcalinas, el indofenol se desprotona generando una coloración azul y se puede leer la absorbancia a 690 nm.



Esquema 2. Pasos de la reacción de Berthelot. Tomado de Afkhami, A. & Norooz-Asl, R., (2008).



## Dicroísmo Circular

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en el espectropolarímetro Chirascan™ equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura y la celda tiene un recorrido óptico de 0,1 cm para UV-lejano. El espectro de dicroísmo circular resultante es un promedio de cinco mediciones en el rango de 200 a 250 nm a una velocidad de 1 nm/s. Antes de medir las enzimas, se centrifugaron, filtraron por filtros de 0.22 μm y ajustó su concentración final de 0.2 mg/ml en un amortiguador de 100 mM fosfatos a pH 7.8. Antes de medir, las proteínas se centrifugaban y filtraban.

### Estimación de la estructura secundaria

Se estimó el porcentaje de estructura secundaria a partir de los espectros de dicroísmo circular con el paquete CDPro, el cual contiene tres programas CDSSTR, ContinLL y SELCON3. Los tres programas se basan en comparar el espectro de dicroísmo circular obtenido con los espectros de proteínas cuya estructura se conoce. Se escogió la base de datos con mayor número de espectros y cuyos rangos sean compatibles con las mediciones entre 200-250 nm. Los datos reportados son el promedio de los tres programas incluidos en el paquete, CDSSTR, ContinLL y SELCON3. La frecuencia absoluta se calculó al multiplicar el número de residuos por las frecuencias relativas obtenidas.

### Desplegamiento térmico

En la misma muestra con la que se obtuvo el espectro de dicroísmo circular, se obtuvo la transición del desplegamiento térmico. La medición se realizó de 20 a 90 °C a una velocidad de 1 °C/min y a una concentración de 0.2 mg/mL. La temperatura se ajustó al final con el termopar del equipo. La transición se midió con los cambios en señal de dicroísmo circular a 208 nm, ya que las nitrilasas tienen un mínimo a 208 nm. Ninguna de las transiciones térmicas fue reversible, por lo tanto, no fue posible estimar el resto de los parámetros termodinámicos. A pesar de no ser reversibles, las transiciones se ajustaron a un modelo de dos estados, para obtener la temperatura media de transición aparente ( $T_{m,app}$ ) la ecuación 3.

$$y = \frac{(m_1x+b)+(m_2x+c)e^{\left(\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{x}-\frac{1}{tm}\right)\right)}}{1+e^{\left(\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{x}-\frac{1}{tm}\right)\right)}} \quad (3)$$

La ecuación 3 se obtiene de la ecuación de van 't Hoff, donde “ $\Delta H$ ” es la entalpia expresada en kcal/mol, “ $R$ ” es la constante de los gases ideales (expresada en Kcal K/mol de proteína, “ $T_m$ ” es la temperatura media de transición en K, “ $y$ ” es la variable dependiente y es la fracción desnaturalizada y “ $x$ ” es la variable independiente y es la temperatura en K. En la ecuación la pretransición y la postransición se ajustaron a dos rectas, donde “ $m_1$ ” es la pendiente de la pretransición y “ $b$ ” la ordenada al origen de la pretransición, “ $m_2$ ” es la pendiente de la postransición y “ $c$ ” la ordenada al origen de la postransición. El ajuste se realizó en el programa OriginPro por medio de iteraciones con el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

### **Medición del radio hidrodinámico por dispersión dinámica de luz**

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

### **Microscopia electrónica con tinción negativa**

Las proteínas purificadas en amortiguador de 100 mM fosfatos a pH 7.8 se concentraron hasta una concentración aproximada de 0.5 mg/ml. Más tarde, las proteínas se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min y se recuperaron los sobrenadantes. Después, se filtraron los sobrenadantes en un filtro Millipore™ Millex-GV de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se midió la concentración de concentración y se ajustó la concentración a 0.4 mg/mL al agregar amortiguador de 100 mM fosfatos a pH 7.8, previamente filtrado. Para preparar las muestras se realizó una dilución 1 a 4 (0.1 mg/ml) justo antes de preparar la muestra. Se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de proteínas a las rejillas. Se dejaron reposar por un minuto y luego se secó la rejilla. Después, se agregó 10  $\mu\text{l}$  de ácido fosfotúngstico (PTA) al 2 % y se dejó reposar a por 30 s antes de quitar el PTA. Las micrografías se observaron en un microscopio electrónico JEM-1200EX II a 80 000 V en el instituto de fisiología de la UNAM.

## Resultados

### Evaluación de las estructuras de las nitrilasas RsV51BNit y AtNit4

Antes de realizarse los análisis *in silico* con las estructuras de la nitrilasas de AtNit4 (Mulelu *et al.*, 2019) (PDB: 6I00) y de la estructura de RsV51BNit, se evaluaron las estructuras y en caso de ser necesario, se refinaron. Los mapas de potencial obtenidos por Cryo-EM y las estructuras alcanzaron una resolución máxima de 3.4 Å. En ambas estructuras no se pudieron resolver los últimos diez residuos del C-terminal y en el caso de la estructura AtNit4 tampoco se resolvieron una región que va del residuo doscientos cincuenta y dos al residuo doscientos cincuenta y seis. Tampoco se resolvieron los primeros treinta y cuatro residuos del N-terminal. Ambas estructuras se evaluaron en los servidores MolProbity y SWISS-MODEL y se usó el programa Rosetta y el protocolo Rosetta-HMMR.

En los servidores MolProbity y SWISS-MODEL se evaluaron los valores de la geometría del C $\alpha$ , C $\beta$  y rotámeros; la distribución de los valores de  $\phi$  y  $\psi$ ; el puntaje de MolProbity; el puntaje del Z-score y el puntaje de CaBLAM el puntaje de MolProbity de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4.

De acuerdo con el servidor MolProbity tanto AtNit4 como RsV51BNit tienen más del 80 % de sus aminoácidos con ángulos de torsión  $\phi$  y  $\psi$  favorables, mientras que AtNit4 tiene casi el 90 % de sus rotámeros en conformaciones favorecidas y RsV51BNit solo el 57 %. Es importante notar que en ambos casos son porcentajes menores a lo ideal. Se calculó el puntaje de MolProbity de la estructura de RsV51BNit. Si el puntaje de MolProbity es menor a la resolución de la estructura, se considera una buena estructura (Chen *et al.*, 2009). El puntaje de MolProbity de RsV51BNit es alto y mayor que la resolución de la estructura, indicando problemas en la estructura, mientras que el puntaje de MolProbity de AtNit4 es bajo y menor a la resolución de la estructura, indicando una buena estructura (Tabla IV).

También, se calcularon los puntajes de CaBLAM y Z-Score, lo cuales son útiles para evaluar los problemas que los puntajes tradicionales no podrían notar en las estructuras resultas por Cryo-EM (Prisant *et al.*, 2019; Sobolev *et al.*, 2020). CaBLAM calcula una serie de valores a partir del C $\alpha$  y los cinco C $\alpha$  aledaños y los compara con los valores de una biblioteca (Prisant *et al.*, 2019). Los valores de CaBLAM indica que un porcentaje relativamente alto de los aminoácidos de ambas estructuras no tienen valores ideales y deberían revisarse. El Z-score indica que tan probable es la distribución de los valores de  $\phi$  y  $\psi$  en una estructura. Valores de Z-score entre menos dos a dos se consideran normales, mientras que valores fuera de este rango se consideran poco probables. El valor del Z score de RsV51BNit es menor a menos tres y el valor del Z score de AtNit4 es menor a menos cinco. Esto indica que pueden existir problemas en la estructura, aunque no sean evidentes.

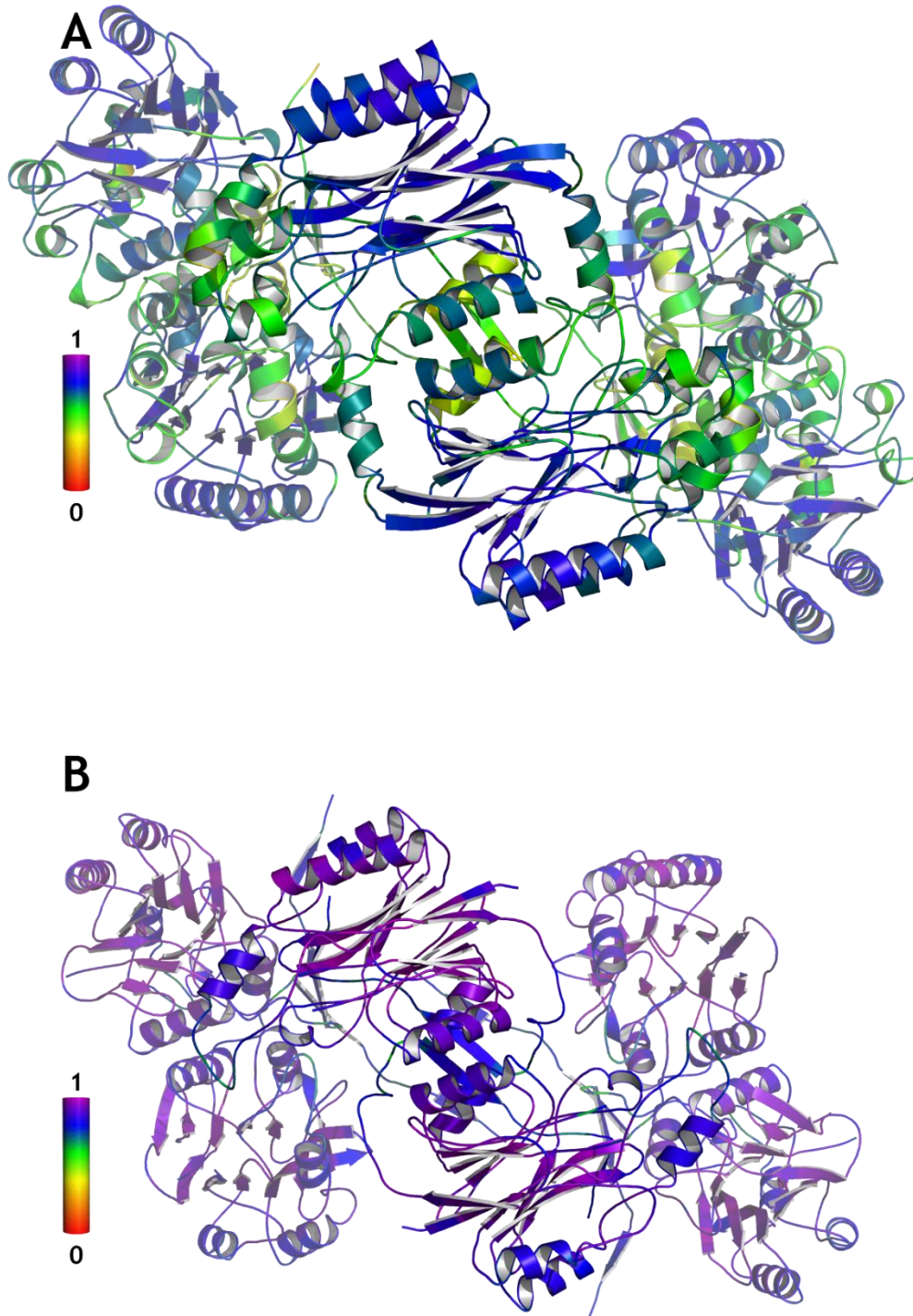
Tabla IV. Evaluación de las estructuras de RsV51BNit y de AtNit4.

	<i>AtNit4</i>		<i>RsV51BNit</i>		<i>Meta</i>
	Antes de refinar	Después de refinar	Antes de refinar	Después de refinar	
<i>Rotámetros pobres</i>	2.72 %	0.13 %	26.52 %	0.06 %	<0.3 %
<i>Rotámetros favorecidos</i>	89.59 %	98.96 %	57.47 %	99.30 %	>98 %
<i>Valores atípicos de Ramachandran</i>	0.73 %	1.18 %	2.22 %	1.01 %	<0.05 %
<i>Valores favorecidos de Ramachandran</i>	83.04 %	93.41 %	88.36 %	92.49 %	>98 %
<i>Desviaciones de CB</i>	0.79 %	1.02 %	1.87 %	1.41 %	0 %
<i>Enlaces pobres</i>	0.05 %	0.13 %	1.44 %	0.7 %	0 %
<i>Ángulos pobres</i>	0.15 %	0.34 %	1.71 %	0.6 %	<0.1 %
<i>Z score</i>	-5.33±0.11	-0.83±0.13	-3.65±0.17	-1.97±0.18	Z score  < 2
<i>Valores atípicos CaBLAM</i>	2.9 %	3.2 %	2.9 %	2.8 %	<1.0 %
<i>Valores atípicos de geometría de Ca</i>	0.8 %	1.02 %	0.8 %	0.75 %	<0.5 %
<i>Puntaje de MolProbity</i>	2.41	1.52	3.86	1.74	
<i>Resolución del mapa de potencial de Coulomb (Å)</i>	3.4	3.4	3.8	3.8	
<i>Clash score</i>	6.99	3.03	51.86	5.10	
<i>Rosetta Energy Units (REU)</i>	6449.681	-3242.744	15534.003	-1271.943	<0
<i>Porcentaje de residuos encontrados con Rosetta-HMMR</i>	40.21 %	78.27 %	47.85 %	88.01 %	

En el servidor SWISS-MODEL se evaluaron los valores QMEAN por residuo de las estructuras (Fig. 11). Los valores de QMEAN por residuo va del cero al uno, donde uno es lo ideal. En la estructura de RsV51BNit, la mayoría de los valores de QMEAN por residuo son alto en las regiones centrales de la estructura. Los aminoácidos en las cercanías de las superficies de interacción y a lo largo del C-terminal tienen valores bajos, indicando que estas son las zonas más problemáticas. En AtNit4, los valores de QMEAN por residuo son cercanos a uno a lo largo de todo el modelo, lo cual indica que el modelo de AtNit4 tiene mejor calidad que RsV51BNit.

Aparte de usar los puntajes resultantes de un servidor, se evaluaron las estructuras en Rosetta. La primera evaluación se basó en la función score de Rosetta, la cual asigna un puntaje llamado Rosetta energy units (REU). Este puntaje no tiene verdaderas unidades, pero tiene la misma convención que la energía libre de Gibbs. Por lo tanto, valores menores a cero son favorables y mientras menor sea el valor de REU, mejor es la calidad de la estructura. La segunda evaluación examina la relevancia biológica de las estructuras con el protocolo de Rosetta-HMMR, el cual reconstruye la secuencia de residuos a partir de la posición del de la cadena principal de la proteína. A partir de las secuencias armadas, se construye un modelo oculto de Markov. Una estructura de buena calidad es capaz de recuperar su secuencia inicial entre sus primeras opciones y recobrar un porcentaje alto de los aminoácidos debe identificados correctamente. Tanto RsV51BNit como AtNit4 tienen un puntaje positivo de REU, lo que indica que las estructuras son desfavorables (Tabla IV). El protocolo Rosetta-HMMR encontró a la secuencia de nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 como el mejor blanco para RsV51BNit, la cual solo difiere en cinco aminoácidos de RsV51BNit. En el caso de AtNit4, el protocolo encontró con éxito la secuencia de la enzima. No obstante, en ambos casos el número de residuos identificados exitosamente es menor al 50 % (Tabla IV).

Los resultados de estos análisis sugieren que ambas estructuras tienen problemas subyacentes, aunque los parámetros de geometría y el QMEAN por residuo no sean malos. Dado que las estructuras se resolvieron por Cryo-EM, es normal que la estructuras tengan una menor resolución a las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X. Esta menor resolución se traduce en la posibilidad de ajustar estructuras con valores de geometría aceptables y, aún así, tener problemas importantes, los cuales pueden pasar por alto con los protocolos y puntajes más tradicionales (Sobolev *et al.*, 2020). Esto es especialmente importante en la estructura de AtNit4, el cual ya ha sido publicado y revisado. Por otra parte, la estructura de RsV51BNit es una estructura previa y es comprensible las fallas que tiene. La decisión final fue refinar ambas estructuras con la intención de mejorar su calidad antes de realizar los análisis *in silico* y obtener resultados de calidad.



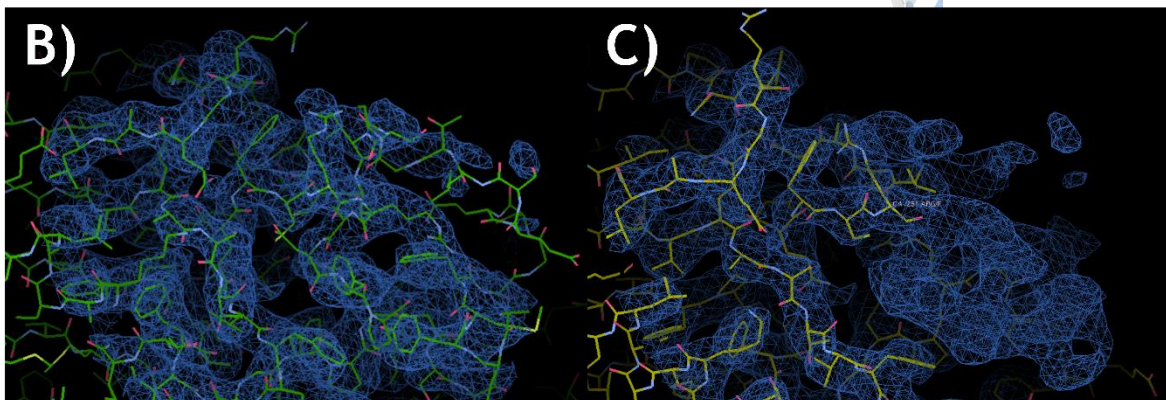
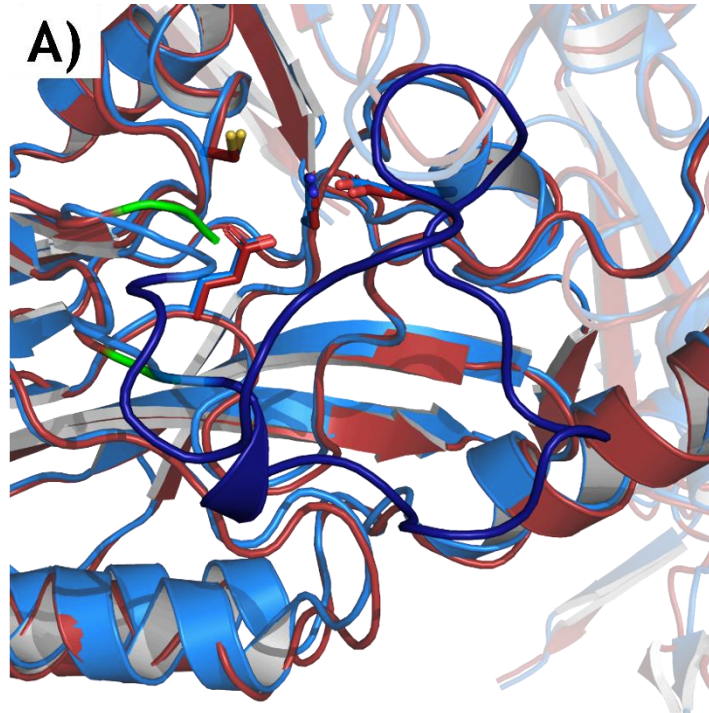
**Figura 11. Valores de QMEAN por residuo a lo largo de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4.** Los valores de QMEAN por residuo van de cero a uno, donde uno indica que el aminoácido tiene los valores esperados para una proteína y cero que se aleja de los valores esperados. En la estructura los colores van del rojo al azul que corresponde a 0.2 y 0.8 respectivamente. A) Estructura previa de RsV51BNit. B) Estructura publicada de AtNit4. Imagen hecha en Pymol. El PDB proviene del servidor SWISS-MODEL.

## Refinamiento y evaluación de las estructuras resultantes de RsV51BNit y AtNit4.

Debido a los problemas observados tanto en la estructura de AtNit4 y en la estructura de RsV51BNit, se decidió refinar la estructura. La estructura de RsV51BNit se refinó como parte de otro proyecto. A pesar de provenir de otro proyecto, tanto la estructura de RsV51BNit como la estructura de AtNit4 se refinaron y volvieron a evaluar usando el mismo protocolo. En ambos casos se usó Rosetta y la paquetería CCP-EM, para refinar las estructuras.

Antes de refinar la estructura de AtNit4 se reconstruyó una región comprendida del residuo doscientos cincuenta y dos al residuo doscientos setenta y cinco. Esta región se encuentra en la cercanía del sitio activo, por lo que se consideró importante para los análisis *in silico* de la estructura de AtNit4. El mapa de potencial de Coulomb en esta región está cortado en varias regiones, lo que explica que no fuera construido inicialmente. Existen algunas regiones lo suficientemente claras para identificar algunos aminoácidos. No obstante, no queda claro el camino del esqueleto de la proteína y las cadenas laterales de algunos aminoácidos (Fig. 12).

Primero se reconstruyó esta región usando el programa Modeller. La estructura resultante no se ajustaba al mapa de potencial de Coulomb y cada una de las doce cadenas modela esta región diferente. Aún así, esta estructura permitía explicar el camino que toma el esqueleto para alcanzar las cadenas laterales observables en el mapa de potencial de Coulomb. La cadena principal y los rotámeros se ajustaron manualmente con Coot al mapa de potencial de Coulomb. A pesar de los huecos en el mapa de potencial de Coulomb, se pudieron ajustar las suficientes secciones de la cadena principal y cadenas laterales para explicar las regiones visibles (Fig. 12). Una vez con esta sección que va del residuo doscientos cincuenta y dos al residuo doscientos setenta y cinco, se refinaron en conjunto con el resto de la estructura.



**Figura 12. Construcción de la región faltante en la estructura de Atnit4.** A) Comparación de la estructura publicada de AtNit4 y la estructura refinada de AtNit4 con la sección faltante construida. En rojo la estructura publicada de AtNit4. En azul la estructura de AtNit4 refinado con la sección faltante construida. En verde las regiones limítrofes de la región no construida en la estructura publicada. En varillas se marca los residuos de la tétrada catalítica. B) La estructura publicada de AtNit4 y el mapa de potencial de Coulomb publicado. C) La estructura refinada AtNit4 refinado con la sección faltante construida y el mapa de potencial de Coulomb publicado. Nótese las regiones en las que no existe potencial y como la región construida concuerda con los datos experimentales. Imagen hecha en Pymol y Coot.

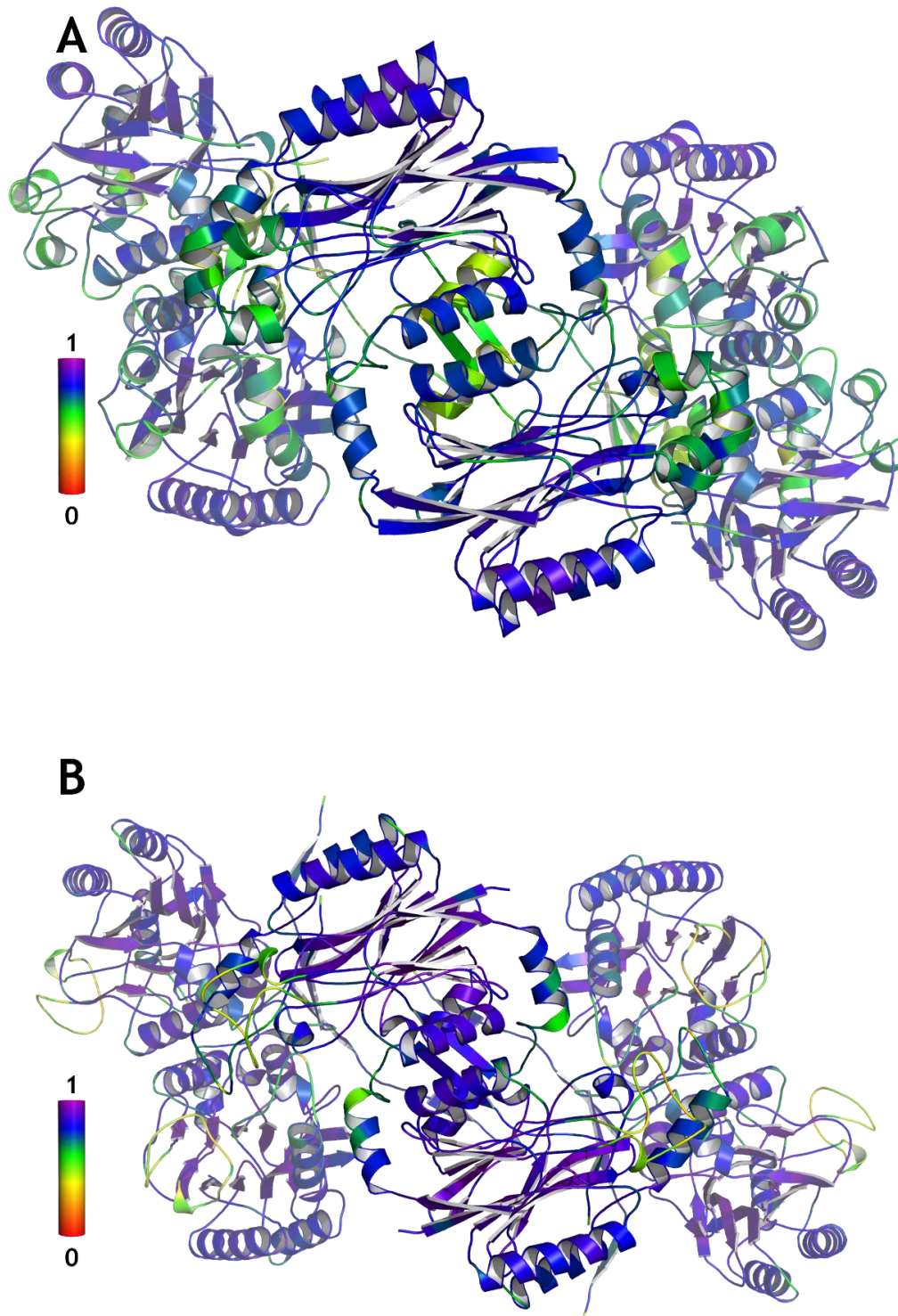


Una vez reconstruida esta región, se procedió a refinar la estructura de AtNit4 mediante alternar ciclos de Rosetta y Refmac. El primer paso del ciclo consistió en relajar la estructura con la función relax de Rosetta con la intención de ajustar los valores de geometría a los valores esperados para una proteína. En el siguiente paso del ciclo, la estructura resultante se refinó por Refmac, para ajustar la estructura proveniente de Rosetta al mapa de potencial de Coulomb. Es decir, las estructuras no solo se refinaron para tener los valores esperados de geometría, también se ajustaron para los resultados experimentales de Cryo-EM. Después, se resolvieron problemas puntuales manualmente en coot y se volvió a ajustar al mapa de potencial de Coulomb con Refmac. Este ciclo se repitió hasta que la evaluación de las estructuras indica que no se está mejorando la calidad.

