



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Rol funcional y estructural de la agregación de enzimas en filamentos: el caso de las nitrilasas

Functional and structural role of the aggregation of enzymes in filaments  
(the case of nitrilases)

Aguirre Sampieri, Sergio<sup>1</sup> y Garza-Ramos Martínez, Georgina<sup>1\*</sup>

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

\*Correspondencia. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70159, Coyoacán, Ciudad de México, CP. 04510 Tel +52 (55) 5623-2275, ggarza@bq.unam.mx

### Resumen

La oligomerización es una propiedad física común de las proteínas y representa una característica ventajosa en los sistemas biológicos. Algunas enzimas pueden formar polímeros de gran tamaño, en los cuales múltiples subunidades se ensamblan en estructuras filamentosas regulares. Enzimas como la piruvato descarboxilasa de *Neurospora crassa* o la nitrilasa de *Arabidopsis thaliana*, forman filamentos que son parte esencial e integral del citoesqueleto, funcionando a su vez como catalizadores eficientes. En este escrito se dan ejemplos de enzimas cuya actividad está regulada por cambios en su estructura cuaternaria, como la acetil-CoA carboxilasa o algunas nitrilasas bacterianas. La oligomerización de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B se modula por la longitud del extremo C-terminal. El truncamiento favorece cambios conformacionales que modifican las superficies de interacción entre subunidades llevando a una estructuración de la enzima en filamentos helicoidales regulares. El cambio en la agregación de las enzimas se manifiesta como un aumento en la estructura secundaria, en la estabilidad térmica y en la actividad enzimática. Los filamentos catalíticos de las nitrilasas constituyen un prototipo ideal para el desarrollo de diversas estructuras supramoleculares estables y su implementación en procesos biotecnológicos.

**Palabras clave:** oligomerización, filamentos, activación enzimática, nitrilasa.

### Abstract

Oligomerization is a common physical property of proteins and represents an advantageous feature in biological systems. Some enzymes can form large polymers, in which multiple subunits are assembled into regular filamentous structures. The high-molecular filamentous structures of pyruvate decarboxylase in *Neurospora crassa* or nitrilase in *Arabidopsis thaliana* are structural scaffold of the cytoskeleton functioning as well as efficient catalysts. This paper gives examples of enzymes whose activity is regulated by changes in their quaternary structure, such as acetyl-CoA carboxylase or some bacterial nitrilases. Oligomerization of the nitrilase from *Rhodococcus sp.* V51B is modulated by the length of the C-terminal end. Nitrilase assembles into long helical filaments after C-terminal truncation. This effect is accompanied by an increase in the content of  $\alpha$ -helix, in stability and in enzyme activity. Nitrilase filaments constitute an ideal prototype for the development of various supramolecular structures and their implementation in biotechnological processes.

**Key words:** oligomerization, filaments, enzymatic activation, nitrilase.

## Oligomerización de enzimas

Muchas enzimas son oligómeros que se ensamblan con un número de subunidades bien definidos, que típicamente varían de 2 a 12 subunidades por oligómero. Estudios recientes sugieren que algunas enzimas también pueden formar polímeros de mayor tamaño y de orden más alto, en los cuales docenas a cientos de subunidades se ensamblan en filamentos. Para la mayoría de estas estructuras, carecemos de una comprensión de la regulación, así como del significado funcional de su polimerización [1]. En las proteínas oligoméricas, la asociación entre las subunidades puede variar en intensidad y duración. Algunas proteínas se encuentran sólo o principalmente, en un estado oligomérico. Estas proteínas generalmente tienen constantes de disociación en el rango nanomolar. Otras tienen una tendencia débil a asociarse y la oligomerización depende de las condiciones ambientales como la concentración, la temperatura y el pH. Algunas otras proteínas se oligomerizan de forma dinámica en respuesta a estímulos, como un cambio en la unión de nucleótidos u otros metabolitos o por cambios en el estado de fosforilación. Tales cambios pueden tener un efecto dramático en la afinidad de las subunidades en varios órdenes de magnitud [2].

Se han caracterizado varias enzimas cuya actividad está regulada por cambios en su estructura cuaternaria. Algunas de estas, forman arreglos altamente ordenados que sirven como plataformas estructurales que facilitan la interacción de otras biomoléculas, desempeñando así diversas funciones celulares. A continuación se describen algunos ejemplos.