La última evaluación de las estructuras muestra cuáles fueron los avances del refinamiento de las estructuras. Los valores de geometría mejoraron con más del 90 % de los ángulos de torsión  $\varphi$  y  $\psi$  y los rotámeros en conformaciones favorables. El porcentaje de enlaces pobres, ángulos pobres, valores atípicos de geometría de C $\alpha$  y el clashcore disminuyeron. Sin embargo, el porcentaje de aminoácidos con desviaciones de acuerdo con CaBLAM y las desviaciones de C $\beta$  bajaron levemente y quedaron prácticamente en el mismo rango.

La mayor diferencia se observó en los valores de los puntajes del Z-score, REU, MolProbity score y el porcentaje de residuos encontrados por Rosetta-HMMR. Las estructuras refinadas tienen valores favorables de REU, el valor de MolProbity score son menores a la resolución de las estructuras, los valores del Z-score se encuentran en rangos aceptables y el protocolo Rosetta-HMMR duplicó el número de residuos que identificó con éxito en ambas estructuras. Las regiones que no se pudieron identificar con éxito corresponden a los C-terminales y en el caso de AtNit4 a la región reconstruida que va del residuo doscientos cincuenta y dos al residuo doscientos setenta y cinco dos. Es posible que la falta de contactos en estas zonas dificulte encontrar rotámeros adecuados, ya que muchas secuencias distintas podrían llenar estas regiones. Los valores de QMEAN por residuo identifican donde se encuentran la mayor parte de los problemas. En RsV51BNit se encuentran en el C-terminal y en algunos loops en la cercanía de la superficie C, mientras que en la estructura de AtNit4 se encuentran el C-terminal y en la región construida de la estructura AtNit4 (Fig. 13).

La evaluación de las estructuras finales de AtNit4 y de RsV51BNit indican que mejoraron su calidad. Por lo tanto, se considera que las estructuras refinadas tienen la calidad necesaria para los análisis posteriores.



**Figura 13.** Valores de QMEAN por residuo a lo largo de las estructuras de RsV51BNit y AtNit4. Los valores de QMEAN por residuo van de 0 a 1, donde 1 indica que el aminoácido tiene los valores esperados para una proteína y 0 que se aleja de los valores esperados. En la estructura los colores van del rojo al azul que corresponde a 0.2 y 0.8 respectivamente. A) Estructura refinada de RsV51BNit. B) Estructura refinada de AtNit. Imagen hecha en Pymol. El PDB proviene del servidor SWISS-MODEL.

## Diseño y evaluación de las mutantes de RsV51BNit y AtNit4 por redes de interacción

Ya que el C-terminal estabiliza las interacciones de las superficies A y C y no forman parte del sitio activo o del plegamiento de las enzimas, se espera que al eliminar regiones del C-terminal se disminuya el número de monómeros que forman los filamentos. Se buscaron regiones del C-terminal, que pudieran ser mutadas por un codón de paro sin tener un efecto más allá de la eliminación del C-terminal.

Para buscar estas posiciones, se construyó una red de interacciones de residuos (RIN) con las estructuras refinadas y validadas de RsV51BNit y la AtNit4 en el servidor Ring 2.0 (Piovesan, Minervini & Tosatto, 2016). Las interacciones formadas se observaron en el programa Cytoscape. Para escoger las posiciones candidatas a ser mutadas, se usaron dos argumentos. El primer argumento es que los aminoácidos que se van a mutar tengan ninguna o pocas interacciones. En caso de tener interacciones se prefieren que sean interacciones de Van der Waals o residuos río abajo de la posición a ser mutada, ya que son interacciones que se perderían al insertar un codón de paro. El segundo argumento es que las posiciones candidatas no formen parte de alfa hélices y hebras beta.

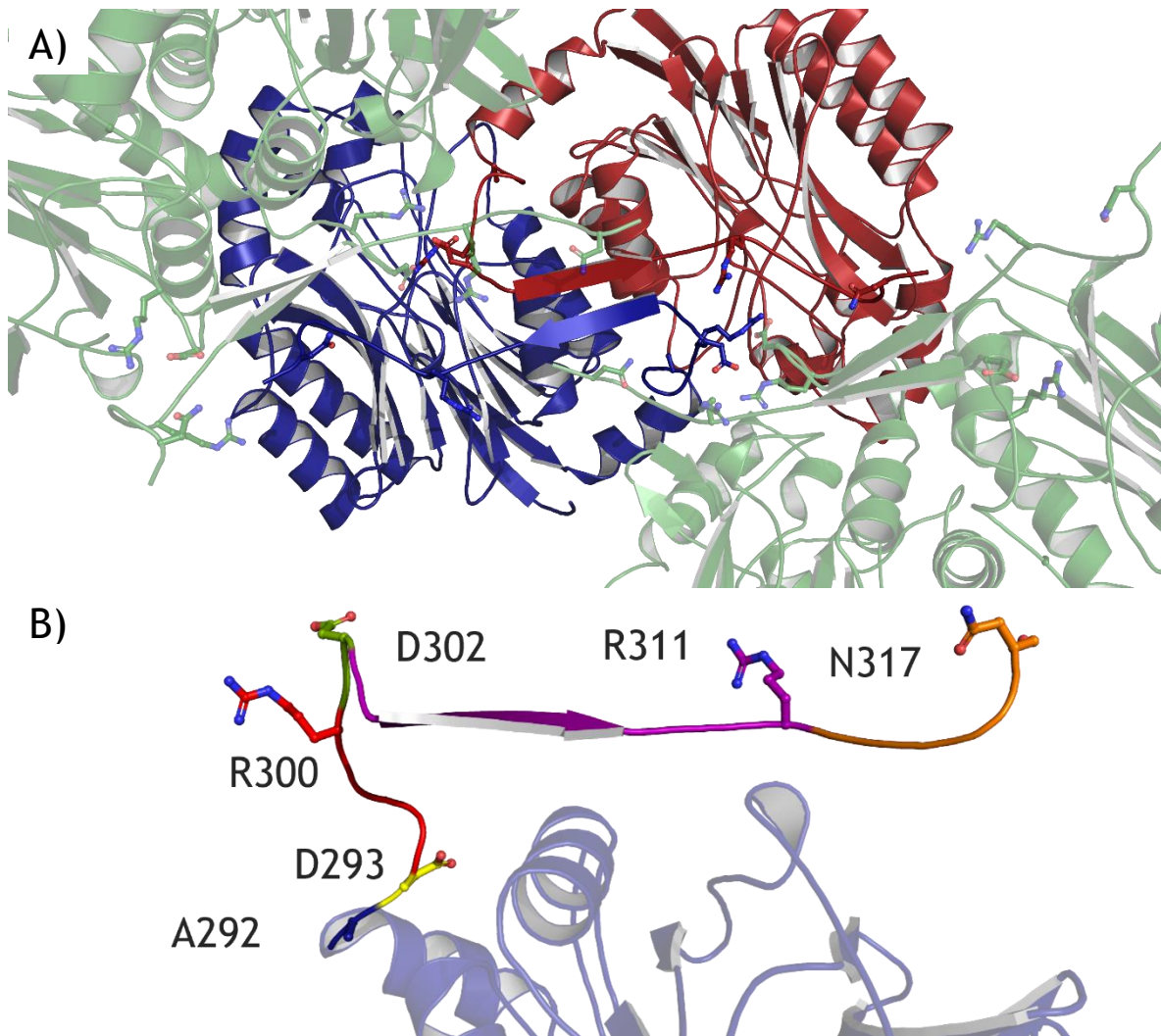
Se construyó la red de interacciones de RsV51BNit para evaluar el efecto de mutar algunas posiciones por codones de paro en las NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74, las cuales se diseñaron antes de contar con la estructura de RsV51BNit, y para planear otras mutaciones a lo largo del C-terminal. Primero, se evaluaron las interacciones de los aminoácidos prolina doscientos noventa y cuatro y la asparagina doscientos noventa y tres, los cuales son los residuos que son sustituidos por un codón de paro en las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 respectivamente. En la figura 14 se observa que la prolina doscientos noventa y cuatro solamente forma interacciones de Van der Waals con otros residuos de la misma cadena, por lo que sería un lugar ideal para sustituir por un codón de paro. En cambio, la asparagina doscientos noventa y tres es un aminoácido con varias interacciones. Este residuo forma puentes de hidrógeno con la lisina doscientos ochenta y nueve y con la tirosina doscientos noventa y ocho de la misma cadena y la serina ciento once de otra cadena. Además, La asparagina doscientos noventa y tres forma un puente salino con la lisina doscientos ochenta y nueve.

La prolina doscientos noventa y cuatro tiene pocas interacciones y su sustitución por un codón de paro no debería tener otro efecto aparte de la eliminación del C-terminal. En cambio, la asparagina doscientos noventa y tres es un aminoácido bien conectado y con varias interacciones intercadena e intracadena. La sustitución de este aminoácido por un sitio de paro podría eliminar interacciones importantes más allá del C-terminal río abajo. En las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 se eliminan las dos hebras betas que estabilizan la superficie C y una región desordenada en la cercanía de la superficie C (Fig. 15).



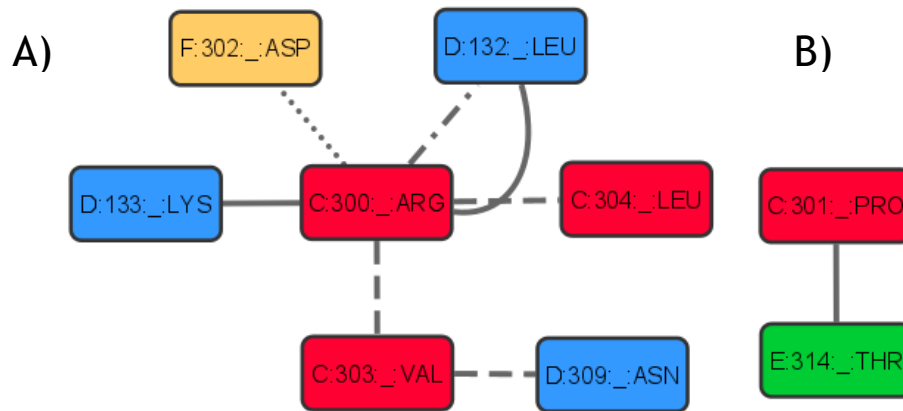
**Figura 14.** Red de interacciones de la prolina doscientos noventa y cuatro y la asparagina doscientos noventa y tres. Cada nodo tiene la cadena a la que pertenece, la posición del aminoácido y el tipo de aminoácido. Las aristas representan el tipo de interacción. En líneas sólida se muestran interacciones de Van der Waals. En guiones se muestran puentes de hidrógeno entre la cadena principal. En línea punteada y guiones se muestran puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales y la cadena principal. En línea punteada se muestran puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales. En doble línea sólida se muestran puentes salinos. Red hecha en Cytoscape a partir de RIN de Rsv51BNit.

Anteriormente en el laboratorio se había diseñado y caracterizado la mutante NitRspCΔ55. El sitio de paro de la mutante se posiciona en un asa que une las dos hebras betas del C-terminal y, por lo tanto, elimina una de las hebras betas (Fig. 15). Sin embargo, la mutante no es activa, por lo que se buscaron otras posiciones en el C-terminal para ser mutadas.



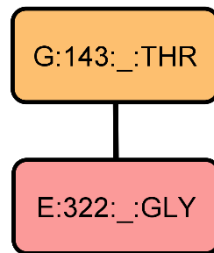
**Figura 15. C-terminal de RsV51BNit.** Cada monómero se coloreó diferente. Se marcaron los residuos terminales de las siguientes mutantes: alanina doscientos noventa y dos en NitCRsp $\Delta$ 74, aspartato doscientos noventa y tres en NitCRsp $\Delta$ 73, arginina trescientos en NitCRsp $\Delta$ 66, aspartato trescientos dos en NitCRsp $\Delta$ 64, arginina trescientos once en NitRspC $\Delta$ 55 y asparagina trescientos diecisiete en NitRspC $\Delta$ 49. A) Hebras beta del C-terminal que estabilizan la superficie A y C. B) C-terminal de una de las cadenas con los residuos terminales de las mutantes NitCRsp $\Delta$ 74, NitCRsp $\Delta$ 73, NitCRsp $\Delta$ 66 y NitCRsp $\Delta$ 64. También se marca los residuos en los que acaban las mutantes NitRspC $\Delta$ 55 y NitRspC $\Delta$ 49, las cuales se caracterizaron anteriormente. Imagen hecha PyMOL a partir de la estructura de RsV51BNit.

Se buscaron posiciones que al ser sustituidas por un C-terminal eliminaran las dos hebras betas que estabilizan las superficies A y C y que conserven la región entre la última alfa hélice y la penúltima hebra beta. Se encontraron dos posiciones que cumplían con estos argumentos, la valina trescientos tres y la prolina trescientos uno. La valina trescientos tres, que al ser sustituida por un codón de paro generaría la mutante NitCRsp $\Delta$ 64, forma un puente de hidrógeno con la cadena principal, con la asparagina trescientos nueve del otro monómero del dímero y con la cadena principal de la arginina trescientos de la misma cadena. La arginina trescientos forma varias interacciones no solo con la misma cadena, también forma puentes de hidrógeno con otras cadenas tanto con la cadena principal como con la cadena lateral (Fig. 16). La prolina trescientos uno, la cual al ser sustituido por un codón de paro formaría la mutante NitCRsp $\Delta$ 66, solo tiene interacciones de Van der Waals con la treonina trescientos catorce del otro monómero. Esto indicaría que estas interacciones no comprometerían la estructura de la enzima más allá de las interacciones perdidas al eliminar el C-terminal (Fig. 16). Por lo tanto, esperaríamos que el efecto observado se deba únicamente a la pérdida del C-terminal y no a la disrupción de alguna interacción.



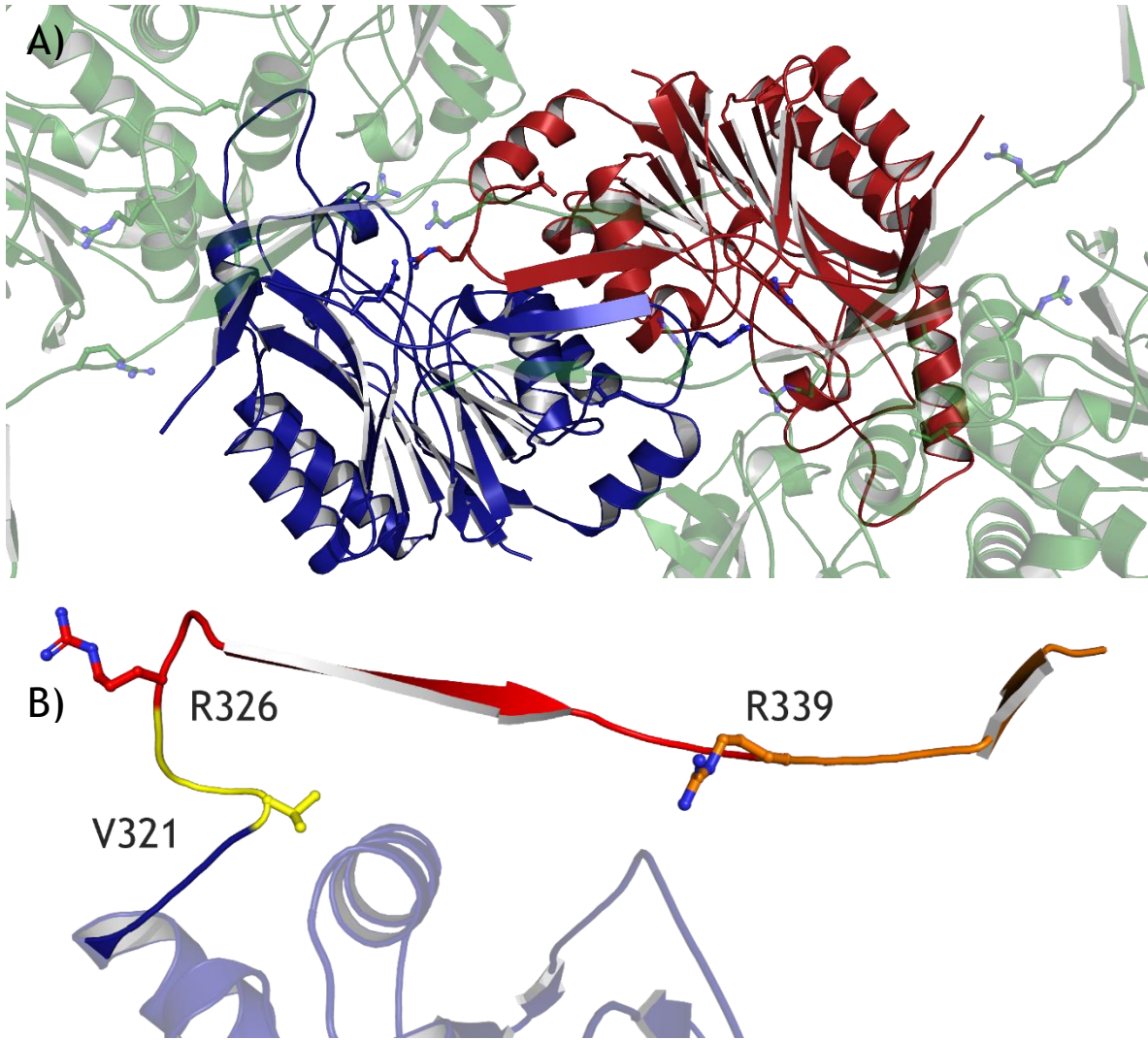
**Figura 16. Red de interacciones de la valina trescientos tres y la prolina trescientos uno de RsV51BNit.** Cada nodo tiene la cadena a la que pertenece, la posición del aminoácido y el tipo de aminoácido. Las aristas representan el tipo de interacción. En líneas sólida se muestran interacciones de Van der Waals. En guiones se muestran puentes de hidrógeno entre la cadena principal. En línea punteada y guiones se muestran puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales y la cadena principal. En línea punteada se muestran puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales. En doble línea sólida se muestran puentes salinos. Red hecha en Cytoscape a partir de RIN de la estructura de RsV51BNit.

Antes de este trabajo, no se había caracterizado ninguna mutante trunca en AtNit4. Por lo tanto, se seleccionaron posiciones a lo largo de todo el C-terminal que eliminaran elementos las hebras betas que estabilizan las superficies de interacción A y B. Se encontraron tres posiciones cuyos aminoácidos tienen pocas interacciones y cumplen con los argumentos mencionados anteriormente, la lisina trescientos cuarenta, la prolina trescientos veintisiete y la glicina trescientos veintidós.



**Figura 17. Red de interacciones de la glicina trescientos veintidós de AtNit4.** Cada nodo tiene la cadena a la que pertenece, la posición del aminoácido y el tipo de aminoácido. Las aristas representan el tipo de interacción. En líneas sólidas interacciones de Van der Waals. Red hecha en Cytoscape a partir del RIN de la estructura de AtNit4.

Como se observa en la figura 17, la glicina trescientos veintidós únicamente tiene contactos con la treonina, ciento cuarenta y tres de otra subunidad por medio de interacciones de Van der Waals. Tanto la lisina trescientos cuarenta como la prolina trescientos veintisiete no tienen interacciones, por lo que no se muestra ninguna red de interacciones. La mutante NitAtC $\Delta$ 16 sustituye a la lisina trescientos cuarenta por un codón de paro y elimina la última hebra beta, la cual estabiliza la superficie C. La mutante NitAtC $\Delta$ 29 sustituye la prolina trescientos veintisiete por un codón de paro y elimina las dos últimas hebras betas, las cuales estabilizan las superficies C y A. La mutante NitAtC34 sustituye a la glicina trescientos veintidós por un codón de paro y elimina tanto las dos hebras betas que estabilizan las superficies A y C como una región en las cercanías de la superficie C. Por lo tanto, las posiciones seleccionadas tienen pocas interacciones y se esperaría que los efectos observados al sustituir estas posiciones por codones de paro serían los efectos de eliminar el C-terminal.

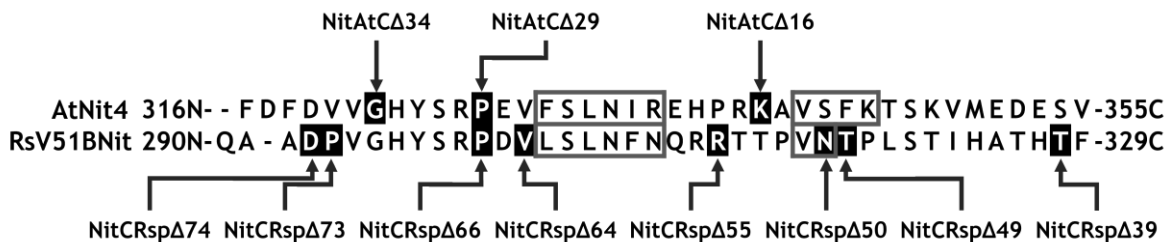


**Figura 18. C-terminal de la AtNit4.** Cada monómero se coloreó diferente. Los residuos en los que acaban las mutantes NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34, la valina trescientos veintiuno, la arginina trescientos veinte seis y la lisina trescientos cuarenta respectivamente, se marcaron. A) Hebras beta del C-terminal que estabilizan la superficie A y C. B) C-terminal de una de las cadenas con los residuos en los que acaban las mutantes NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. Imagen hecha PyMOL a partir de la estructura de AtNit4.



## Comparación de las mutantes truncas de AtNit4 y RsV51BNit

Las mutantes truncas de AtNit4 y RsV51BNit, trabajadas en el laboratorio, son comparables entre ellas. Esto se debe a que el C-terminal de AtNit4 y RsV51BNit estabilizan las superficies de interacción A y C de una manera similar. Por lo tanto, las posiciones escogidas a para ser mutadas por codones de paro están en posiciones cercanas de acuerdo con el alineamiento de la figura 4. La mutante NitAtCΔ16 y NitRspCΔ55 eliminan la hebra beta que estabiliza la superficie C (Fig. 19). Es importante recordar que las mutantes NitRspCΔ55 y NitRspCΔ49 se caracterizaron en proyectos anteriores. La mutante NitAtCΔ29 y las mutantes NitRspCΔ64 y NitRspCΔ66 eliminan las dos hebras betas que estabilizan las superficies de interacción A y C. Por último, la mutante NitAtCΔ34 y las mutantes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 eliminan las dos hebras betas mencionadas anteriormente y una región en las cercanías de la superficie C. Únicamente las mutantes NitAtCΔ29 y NitCRspΔ66 acaban en el mismo codón como se aprecia en la figura 21.



**Figura 19.** Representación del C-terminal de las nitrilasas de AtNit4, R. y RsV51BNit. Se marca con fondo negro los residuos que se sustituyeron por un codón de paro. En cajas grises se marca las hebras betas que estabilizan las superficies de interacción.

## Acoplamiento proteína-proteína

Uno de los objetivos del proyecto es disminuir el tamaño de los oligómeros que forman las nitrilasas RsV51BNit y AtNit4. Con el objetivo de estimar la afinidad de las superficies de interacción A y C, se realizaron experimentos de acoplamiento molecular proteína-proteína en el servidor ClusPro 2.0.

Se crearon las estructuras de las mutantes truncas al eliminar los aminoácidos del C-terminal correspondientes a cada mutante en PyMol. ClusPro 2.0 realiza el acoplamiento molecular proteína-proteína al rotar un grupo de subunidades y generar una biblioteca con un grupo de subunidades rotadas en setenta mil posiciones diferentes. Cada grupo de subunidades rotadas es desplazado en las coordenadas X, Y y Z. Se evalúa el puntaje en cada posición y se escoge la posición con el mejor puntaje. Posteriormente, se filtran los mil resultados con los mejores puntajes y se crean conjuntos de acuerdo con su posición. Las posiciones más favorables son las posiciones cuyo conjunto tenga un mayor número de miembros. Se realizó acoplamiento molecular entre dos dímeros para evaluar las interacciones de la superficie C y se hizo acoplamiento molecular entre dos monómeros para evaluar las interacciones de la superficie A (Tabla VI).

Se realizó el acoplamiento molecular proteína-proteína de las mutantes truncas de RsV51BNit. Las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64, NitCRsp $\Delta$ 66, NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 eliminan las dos hebras betas que estabilizan la superficie A y C, aunque NitCRsp $\Delta$ 64 y NitCRsp $\Delta$ 66 conservan una sección C-terminal en las proximidades de la superficie C (Fig. 15). Cabe recordar que, aunque en la estructura de RsV51BNit no se pudieron observar los últimos diez residuos, conserva las dos hebras betas que estabilizan las superficies de interacción A y C. Al pasar de la mutante NitRspC $\Delta$ 39 a la mutante NitRspC $\Delta$ 55 se elimina la hebra beta que estabiliza la superficie C se disminuye la afinidad de las superficies C y A. En especial, la superficie C es la más afectada. Al pasar a las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64 y NitCRsp $\Delta$ 66 se disminuye la afinidad de las superficies A y C, aunque la superficie A tiene una mayor afinidad que la superficie C. Al pasar de las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64 y NitCRsp $\Delta$ 66 a las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 se vuelve a disminuir tanto la afinidad de las superficies A y C, pero en esta ocasión la superficie C tiene mayor afinidad que la superficie A.

En AtNit4, al reducir el carboxilo terminal en dieciséis residuos, se elimina la primera hebra beta que estabiliza la superficie C (Fig. 18). Se observa cómo la afinidad de la superficie A se mantiene, pero la afinidad de la superficie C se reduce (Tabla VI). Al reducir el carboxilo terminal en veintinueve residuos, se elimina la segunda hebra beta, la cual estabiliza la superficie A (Fig. 20). Tanto la superficie A como la superficie C reducen su afinidad, aunque como era de esperarse, la superficie A es la más afectada (Tabla VI). Por último, al reducir el C-terminal en treinta y cuatro aminoácidos, solo se pudo agrupar veinte conformaciones en la posición correcta en la superficie A y la afinidad disminuyó. No hubo problemas con la superficie C y la afinidad disminuyó ligeramente. Los resultados sugieren que la eliminación del C-terminal permite disminuir la afinidad de las superficies de interacción. En especial, la mutante NitAtCΔ16 disminuye la afinidad de la superficie C con un efecto mínimo en la superficie A (Tabla VI).

Al igual que en la estructura RsV51BNit, en la estructura de AtNit4, no se observaron los últimos diez residuos del C-terminal y la etiqueta de histidinas, aunque parece poco probable que contribuyan a estabilizar las superficies A o C. El resto de los valores de afinidad reportados corresponden a las mutantes planteadas.

Tabla VI. Afinidad de las superficies A y C de RsV51BNit y de AtNit4

Nitrilasa	Mutante trunca	Superficie A (Porcentaje)	Superficie A (kcal/mol)	Superficie C (Porcentaje)	Superficie C (kcal/mol)
RsV51BNit	NitRspCΔ39	13.1	-2205.2	10.9	-1997.1
	NitRspCΔ55	12.4	-2024.1	24.4	-1533.8
	NitCRspΔ64	13.3	-1475.2	14.9	-1407.5
	NitCRspΔ66	11.4	-1425.8	13.5	-1393.4
	NitCRspΔ73	11.6	-1116	11.7	-1204
	NitCRspΔ74	7.1	-1072.3	13.3	-1201.6
AtNit4	AtNit4 WT	13.2	-2092.7	12.0	-2501.8
	NitAtCΔ16	13.4	-2056.1	17.8	-1966.1
	NitAtCΔ29	6.6	-1392.6	14.6	-1792.6
	NitAtCΔ34	2.0	-969.5	15.0	-1579.2

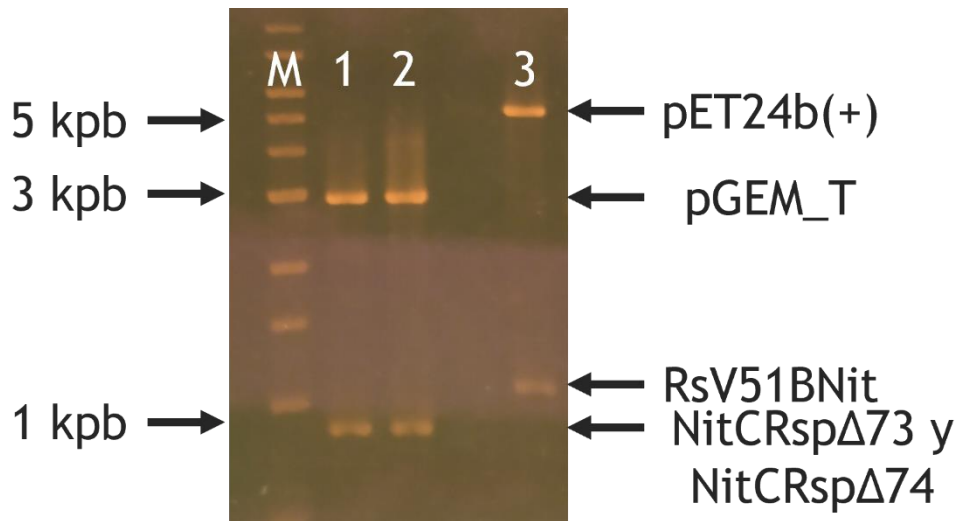
En la tabla se indica el porcentaje de las mil posiciones resultantes que tiene el conjunto y se muestra la afinidad para cada conjunto calculada por ClusPro 2.0.

### Mutantes *in vitro*

Las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 se encontraban en el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector. Entonces, se subclonaron para poder expresar las mutantes. Los genes de las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64 y NitCRsp $\Delta$ 66, se encontraban en el vector pET24b(+) y las mutantes NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34 se encontraban en el vector pET22(+). Por lo que no necesitaron ser subclonados.

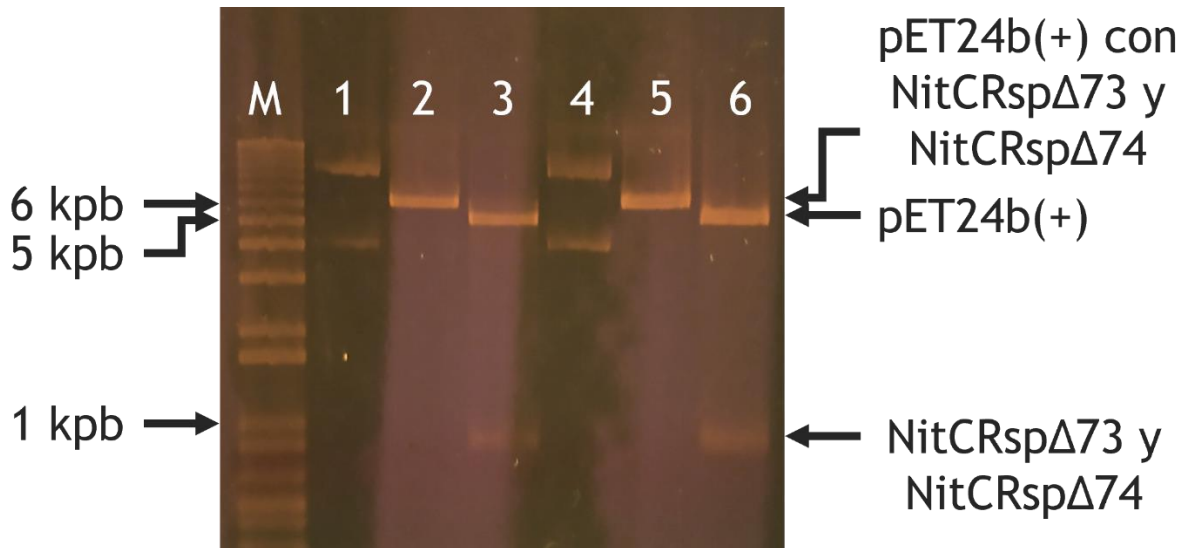
### Subclonación de las mutantes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74

Se realizó una doble digestión de NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 en pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector y de la nitrilasa silvestre de *Rhodococcus* sp. V51B en pET24b(+) con las enzimas de digestión *Nde*I y *Hind*III para obtener el vector pET24b(+). En la figura 20 se muestra la doble digestión y como se puede observar se tuvo una digestión exitosa y se pudo separar el gen del plásmido.



**Figura 20. Digestion doble de pGEM-T/NitCRsp $\Delta$ 73, pGEM\_T/NitCRsp $\Delta$ 74 y pET24b(+)/NitWT.** La digestión se realizó con las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III. M) Marcador de peso molecular 1 kb Extend DNA Ladder 1) Digestión doble de NitCRsp $\Delta$ 73 en pGEM<sup>®</sup>-T 2) Digestión doble de NitCRsp $\Delta$ 74 en pGEM<sup>®</sup>-T. 3) Digestión doble de la nitrilasa silvestre de RsV51BNit en pET24b(+). El tamaño de los genes NitWT, NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 es de 1098 pb, 879 pb y 876 pb respectivamente y el tamaño de los plásmidos pET24b(+) y pGEM<sup>®</sup>-T es de 5251 pb y 3015 pb respectivamente.

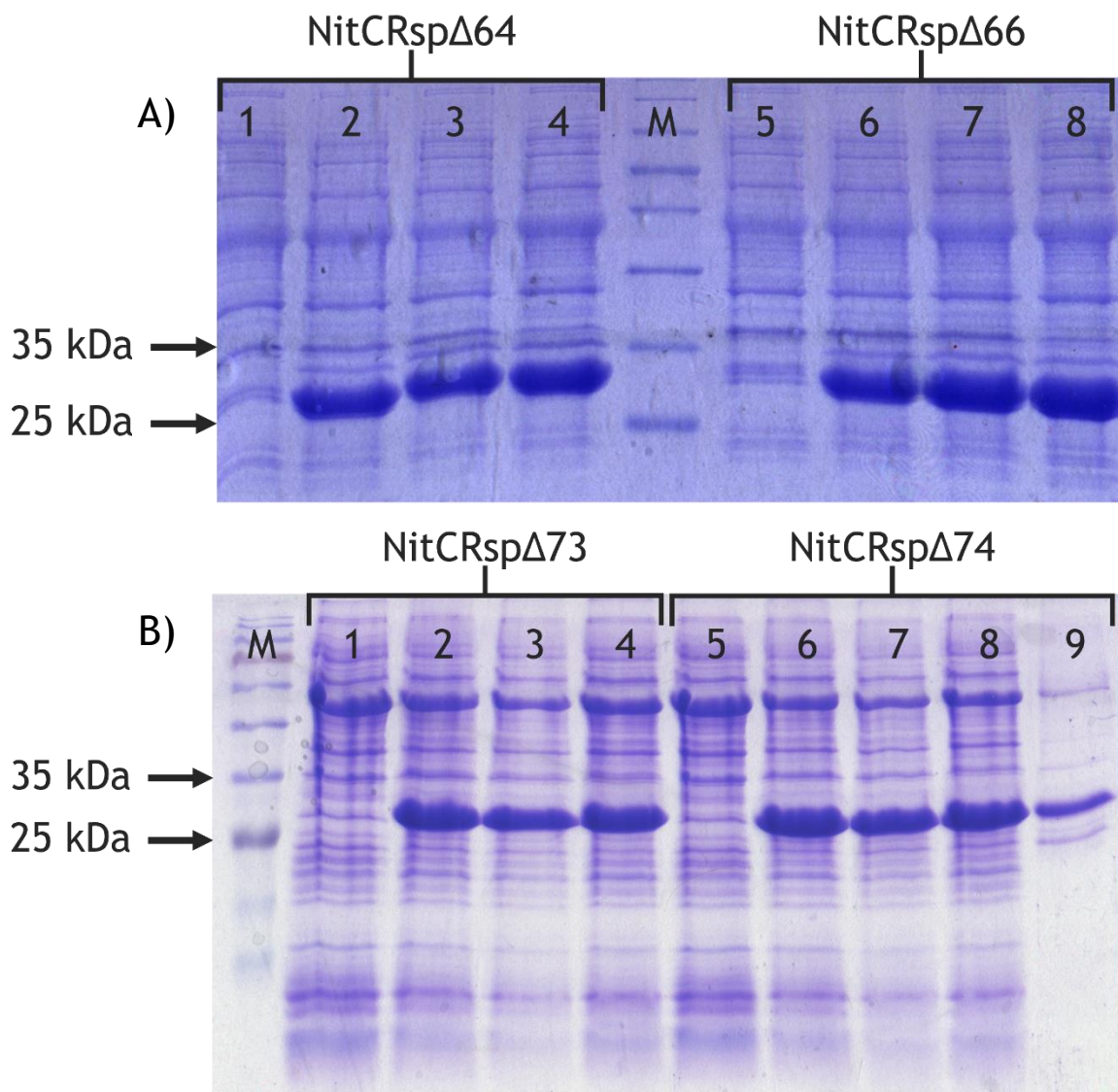
A partir de la digestión, se aislaron los genes de NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 y el plásmido pET24b(+), el cual es el vector receptor. Una vez aislados los insertos y el plásmido pET24b(+) linealizados, se ligaron los genes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 en el vector pET24b(+), se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se sembraron cajas con las células transformadas y se aisló el DNA de las colonias que crecieron en las placas con kanamicina. Para confirmar la presencia del inserto en el vector de interés, se realizaron digestiones con *Nde*I y *Hind*III. En la figura 21 se puede observar el peso del gen y del vector corresponden a los pesos esperados de los genes NitCRsp $\Delta$ 73 y NitCRsp $\Delta$ 74 y el vector pET24b(+).



**Figura 21. Digestion doble de pET24b(+)/NitCRspΔ73 y pET24b(+)/NitCRspΔ74.** La digestion se realizó con *NdeI* y *HindIII*. M) Marcador de peso 1 kb Plus DNA Ladder. 1) NitCRspΔ73 en pET24b(+) sin digerir. 2) NitCRspΔ73 en pET24b(+) digerido con *NdeI*. 3) NitCRspΔ73 en pET24b(+) digerido con *NdeI* y *HindIII*. 4) NitCRspΔ74 en pET24b(+) sin digerir. 5) NitCRspΔ74 en pET24b(+) digerido con *NdeI*. 6) NitCRspΔ74 en pET24b(+) digerido con *NdeI* y *HindIII*. El tamaño de los genes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 es de 879 pb y 876 pb respectivamente y el tamaño del plásmido pET24b(+) es de 5251 pb.

### Sobreexpresión de las mutantes truncas de RsV51BNit

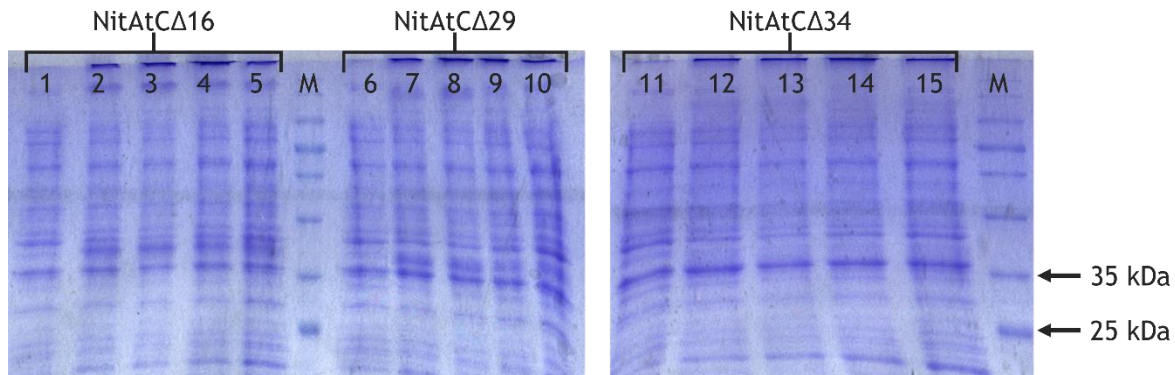
Con la finalidad de obtener grandes cantidades de proteínas solubles para poder realizar la caracterización de las mutantes, se sobreexpresaron. Se transformaron células de la cepa BL21-pGro7, la cual contiene un plásmido con las chaperonas GroEL (60 kDa) y GroES (10 kDa), con los genes de NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 en el plásmido pET24b(+). Se determinó que la mejor condición de inducción para NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 fue 6 h a 30 °C, y para NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66, 6 h de inducción a 22 °C con 0.4 mM de IPTG. El peso molecular estimado de las mutantes NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66, NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 es 33.4, 33.2, 32.4 y 32.2 kDa respectivamente. En la figura 22 se puede observar que las cuatro mutantes se obtuvieron en una buena cantidad y solubles. A partir de esta inducción se purificaron las mutantes.



**Figura 22. Inducción y solubilización de las mutantes truncas de Rsv51BNit en la cepa BL21-pGro7. (A) NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66; B) NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74: 1 y 5) Antes de inducir. 2 y 6) Después de inducir. 3 y 7) Extracto total. 4 y 8) Sobrenadante. M) Marcador de peso BLUEstain™ Protein ladder. B 9) NitCRspΔ73 procedente de una purificación previa y usada como marcador de peso.**

### Sobreexpresión de las mutantes truncas de AtNit4

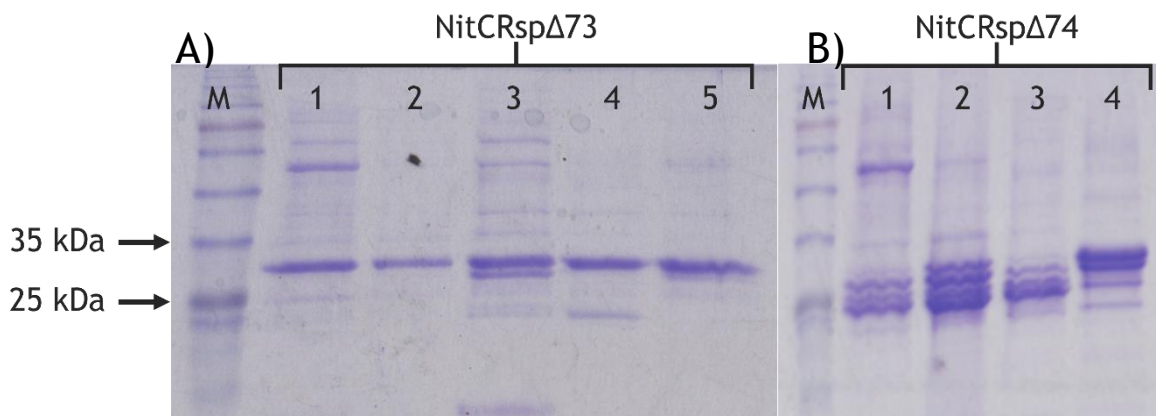
Se transformaron células Rosetta™(DE3)pLysS con los plásmidos pET22b(+) con los genes de NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. La cepa Rosetta™ está especializada para la expresión de proteínas eucariontes y fue la cepa que permitió la expresión de AtNit4 y sus mutantes. La condición usada para la expresión de las tres mutantes fueron 8 h de inducción a 22 °C con 0.4 mM de IPTG. Como se observa en la figura 23, las condiciones de sobreexpresión y solubilización de las mutantes NitAtCΔ16 (carril 5), NitAtCΔ29 (carril 10) y NitAtCΔ34 (carril 15) permiten obtener a las proteínas mutantes en la fracción soluble. El peso molecular estimado de las mutantes NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34 es 33.4, 33.6 y 38.2 kDa respectivamente. En el gel, se aprecia una banda entre el límite del gel superior y del gel inferior, la cual solo está presente después de inducir. Esta migración anómala se ha observado anteriormente en el laboratorio con la AtNit4 silvestre, y correlaciona con el estado oligomérico en el que se ensamblan las nitrilasas.



**Figura 23.** Inducción y solubilización de las mutantes truncas de AtNit4 en la cepa Rosetta™(DE3)pLysS. 1-5) NitAtCΔ16; 6-10) NitAtCΔ29 y 11-15) NitAtCΔ34. Carriles 1,6 y 11, Antes de inducir; 2, 7 y 12 Después de inducir 4 h a 22 °C. 3, 8 y 13 Después de inducir 8 h a 22 °C. 4, 9 y 14 Extracto total. 5, 10 y 15 Sobrenadante. M) Marcador de peso BLUEstain™ Protein ladder.

### Purificación de las mutantes de RsV51BNit NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74

Una vez que se obtuvieron las mutantes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 en gran cantidad y solubles, se procedió a su purificación, para poder realizar los análisis posteriores. El protocolo de purificación de las mutantes NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74 fue el siguiente. El primer paso consistió en precipitar a las mutantes con sulfato de amonio al 20 %. Las proteínas precipitadas se resuspendieron y dializaron en el amortiguador de corrida (Buffer A.1), y se pasaron por una columna de filtración en gel S-300. Las distintas fracciones se analizaron en un gel SDS-PAGE y las fracciones más puras se concentraron por medio de unidades filtradoras Amicon con corte de 10 kDa. Las fracciones más puras se pasaron por la columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP con un gradiente de 0.1 a 1M NaCl. Las fracciones resultantes más puras, analizadas por SDS-PAGE, se concentraron por medio de unidades filtradoras y se dializaron en amortiguador de corrida a pH 7.0. Estas fracciones se volvieron a pasar por la columna HiTrap Q HP con un gradiente de 0.1 a 1M NaCl a pH 7.0. En la figura 24 se presenta la purificación de las mutantes. La mutante NitCRspΔ73 se pudo llevar a un grado de pureza mayor que la mutante NitCRspΔ74.

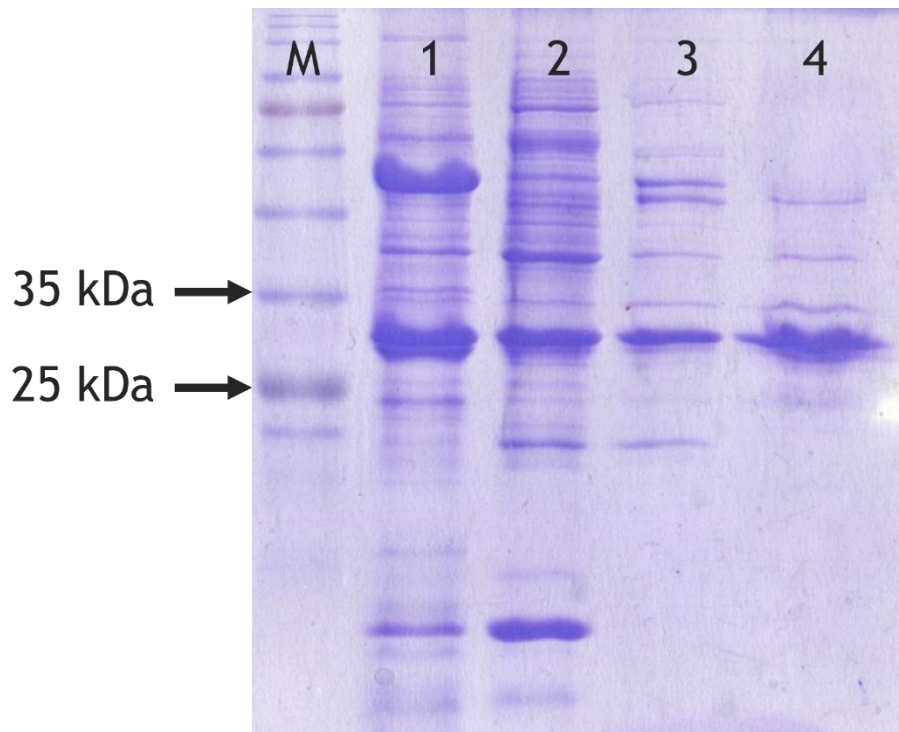


**Figura 24. Purificación de las nitrilasas NitCRspΔ73 y NitCRspΔ74.** A) Purificación de NitCRspΔ73: 1) Proteínas provenientes de células BL21-pGro7 con 6 h de inducción a 30 °C. 2) Proteínas que precipitaron al 20 % de sulfato de amonio. 3) Proteínas resultantes después de pasar por una columna de filtración en gel S-300. 4) Proteínas resultantes después de pasar por la columna HiTrap Q HP a pH 7.8. 5) Enzima pura resultante después de pasar por la columna HiTrap Q HP a pH 7.0. B) Purificación de NitCRspΔ74. 1) Proteínas provenientes de células BL21-pGro7 con 6 h de inducción a 30 °C. 2) Proteínas que precipitaron a 20 % de sulfato de amonio. 3) Proteínas resultantes después de pasar por una columna de filtración en gel. 4) Proteínas resultantes después de pasar por la columna HiTrap Q HP a pH 7.8. M) Marcador de peso BLUEstain™ Protein ladder



### Purificación de las mutantes de RsV51BNit NitCRspΔ64 y NitCRspΔ66.

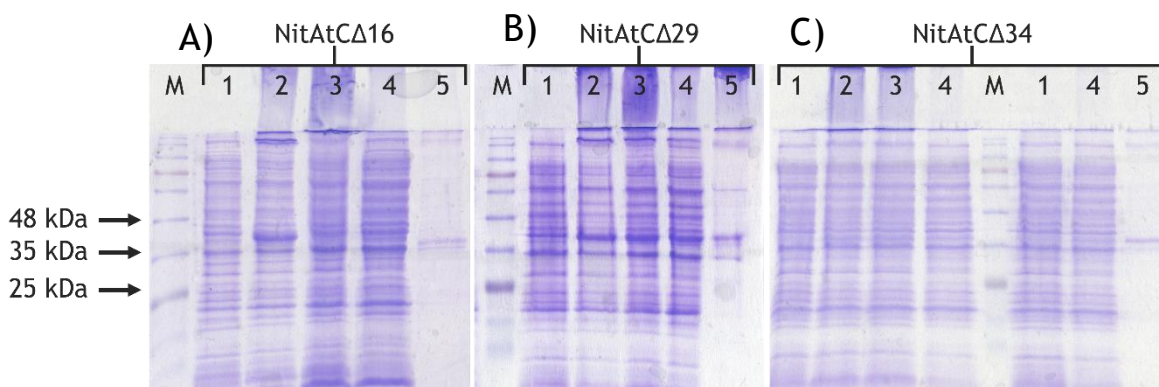
El protocolo de purificación de las mutantes NitCRspΔ66 y NitCRspΔ64 fue diferente. Esto se debe a que las mutantes NitCRspΔ66 y NitCRspΔ64 se agregan irreversiblemente al agregar sulfato de amonio. Por consiguiente, no se usó sulfato de amonio y se cambió el amortiguador de lisis (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.150 M NaCl y 0.2 mM PMSF a pH 7.8). El sobrenadante se inyectó primero a una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP, equilibrada en amortiguador fosfatos de sodio 50 mM, 150 mM de NaCl y 1 mM de EDTA pH 7.8, la proteína se eluyó en un gradiente de 0.15-1M de NaCl. Se tomaron las fracciones más puras que eluyeron al 20 % del amortiguador 1 M de NaCl (305 mM), se concentraron y dializaron en amortiguador de corrida a pH 7.0 para volverlas a pasar por una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP. Las distintas fracciones se analizaron en un gel SDS-PAGE y las fracciones más puras se concentraron por medio de unidades filtradoras (Amicon con corte de 10 kDa). Las proteínas eluyeron al 40 % de amortiguador 1 M (490 mM) de NaCl. Por último, se inyectó a una columna de filtración en gel S-300. En la figura 25 se presenta la purificación de la mutante NitCRspΔ64, la mutante NitCRspΔ66 tuvo un proceso de purificación similar.



**Figura 25. Purificación de la nitrilasa NitCRspΔ64.** M) Marcador de peso BlueElf Prestained Protein Marker. 1) Proteínas provenientes de células BL21-pGro7 con 6 h de inducción a 22 °C. 2) Proteínas resultantes después de pasar por la columna HiTrap Q HP a pH 7.8. 3) Proteínas resultantes después de pasar por la columna HiTrap Q HP a pH 7.0. 4) Proteínas resultantes después de pasar por una columna de filtración en gel.