### La acetil-CoA carboxilasa

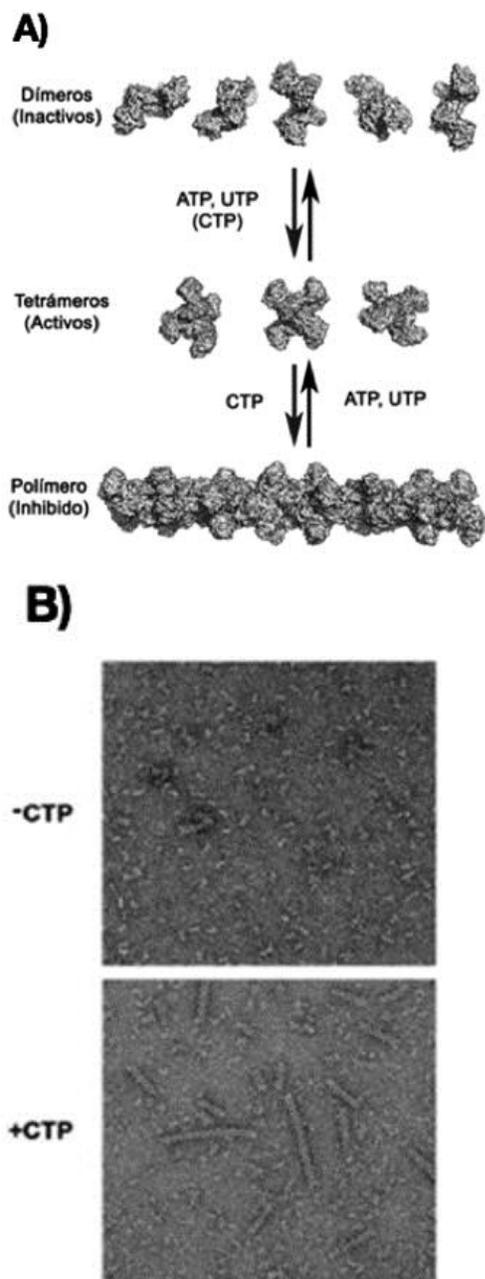
Quizá el primero y mejor ejemplo caracterizado de la relación entre la actividad de una enzima y su ensamblaje de orden superior se estableció con la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Esta enzima cataliza la formación de malonil-CoA, un sustrato esencial para la sintasa y los sistemas de elongación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos; es también un potente inhibidor de la oxidación de ácidos grasos. La enzima es regulada por fosforilación reversible, por cambios en los niveles de transcripción y, en mamíferos por un mecanismo de polimerización [3]. La regulación de la actividad de la ACC por citrato es a través de una activación alostérica que puede inducir su polimerización lo que aumenta su actividad catalítica. La oligomerización

*in vitro* de la ACC es inducida por concentraciones altas de citrato (> 5 mM) formando polímeros filamentosos altamente activos de hasta 4000 Å de longitud. La contribución general de este nivel de regulación ha sido cuestionada en la medida en que la concentración de citrato necesaria para aumentar la actividad de la ACC es mucho más alta que la normalmente presente en las células. Sin embargo, Kim *et al*, en 2010 [4], demostraron que una proteína citosólica de 22 kDa de función previamente desconocida, MIG12, se une a la ACC humana (ACC-1) y reduce el umbral para la activación de citrato en el rango fisiológico (<1 mM). Los dímeros y polímeros de la ACC están en equilibrio; sin embargo, en células adiposas y hepáticas expuestas a la insulina, la proporción de polímeros activados aumenta rápidamente y disminuye en condiciones catabólicas [5].

### La citidina sintasa

La enzima citidina sintasa (CTP sintasa), forma filamentos grandes y micrométricos en una amplia variedad de especies bacterianas y eucariotas [6]. La función de esta enzima es transformar el nucleótido uridina trifosfato (UTP) en citidina trifosfato (CTP). La oligomerización de la CTP sintasa es necesaria para su actividad catalítica y está controlada por la disponibilidad de nucleótidos; ATP, UTP o CTP que pueden favorecer la formación de tetrámeros activos. Sin embargo, la polimerización regula negativamente su actividad cuando se acumula el producto, CTP [7]. La actividad de la CTP sintasa está estrechamente relacionada con el control de la formación del filamento pero también con su longitud. Barry *et al*, (2014) [1], demostraron que la CTP sintasa, se inactiva casi completamente cuando se forman estos polímeros; el CTP promueve su formación, mientras que el UTP y el ATP hacen que se desarmen (Figura 1). Esta enzima, por lo tanto, es menos activa cuando hay exceso de producto en la célula y activa cuando sus sustratos son abundantes. Mediante criomicroscopía electrónica fue posible obtener la estructura tridimensional de un polímero de la CTP sintasa, determinando que sus sitios activos pueden acceder fácilmente al sustrato, aun cuando el CTP esté unido a las enzimas. No obstante, las enzimas en el polímero parecen estar bloqueadas en una forma que las hace incapaces de llevar a cabo su función. Probablemente son las restricciones cuaternarias impuestas por la estructura del filamento las que proporcionan el mecanismo para la inhibición de la reacción de síntesis. Dado que la polimerización de la CTP sintasa se conserva entre diversos procariontes y eucariotas, se propone que la polimerización

evolució de un ancestro común temprano para regular la actividad enzimática [1]. La CTP sintasa puede considerarse como un modelo para una clase de enzimas cooperativas cuya actividad está regulada por un ensamblaje de orden superior.



**Figura 1. Formación de filamentos en la CTP sintasa de *E. coli*.** A) Los dímeros son inactivos, la enzima alcanza su forma activa (tetramérica) con la disponibilidad de nucleótidos (sustrato), la acumulación de CTP (sustrato) induce la polimerización de la enzima y su inactivación. B) Micrografías electrónicas con tinción negativa de la CTP sintasa en presencia y ausencia de CTP. Figura modificada de la referencia [1].