### Purificación de las mutantes de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34

Las mutantes NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34 se purificaron de acuerdo con el protocolo descrito en Métodos. Ya que estas mutantes tienen una etiqueta de histidinas en el C-terminal, el sobrenadante se inyectó directamente a una columna de afinidad His-Trap HP y la muestra eluyó al 20 % de amortiguador NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, Imidazol 500 mM, 500 mM NaCl. Las distintas fracciones se analizaron en un gel SDS-PAGE y las fracciones más puras se concentraron por medio de unidades filtradoras (Amicon con corte de 10 kDa). En la figura 26 se puede observar los pasos de purificación de las mutantes, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34, cuyo peso esperado es 38.3 kDa, 36.7 kDa y 36.1 kDa respectivamente.



**Figura 26.** Purificación de las nitrilasas NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34. A) NitAtCΔ16, B) NitAtCΔ29 y C) NitAtCΔ34. Carriles: 1) Antes de inducir. 2) Después de inducir 8 h a 22 °C. 3) Extracto total. 4) Sobrenadante. 5) Proteínas resultantes después de pasar por la columna de afinidad HisTrap HP. M) Marcador de peso BlueElf Prestained Protein Marker.

### Caracterización cinética de las mutantes de RsV51BNit y de AtNit4

Uno de los objetivos más importantes del proyecto es generar mutantes activas a pesar de modificar el estado oligomérico. Entonces, se procedió a caracterizar la actividad de las mutantes y en caso de ser posible, obtener los parámetros cinéticos.

Se realizaron pruebas de actividad a las mutantes truncas de RsV51BNit para diferentes nitrilos: benzonitrilo, valerónitrilo, adiponitrilo, acrilonitrilo, propionitrilo, 4-piridincarbonitrilo, 4-clorobenzonitrilo y cianuro. En ninguna condición con las mutantes de RsV51BNit se detectó la formación de amonio, lo cual indica la pérdida total de actividad al eliminar el C-terminal en sesenta y cuatro y setenta y cuatro residuos. Para descartar la posibilidad de que las mutantes perdieran su actividad durante el proceso de purificación, se realizaron pruebas de actividad con benzonitrilo a partir de las células lisadas de BL21-pGro7 después de la inducción. Sin embargo, no se detectó formación de amonio.

Se realizaron pruebas de actividad a las mutantes truncas de AtNit4 con  $\beta$ -ciano alanina. En la tabla VII se muestran las actividades específicas de la AtNit4 silvestre, la NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29. Las mutantes presentan una actividad aproximadamente veinticinco veces menor con respecto a la silvestre. La mutante NitAtC $\Delta$ 34 es completamente inactiva.

Tabla VII. Actividad específica de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 con 3 mM  $\beta$ -ciano alanina.

Enzima	Actividad específica ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Actividad relativa (%)
AtNit4	9.6	100
NitAtC $\Delta$ 16	0.41	4.3
NitAtC $\Delta$ 29	0.25	2.6

La actividad específica se calculó como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4 \text{mg}^{-1}$  de enzima  $\text{min}^{-1}$ . La actividad relativa se calculó a partir de la actividad específica de AtNit4.

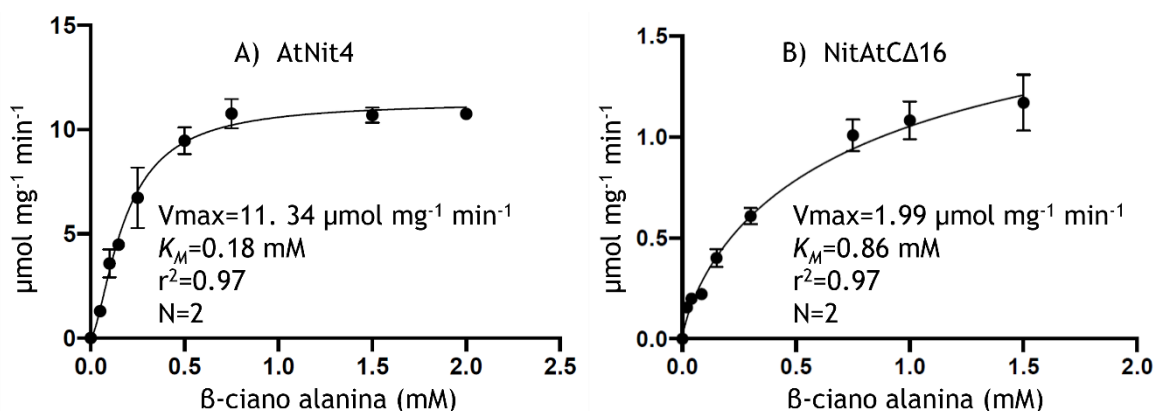


Figura 27. Efecto de la concentración de  $\beta$ -ciano alanina en la velocidad inicial de AtNit4 WT. Las curvas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten

La caracterización de NitAtC $\Delta$ 16 con  $\beta$ -ciano alanina indica que al eliminar la última hebra beta, la cual estabiliza la superficie A, se aumenta la K<sub>M</sub> y se disminuye la V<sub>max</sub> (Fig. 27). Esto se traduce en que la k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> de NitAtC $\Delta$ 16 disminuye veinticinco veces con respecto a AtNit4 silvestre (Tabla VIII). Aunque la mutante NitAtC $\Delta$ 29 es activa, no se encontraron las condiciones para obtener los parámetros cinéticos.

Tabla VIII. Parámetros cinéticos de AtNit4 y NitAtC $\Delta$ 16 con  $\beta$ -ciano alanina.

Mutante	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
AtNit4	7.52	0.18	41.8
NitAtC $\Delta$ 16	1.27	0.86	1.47

## Dicroísmo circular de las mutantes de RsV51BNit y de AtNit4

Con la finalidad de estimar la estructura secundaria de las mutantes, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular (CD) de RsV51BNit y sus mutantes y AtNit4 y sus mutantes. Únicamente no se midió el espectro de NitCRsp $\Delta$ 74, debido a que no se contaba con esta mutante en la pureza requerida.

Las nitrilasas activas y formadoras de filamentos de *Rhodococcus sp.* V51B suelen tener dos mínimos, a 208 nm y a 220 nm, el cual es característico de un plegamiento  $\alpha + \beta$  (Gómez, 2015). Como se observa en la figura 28 A, las mutantes NitCRsp $\Delta$ 64, NitCRsp $\Delta$ 66 y NitCRsp $\Delta$ 73 han perdido su mínimo a 208 nm y han disminuido su señal con respecto a NitRspC $\Delta$ 39, la cual es una mutante formadora de filamentos y activa descrita anteriormente (Gómez, 2015). Esto sugiere que la pérdida de actividad en estas mutantes podría deberse a la pérdida de estructura, aunque las mutaciones eliminan hebras betas lejos de la parte globular de la proteína.

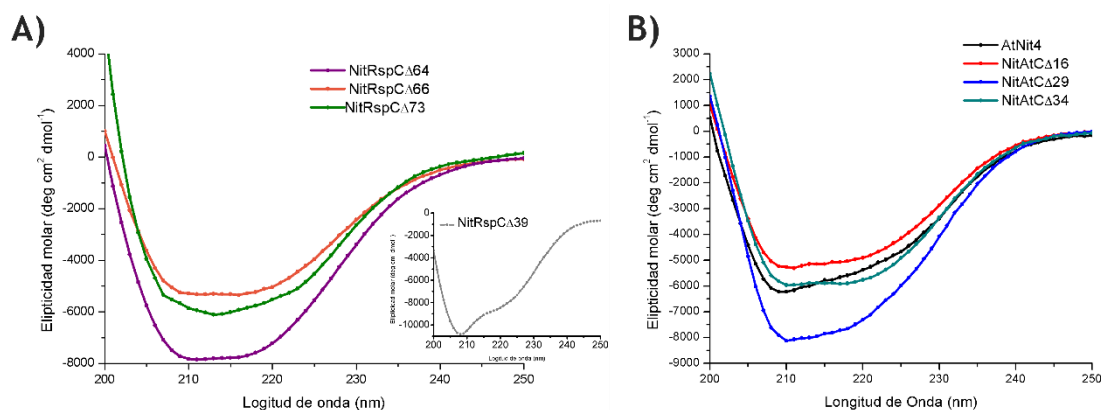


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de RsV51BNit, AtNit4 y sus mutantes. A) Espectros de RsV51BNit. NitRspC $\Delta$ 39 en gris, NitRspC $\Delta$ 64 en morado, NitRspC $\Delta$ 66 en verde y NitCRsp $\Delta$ 73 en naranja. B) Espectros de AtNit4 y sus mutantes. AtNit4 en negro, NitAtC $\Delta$ 16 en Roja, NitAtC $\Delta$ 29 en azul y NitAtC $\Delta$ 34 en verde azulado.

El espectro de AtNit4 tiene el mínimo a 208 nm, característico de las nitrilasas. A diferencia de las mutantes de RsV51BNit, las mutantes NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34 tienen un espectro similar al espectro de la enzima silvestre AtNit4 (Fig. 28 B). Incluso NitAtC $\Delta$ 29, una mutante con baja actividad, tiene una mayor señal que AtNit4. Esto sugiere que las mutantes truncas de AtNit4 se han plegado correctamente y la pérdida de actividad en estas mutantes no se debe a un plegamiento incorrecto.

Para corroborar las inferencias hechas a partir de los espectros de dicroísmo circular se deconvolucionaron los espectros de CD en el programa CDPro. De acuerdo con los porcentajes obtenidos por CD, las mutantes de RsV51BNit y AtNit4 han disminuido el número de aminoácidos formando hélices alfas y aumentado el número de aminoácidos formando hebras beta (Tabla IX). No obstante, al recortar fragmentos cada vez más grandes del C-terminal de AtNit4, se incrementa el porcentaje de residuos formando hélices alfas. Esta tendencia concuerda con lo esperado al eliminar fragmentos del C-terminal que forman hebras beta (Fig. 15).

Tabla IX. Porcentaje de estructura secundaria de las mutantes.

Mutante	Helices $\alpha$ (%)	Hebras $\beta$ (%)	Giros (%)	Otros (%)
NitRsp $\Delta$ 39	26.4	22.2	23	30
NitCRsp $\Delta$ 64	17.4	29.2	21.7	30.4
NitCRsp $\Delta$ 66	8.8	33.4	23.6	33.9
NitCRsp $\Delta$ 73	17.3	34.4	19.6	27.2
AtNit4	16	28.8	20.7	30.8
NitAt $\Delta$ 16	11.8	33	22	32.4
NitAt $\Delta$ 29	16.1	29	20.6	29.8
NitAt $\Delta$ 34	19.9	27.8	21.4	29.9

#### Desplegamiento térmico de las mutantes de AtNit4, NitAt $\Delta$ 16, NitAt $\Delta$ 29 y NitAt $\Delta$ 34

Para evaluar los efectos de la estabilidad al eliminar fragmentos sucesivamente más largos del C-terminal, se midió la disminución de la señal de CD a 208 nm al aumentar la temperatura en las mutantes NitAt $\Delta$ 16, NitAt $\Delta$ 29, NitAt $\Delta$ 34 y se comparó con el despliegamiento de la enzima silvestre AtNit4. No se midió el despliegamiento térmico de las mutantes de RsV51BNit, dado que ninguna de las mutantes mantiene su plegamiento nativo y no son activas (Fig. 28). A pesar de que ninguna de las transiciones fue reversible, los datos se ajustaron a un modelo de dos estados en la ecuación de Van't Hoff y a partir de este ajuste se obtuvo la temperatura fusión aparente ( $T_{m,app}$ ) de las distintas mutantes (Fig. 29).

En la figura 29 se aprecia que AtNit4 tiene la menor  $T_{m,app}$  e incluso la mutante inactiva NitAt $\Delta$ 34 presenta una  $T_{m,app}$  mayor. La transición entre el estado plegado al desplegado de NitAt $\Delta$ 29 tiene un intervalo de temperatura considerablemente más corto que el resto de las mutantes, realizándose entre los 55 °C y los 70 °C. El resto de las mutantes se empiezan a desnaturalizar alrededor de los 40 °C y terminan casi en los 70 °C. Estos resultados junto con los espectros de CD indican que las mutantes mantienen parte de su estructura nativa después de eliminar regiones importantes del C-terminal.

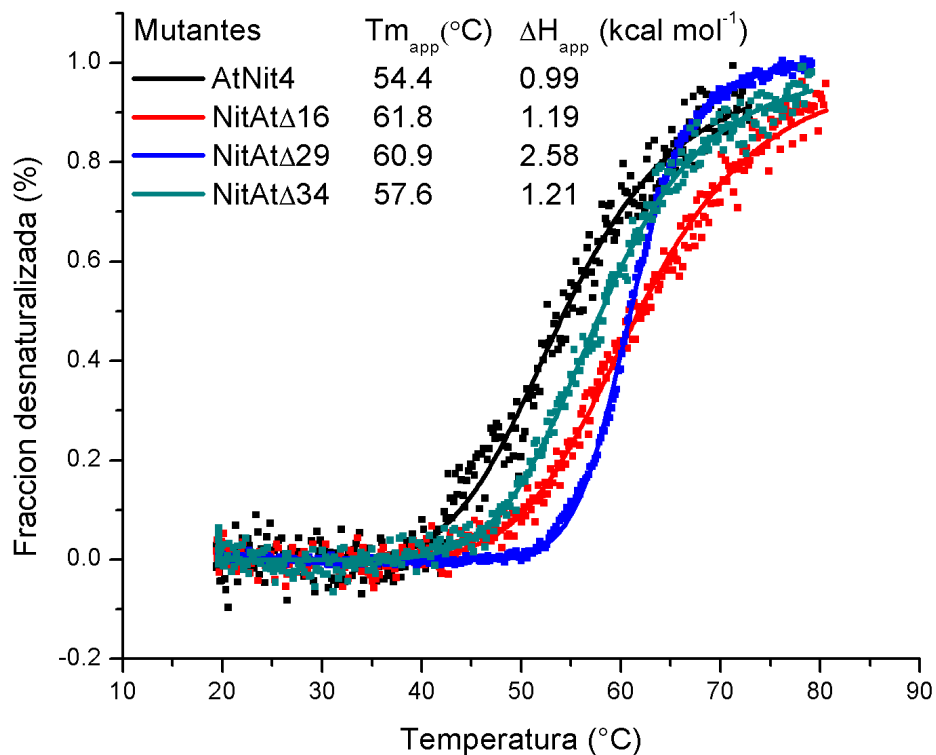


Figura 29. Transiciones térmicas de desplegamiento de AtNit4, NitAtΔ16, NitAtΔ29 y NitAtΔ34. El desplegamiento se midió a 208 nm. Se presentan las transiciones de AtNit4 en negro, NitAtΔ16 en rojo, NitAtΔ29 en azul y NitAtΔ34 en verde azulado. En puntos se presenta los datos experimentales y en línea el ajuste a la ecuación de Van't Hoff.

## Estimación del radio hidrodinámico de las mutantes de AtNit4 por dispersión dinámica de luz

Uno de los objetivos del proyecto es disminuir el tamaño de los oligómeros formados al eliminar las secciones del C-terminal que estabilizan las superficies C y A. Con la finalidad de estimar el cambio de tamaño de las mutantes de AtNit4 por el efecto de eliminar el C-terminal, se estimó el radio hidrodinámico ( $R_h$ ) por medio de dispersión dinámica de luz (DLS).

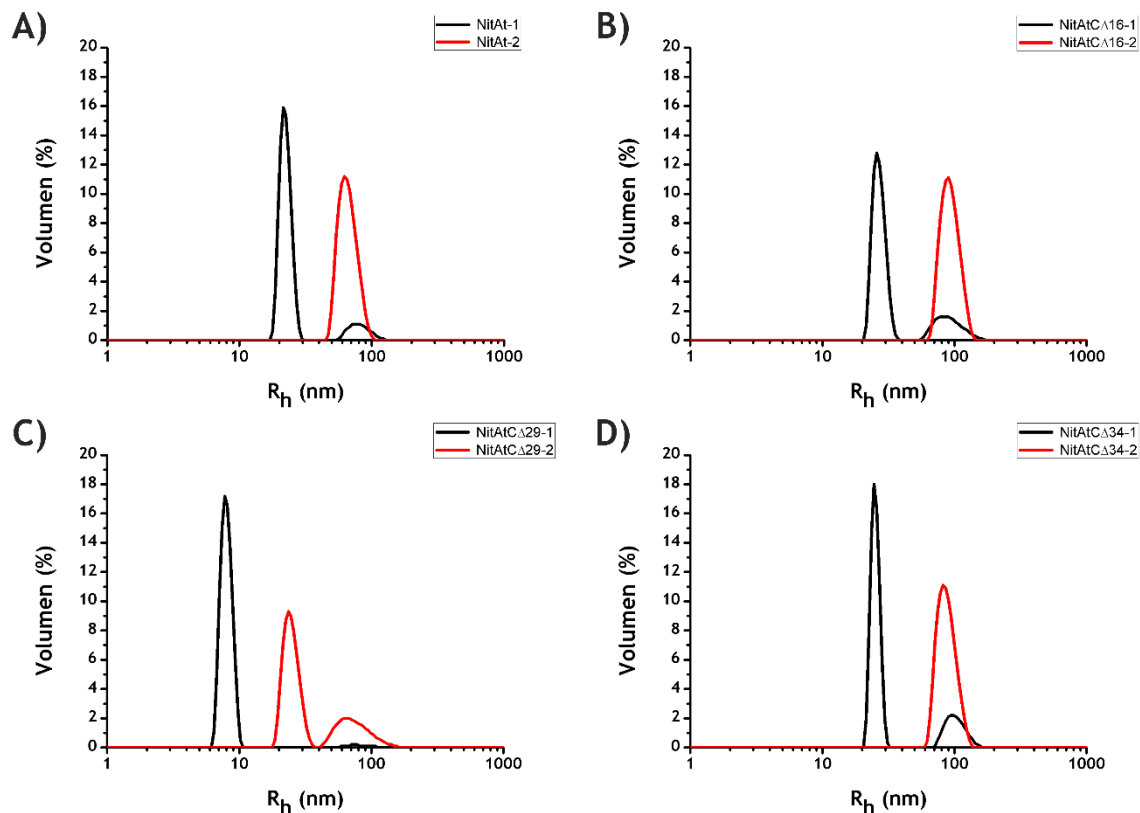


Figura 30. Radio hidrodinámico representativo de las distintas poblaciones. A) AtNit4. B) NitAtC $\Delta$ 16. C) NitAtC $\Delta$ 29. D) NitAtC $\Delta$ 34.

Como se observa en la figura 30, tanto en la enzima silvestre como en las mutantes truncas se forman poblaciones con una amplia variedad de tamaños. En todas las mutantes se presentan al menos dos poblaciones, una población de menor tamaño y menor polidispersidad, y una población de gran tamaño y mayor polidispersidad. En AtNit4 ambas poblaciones representan el 50 % de la masa. En las mutantes NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34, la población de mayor tamaño representa la mayor parte de la masa, lo que sugiere que los oligómeros de las mutantes tienden a formar agregados heterogéneos (Tabla X).

**Tabla X. Radio hidrodinámico medido por DLS de AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34.**

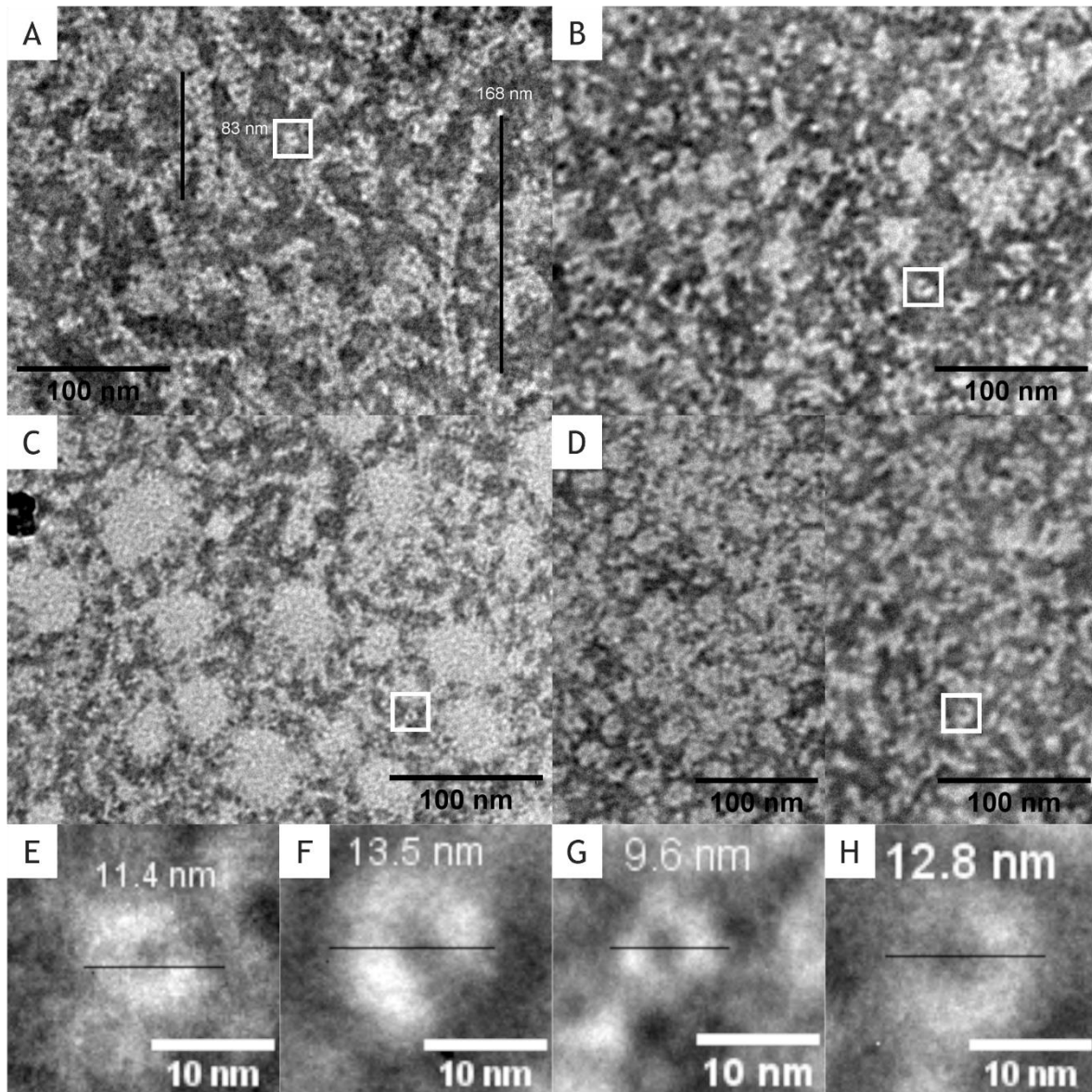
<b>Mutante</b>	<b>R<sub>h</sub> (nm)</b>	<b>Polidispersidad* (%)</b>
AtNit4	22.4±2.0	9.2
AtNit4	68.0±10.7	15.3
NitAtCΔ16	27.0±2.9	10.5
NitAtCΔ16	98.5±14.6	14.9
NitAtCΔ29	8.1±0.7	9.1
NitAtCΔ29	25.8±3.4	13.1
NitAtCΔ29	89.8±25.7	28.1
NitAtCΔ34	27.8±1.7	6.8
NitAtCΔ34	89.8±28.0	29.0

\*Valores mayores a 20 indican poblaciones polidispersas



### Microscopia electrónica de transmisión de las mutantes de AtNit4

Para conocer la forma en la que se asocian las subunidades de ANit4 y sus mutantes, se observaron por microscopia electrónica de transmisión con tinción negativa. Las mediciones del  $R_h$  por DLS permiten diferenciar entre los oligómeros y los agregados amorfos.



**Figura 31. Microscopia electrónica de transmisión con tinción negativa.** En un marco blanco se marcan oligómeros a los que se realizó un acercamiento. Micrografías de: A) AtNit4WT. B) NitAtC $\Delta$ 16. C) NitAtC $\Delta$ 29. D) NitAtC $\Delta$ 34. En un marco blanco se marcan oligómeros a los que se realizó un acercamiento y se muestran en: E) AtNit4WT. F) NitAtC $\Delta$ 16. G) NitAtC $\Delta$ 29. H) NitAtC $\Delta$ 34

En la figura 31 A se observa que AtNit4 forma principalmente filamentos de longitud variable y algunos oligómeros de menor tamaño, formando estructuras semi-cerradas (Fig. 31 E). Los filamentos tienen una longitud promedio de 73 nm y un diámetro de 10.9 nm. Los oligómeros de menor tamaño tienen un diámetro de 12.1 nm (Tabla XI).

Las mutantes NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34 dejan de formar filamentos y forman gran cantidad de agregados amorfos de diversos tamaños (Fig. 31 B-D) y oligómeros en estructuras semi-cerradas similares a los observados para la AtNit4 (Fig. 31 F-H). El diámetro de estos oligómeros está entre los 9.8 nm y los 12 .8 nm (Tabla XI).

Tabla XI. Diámetro de los oligómeros formados por AtNit4, NitAtCΔ16, NitAtCΔ29 y NitAtCΔ34.

Mutante	Diámetro (nm)	Tamaño de muestra
AtNit4 Filamentos	10.9±1.7	30
AtNit4	12.1±1.7	8
NitAtCΔ16	12.8±1	4
NitAtCΔ29	9.8±1.7	6
NitAtCΔ34	11.9±1.5	8

## Acoplamiento Proteína ligando con RsV51BNit

Con la finalidad de investigar los residuos implicados en la actividad enzimática en el sitio activo de RsV51BNit, se realizaron acoplamientos moleculares con la estructura refinada y con distintos sustratos probados anteriormente en el laboratorio con la mutante NitRspCΔ39 (Romero, 2015). También se incluyó el cianuro como un control negativo. El sitio activo de RsV51BNit se encuentra contenido en un solo monómero y está formado por residuos no polares, en especial residuos aromáticos. En la figura 32 se presentan algunos de los resultados del acoplamiento molecular, en los que se obtuvo la menor distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano ( $D_{C-S}$ ).

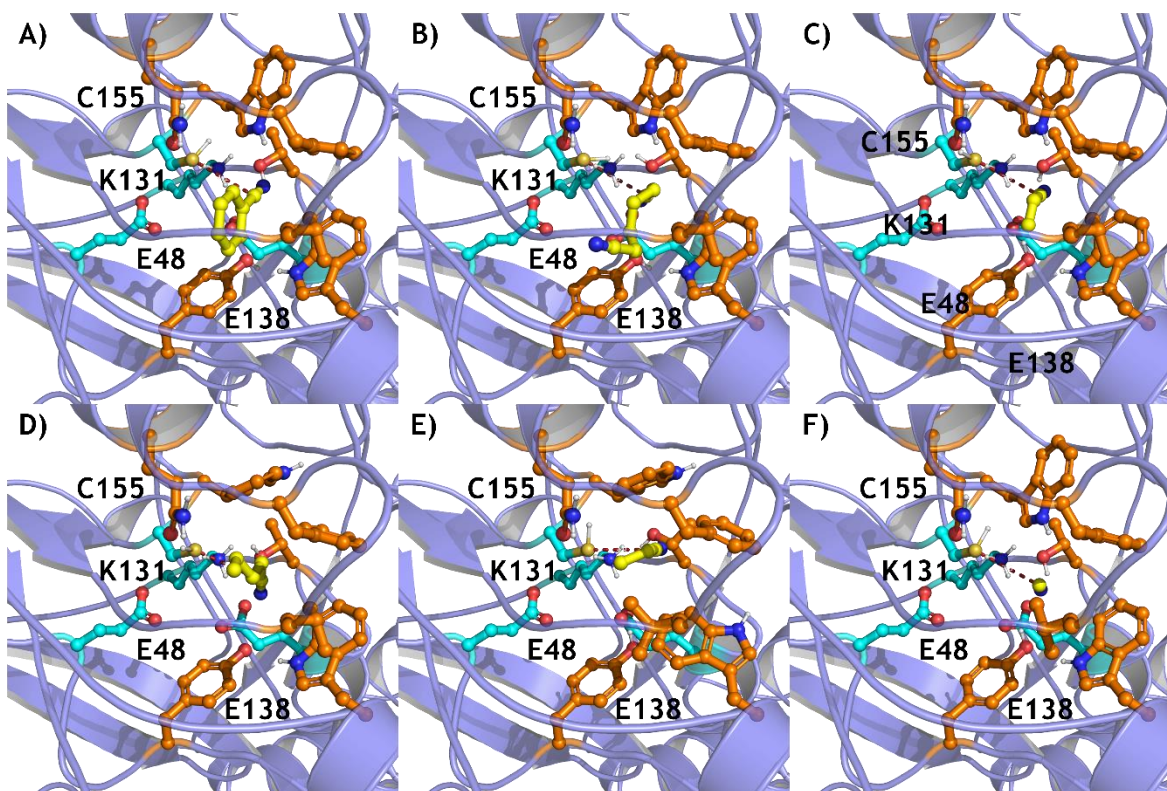


Figura 32. Resultados del acoplamiento molecular en RsV51BNit. La conformación seleccionada es la conformación con la menor distancia entre el carbono del grupo nitrilo y el azufre de la cisteína. A) Benzonitrilo. B) Adiponitrilo. C) Acrilonitrilo. D) Valeronitrilo. E) Propionitrilo. F) Cianuro. Imagen hecha en Pymol. Los PDB fueron hechos en AutoDock4.

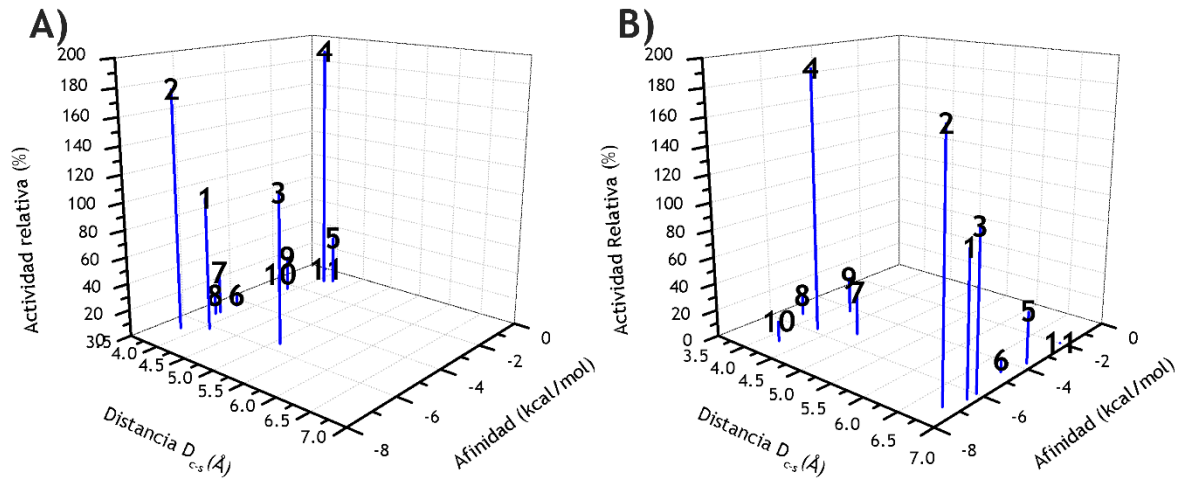
Se recopiló la información de la distancia entre del azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo nitrilo ( $D_{S-O}$ ) y el valor de la afinidad dado por AutoDock vina para cada una de las conformaciones resultantes del acoplamiento molecular. Dado que el acoplamiento molecular entrega varias conformaciones para cada sustrato, se usaron dos argumentos para seleccionar las conformaciones, la conformación con la menor distancia  $D_{S-O}$  y las conformaciones con el menor valor de afinidad reportado por AutoDock Vina. En la tabla XII, se presenta la información de cada una de las conformaciones seleccionadas con cada sustrato usando los dos argumentos mencionados anteriormente y la actividad catalítica reportada de los sustratos probados anteriormente en el laboratorio con la mutante NitRspCΔ39 (Romero, 2015).

Tabla XII. Resultado del acoplamiento molecular de RsV51BNit.

Sustrato	Número	Distancia $D_{S-O}$ (Å)	Afinidad (kcal/mol)	Distancia $D_{S-O}$ (Å)	Afinidad (kcal/mol)	Actividad (%)
Argumento usado		Menor distancia		Mayor afinidad		
Benzonitrilo	1	4.1	-6.2	6.9	-6.4	100
p-clorobenzonitrilo	2	3.8	-6.7	6.8	-7.1	176.7
Nicotinonitrilo	3	5.1	-5.6	6.9	-6.0	110.5
Isonicotinonitrilo	4	4.1	-1.0	4.3	-5.8	191.5
Propionitrilo	5	4.2	-0.8	6.9	-3.7	37.5
Valeronitrilo	6	3.8	-4.4	6.8	-4.6	8.2
2-metilglutaronitrilo *	7	3.8	-5.1	4.8	-5.3	31.95
Adiponitrilo	8	3.8	-5.3	3.8	-5.3	14.6
Succinonitrilo *	9	3.9	-2.3	4.2	-4.2	26.58
3-fenilpropionitrilo	10	3.9	-2.7	4.2	-7.1	14.7
Cianuro	11	3.8	-0.1	6.9	-2.0	0

Las actividades se obtuvieron de trabajos anteriores del laboratorio con NitRspCΔ39. Los sustratos con asterisco se obtuvieron de valores de actividad en agregados enzimáticos entrecruzados de NitRspCΔ39 (Romero, 2018). Se presentan la distancia y la afinidad usando las conformaciones escogidas con el argumento de menor distancia y mayor afinidad reportada

A partir de los resultados del acoplamiento molecular, se buscó una correlación entre la actividad catalítica reportada, la distancia  $D_{S-O}$  y la afinidad de las conformaciones seleccionadas con cada uno de los argumentos mencionados anteriormente. En la figura 33, se presentan una grafica con las posibles relaciones entre estos parámetros. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre ninguno de los valores usando las conformaciones seleccionadas con cada uno de los argumentos.



**Figura 33. Gráficas de las tres variables medidas.** Se evaluó la distancia D<sub>c-s</sub>, la afinidad calculada por AutoDock Vina y la actividad reportada (Romero, 2018). Los números identifican los sustratos con la tabla XI. A) Conformaciones seleccionadas usando la menor distancia D<sub>s-o</sub> como argumento. B) Conformaciones seleccionadas usando la mayor afinidad.

### Acoplamiento molecular proteína-ligando de AtNit4 con ligando hidratado

Se realizó acoplamiento molecular con AtNit4 con la finalidad de investigar el sitio activo de AtNit4. A diferencia de RsV51BNit, el sitio activo de AtNit4 no se encuentra completamente contenido en un solo monómero. AtNit4 tiene una inserción entre la posición ochenta y nueve y la posición noventa y dos con respecto al alineamiento (Fig. 4). Esta inserción forma un asa, la cual se proyecta a través de la superficie C y permite cerrar la cavidad del sitio activo del dímero alejando (Mulelu *et al.*, 2019). Además, el sitio activo tiene residuos polares y cargados y el sustrato de la enzima es la β-ciano alanina, la cual tiene dos grupos cargados. Por lo tanto, se decidió hacer acoplamiento molecular hidratado y como control se hizo acoplamiento molecular con los mismos parámetros, pero sin tener el sustrato hidratado. El protocolo incluye un pseudoátomo denominado WAT, el cual representa a una molécula de agua y tiene la capacidad de ser tanto donador como aceptor de puentes de hidrógeno (Forli & Olson, 2012). El protocolo de acoplamiento molecular hidratado entrega solamente la conformación de mayor afinidad, por lo que la comparación se hizo con la conformación de mayor afinidad de acoplamiento molecular sin agua.

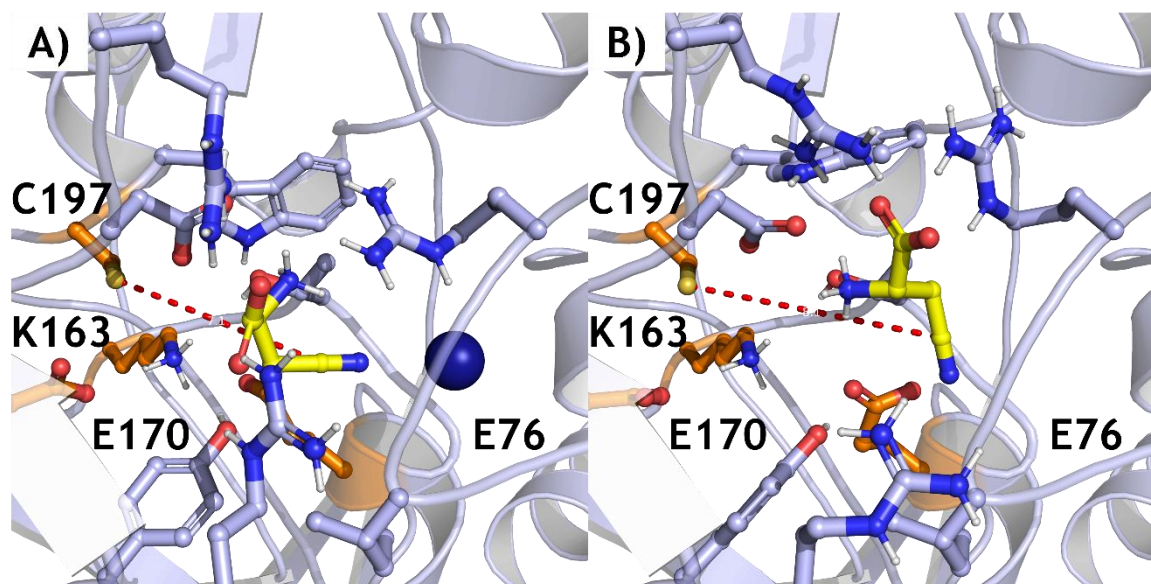
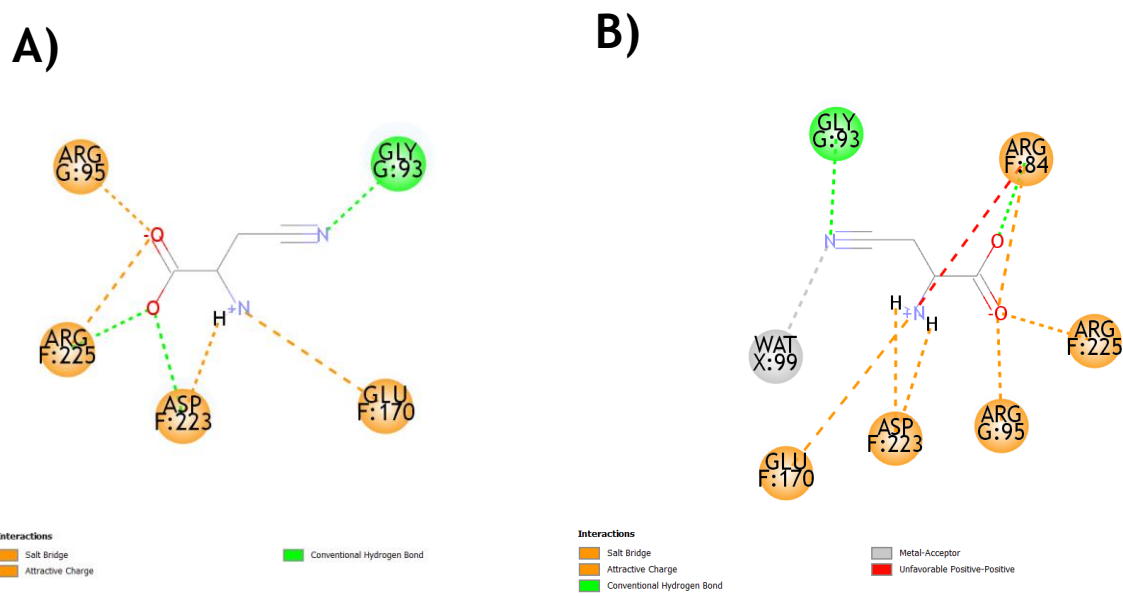


Figura 34. Resultados del acoplamiento molecular en la nitrilasa AtNit4. A)  $\beta$ -ciano alanina. B)  $\beta$ -ciano alanina hidratada. En naranja la tétrada catalítica. En azul claro los residuos del sitio activo. En amarillo la  $\beta$ -ciano alanina. En violeta la molécula de agua. Imagen hecha en Pymol. Los PDB fueron hechos en AutoDock4.

En la figura 34 se muestra el resultado de los dos acoplamientos moleculares. En el acoplamiento molecular con sustrato hidratado, únicamente el pseudoátomo WAT interactuando con el grupo nitrilo se conservó. Los otros dos pseudoátomos interactuando con el grupo amino y carboxilo fueron desplazados y no se contemplan. Aparte de esta diferencia, en ambos casos el sustrato se acomoda de una forma similar. Sin embargo, hay una diferencia importante en la afinidad reportada por AutoDock al incluir el sustrato hidratado (Tabla XIII). También parece que se ha reducido la distancia  $D_{s-c}$  en un Å con respecto al sustrato hidratado, aunque en ambos casos el grupo ciano es alejado de la cisteína catalítica e incluso el resto del sustrato bloquea esta interacción.

Tabla XIII. Resultado del acoplamiento molecular de AtNit4 hidratado y con solvente implícito.

Sustrato	$D_{s-c}$ (Å)	Afinidad (kcal/mol)
$\beta$ -ciano alanina	8.1	-16.66
$\beta$ -ciano alanina hidratado	7.1	-8.3



**Figura 35. Diagrama bidimensional de las interacciones de  $\beta$ -ciano alanina con AtNit4. A)  $\beta$ -ciano alanina. B)  $\beta$ -ciano alanina hidratada. Diagrama hecho en Discovery Studio.**

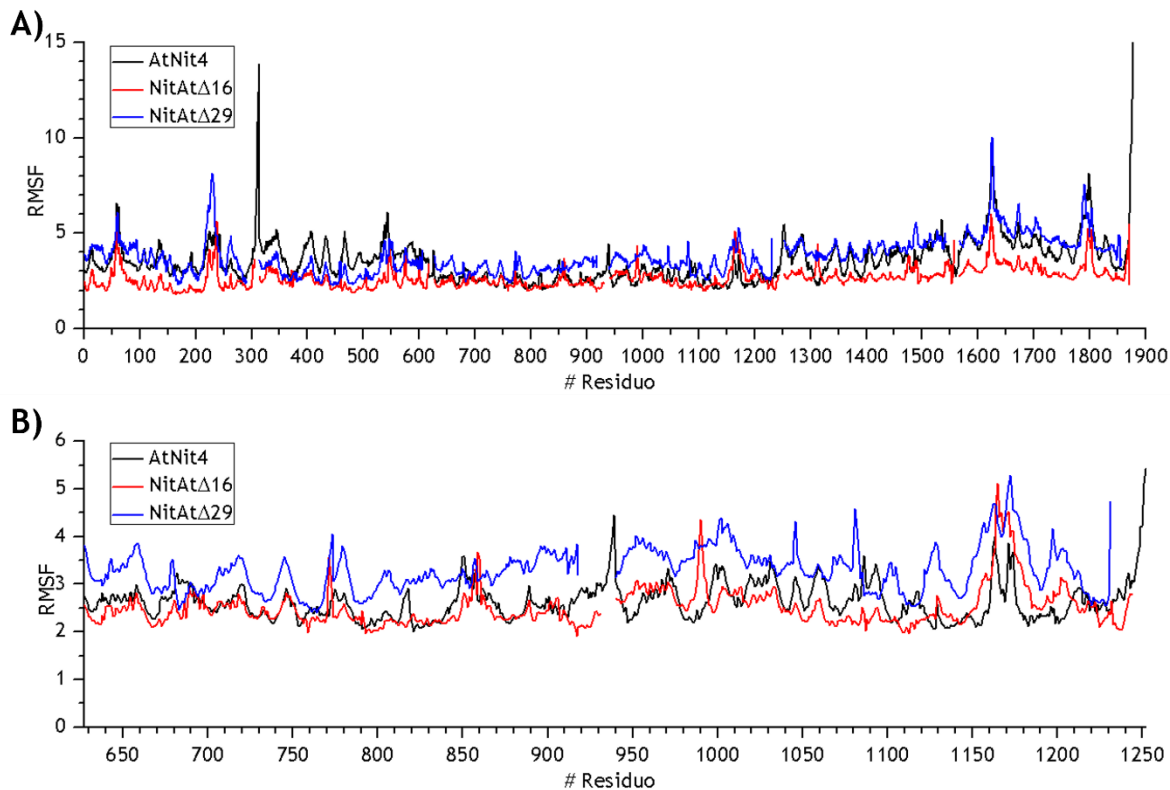
Para conocer la fuente de la diferencia en la afinidad entre los dos acoplamientos, se analizaron las interacciones del sustrato,  $\beta$ -ciano alanina, con AtNit4. En la figura 35 se representan las interacciones de la  $\beta$ -ciano alanina con AtNit4. Tanto con el sustrato hidratado como sin hidratar, las interacciones son muy similares y con los mismos residuos. El grupo ciano interactúa con la glicina noventa y tres del sitio activo, el grupo ácido de la  $\beta$ -ciano alanina forma puentes salinos con la arginina doscientos veinticinco de la misma cadena y con la arginina noventa y cinco del dímero aledaño. El grupo amino de la  $\beta$ -ciano alanina forma puentes salinos con el glutamato ciento setenta y tres y el aspartato doscientos veintitrés. Las únicas diferencias entre el acoplamiento molecular con sustrato hidratado y el sustrato sin hidratar es la arginina ochenta y cuatro y el pseudoátomo WAT. La  $\beta$ -ciano alanina se aproxima a la arginina ochenta y cuatro y forma un puente salino y un puente de hidrógeno con su grupo ácido. La cercanía del sustrato también genera cierta repulsión entre la arginina ochenta y cuatro y el grupo amino. El pseudoátomo WAT interactúa con el nitrógeno del grupo ciano. Esto parece indicar que la principal fuente de diferencia en la afinidad son las interacciones del pseudoátomo WAT y de la arginina ochenta y cuatro.

## Dinámica molecular con AtNit4 y sus mutantes

Aunque el acoplamiento molecular puede brindar información de la interacción de un sustrato con su ligando, es incapaz de tomar en cuenta el movimiento de la proteína y las consecuencias de ello en la unión al sustrato. Con la finalidad de comprender los cambios en la estructura al eliminar secciones del C-terminal y su efecto sobre la afinidad y posición de la  $\beta$ -ciano alanina en el sitio catalítico, se realizó una dinámica molecular con AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 con su sustrato,  $\beta$ -ciano alanina.

Anteriormente se ha probado que la  $D_{5-0}$  correlaciona con la actividad de algunas nitrilasas y ha sido capaz de distinguir las diferencias de actividad entre mutantes puntuales (Zhang *et al.*, 2014). No obstante, nunca se han hecho dinámicas moleculares para estudiar el efecto de eliminar secciones del C-terminal sobre la actividad. Dado que el bloque básico de construcción de los miembros de la superfamilia de las nitrilasas es un homodímero y que los dos C-terminales de cada homodímero interactúa con las subunidades aledañas, se realizó la dinámica molecular con un hexámero para garantizar que el dímero en el centro del hexámero mantuviera todos sus contactos, especialmente los contactos del C-terminal. Como se ha mencionado previamente, el sitio catalítico de AtNit4 queda limitado por un asa de la subunidad aledaña, al usar un hexámero también se garantiza que las dos cavidades de los sitios activos del dímero del centro del hexámero estén totalmente formadas y completamente delimitadas.

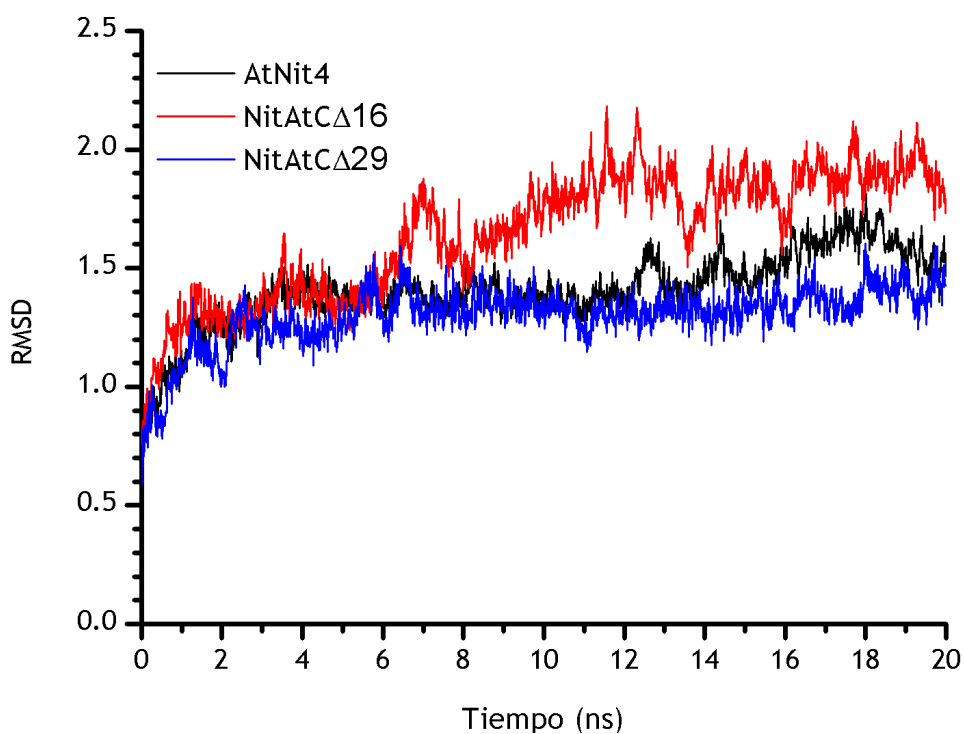




**Figura 36. Root-mean-square fluctuation (RMSF) después de los 10 ns de simulación. A) RMSF de las seis subunidades. B) RMSF de las dos subunidades del centro. En negro se marca el RMSF de AtNit4. En rojo se marca el RMSF de NitAtΔ16. En azul marca el RMSF de NitAtΔ29.**

Una de las primeras mediciones que se obtiene de una dinámica molecular es la fluctuación del valor cuadrático medio (RMSF). En la figura 36 se presenta la RMSF de los hexámeros de AtNit4, NitAtΔ16y NitAtΔ29 a lo largo de la dinámica. Se puede observar que las fluctuaciones más marcadas a lo largo de la dinámica se encuentran en los residuos de los extremos que corresponde a los dímeros de las orillas. En contraste, el dímero del centro, el cual abarca del residuo seiscientos veintisiete al residuo mil doscientos cincuenta y dos, tiene una menor variación a lo largo de la dinámica, incluido el C-terminal (Fig. 36). La falta de contactos de los C-terminales de las dos subunidades de las orillas es la responsable de las mayores fluctuaciones, mientras que las subunidades con todos sus contactos tienen menores fluctuaciones.