### La glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa, enzima que cataliza la conversión del aminoácido glutamato en glutamina, forma filamentos en células de levadura. La formación de filamentos se observó con mayor frecuencia cuando las células entran en la fase estacionaria del ciclo celular o al estar expuestas a una disminución del pH intracelular. Los filamentos se forman por apilamiento repetido de complejos enzimáticos homo-decaméricos, dando como resultado una inactivación enzimática y la formación de depósitos temporales de glutamina sintetasa y otras proteínas. Probablemente la formación de estos agregados representa una adaptación que permite a la levadura recuperarse más rápido de una situación de estrés inducida por la falta de su fuente primaria de energía, la glucosa, o entrar en la siguiente etapa del ciclo celular ahorrando recursos energéticos [8]. Se ha propuesto que el cambio en el pH citosólico inducido por la depleción de nutrientes en las levaduras, puede reducir fuertemente la carga neta de la enzima, cuyo punto isoeléctrico teórico es cercano a 6; por lo que una disminución en las interacciones repulsivas o alteraciones en la distribución de cargas en la interface de las subunidades de la glutamina sintetasa, pueden ser la fuerza impulsora para su ensamblaje.

### La piruvato descarboxilasa de *Neurospora crassa*

Otro caso de enzimas con capacidad de formar estructuras filamentosas es la piruvato descarboxilasa de *Neurospora crassa* (NcPDC). La PDC es una enzima clave en organismos cuyo metabolismo energético se basa en la fermentación alcohólica. Cataliza la descarboxilación no oxidativa de  $\alpha$ -cetoácidos para producir el aldehído correspondiente y la liberación de dióxido de carbono. La unidad estructural más pequeña y catalíticamente activa es el dímero; sin embargo, el estado oligomérico dominante es el tetramero que consta de cuatro subunidades idénticas. La disociación del oligómero depende de la concentración de proteína, así como del pH y la concentración del cofactor tiamina pirofosfato [9]. En el caso particular de la NcPDC, los cambios en el pH del medio inducen su polimerización en arreglos filamentosos que muestran elevada actividad catalítica [10]. Mediante microscopía electrónica de transmisión, se demostró que la enzima aislada forma filamentos con diámetros de 7-10 nm y longitudes de 120-200 nm a pH entre 5.0 y 6.0. La función biológica de estas estructuras no ha sido descrita; sin embargo, estudios previos demostraron la formación *in vivo* de

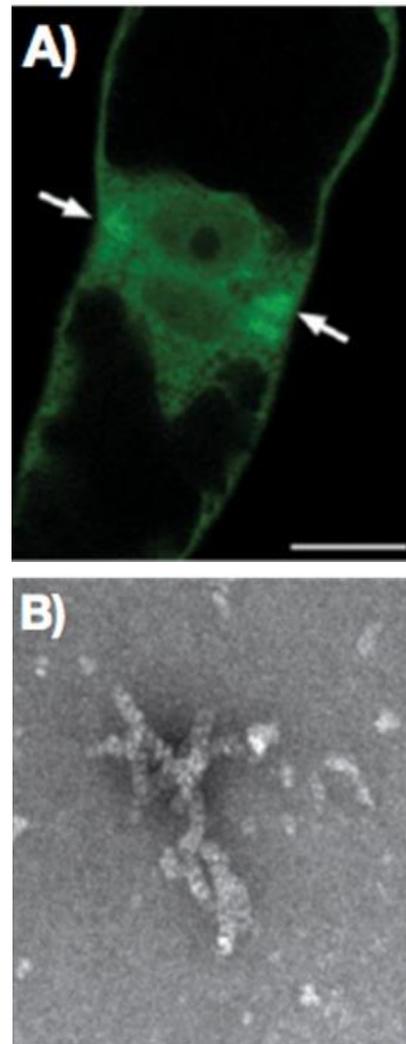
filamentos de PDC en el citoplasma de *N. crassa* [11]. *In vitro* se observó una correlación entre el aumento de la eficiencia catalítica con la formación de agregados filamentosos. Se deduce de lo anterior, que las estructuras filamentosas de la PDC de *N. crassa* pueden ser parte esencial e integral del citoesqueleto funcionando a su vez como catalizadores eficientes.

### La nitrilasa de *Arabidopsis thaliana*

Las nitrilasas son una familia de enzimas que catalizan la transformación directa de nitrilos orgánicos en sus correspondientes ácidos carboxílicos y la liberación de amonio. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se les puede encontrar principalmente en plantas, hongos y bacterias.

Algunas nitrilasas de bacterias y hongos poseen la capacidad de ensamblarse en estructuras filamentosas *in vitro*, propiedad que se ha observado *in vivo* en hojas de *Arabidopsis*, donde se han visto agregados de nitrilasa con estructura filamentosas, en proximidad al núcleo de la célula. Esto ocurre en respuesta a heridas mecánicas o tratamiento con herbicidas y durante los primeros pasos de la muerte celular programada (Figura 2). El genoma de *Arabidopsis* expresa cuatro isogenes de nitrilasa, denominados *NIT1-NIT4*. La enzima Nit1 está implicada en el catabolismo de glucocinolatos, compuestos de defensa que se metabolizan tras una herida o durante las primeras etapas del desarrollo de las plántulas [12]. Participa también en una de las respuestas más tempranas de estos sistemas de muerte celular; Nit1 se redistribuye en agregados que son visibles *in vivo*, como gránulos de la enzima marcada con proteína verde fluorescente (GFP-Nit1) o como una forma sedimentable de baja velocidad [13]. La agregación de la enzima en filamentos precede la contracción nuclear y el colapso celular, dos características citológicas clásicas de la muerte celular de las plantas [14]. Estudios más recientes determinaron que el silenciamiento del gen *NIT1* compromete el crecimiento, lleva a la pérdida de la organización tisular, a la proliferación sostenida e inhibición de la citocinesis, dando lugar a células agrandadas y poliploides. Por el contrario, células que sobreexpresan *NIT1* muestran un crecimiento lento y una mayor tasa de muerte celular programada, lo que sugiere que los filamentos de *NIT1* regulan la salida del ciclo celular y la entrada en la diferenciación; y que al mismo tiempo se encuentra implicada en la citocinesis [15]. Estos hallazgos sugieren que los filamentos de Nit1, proveen a la célula de plataformas para que se lleven