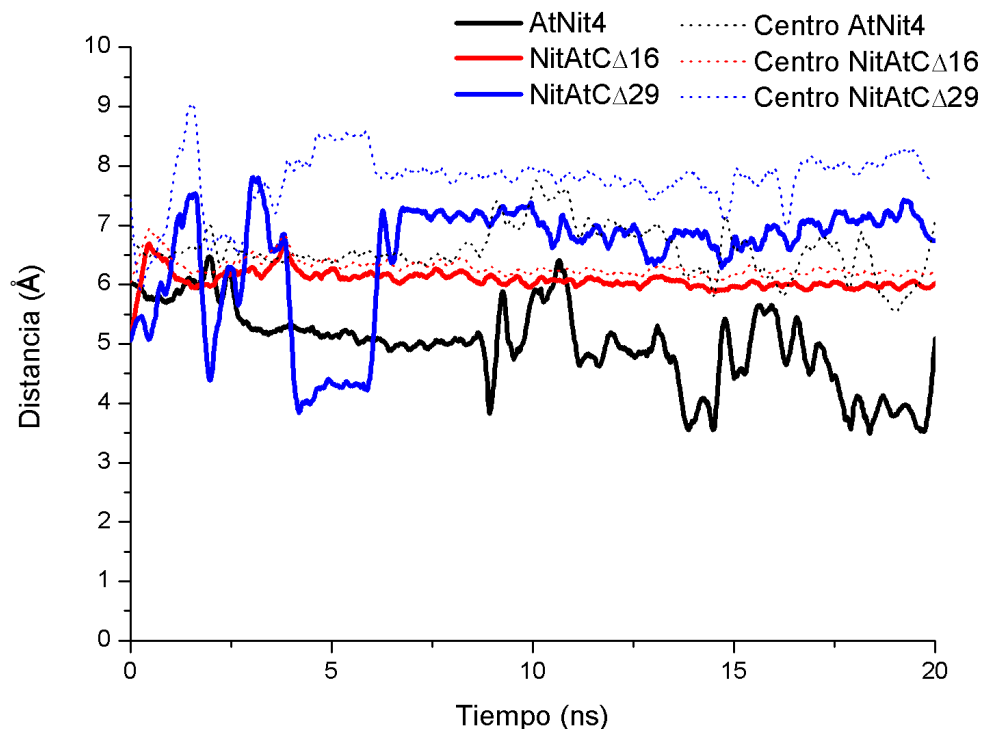
Para confirmar que en el intervalo simulado de la dinámica molecular se llegó al equilibrio, se midió la desviación del valor cuadrático medio (RMSD) a lo largo de la dinámica. Se calculó el RMSD del residuo treinta y cinco al residuo trescientos veintiuno de las dos subunidades del centro para evitar que la fluctuación de los dímeros de las orillas y las regiones del C-terminal que no se presentan en todas las mutantes, pudieran afectar las mediciones. En la figura 37, se observan los resultados de RMSD de la dinámica. El RMSD de la mutante NitAtCΔ29 se mantiene en el mismo rango a partir de los 7.5 ns, mientras que las mutantes AtNit4 y NitAtCΔ16 se mantienen en el mismo rango hasta después de los 10 ns de dinámica. Por lo tanto, a partir de los 10 ns de dinámica molecular, las tres mutantes han llegado al equilibrio y los análisis posteriores se realizarán después de este intervalo de tiempo.



**Figura 37. Root-mean-square deviation (RMSD) de AtNit4 y sus mutantes.** Se midió el RMSD de las seis subunidades. En negro, se representa AtNit4. En rojo, se representa NitAtCΔ16. En azul, se representa NitAtCΔ29.

### Medición de la distancia de $D_{c-s}$ durante la dinámica molecular

Durante la dinámica de las mutantes de AtNit4 con su sustrato, se midió la distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano de la  $\beta$ -ciano alanina. En la figura 38 se muestran  $D_{c-s}$  de las dinámicas de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 a lo largo de la dinámica molecular. Se puede apreciar que a partir de los 10 ns se presenta una tendencia clara en las distancias. La enzima silvestre, AtNit4, mantiene una distancia entre los 3.5 y 6 Å. Mientras, la mutante NitAtC $\Delta$ 16 mantiene una distancia entre los 5.5 Å y 6.5 Å a lo largo de toda la dinámica, mientras que la mutante NitAtC $\Delta$ 29 mantiene una distancia entre los 6 Å y 8 Å. Estas distancias parecen correlacionar con la actividad de las distintas mutantes por la  $\beta$ -ciano alanina, es decir, a menor  $D_{c-s}$  mayor actividad. Esta correlación es similar a la reportada por Zhang y col (2014), mostrando que a menor distancia entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano ( $D_{c-s}$ ), mayor actividad. Durante la dinámica molecular de Nit6803, el fumarotinitrilo mantiene una distancia  $D_{c-s}$  entre 3 y 5 Å, mientras que las mutantes W146Y, W146F y W146H, las cuales tienen una menor actividad que la enzima silvestre, mantienen una distancia entre 4 y 9 Å.



**Figura 38.** Distancia del sustrato a la cisteína catalítica a lo largo de la simulación. Las distancias entre el azufre de la cisteína y el carbono del grupo ciano ( $D_{c-s}$ ) en línea continua y la distancia entre el centro de masa de la cisteína catalítica y centro de masa del sustrato durante la dinámica ( $D_{sus-cys}$ ) en línea punteada. AtNit4 en negro, NitAtC $\Delta$ 16 en rojo y NitAtC $\Delta$ 29 en azul.

En el acoplamiento molecular proteína ligando de AtNit4 con sustrato hidratado y sustrato sin hidratar, la  $\beta$ -cianoalanina se orientó de tal manera que el resto de la molécula impide el acercamiento entre la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano (Fig. 34). Para corroborar la posición y orientación del sustrato durante la dinámica molecular se obtuvieron algunos fotogramas. En la figura 39 se puede observar que durante la dinámica molecular de AtNit4 el sustrato cambia su orientación a lo largo de la dinámica y permite que el grupo ciano se acerque a la cisteína catalítica en los últimos 10 ns de dinámica. Por el contrario, la  $\beta$ -cianoalanina mantiene una orientación que impide el contacto entre la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano en las dinámicas de NitAt $\Delta$ C16 y NitAt $\Delta$ C29 en los últimos 10 ns de dinámica (Fig. 38).

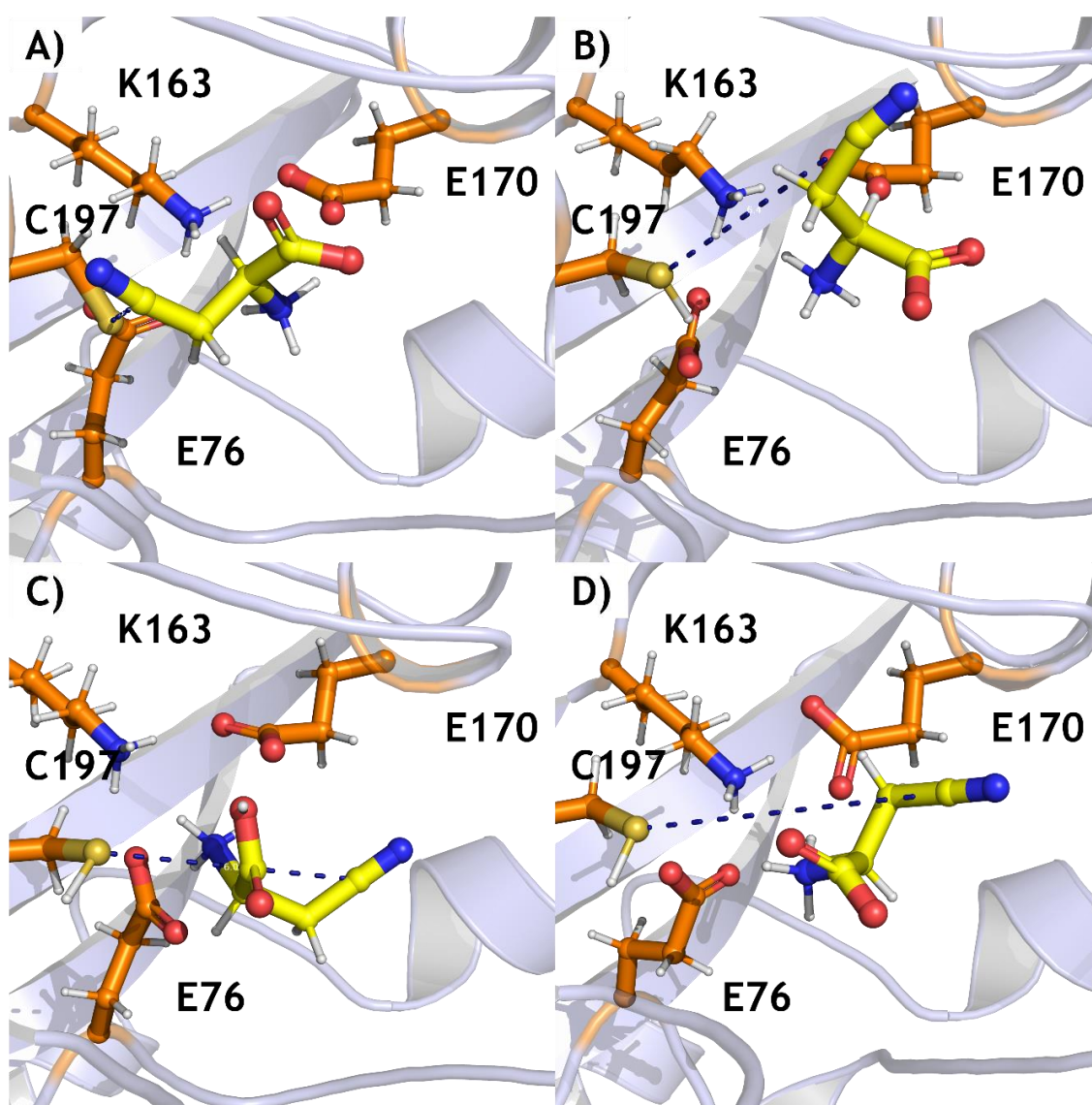


Figura 39. Fotogramas de la dinámica molecular de AtNit4 y sus mutantes con  $\beta$ -ciano alanina. A) NitAt4 a los 14.65 ns. B) NitAt4 a los 14.80 ns. C) NitAt $\Delta$ C16 a los 14.65 ns. D) NitAt $\Delta$ C29 a los 14.65 ns. PDBs hechos en Amber y las imágenes hechas en PyMol.

Los cambios en la orientación del sustrato pueden ser inferidos con la distancia a lo largo de la dinámica, por lo que se midió la distancia del centro de masa de la cisteína catalítica y el centro de masa del sustrato ( $D_{\text{sus-cys}}$ ). Si la distancia entre los centros de masa de la cisteína catalítica y el sustrato se mantienen constantes, pero se altera la distancia  $D_{\text{c-s}}$ , significa que el sustrato está rotando. En la figura 38, se presenta tanto la distancia  $D_{\text{c-s}}$  como la distancia  $D_{\text{sus-cys}}$ .

NitAtCΔ16 mantiene tanto  $D_{\text{c-s}}$  como  $D_{\text{sus-cys}}$  constante a lo largo de toda la dinámica, indicando que el sustrato mantuvo su posición y orientación prácticamente constante a lo largo de la dinámica. NitAtCΔ29 mantiene  $D_{\text{c-s}}$  y  $D_{\text{sus-cys}}$  después de los 7 ns de dinámica. Alrededor de los 5 ns de dinámica se observa que la distancia  $D_{\text{sus-cys}}$  se incrementó y la distancia  $D_{\text{c-s}}$  disminuyó, lo que indica que el sustrato rotó y se acercó por un momento el grupo ciano a la cisteína catalítica. Después, se acercó un poco el sustrato y el sustrato volvió a rotar alejándose el grupo ciano de la cisteína catalítica.

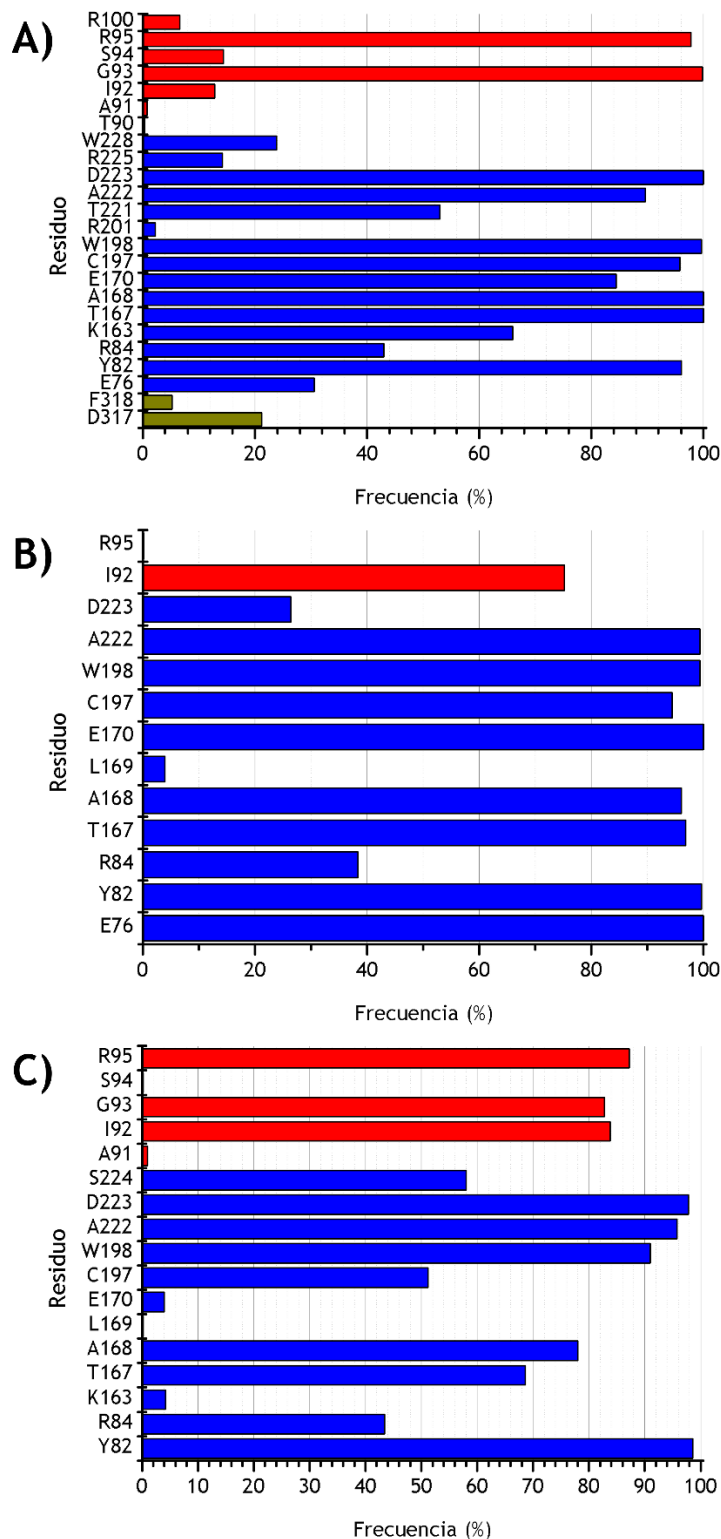
Por último, tanto  $D_{\text{sus-cys}}$  y  $D_{\text{c-s}}$  de AtNit4 varían a lo largo de toda la dinámica, lo que sugiere que el sustrato está desplazándose y rotando a lo largo de la dinámica. Los momentos con menor distancia  $D_{\text{c-s}}$  corresponden a momentos con una posición y orientación adecuada. La distancia  $D_{\text{c-s}}$  suele ser menor a la distancia  $D_{\text{sus-cys}}$  por casi 1.5 Å, indicando que el grupo ciano está apuntando a la cisteína catalítica durante la mayor parte de la dinámica.

## Residuos en la cercanía de $\beta$ -ciano alanina durante la dinámica

También se analizaron los residuos en la cercanía del sustrato a lo largo de la dinámica. Se tomaron uno de cada dos fotogramas de los últimos 10 ns de las dinámicas moleculares y se anotaron los residuos a 3 Å del sustrato con el programa VMD. De acuerdo con los resultados, la mayoría de los residuos se conservan entre las distintas dinámicas, en especial los residuos más frecuentes a lo largo de toda la dinámica (Fig. 40). Esto puede deberse a que el sitio catalítico de AtNit4 está aislado y a que, de acuerdo con la distancia  $D_{\text{sus-cys}}$ , la ubicación de la  $\beta$ -ciano alanina en el sitio activo no es muy diferente entre las distintas dinámicas moleculares (Fig. 38).

Algunos de los residuos aparecieron en las tres dinámicas moleculares. Entre los residuos que aparecieron se encuentran la tretrada catalítica, el glutamato setenta y seis, lisina ciento sesenta y tres, el glutamato ciento setenta y la cisteína ciento noventa y siete. Además, se encontraron residuos conservados en las nitrilasas de planta como la tirosina ochenta y dos, la arginina ochenta y cuatro, la treonina ciento sesenta y siete, el triptófano ciento noventa y ocho, la alanina doscientos veintidós y el aspartato doscientos veintitrés (Mulelu *et al.*, 2019). Estos residuos pertenecen a la cadena F y es la cadena en la que se acopló el sustrato antes de iniciar la dinámica molecular. También se pueden observar residuos de otras cadenas como la glicina noventa y tres y la arginina noventa y cinco del dímero aledaño. Únicamente en la dinámica molecular de AtNit4 se encontraron residuos de la cadena E en la cercanía, aunque son poco frecuentes.

De las tres dinámicas moleculares NitAt $\Delta$ 16, tiene el patrón de contactos más estables a lo largo de toda la simulación. La  $\beta$ -ciano alanina se mantiene en la cercanía de un número reducido de residuos en la dinámica de NitAt $\Delta$ 16. Por otro lado, los residuos en la cercanía de la  $\beta$ -ciano alanina no son tan estables y varían a lo largo de la dinámica en las dinámicas de AtNit4 y NitAt $\Delta$ 29. Esta variación concuerda con lo observado en las distancias  $D_{\text{sus-cys}}$  y  $D_{\text{c-s}}$ . Otra diferencia entre la dinámica de NitAt $\Delta$ 16 y las dinámicas de AtNit4 y NitAt $\Delta$ 29 son los residuos que se mantienen en la cercanía a lo largo de la dinámica. En las dinámicas de AtNit4 y NitAt $\Delta$ 29, la  $\beta$ -ciano alanina se acerca a la arginina noventa y cinco y se aleja del glutamato setenta y seis. Por el contrario, la  $\beta$ -ciano alanina se aleja de arginina noventa y cinco y se acerca al glutamato setenta y seis en la dinámica NitAt $\Delta$ 16.



**Figura 40. Frecuencia relativa de los los residuos a 3 Å del sustrato.** Se tomaron los residuos a al menos 3 Å de la β-ciano alanina en los últimos 10 ns de simulación. En barras verdes se marca los residuos de la cadena E. en barras azul se marcan los residuos de la cadena F. En barras rojas se marca la cadena G. A) Dinámica molecular de AtNit4. B) Dinámica molecular de NitAtCΔ16 C) Dinámica molecular de NitAtCΔ29.

### Interacciones de la $\beta$ -ciano alanina con AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29.

La cercanía entre residuos durante una dinámica molecular no necesariamente implica que existan interacciones entre estos residuos o bien que las interacciones estabilicen al sustrato en el sitio activo. Esto es especialmente importante en esta nitrilasa porque tanto  $\beta$ -ciano alanina como el sitio activo de esta enzima tienen grupos cargados y podría existir repulsiones entre los grupos cargados. Con la finalidad de tener resultados más detallados de las interacciones entre el ligando y la proteína y las diferencias entre las distintas mutantes, se construyó un pdb de la estructura a los 19.7 ns de la dinámica de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29.

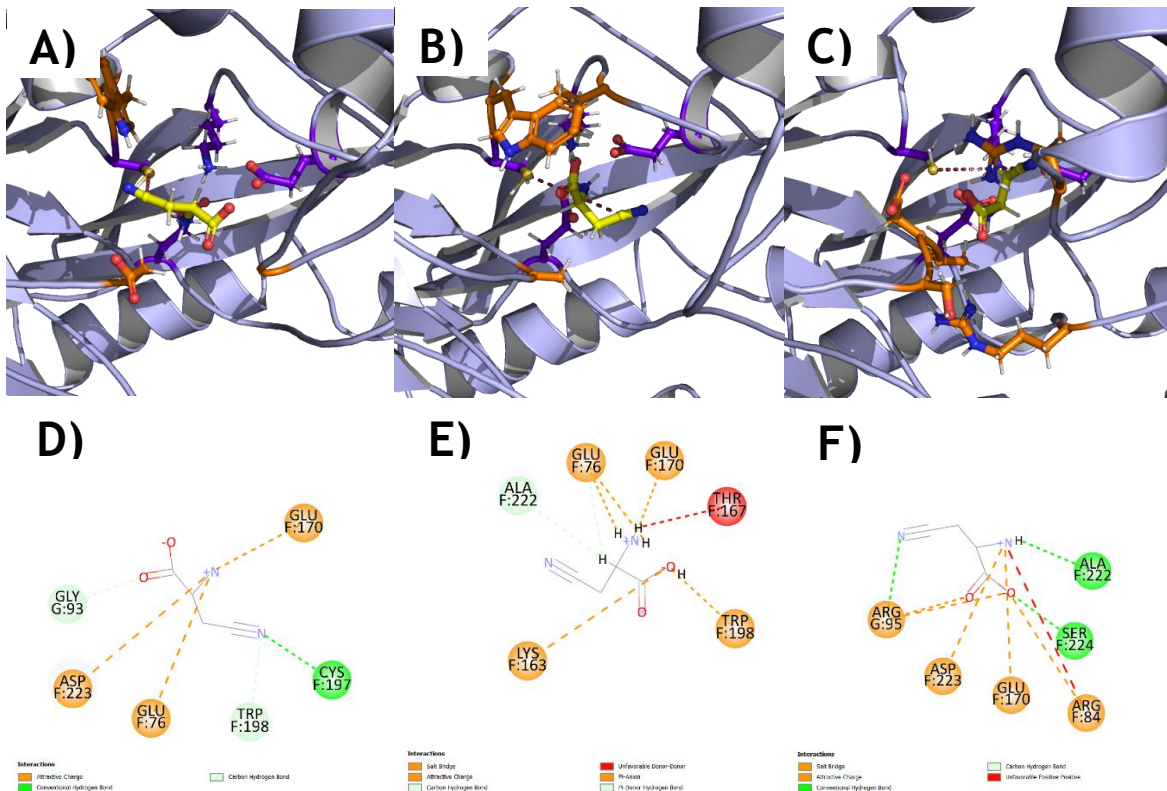
La primera diferencia en apreciarse en la posición del sustrato en el sitio de catalítico de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 es la posición de la  $\beta$ -ciano alanina (Fig. 41). En AtNit4 se aprecia que el grupo ciano de AtNit4 apunta a la cisteína catalítica, mientras que en NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 el grupo ciano apunta a la dirección contraria y el resto de la molécula impide el contacto del grupo ciano y la cisteína catalítica. Esta orientación se asemeja a las posiciones obtenidas del acoplamiento molecular de AtNit4 con  $\beta$ -ciano alanina (Fig. 34).

También se analizaron las interacciones de AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 con  $\beta$ -ciano alanina. En AtNit4, el grupo ciano de  $\beta$ -ciano alanina es lo suficientemente cercano a la cisteína catalítica para interactuar con ella. El glutamato catalítico setenta y seis, el glutamato catalítico ciento setenta y el aspartato doscientos veintitrés interactúan con el grupo amino de la  $\beta$ -ciano alanina. En los contactos no aparece la lisina ciento sesenta y tres en concordancia con los residuos a 3 Å, aunque aparece el glutamato setenta y seis. El grupo ácido solo interactúa con la glicina noventa y tres del dímero aledaño (Fig. 37).

En NitAtC $\Delta$ 16, el grupo ácido de la  $\beta$ -ciano alanina interactúa con el triptófano ciento noventa y ocho y la lisina catalítica ciento sesenta y tres. El grupo amino de la  $\beta$ -ciano alanina interactúa con los glutamatos catalíticos setenta y seis y ciento setenta, y además con la treonina ciento sesenta y siete.

En NitAtC $\Delta$ 29, el grupo ácido interactúa con la arginina ochenta y cuatro y la arginina noventa y cinco del dímero aledaño. El grupo amino interactúa con el aspartato doscientos veintitrés y la serina doscientos veinticuatro, el glutamato catalítico ciento setenta y la alanina doscientos veintidós; y tiene repulsión de la arginina ochenta y cuatro.





**Figura 41. Posiciones e interacciones de  $\beta$ -ciano alanina en AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 a los 19.7 ns de dinámica. A) Estructura de AtNit4 y  $\beta$ -ciano alanina. B) Estructura de NitAtC $\Delta$ 16 y  $\beta$ -ciano alanina. C) Estructura de NitAtC $\Delta$ 29 y  $\beta$ -ciano alanina. D) Interacciones de AtNit4 con  $\beta$ -ciano alanina. E) Interacciones de NitAtC $\Delta$ 16 con  $\beta$ -ciano alanina. F) Interacciones de NitAtC $\Delta$ 29 con  $\beta$ -ciano alanina. Diagrama hecho en Discovery Studio e imagen hecha en PyMol.**

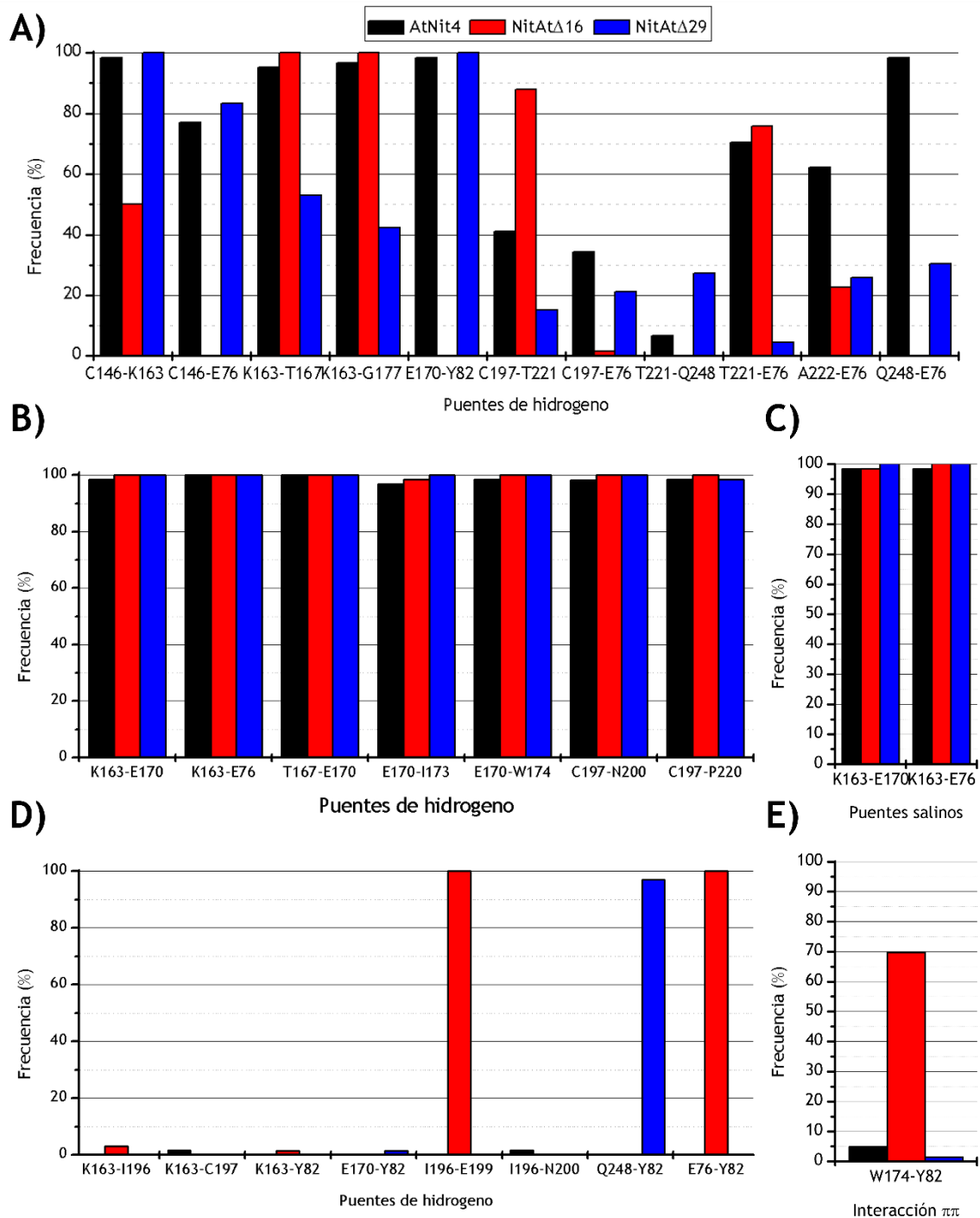
En los PDBs obtenidos, se observa una tendencia a alejarse de los residuos del sitio activo al recortar el C-terminal y aparecen interacciones nuevas con los residuos del dímero aledaño. Únicamente, en la dinámica con la AtNit4 silvestre, se encuentra a la  $\beta$ -ciano alanina en la posición y en la ubicación adecuadas, para realizar un contacto entre el carbono del grupo ciano y el azufre de la cisteína catalítica, lo cual concuerda con lo observado en la distancia  $D_{C-S}$  y  $D_{CYS-SUS}$  (Fig. 38). La figura 41 B y E se muestra la interacción del sustrato con la lisina ciento sesenta y tres de NitAtC $\Delta$ 16 y explica porque en los mapas de residuos a 3 Å del sustrato aparece estos residuos (Fig. 41) y podría ser una interacción importante.