a cabo las interacciones moleculares implicadas en la regulación y proliferación en balance con la apoptosis celular.



**Figura 2. Imágenes representativas de NIT1 de *A. Thaliana*.** A) localización de GFP-NIT1 durante la citocinesis en células cultivadas (Barra 100 nm). B) Micrografía electrónica con tinción negativa de NIT1 en la que se observan filamentos helicoidales. Figura modificada de la referencia [15].

### Nitrilasas formadoras de filamentos

Las nitrilasas (EC 3.5.5.1), junto con las cianuro hidratatas y cianuro dihidratatas, se agrupan en una sola familia conocida como Nitrilasa/Cianuro Hidratasa. Esta familia pertenece a su vez a la superfamilia Nitrilasa, que se agrupa en trece ramas distintas a las hidrolasas carbono-nitrógeno, cuyos miembros catalizan una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno. Las distintas enzimas comparten homología estructural significativa, a pesar de las

grandes variaciones en sus secuencias. Las estructuras cristalográficas de once homólogos distantes de las nitrilasas, con  $\leq 20\%$  de similitud, sugieren que este grupo de enzimas poseen una triada catalítica particular Glu-Lys-Cys, y una conformación multimérica que presenta en su plegamiento un motivo estructural único formado por cuatro capas alfa-beta-beta-alfa (ABBA “sándwich”) [16,17].

A la fecha, se han caracterizado un gran número de nitrilasas provenientes de diferentes organismos, en su mayoría bacterias y hongos [18, 19, 20]. Aunque su papel fisiológico no es claro aún, se reconoce su participación en la síntesis del ácido 3-indolacético, una auxina [21] y de cianolípidos, o en la hidrólisis de la  $\beta$ -cianoalanina, intermediario en la vía de detoxificación del cianuro en plantas [12]. Las propiedades bioquímicas de las nitrilasas varían dependiendo de la especie. Las diferencias más significativas están en la especificidad por sus sustratos, su estructura cuaternaria, sus propiedades de agregación y sus pH óptimos. De acuerdo con la especificidad por su sustrato se clasifican en tres categorías: aquellas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, que son la mayoría; las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos, y las que actúan sobre arilacetónitrilos. Se ha descrito para algunas nitrilasas la capacidad de hidrolizar ambos tipos de nitrilos: las nitrilasas alifáticas de *Acidovorax facilis* 72W, *Acinetobacter* sp AK226, *Synechocystis* sp PCC6803, *Rhodococcus rhodochrous* K22 y *R. rhodochrous* ATCC33278 presentan actividad para benzonitrilo, sustrato aromático, que representa entre el 5 y 94% de la actividad relativa al sustrato alifático correspondiente, mientras que la arilacetónitrilasa de *Pseudomonas putida* presenta el 23% [22, 23]. Las cianuro dihidratasa (CynD) y las cianuro hidratasa (CHT) comprenden a un grupo de enzimas producidas por bacterias y hongos, respectivamente, las cuales catalizan la hidrólisis específica del cianuro inorgánico. Las CynD lo hidrolizan en ácido fórmico y amonio, mientras que las CHT lo convierten a formamida [24].

Las nitrilasas bacterianas, más de 200 identificadas por tamizado funcional de bibliotecas de DNA ambiental y algunas decenas de especies cultivadas, han sido clasificadas en seis “clados” o subfamilias. De estos estudios, se encontró que el número de propiedades enzimáticas distintas (químico y regio especificidad) identificadas en las diferentes nitrilasas, son específicas de cada subfamilia y, en algunos casos, correlaciona con la biogeografía y ecología de las muestras ambientales. La pérdida o

ganancia de distintas actividades o especificidades coinciden con los eventos evolutivos que llevaron a la formación de las subfamilias principales [25, 26]. El hecho de que las diferencias en sus propiedades enzimáticas se correlacionen con cada una de las subfamilias de genes, sugiere fuertemente que las nitrilasas han divergido funcionalmente, desempeñando diferentes funciones biológicas en las poblaciones microbianas que ocupan una gran variedad de nichos ecológicos [25]. Más aun, la búsqueda de nuevas enzimas por técnicas de bioprospección y minería genómica, han permitido identificar y caracterizar un gran número de nitrilasas con potencial para transformar nitrilos química e industrialmente importantes [27, 28, 29].

Recientemente fueron depositadas las estructuras cristalográficas de dos miembros de esta familia, la nitrilasa termófila de *Pyrococcus abyssi* (PDB 3ivz, [30]) y la de *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB 3wuy, [31]) (Figura 8). La comparación entre las estructuras de ambas nitrilasas muestra una gran similitud estructural no sólo a nivel de los monómeros, sino también de los dímeros. Las diferencias más importantes se observan alrededor del sitio activo y en las interacciones del extremo C-terminal. Las diferencias en el volumen de la cavidad del sitio activo podrían explicar la especificidad diferente por el sustrato, la nitrilasa de *P. abyssi* es específica para dinitrilos pequeños, mientras que la de *Synechocystis* muestra actividad de hidrólisis hacia un amplio espectro de sustratos, mononitrilos o dinitrilos, aromáticos o alifáticos. En la nitrilasa de *P. abyssi*, el carboxilo terminal de cada subunidad penetra al interior de la otra subunidad, estableciendo interacciones específicas que participan en la dimerización. En el caso de la nitrilasa de *Synechocystis* no se observó densidad electrónica de un segmento del extremo C-terminal, debido a que durante el proceso de cristalización se eliminaron 56 residuos.

### Mecanismo de reacción

Dado que a la fecha no se dispone de una estructura de nitrilasa unida a un análogo del sustrato, sólo se cuenta con un mecanismo catalítico propuesto (Figura 3). El Glu catalítico actúa como base general, aceptando el hidrógeno del tiol de la cisteína. La Cys activada lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el C del grupo ciano formando un complejo enzima-sustrato covalente. El residuo de Lys estabiliza al intermediario tetraédrico de la reacción *vía* la adición de una molécula de agua. El ataque nucleofílico de una segunda molécula de agua produce la liberación de amonio y la liberación del

ácido carboxílico correspondiente del intermediario tioéster [30, 32]. Se ha reportado que algunas nitrilasas aisladas de plantas y bacterias poseen la propiedad de convertir algunos nitrilos en amidas. En este caso, si la posición o el impedimento estérico

producido por el grupo R favorecen que una carga positiva se encuentre sobre la lisina, se esperaría el rompimiento del enlace C-S con la liberación del grupo tiol, llevando la reacción a la formación de amidas [33].

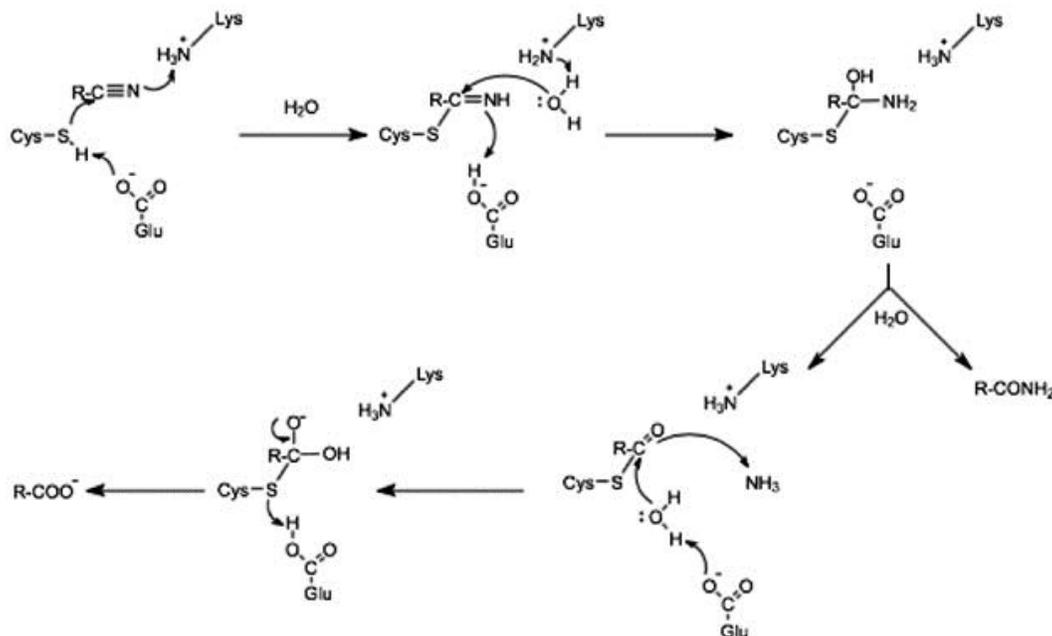


Figura 3. Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por las nitrilasas.

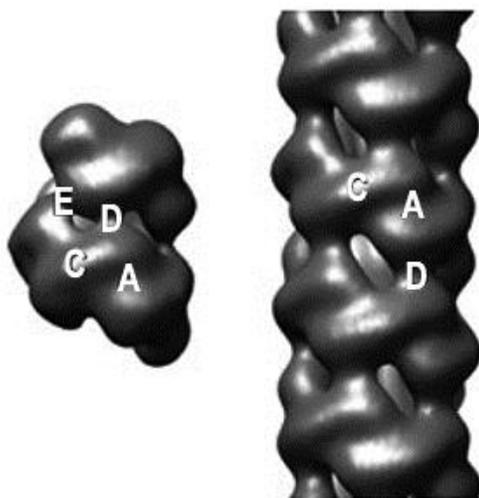
### Oligomerización de nitrilasas en filamentos catalíticos