## Interacciones de los residuos de los residuos del sitio activo en las dinámicas moleculares de AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29

Las diferencias en las interacciones entre las distintas mutantes con la β-ciano alanina podría deberse a diferencias en el sitio activo durante la dinámica molecular. Para analizar las interacciones de los residuos de la cavidad del sitio activo y su permanencia a lo largo de las dinámicas moleculares, se construyeron redes de interacciones de residuos. Se analizaron las interacciones de la tétrada catalítica, glutamato setenta y seis, lisina ciento sesenta y tres, glutamato ciento setenta y siete y cisteína ciento noventa y siete; y la arginina noventa y cinco después de los 11 ns hasta los 20 ns de simulación. Debido a que el tiempo es una variable en las dinámicas moleculares, también se reporta la frecuencia de estas interacciones en los fotogramas analizados.

Se identificaron los residuos que interactúan con la tétrada catalítica y las interacciones entre ellos. Se descartaron las interacciones de Van Der Waals debido a la poca fuerza de estas interacciones y la baja frecuencia de estas interacciones a lo largo de la dinámica. En el análisis, se encontraron veintinueve interacciones distintas (Fig. 42). Nueve de las veintinueve interacciones se mantienen durante más del 90 % del intervalo analizado en las tres dinámicas moleculares, siete puentes de hidrógeno y dos puentes salinos (Fig. 42 B y C). Ocho interacciones solo se encontraron en una de las tres dinámicas moleculares. La mayoría de las interacciones que únicamente se encontraron en una de las tres dinámicas no se mantiene a lo largo de la simulación.

Los residuos de la tétrada catalítica mantienen varias interacciones constantes a lo largo de las tres simulaciones. La lisina ciento sesenta y tres forma puentes salinos con el glutamato setenta y seis y glutamato ciento setenta (Fig. 42 C). El glutamato setenta y seis mantiene puentes de hidrógeno con la treonina ciento sesenta y siete, la isoleucina ciento setenta y tres y el triptófano ciento setenta y cuatro (Fig. 42 B). Por su parte, la cisteína catalítica, la cisteína ciento noventa y siete, forma puentes de hidrógeno con la asparagina doscientos y la prolina doscientos veinte. Estas interacciones pueden ser importantes para la actividad de la enzima debido a que se mantienen constantes. Sin embargo, no permiten explicar las diferencias entre las distintas mutantes.



**Figura 42. Interacciones de los residuos de la tétrada catalítica y la frecuencia de estas.** No se marcan las cadenas porque todas las interacciones fueron en la cadena F. En columnas negras la frecuencia de las interacciones de AtNit4. En columnas rojas la frecuencia de las interacciones de NitAt $\Delta$ 16. En columnas azul la frecuencia de las interacciones de NitAt $\Delta$ 29. A) Puentes de hidrógeno variable en las tres simulaciones. B) Puentes de hidrógeno que se mantienen constantes en las tres simulaciones. C) Puentes salinos. D) Puentes de hidrógeno variable que se encontraron en solmante una de las tres simulaciones. E) Interacciones interacciones  $\pi$ - $\pi$ .

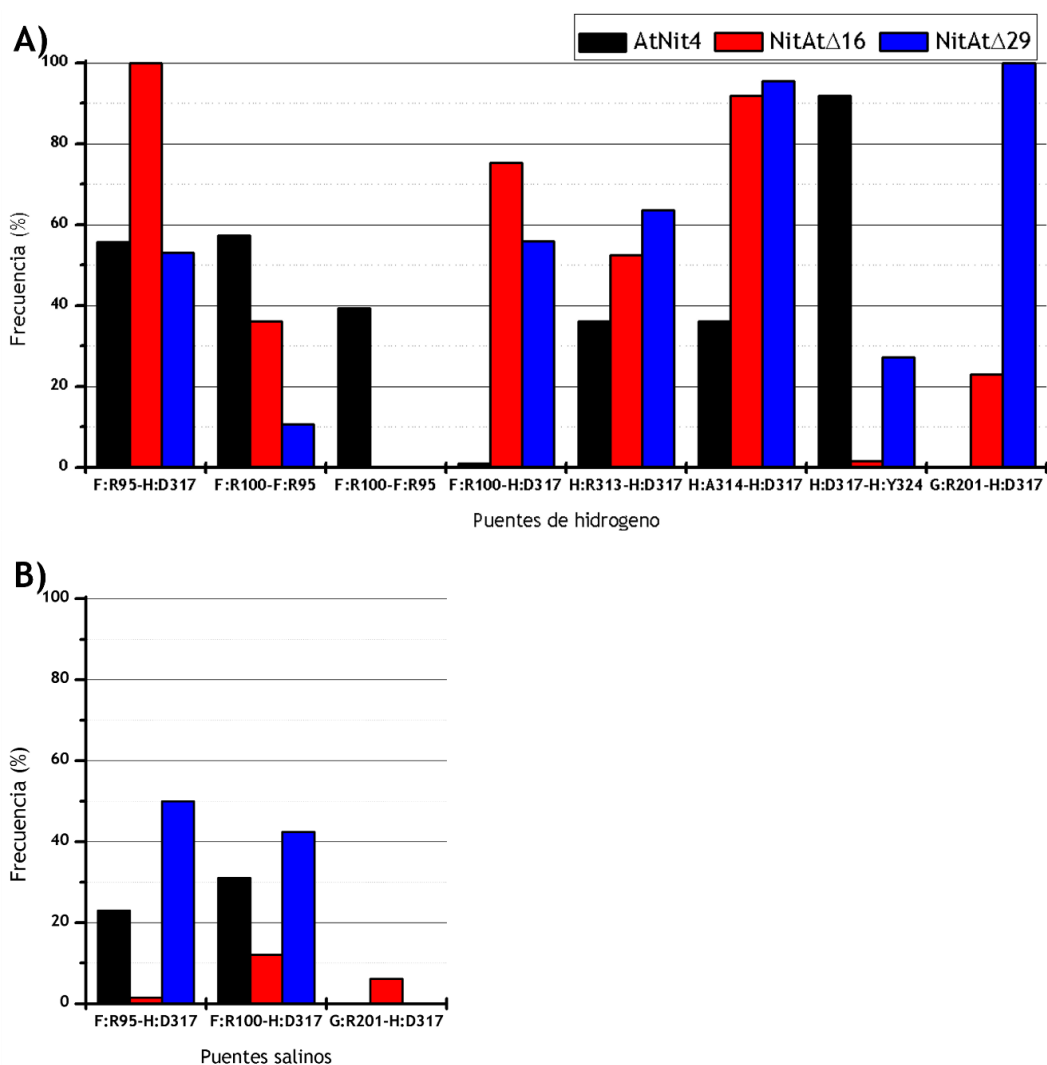
Algunas diferencias en las intracciones entre las distintas dinámicas moleculares se manifiestan como diferencias en las interacciones y otras veces como diferencias en la frecuencia de estas interacciones. Las interacciones de AtNit4 y NitAtCΔ29 son muy similares y la mayoría de las diferencias se ven en las frecuencias de las interacciones. La lisina ciento sesenta y tres reduce la frecuencia con la que mantiene sus puentes de hidrógeno con la treonina ciento sesenta y siete y la glicina ciento setenta y siete en la dinámica de NitAtCΔ29 (Fig. 42 A). La glutamina doscientos cuarenta y ocho disminuye la frecuencia con la que forma un puente de hidrógeno con el glutamato setenta y seis (Fig. 42 A) y en cambio, la glutamina doscientos cuarenta y ocho forma un puente de hidrógeno con la tirosina ochenta y dos (Fig. 42 D).

A diferencia de NitAtCΔ29, NitAtCΔ16 tiene un patrón de interacciones diferentes al de AtNit4. En el análisis se encontró que el glutamato ciento setenta forma un puente de hidrógeno con la tirosina ochenta y dos y el glutamato setenta y seis forma puentes de hidrógeno con cisteína ciento cuarenta y seis y con la glutamina doscientos cuarenta y ocho en la dinámica de AtNit4. Mientras en la dinámica de NitAtCΔ16 se perdieron las interacciones mencionadas anteriormente. En su lugar, el glutamato setenta y seis forma un puente de hidrógeno con la tirosina ochenta y dos y la isoleucina ciento noventa y seis forma puentes de hidrógeno con el glutamato ciento noventa y nueve. Además, la frecuencia de la interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el triptófano ciento setenta y cuatro y la tirosina ochenta y dos y el puente de hidrógeno entre la cisteína ciento noventa y siete y la treonina doscientos veintiuno se incrementa.

Estas diferencias en las interacciones podrían deberse a la posición del sustrato a lo largo de la dinámica. Las mediciones de  $D_{\text{sus-cys}}$  y  $D_{\text{c-s}}$  de la dinámica de NitAtCΔ16 indican que el sustrato explora un espacio reducido de posiciones. Por el contrario, el sustrato en las dinámicas de AtNit4 y NitAtCΔ29 exploran un espacio amplio de posiciones, aunque la orientación es diferente.

Mulelu y col (2019) encontraron en una dinámica molecular que el aspartato trescientos diecisiete de una subunidad forma un puente salino con la arginina noventa y cinco de la subunidad aledaña. Esta interacción funciona como un cerrojo que mantiene cerrada la tapa del sitio activo. Cambios en estos residuos alteran la especificidad y el tamaño del sustrato. Se analizaron las interacciones del aspartato trescientos diecisiete para confirmar la existencia de cambios en las interacciones de este residuo.

Las redes de interacción de residuos confirman que la arginina noventa y cinco forma un puente salino con el aspartato trescientos diecisiete, aunque el aspartato trescientos diecisiete también forma puentes salinos con la arginina cien. Ambas interacciones no se mantienen más allá del 50 % de los fotogramas (Fig. 43 B). Aparte de los puentes salinos, el aspartato trescientos diecisiete forma puentes de hidrógeno con varios residuos como la arginina noventa y cinco, la arginina cien, la arginina trescientos trece, la alanina trescientos catorce, la tirosina trescientos veinticuatro y la arginina doscientos uno (Fig. 43 A). Por lo tanto, la interacción entre el aspartato trescientos diecisiete existe, aunque hay otra arginina, la arginina cien, que forma puentes salinos y varios puentes de hidrógeno con otros residuos.



**Figura 43. Interacciones del aspartato trescientos diecisiete.** La cadena se marca antes del residuo con dos puntos. En columnas negras la frecuencia de las interacciones de AtNit4. En columnas rojas la frecuencia de las interacciones de NitAtΔ16. En columnas azul la frecuencia de las interacciones de NitAtΔ29. A) Puentes de hidrógeno. B) Puentes salinos.

### Cálculo de energía de unión proteína-ligando en las dinámicas de AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29

Para conocer el efecto en la energía de unión proteína ligando al eliminar secciones cada vez más largas del C-termina, se calculó la energía de unión con MM/PBSA y MM/GBSA. Se escogió el intervalo 17.5 y 19.5 ns debido a que anteriormente se analizaron las interacciones de las conformaciones de este intervalo y también se presentan la mayor diferencia en la distancia  $D_{c-s}$  (Fig. 40).

Los resultados reportan dos términos  $\Delta G_{gas}$  y  $\Delta G_{sol}$ .  $\Delta G_{gas}$  representa las interacciones electrostáticas y las interacciones de Van der Waals.  $\Delta G_{sol}$  representa la energía de solvatación. La diferencia entre MM/PBSA y MM/GBSA radica en como se calcula la contribución polar a la energía de desolvatación. Debido al tipo de residuos que se encuentran en el sitio activo de AtNit4 se usaron los dos métodos. Como se observa en la tabla XIV, la diferencia entre MM/PBSA y MM/GBSA se encuentra en el componente en  $\Delta G_{sol}$ .

Tabla XIV. Energías de unión de AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29 a β-ciano alanina

Método	MM/PBSA			MM/GBSA		
	AtNit4	NitAtCΔ16	NitAtCΔ29	AtNit4	NitAtCΔ16	NitAtCΔ29
$\Delta G_{gas}$	-23.3±2.5	-281.4±8.9	-33±2.7	-23.3±2.5	-281.4±8.9	-33±2.7
$\Delta G_{sol}$	20.1±3.7	259.9±8.3	26.4±4.1	8±1.6	258.3±7.6	12.8±1.6
$\Delta G$ Total	-3.2±4.4	-21.6±4.5	-6.6±4.2	-15.3±2.3	-23.2±3	-20.3±2.2

Energías calculas en kcal/mol.  $\Delta G$  Total, es la suma de  $G_{gas}$  y  $G_{sol}$ .

En la tabla XIV se presentan los resultados de la energía de unión calculados por MM/PBSA y MM/GBSA. En los resultados de ambos métodos se observa que la energía de unión de NitAtCΔ16 a β-ciano alanina es la más afín, mientras que la energía de AtNit4 es la meno afín. Esto sugiere que la β-ciano alanina está fuertemente unida a NitAtCΔ16, aunque la orientación no sea la adecuada para realizar la catálisis. Mientras, la β-ciano alanina no está fuertemente unida, lo que permite que el sustrato explore distintas posiciones y orientaciones. Algunas de estas posiciones y orientaciones son adecuadas para que se lleve a cabo la catálisis.

## Discusión

### Refinamiento y evaluación de las estructuras

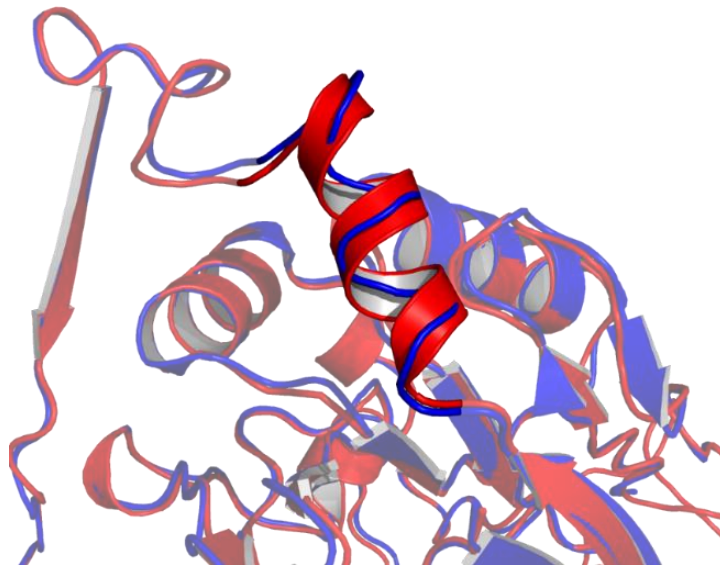
La cristalografía de rayos X es una técnica que ha permitido obtener la estructura de un gran número de estructuras de diferentes proteínas. Sin embargo, la técnica es dependiente de la cristalización de la proteína, la cual suele limitar la obtención de una estructura (Durbin & Feher, 1996). La obtención de las estructuras de las nitrilasas por esta técnica ha resultado compleja. Se propone que la simetría pentagonal de los oligómeros formados por las nitrilasas es la responsable de impedir la formación cristales (Mulelu *et al.*, 2019). Es importante notar que las dos estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X, no tienen esta simetría. En el caso de PaNit, la enzima es un dímero activo *in vitro* (Mueller *et al.*, 2006) y Nit6803 forma oligómeros con simetría hexagonal al perder los últimos cincuenta y seis residuos del C-terminal (Woodward *et al.*, 2018). Una técnica que ha sido clave para resolver este tipo de proteínas es la Cryo-EM (Cheng, 2018). No obstante, la gran desventaja de la Cryo-Em es que la baja resolución de los mapas obtenidos permite ajustar diferentes estructuras al mismo mapa de potencial de Coulomb. Algunas de estas incluso se desvían de la norma. Este reto ha implicado la creación de nuevos métodos de validación como CaBLAM (Prisant *et al.*, 2019) o el uso de métodos de evaluación anteriormente no tan populares como Z score (Sobolev *et al.*, 2020). Estas desventajas de las estructuras provenientes de Cryo-EM se tradujo en el uso de una amplia gama de métodos para evaluar y refinar las estructuras.

Se evaluaron las estructuras de AtNit4 y RsV51BNit antes de los análisis para conocer la calidad de estos. Este paso es importante debido a que la calidad de los resultados depende de la calidad de las estructuras y es recomendable hacer un refinamiento en caso de ser necesario (Hollingsworth & Dror, 2018). La evaluación de las estructuras de AtNit4 y RsV51BNit reveló problemas, en especial en la estructura de RsV51BNit, el cual es una estructura previa y aún no ha sido publicada (Tabla IV). En cambio, la estructura publicada de AtNit4 presenta un alto porcentaje de aminoácidos con ángulos  $\psi$ ,  $\phi$  y  $\chi$  ideales indicando una estructura favorable. Sin embargo, puntajes como el Z-score y REU indican problemas subyacentes en la estructura, por lo que se decidió refinar las estructuras antes de hacer cualquier análisis con ellas.

Las estructuras se refinaron tanto con el programa Rosetta como con el programa REFMAC. El programa Rosetta garantizó que las estructuras tuvieran valores de  $\psi$  y  $\phi$  ideales, así como rotámeros comunes. Debido a que se cuenta con los mapas de potencial de Coulomb se ajustaron las estructuras resultantes a los mapas. Esto garantizó que las estructuras finales no se desviaran de la evidencia experimental.

La evaluación de las estructuras refinadas reveló que ambas mejoraron su calidad y en el caso de AtNit4, el proceso de refinamiento implicó la construcción de una región comprendida entre el residuo doscientos cincuenta y dos y el residuo doscientos setenta y cinco. El porcentaje de aminoácidos con ángulos favorables de  $\psi$ ,  $\phi$  y  $\chi$  se incrementaron. Ambas estructuras pudieron obtener su secuencia utilizando el protocolo Rosetta-HMMR y aumentaron la cantidad de residuos que fueron identificados exitosamente. La mayoría de los residuos no identificados se encuentran en el C-terminal y probablemente se deba a la falta de contactos en esta región. En cuanto a su energía, el Puntaje de REU disminuyó, indicando una estructura favorable. Por último, los valores de Z-score indican que la distribución de ángulos  $\psi$  y  $\phi$  se ajustan a lo observado en otras estructuras de alta resolución. La evaluación indica que las estructuras han mejorado su calidad y se procedió a realizar los análisis *in silico* con las estructuras.

Los efectos del refinamiento de las estructuras se pueden observar en las mismas estructuras. Un buen ejemplo de cómo el refinamiento mejoró los ángulos  $\psi$  y  $\phi$  es una región comprendida entre el residuo trescientos veintidós y el residuo trescientos treinta y cuatro de AtNit4. En la figura 44 se observa que la estructura publicada de AtNit4 esta región forma un asa larga dando vueltas en espiral, mientras que en la estructura refinada se aprecia que esta región forma una hélice alfa (Fig. 44). La razón por la que PyMol no identifica esta región de la estructura publicada de AtNit4 como una alfa hélice es que los valores de  $\psi$  y  $\phi$  se desvían de los valores ideales. Este tipo de errores son comunes a lo largo de la estructura y podrían explicar por qué la evaluación de la estructura publicada tiene un Z-score anómalo pero un porcentaje alto de aminoácidos con ángulos  $\psi$  y  $\phi$  favorables (Tabla IV).



**Figura 44. Comparación de la estructura publicada y la estructura refinada de AtNit4.** En azul se presenta la estructura publicada de AtNit4 y en rojo se presenta la estructura refinada de AtNit4. Imagen hecha en PyMol.



## Actividad de las mutantes

Se seleccionaron posiciones a lo largo del C-terminal para ser mutadas por un codón de paro con base a las interacciones de este residuo y en las interacciones de las regiones eliminadas. Debido a que estas mutaciones no eliminan fragmentos de la parte globular de las enzimas, se esperaba que las mutantes se plegaran fueran activas. Sin embargo, todas las mutantes de RsV51BNit en este proyecto son inactivas y las mutantes de AtNit4 pierden actividad conforme se reduce el largo del C-terminal. Este problema plantea varias cuestiones que tienen que analizarse.

Se esperaba que al disminuir el número de subunidades que conforman los oligómeros disminuyera la actividad de las mutantes. Existe evidencia que indica que en la superfamilia de las nitrilasas la oligomerización posiciona algunos residuos del sitio activo y de la tétrada catalítica en la conformación correcta. En la amidasa de *Geobacillus pallidus* RAPc8 el glutamato ciento cuarenta y siete y, en la  $\beta$ -alanina sintetasa de *Homo sapiens* el glutamato doscientos siete, ambos correspondientes al glutamato ciento setenta del alineamiento (Fig. 4), se encuentran en un asa en la cercanía de la superficie C y obtienen su conformación cuando hay interacciones con otro dímero (Kimani *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2018). En el caso específico de AtNit4 un asa comprendida entre el residuo ochenta y dos y el residuo noventa y siete delimitan el tamaño del sitio activo. Es probable que los sitios activos de las subunidades de las orillas no estén en la conformación adecuada. Conforme la afinidad de la superficie C disminuye, disminuye el número de subunidades que conforman los oligómeros y aumenta el número de subunidades que se encuentran en las orillas. Por lo tanto, es posible que al disminuir la afinidad de la superficie C, disminuya el número de sitios activos en conformaciones adecuadas.

Para estudiar los efectos de las mutaciones en los sitios activos formados correctamente, se realizaron acoplamiento proteína-ligando y dinámicas moleculares. Anteriormente, la medición de  $D_{c-s}$  ha sido un buen predictor de la actividad y ha sido capaz de distinguir las diferencias en la actividad de mutantes puntuales (Zhang *et al.*, 2014), la regioselectividad (Chen *et al.*, 2019) y la estereoselectividad en dinámicas moleculares (Chen *et al.*, 2021). De acuerdo con el mecanismo de reacción, el grupo ciano debe encontrarse a distancia de un puente de hidrógeno de la lisina catalítica, lisina ciento setenta y tres, de acuerdo con el alineamiento (Fig. 3; Fernandes *et al.* 2006). Por lo que también se puede usar para discriminar las posiciones adecuadas del sustrato en un acoplamiento molecular (Rucká *et al.*, 2019).

Los resultados de acoplamiento molecular no permitieron explicar los resultados obtenidos. En los resultados de acoplamiento molecular de RsV51BNit, se usaron dos argumentos para seleccionar las conformaciones a analizar. En ninguno de los casos se encontró una correlación entre la distancia  $D_{C-S}$  medida, la afinidad calculada y la actividad catalítica reportada anteriormente. Al usar el argumento de la  $D_{C-S}$  más corta se encontraron conformaciones compatibles con el mecanismo de reacción. Sin embargo, no hay una correlación entre los datos recopilados. La distancia entre el sustrato y la lisina catalítica no permitió seleccionar conformaciones, ya que en las conformaciones en las que la distancia  $D_{C-S}$  es corta, el grupo ciano se encontraba en la cercanía de la lisina catalítica. En las conformaciones seleccionadas por la afinidad reportada, la mayoría de las conformaciones no son compatibles con el mecanismo de reacción.

En el caso de los acoplamientos moleculares de AtNit4, se hizo acoplamiento con el sustrato hidratado y sin hidratar. Las conformaciones resultantes de estos dos acoplamientos no son compatibles con el mecanismo de reacción. La orientación del sustrato ubica al grupo ciano en la dirección incorrecta e impide que la cisteína catalítica y el grupo ciano tengan un contacto significativo. Aun así, se observan diferencias en la afinidad reportada.

Debido a los resultados obtenidos en los acoplamientos proteína ligando, se realizaron dinámicas moleculares de las enzimas AtNit4, NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29 con β-ciano alanina. Este método nunca se ha usado para explicar las diferencias en actividad al recortar secciones del C-terminal. A pesar de las complicaciones, el método es lo suficientemente robusto para marcar diferencias en la distancia  $D_{C-S}$  al eliminar secciones del C-terminal, las cuales correlacionan con la actividad de las distintas mutantes. Es importante notar que únicamente en la dinámica molecular de AtNit4, la β-ciano alanina explora posiciones y orientaciones factibles para un contacto productivo entre el azufre de la cisteína catalítica y el carbono del grupo ciano del sustrato. Tanto en la dinámica molecular de NitAtCΔ16 como de NitAtCΔ29 la orientación del sustrato aleja el grupo ciano de la cisteína catalítica y el resto del sustrato bloquea un posible contacto entre el grupo ciano y la cisteína después de los 10 ns de dinámica. Una diferencia crucial es que la β-ciano alanina en la dinámica de NitAtCΔ29 exploró algunas posiciones y orientaciones distintas e incluso se aproximó a la cisteína catalítica antes de los 10 ns (Fig. 38). En contraste, la β-ciano alanina explora pocas posiciones a lo largo de la dinámica de NitAtCΔ16 (Fig. 38).