Las nitrilasas están conformadas por subunidades de aproximadamente 30 a 45 kDa, que se asocian en homooligómeros de diferentes tamaños (entre 4 y 22 subunidades), dando la forma activa de la enzima. Las nitrilasas aisladas de varias especies del género *Rhodococcus* son dímeros inactivos; la presencia de altas concentraciones de sustrato, como benzonitrilo o sales como el sulfato de amonio, inducen su asociación formando decámeros o dodecámeros, catalíticamente activos [34]. Sólo las nitrilasas de *Klebsiella ozaenae* y *P. abyssi* mantienen una estructura dimérica funcional [35, 36]. Los dímeros de las cianuro dihidratasa de *Pseudomonas stutzeri* AK61 y *Bacillus pumilus* C1 se asocian en una estructura oligomérica espiral con un tamaño definido, 14 y 18 subunidades respectivamente. La estructura cuaternaria de estos ensamblajes catalíticamente activos se determinó por microscopía electrónica con tinción negativa y reconstrucción tridimensional (Figura 4) [37, 38]. En el caso particular de la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* C1, los agregados espirales de 18 subunidades pueden crecer formando filamentos helicoidales regulares de

mayor tamaño, en un proceso dependiente del pH. La enzima a pH 8 adquiere una estructura espiral conformada por 18 subunidades, mientras que a pH 5.4 se favorece la formación de hélices de tamaño variable (50-300 nm). La espiral se construye a partir de un bloque dimérico y el modelo estructural revela que cada vuelta de hélice comprende 4.9 dímeros. Otras estructuras similares incluyen los filamentos helicoidales de las cianuro hidratasa de *Gloeocercospora sorghi*, *N. crassa* y *Aspergillus niger* K10 [39, 40]. Las fibras son de mayor tamaño, en las que se acomodan 5.5 dímeros por vuelta de hélice. El cambio en la estructura cuaternaria de la CynD de *B. pumilus* C1 inducido por el cambio de pH es reversible y se acompaña de un ligero incremento de la actividad catalítica. El estado de protonación de algunas histidinas localizadas en el C-terminal, podría estar implicado en el crecimiento de la hélice [17, 38].

Se ha reportado que la oligomerización de las nitrilasas de *Fusarium solani* O1 y *R. rhodochrous* J1 lleva también a la formación de espirales cortas, de tamaño variable, y en el caso de ésta última, se observó la formación de fibras helicoidales largas, muy parecidas a las de la cianuro dihidratasa de *B.*

*pumilus*, como resultado de un proceso auto-proteolítico en el que se eliminaron 39 residuos del extremo carboxilo terminal [22]. Las nitrilasas y cianuro dihidratasa formadoras de espirales, contienen un segmento C-terminal de entre 40-100 residuos más largo con respecto a las secuencias de otros homólogos estructurales como la *N*-carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium sp.*, las amidasas de *Geobacillus pallidus* (PDB 2plq [41]) y *P. aeruginosa* (PDB 2uxy [42]), el dominio Nit-Fit de *C. elegans* (PDB 1ems [43]) o la nitrilasa dimérica de *P. abyssi* (PDB 3ivz [30]). El segmento C-terminal extendido se localiza en el interior de las espirales formando parte de la superficie de interacción entre los monómeros, por lo que se ha resaltado la importancia de éste en la oligomerización y activación de las nitrilasas [17, 37, 44].



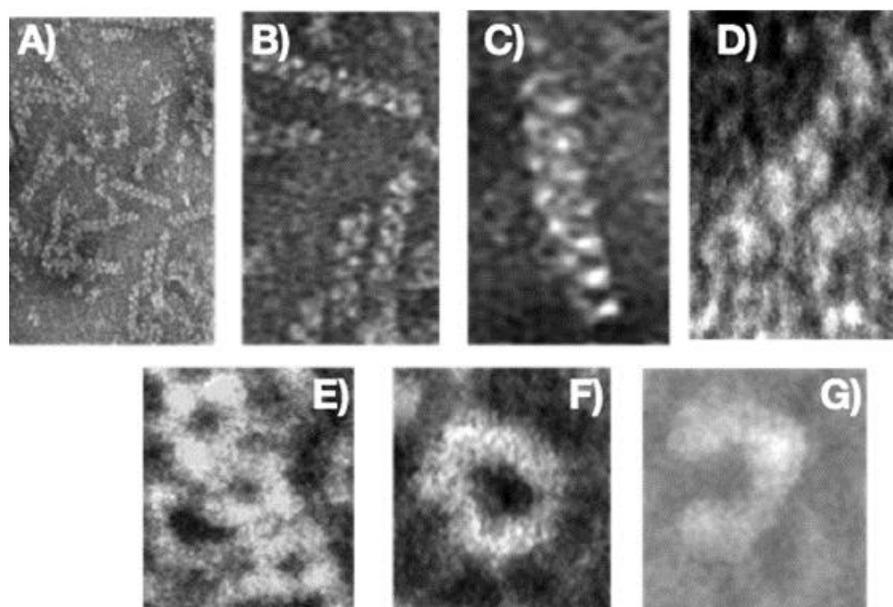
**Figura 4. Reconstrucciones tridimensionales en baja resolución de dos oligómeros de nitrilasa a partir de imágenes de microscopía electrónica.** Se muestran las interfaces de oligomerización denominadas A, C, D y E de la espiral auto-terminada de la cianuro dihidratasa de *Pseudomonas stutzeri* AK61 y el filamento helicoidal de la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* C1 a pH 5.4. Figura modificada de la referencia [17].

La nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B se ha usado en nuestro laboratorio como modelo experimental para caracterizar los cambios oligoméricos y su relación con la estabilidad y actividad catalítica. A partir de la nitrilasa recombinante se han generado varias mutantes truncadas en el extremo C-terminal. La mutante Nit $\Delta$ C328, en la que se eliminaron 39 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, se diseñó considerando el sitio de proteólisis reportado para la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, debido a que comparten una identidad del 92%. Similar a lo reportado por Thuku y col. [22], la mutante

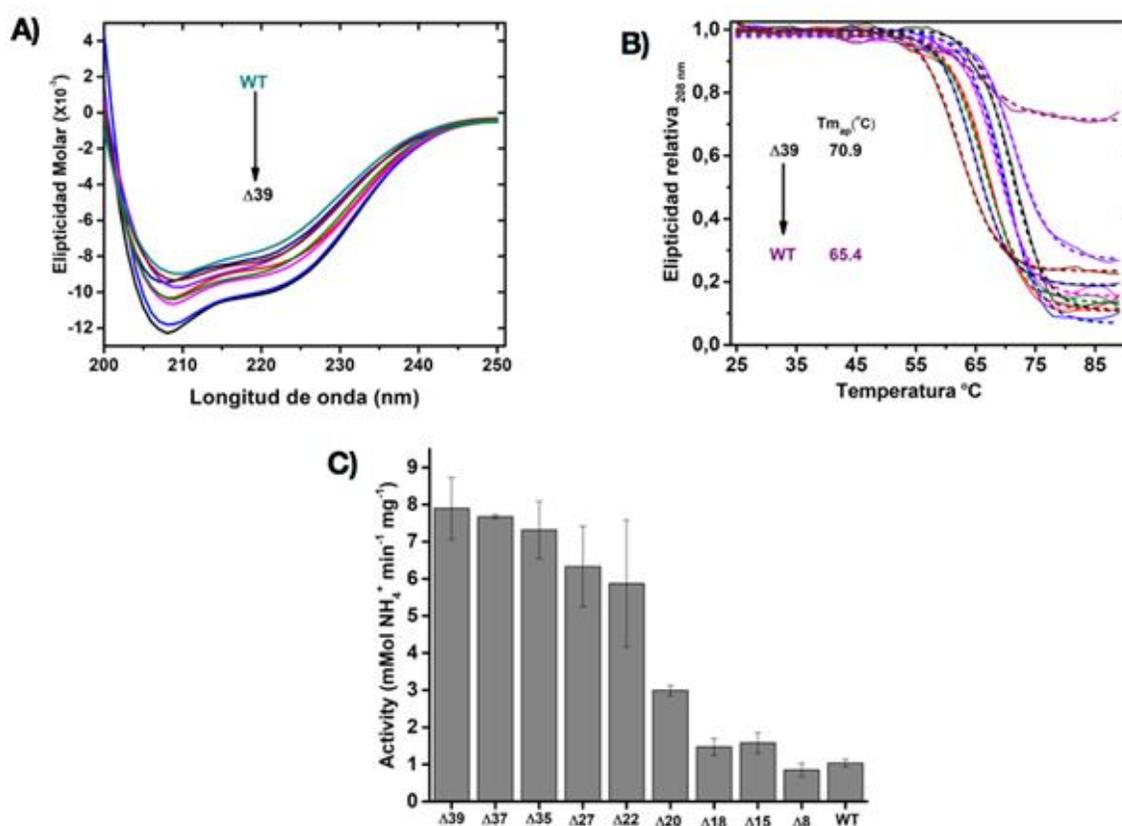
Nit $\Delta$ C328 se ensambla en filamentos helicoidales regulares, activos y estables, de longitud variable (50-400 nm), no obstante, su velocidad catalítica respecto a la nitrilasa silvestre es  $\approx 10$  veces mayor con una  $k_{CAT}$  de 6940 vs 545  $s^{-1}$ .

Mediante el escaneo del C-terminal a través de mutantes truncadas desde la posición 366 hasta la 328 se determinó, por un lado, la longitud mínima que se necesita eliminar para formar filamentos helicoidales largos y, por otro, su activación enzimática y estabilización asociadas. Las mutantes truncadas se visualizaron por microscopía de transmisión con tinción negativa (Figura 5), para así, determinar el estado de agregación que adopta la enzima de acuerdo a la longitud del extremo C-terminal. El análisis de las micrografías electrónicas permitió identificar poblaciones heterogéneas de estructuras con diferentes formas y tamaños, que incluyen filamentos helicoidales largos (50-100 nm), cortos (35-50 nm), estructuras con forma de rosetas y en forma de "C". Esta última es la principal partícula visible que se distingue para la nitrilasa silvestre, estructuras que son similares a las reportadas previamente por Thuku y col. [22]. La longitud mínima del C-terminal que detona el equilibrio oligomérico hacia la formación de filamentos se encuentra entre las posiciones 345 y 349, siendo necesario acortar hasta en 22 residuos la longitud del extremo C-terminal para obtener estos ensamblajes.