Se calculó la energía de unión de la  $\beta$ -ciano alanina a AtNit4, NitAtC $\Delta$ 16 y NitAtC $\Delta$ 29 con MM/PBSA y MM/GBSA en el intervalo 17.5 y 19.5 ns. Los datos de los cálculos de energía de unión sugieren que la  $\beta$ -ciano alanina está fuertemente unida a una posición en la simulación de NitAtC $\Delta$ 16 (Tabla XIV). Esto concuerda con la poca variación de las distancias de  $D_{\text{SUS-cys}}$  y  $D_{\text{C-S}}$  durante la simulación (Fig. 38). Los puentes salinos que mantiene la  $\beta$ -ciano alanina con la lisina y los glutamatos catalíticos podría explicar la fuerte unión en las energías de unión calculadas en la dinámica molecular (Fig. 42). Por otra parte, AtNit4 y NitAtC $\Delta$ 29 tienen una mayor energía de unión que NitAtC $\Delta$ 16 (Tabla XIV) y les permite, en especial a AtNit4, explorar un espacio más amplio de orientaciones y posiciones en el sitio activo, algunas de las cuales permiten el contacto del azufre de la cisteína catalítica con el nitrógeno del grupo ciano. Las diferencias entre los resultados del acoplamiento proteína ligando con AtNit4 y la dinámica molecular con AtNit4 se puede deber a que la dinámica permite una mayor flexibilidad de la proteína y a que el tiempo es una variable extra en la dinámica molecular (Chen, 2015).

### Oligómeros

Se corroboró el efecto de eliminar secciones del C-terminal en la capacidad de formar filamentos por medio de DLS y TEM. Estas mediciones solo se realizaron en las mutantes de AtNit4, ya que mantienen su estructura. Los datos de DLS indican la presencia de al menos dos poblaciones. Los  $R_H$  de la mayoría de las mutantes son cercanos a los  $R_H$  de AtNit4. La mutante NitAtC $\Delta$ 29 presenta tres poblaciones y la población con el menor  $R_H$  tiene un radio considerablemente menor.

Para conocer el tipo de oligómeros formados, se observaron las mutantes de AtNit4 por TEM. En las mutantes truncas NitAtC $\Delta$ 16, NitAtC $\Delta$ 29 y NitAtC $\Delta$ 34 no se observó la formación de filamentos, pero se observó la formación de agregados amorfos. Esto podría explicar por qué se observan poblaciones de gran tamaño en los resultados de DLS de las mutantes. Solamente las poblaciones de menor tamaño identificadas por DLS podrían coincidir con oligómeros con un número limitado de subunidades.

Ninguna de las mutantes truncas forma filamentos y el tipo de oligómeros identificados son muy similares. Esto sugiere que la eliminación de la hebra beta que estabiliza la superficie C es suficiente para impedir la formación de filamentos. Sin embargo, la eliminación de estas regiones del C-terminal aumenta considerablemente la propensión a formar agregados.

## Agregación y plegamiento de las mutantes

Una diferencia importante entre las mutantes de RsV51BNit y AtNit4 es el efecto de eliminar partes del C-terminal en el plegamiento. A pesar de que las mutaciones de RsV51BNit y AtNit4 son similares, las mutantes de AtNit4 mantienen su estructura, mientras que las mutantes de RsV51BNit han perdido su estructura (Fig. 28).

Al comparar las afinidades calculadas de las superficies de interacción, se nota un patrón en la afinidad. La afinidad de la superficie C de las mutantes de RsV51BNit es menor a la afinidad de la superficie C de AtNit4 (Tabla VI). Por ejemplo, la afinidad de la superficie C de NitCRsp $\Delta$ 55 es similar a la afinidad de la superficie C de NitAtC $\Delta$ 34. Aunque las mutantes de AtNit4 y RsV51BNit eliminan secciones similares del C-terminal, es probable que no tengan el mismo efecto en el estado oligomérico (Fig. 45).

La mutante NitCRsp $\Delta$ 50 no elimina completamente la hebra beta que estabiliza la superficie C. Sin embargo, esta región en RsV51BNit está formada por solo dos aminoácidos (Fig. 45). Por lo tanto, es probable que la eliminación de un solo aminoácido impida que se forme esta interacción. Como resultado, las mutantes NitCRsp $\Delta$ 55 y NitCRsp $\Delta$ 50 pueden tener un efecto muy similar. Esta es una de las razones por las que se decidió no cortar estas hebras beta a la mitad en este proyecto.

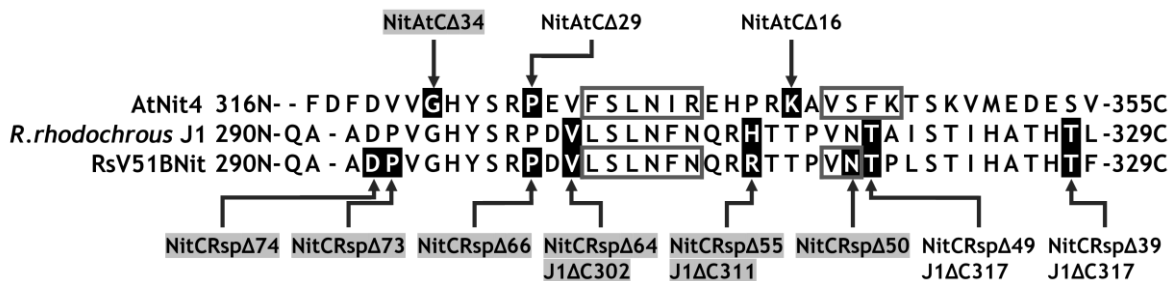


Figura 45. Representación del C-terminal de las nitrilasas de AtNit4, *R. rhodochrous* J1 y RsV51BNit. Se marca con fondo negro los residuos que se sustituyeron por un codón de paro. En cajas grises se marca las hebras betas que estabilizan las superficies de interacción. Los nombres en fondo gris marcan las mutantes inactivas.

Otro efecto de eliminar el C-terminal es la exposición de regiones hidrofóbicas en la superficie de las enzimas y la eliminación de cargas. Las hebras betas del C-terminal tienen un patrón de alternancia entre residuos polares y no polares (Fig. 45). Los residuos no polares se orientan al interior de la proteína y los residuos polares se orientan al solvente. Las regiones que flanquean las hebras betas son ricas en prolinas y residuos cargados. Es decir, el C-terminal oculta parches hidrofóbicos y pone cargas en la luz de los filamentos (Fig. 46). Se ha propuesto que las repulsiones electrostáticas de las histidinas a lo largo del C-terminal de la CynD de *B. pumilus* C1 son las responsables de la formación de espirales al disminuir el pH (Thuku *et al.*, 2009).

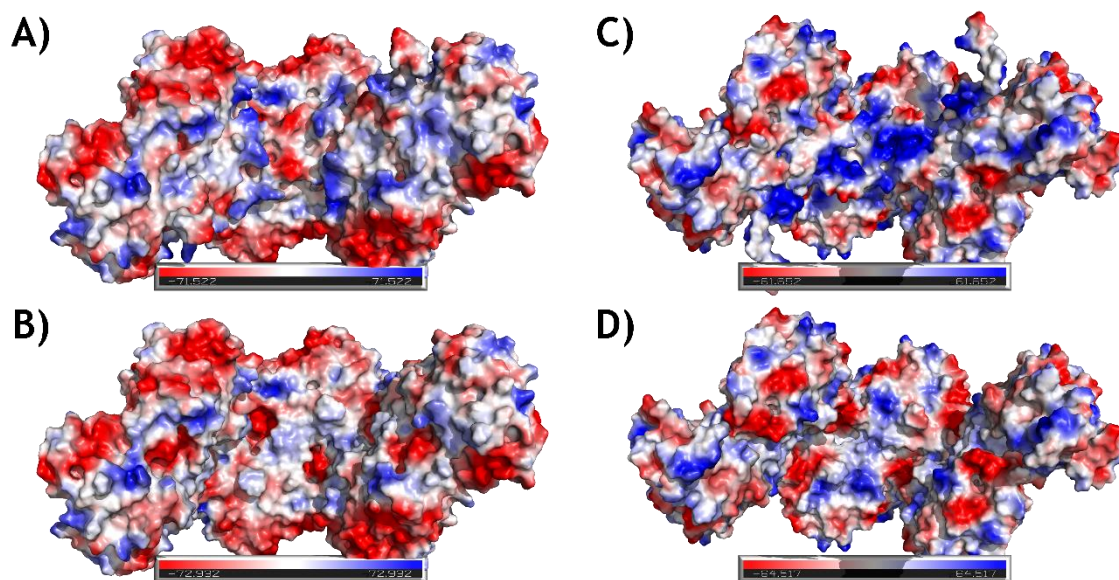


Figura 46. Potencial electrostático en la superficie de AtNit4 y RsV51BNit calculado por PyMol. A) NitRspC $\Delta$ 39. B) NitRspC $\Delta$ 73. C) AtNit4. D) NitAtC $\Delta$ 34. Imagen hecha en PyMol.

La disminución de la afinidad de las superficies de interacción y la exposición de parches no polares, podría favorecer la formación de interacciones no específicas. Este tipo de interacciones podrían explicar la formación de agregados y la poca estabilidad de las mutantes. Debido a que la afinidad de la superficie C de RsV51BNit y que los parches hidrofóbicos expuestos son mayores, los efectos deberían ser mayores. Probablemente, estos sea algunos de los factores que impidan que las mutantes NitCRsp $\Delta$ 74, NitCRsp $\Delta$ 73, NitCRsp $\Delta$ 66 y NitCRsp $\Delta$ 64 se plieguen correctamente.

Una comparación útil es la caracterizaron varias mutantes truncas del C-terminal de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 (Thuku, *et al.*, 2007). La nitrilasa de *R. rhodochrous* J1 tiene una identidad del 97 % con RsV51BNit. Las mutantes J1ΔC302, J1ΔC311, J1ΔC317 y J1ΔC327 de *R. rhodochrous* J1 corresponden a las mutantes NitCRspΔ64, NitCRspΔ55, NitCRspΔ49 y NitCRspΔ49 respectivamente de RsV51BNit (Fig. 47). Las mutantes J1ΔC302 y J1ΔC311 son inactivas, mientras que las mutantes J1ΔC317 y J1ΔC327 son activas. Es decir, las posiciones que generan mutantes inactivas en la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, también generan mutantes inactivas en RsV51BNit. La caracterización de las mutantes inactivas de *R. rhodochrous* J1 se quedó solamente en la actividad. Por consiguiente, no podemos saber si las mutantes truncas de *R. rhodochrous* J1 se pliegan correctamente, aunque es muy probable.

La creación de mutantes truncas eliminó algunas de las interacciones que estabilizan las superficies de interacción. Como consecuencia, el estado oligomérico de las mutantes se alteró. Las mutantes NitAtCΔ16 y NitAtCΔ29 son activas, aunque tienen tendencia agregarse y la actividad está mermada. Las mutantes de RsV51BNit son inactivas dado que han perdido su estructura. La eliminación del C-terminal puede controlar el estado oligomérico, pero conlleva efectos severos en la estructura y la actividad.

## Conclusiones

- Las mutantes NitCRspΔ74, NitCRspΔ73, NitCRspΔ66 y NitCRspΔ64 son inactivas debido a que han perdido su estructura.
- El límite de residuos que se pueden eliminar del C-terminal de RsV51BNit y generar una mutante activa es 49 residuos.
- La eliminación de la sección del C-terminal que estabiliza la superficie C de NitAt4 disminuyen la capacidad de formar filamentos, aunque son propensas a agregarse.
- La eliminación de hasta 29 residuos del C-terminal permite generar mutantes activas.
- La distancia  $D_{C-S}$  a lo largo de la dinámica molecular parece ser un predictor robusto de la actividad.

## **Perspectivas**

La eliminación de las regiones que ayudan a estabilizar las superficies de interacción de AtNit4 y RsV51BNit tiene efectos severos sobre la actividad y la estabilidad. Hacer mutaciones en las superficies de interacción y en el C-terminal podría modificar el estado oligomérico sin tener un efecto severo sobre la actividad y la estabilidad. En especial, la creación de mutantes quiméricas puede ser una opción interesante.

## Referencias

- Afkhami, Abbas, and Rasoul Norooz-Asl. "Micelle-Mediated Extraction and Spectrophotometric Determination of Ammonia in Water Samples Utilizing Indophenol Dye Formation." *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19, no. 8, 2008, pp. 1546-1552., <https://doi.org/10.1590/s0103-50532008000800014>.
- Agerbirk, N., Warwick, S., Hansen, P., & Olsen, C. (2008). Sinapis phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes. *Phytochemistry*, 69(17), 2937-2949. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.014>
- Anastas, P., & Mary M, K. (2002). Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Accounts Of Chemical Research*, 35(9), 686-694.
- Bergeron, S., Chaplin, D. A., Edwards, J. H., Ellis, B. S., Hill, C. L., Holt-Tiffin, K., Knight, J. R., Mahoney, T., Osborne, A. P., & Rucroft, G. (2006). Nitrilase-catalysed desymmetrisation of 3-hydroxyglutaronitrile: preparation of a statin side-chain intermediate. *Organic Process Research & Development*, 10(3), 661-665. <https://doi.org/10.1021/op050257n>
- Bhalla, T., Kumar, V., Kumar, V., Thakur, N., & Savitri. (2018). Nitrile Metabolizing Enzymes in Biocatalysis and Biotransformation. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 185(4), 925-946. doi: 10.1007/s12010-018-2705-7
- Cipolatti, E., Cerqueira Pinto, M., Henriques, R., da Silva Pinto, J., de Castro, A., Freire, D., & Manoel, E. (2019). Enzymes in Green Chemistry: The State of the Art in Chemical Transformations. *Advances In Enzyme Technology*, 137-151. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64114-4.00005-4>
- Chen, Y. (2015). Beware of docking!. *Trends In Pharmacological Sciences*, 36(2), 78-95. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001>
- Cheng, Y. (2018). Single-particle cryo-EM—How did it get here and where will it go. *Science*, 361(6405), 876-880. <https://doi.org/10.1126/science.aat4346>
- Chen, Z., Jiang, S., Wang, H., Wang, L., & Wei, D. (2019). Switching the regioselectivity of two nitrilases toward succinonitrile by mutating the active center pocket key residues through a semi-rational



engineering. *Chemical Communications*, 55(20), 2948-2951.  
<https://doi.org/10.1039/c8cc10110h>

- Chen, Z., Wang, H., Yang, L., Jiang, S., & Wei, D. (2021). Significantly enhancing the stereoselectivity of a regioselective nitrilase for the production of (S)-3-cyano-5-methylhexanoic acid using an MM/PBSA method. *Chemical Communications*, 57(7), 931-934.  
<https://doi.org/10.1039/d0cc07106d>
- Crum, M., Park, J., Sewell, B., & Benedik, M. (2015). C-terminal hybrid mutant of *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase dramatically enhances thermal stability and pH tolerance by reinforcing oligomerization. *Journal Of Applied Microbiology*, 118(4), 881-889. doi: 10.1111/jam.12754
- Dent, K., Weber, B., Benedik, M., & Sewell, B. (2009). The cyanide hydratase from *Neurospora crassa* forms a helix which has a dimeric repeat. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 82(2), 271-278. doi: 10.1007/s00253-008-1735-4
- Doskočilová, A., Kohoutová, L., Volc, J., Kourová, H., Benada, O., & Chumová, J. *et al.* (2013). NITRILASE1 regulates the exit from proliferation, genome stability and plant development. *New Phytologist*, 198(3), 685-698. doi: 10.1111/nph.12185
- Durbin, S., & Feher, G. (1996). PROTEIN CRYSTALLIZATION. *Annual Review Of Physical Chemistry*, 47(1), 171-204. doi: 10.1146/annurev.physchem.47.1.171
- Fernandes, B., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., & van Rantwijk, F. *et al.* (2006). Nitrile Hydratase Activity of a Recombinant Nitrilase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(18), 2597-2603. doi: 10.1002/adsc.200600269
- Forli, S., & Olson, A. (2012). A Force Field with Discrete Displaceable Waters and Desolvation Entropy for Hydrated Ligand Docking. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 55(2), 623-638. <https://doi.org/10.1021/jm2005145>
- Gómez, A. (2016). *Estructuración y activación de la nitrilasa de Rhodococcus sp. V51B inducidas por modificaciones en el extremo C-terminal* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hollingsworth, S., & Dror, R. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

- Huebner, K., Saldivar, J., Sun, J., Shibata, H., & Druck, T. (2011). Hits, Fhits and Nits: Beyond enzymatic function. *Advances In Enzyme Regulation*, 51(1), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.09.003>
- Hung, C., Liu, J., Chiu, W., Huang, S., Hwang, J., & Wang, W. (2007). Crystal Structure of Helicobacter pylori Formamidase AmiF Reveals a Cysteine-Glutamate-Lysine Catalytic Triad. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(16), 12220-12229. doi: 10.1074/jbc.m609134200
- Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P., Sewell, B., Willson, R., & Benedik, M. (2003). CynD, the Cyanide Dihydratase from Bacillus pumilus: Gene Cloning and Structural Studies. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(8), 4794-4805. doi: 10.1128/aem.69.8.4794-4805.2003
- Jandhyala, D., Willson, R., Sewell, B., & Benedik, M. (2005). Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 68(3), 327-335. doi: 10.1007/s00253-005-1903-8
- Jiang, S., Zhang, L., Yao, Z., Gao, B., Wang, H., Mao, X., & Wei, D. (2017). Switching a nitrilase from Syechocystis sp. PCC6803 to a nitrile hydratase by rationally regulating reaction pathways. *Catalysis Science & Technology*, 7(5), 1122-1128. <https://doi.org/10.1039/c7cy00060j>
- Kimani, S., Agarkar, V., Cowan, D., Sayed, M., & Sewell, B. (2007). Structure of an aliphatic amidase from Geobacillus pallidus RAPc8. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63(10), 1048-1058. doi: 10.1107/s090744490703836x
- Kiziak, C., Klein, J., & Stolz, A. (2007). Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction- and enantiospecificity of the arylacetone nitrilase from Pseudomonas fluorescens EBC191. *Protein Engineering Design And Selection*, 20(8), 385-396. doi: 10.1093/protein/gzm032
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorney, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255-278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Larrañaga, H. (2019). *Efecto en la estabilidad y en la actividad de mutaciones sitio-específicas en el C-terminal de la nitrilasa de Rhodococcus sp. V51B* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Liu, H., Gao, Y., Zhang, M., Qiu, X., Cooper, A., Niu, L., & Teng, M. (2013). Structures of enzyme-intermediate complexes of yeast Nit2: insights into its catalytic mechanism and different substrate specificity compared with mammalian Nit2. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69(8), 1470-1481. <https://doi.org/10.1107/s0907444913009347>
- Lundgren, S., Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J., & Dobritzsch, D. (2008). The crystal structure of  $\beta$ -Alanine synthase from *Drosophila melanogaster* reveals a homooctameric helical turn-Like assembly. *Journal Of Molecular Biology*, 377(5), 1544-1559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.011>
- Martínková, L., Rucká, L., Nešvera, J., & Pátek, M. (2016). Recent advances and challenges in the heterologous production of microbial nitrilases for biocatalytic applications. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2173-6>
- Miller, B., McGee, T., Swails, J., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. (2012). *MMPBSA.py*: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, 8(9), 3314-3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
- Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C., Boutou, E., Trauthwein, H., Verseck, S., & Antranikian, G. (2006). Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein Expression And Purification*, 47(2), 672-681. doi: 10.1016/j.pep.2006.01.006
- Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., & Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *European Journal Of Biochemistry*, 267(1), 138-144. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00983.x>
- Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., & Ueki, T. *et al.* (2000). Crystal structure of N-carbamyl-d-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 8(7), 729-738. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00160-x
- Nelson, D., Cox, M., & Lehninger, A. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed., pp. 189-199). New York: W.H. Freeman.

- Pace, H., & Brenner, C. (2001). *Genome Biology*, 2(1), reviews0001.1. doi: 10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001
- Pace, H., Hodawadekar, S., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., & Pekarsky, Y. *et al.* (2000). Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Current Biology*, 10(15), 907-917. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00621
- Piotrowski, M. (2008). Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*, 69(15), 2655-2667. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.08.020
- Prisant, M., Williams, C., Chen, V., Richardson, J., & Richardson, D. (2019). New tools in MolProbity validation: CaBLAM for CryoEM backbone, UnDowser to rethink “waters,” and NGL Viewer to recapture online 3D graphics. *Protein Science*, 29(1), 315-329. <https://doi.org/10.1002/pro.3786>
- Podar, M., Eads, J., & Richardson, T. (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 42. doi: 10.1186/1471-2148-5-42
- Raczynska, J., Vorgias, C., Antranikian, G., & Rypniewski, W. (2011). Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *Journal Of Structural Biology*, 173(2), 294-302. doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.017
- Robertson, D., Chaplin, J., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., & Chi, E. *et al.* (2004). Exploring Nitrilase Sequence Space for Enantioselective Catalysis. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(4), 2429-2436. doi: 10.1128/aem.70.4.2429-2436.2004
- Rucká, L., Chmátal, M., Kulik, N., Petrásková, L., Pelantová, H., & Novotný, P. *et al.* (2019). Genetic and Functional Diversity of Nitrilases in Agaricomycotina. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(23), 5990. <https://doi.org/10.3390/ijms20235990>
- Scheffer, M. (2006). *Helical structures of the cyanide degrading enzymes from Gloeocercospora sorghi and Bacillus pumilus providing insights into nitrilase quaternary interactions* (MSc). University of Cape Town.

- Seffernick, J., Samanta, S., Louie, T., Wackett, L., & Subramanian, M. (2009). Investigative mining of sequence data for novel enzymes: A case study with nitrilases. *Journal Of Biotechnology*, 143(1), 17-26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.06.004
- Sewell, B., Berman, M., Meyers, P., Jandhyala, D., & Benedik, M. (2003). The Cyanide Degrading Nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 Is a Two-Fold Symmetric, 14-Subunit Spiral. *Structure*, 11(11), 1413-1422. doi: 10.1016/j.str.2003.10.005
- Sewell, B., Thuku, R., Zhang, X., & Benedik, M. (2005). Oligomeric Structure of Nitrilases: Effect of Mutating Interfacial Residues on Activity. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1056(1), 153-159. doi: 10.1196/annals.1352.025
- Sharma, N., & Bhalla, T. (2012). Motif Design for Nitrilases. *Journal Of Data Mining In Genomics & Proteomics*, 03(03). doi: 10.4172/2153-0602.1000119
- Sharma, N., Thakur, N., Raj, T., Savitri, & Bhalla, T. (2017). Mining of Microbial Genomes for the Novel Sources of Nitrilases. *Biomed Research International*, 2017, 1-14. doi: 10.1155/2017/7039245
- Sharma, N., Verma, R., Savitri, & Bhalla, T. (2018). Classifying nitrilases as aliphatic and aromatic using machine learning technique. *3 Biotech*, 8(1). doi: 10.1007/s13205-018-1102-9
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2). doi: 10.1007/s13205-016-0485-8
- Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali, & Rawat, D. (2006). Nitrilase and Its Application as a 'Green' Catalyst. *Chemistry & Biodiversity*, 3(12), 1279-1287. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690131>
- Sobolev, O., Afonine, P., Moriarty, N., Hekkelman, M., Joosten, R., Perrakis, A. and Adams, P., 2020. A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure*, 28(11), pp.1249-1258.e2.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2019). QMEANDisCo—distance constraints applied on model

quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765-1771. doi: 10.1093/bioinformatics/btz828

- Thimann, K. V., & Mahadevan, S. (1964). Nitrilase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105(1), 133-141. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90244-9)
- Thuku, R., Brady, D., Benedik, M., & Sewell, B. (2009). Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *Journal Of Applied Microbiology*, 106(3), 703-727. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03941.x
- Thuku, R., Weber, B., Varsani, A., & Sewell, B. (2007). Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS Journal*, 274(8), 2099-2108. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05752
- Sun, H., Zhang, H., Ang, E., & Zhao, H. (2018). Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(7), 1275-1284. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.043>
- Vejvoda, V., Kubáč, D., Davidová, A., Kaplan, O., Šulc, M., & Šveda, O. *et al.* (2010). Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IM196840. *Process Biochemistry*, 45(7), 1115-1120. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.033
- Wardencki, W., Curyło, J., & Namiesńnik, J. (2005). Green Chemistry-- Current and Future Issues. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(4).
- Williamson, D., Dent, K., Weber, B., Varsani, A., Frederick, J., & Thuku, R. *et al.* (2010). Structural and biochemical characterization of a nitrilase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus pallidus* RAPc8. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 88(1), 143-153. doi: 10.1007/s00253-010-2734-9
- Woodward, J., Weber, B., Scheffer, M., Benedik, M., Hoenger, A., & Sewell, B. (2008). Helical structure of unidirectionally shadowed metal replicas of cyanide hydratase from *Gloeocercospora sorghi*. *Journal Of Structural Biology*, 161(2), 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.019>

- Xu, Z., Cai, T., Xiong, N., Zou, S., Xue, Y., & Zheng, Y. (2018). Engineering the residues on “A” surface and C-terminal region to improve thermostability of nitrilase. *Enzyme And Microbial Technology*, 113, 52-58. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.03.001
- Zhang, C., Zhang, Z., Li, C., Yu, H., Zheng, G., & Xu, J. (2012). Efficient production of (R)-O-chloromandelic acid by deracemization of O-chloromandelonitrile with a new nitrilase mined from *Labrenzia Aggregata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 91-99. doi:10.1007/s00253-012-3993-4
- Zhang, L., Yin, B., Wang, C., Jiang, S., Wang, H., Yuan, Y., & Wei, D. (2014). Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. *Journal Of Structural Biology*, 188(2), 93-101.