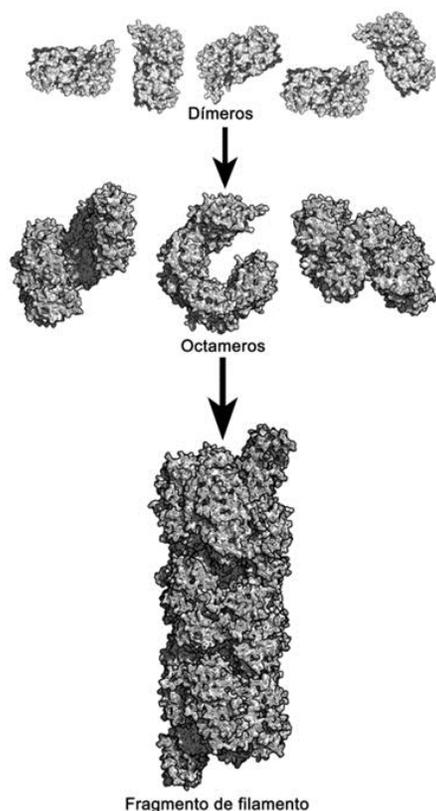
La formación de estructuras helicoidales va acompañada de una estructuración de la enzima que se refleja como un aumento en las estructuras de  $\alpha$ -hélice. Los espectros de dicroísmo circular de las mutantes truncadas mantienen la misma forma con dos mínimos a 208 y 220 nm, que son característicos de la estructura  $\alpha$ -hélice, pero la intensidad de la señal aumenta a medida que se acorta el extremo C-terminal (Figura 6A). Los valores de elipticidad alrededor de estos mínimos, son mayores en las mutantes que forman filamentos con respecto a las mutantes y la nitrilasa silvestre que no los forman. El incremento de estructura secundaria en las mutantes formadoras de filamentos se reflejó en una mayor estabilidad térmica. Las temperaturas de fusión media se desplazan de 65 a 71  $^{\circ}C$  a medida que se acorta la longitud del extremo C-terminal (Figura 6B). Estos cambios se acompañan de una activación enzimática asociada a la estructuración de las enzimas en filamentos helicoidales (Figura 6C). Las mutantes que forman filamentos cortos, rosetas o la estructura de "C", característica de la nitrilasa silvestre, son menos activas respecto a las que forman filamentos helicoidales alargados [45].



**Figura 5.** Imágenes de microscopía electrónica con tinción negativa de la nitrilasa de *Rhodococcus sp. V51B*. Se pueden observar los distintos estados oligoméricos inducidos por truncamiento del C-terminal: filamentos helicoidales largos (50-100 nm) (A-C), cortos (35-50 nm) (D), estructuras con forma de rosetas (E y F) y estructuras con forma de “C” (G). Figura modificada de referencia 45.



**Figura 6.** Estabilidad y actividad de distintas mutantes truncadas de la Nitrilasa de *Rhodococcus sp. V51B*. (A) Espectros de CD en el UV lejano donde se observan los mínimos a 208 y 220 nm. (B) Gráfica de estabilidad térmica de las mutantes de nitrilasa seguida por cambios en la señal de CD a 208 nm. (C) Actividades enzimáticas de las mutantes truncadas, se muestra el número de aminoácidos eliminados para cada construcción. Figura modificada de referencia 45.



**Figura 7. Modo de oligomerización propuesto para la enzima  $\beta$ -alanina sintasa de *Drosophila melanogaster* (PDB 2vhi).** Los dímeros se asocian entre sí dando lugar a un octámero con forma de "C", por operaciones de simetría los octámeros pueden ser apilados uno sobre otro dando lugar a un filamento helicoidal con giro a la izquierda.

### Reconstrucción tridimensional de los filamentos

Los modelos estructurales generados por reconstrucción tridimensional a partir de las estructuras atómicas de algunos homólogos cristalizados de las nitrilasas como la N-carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium* sp. KNK712 (PDB 1erz [46]), el dominio Nit-Fit [43], la  $\beta$ -alanina sintasa de *Drosophila melanogaster* (PDB 2vhi [47]) (Figura 7) y la nitrilasa de *P. abyssi* (PDB 3ivz [30]), han permitido comprender mejor el modo en que las subunidades se ensamblan en filamentos helicoidales. A partir de estos modelos, se han identificado diferentes caras de contacto entre subunidades, referidas como A, C, D y E, las cuales participan en la formación de los filamentos helicoidales (Figura 8). En la región A se localiza el extremo C-terminal y a través de esta superficie los monómeros de las nitrilasas se asocian para formar dímeros. Se ha reportado que las interacciones en la superficie A son necesarias para posicionar la cisteína catalítica en el sitio activo. Por otra parte, la

asociación entre dímeros lleva a la formación de la superficie C, la cual es clave en la formación de espirales. La superficie C está posicionada perpendicularmente a  $90^\circ$  respecto de la superficie A, lo que favorece el ensamble en dímeros y oligómeros (Figura 8). De hecho, variaciones de esta relación angular entre ambas superficies llevan a distintas formas y tamaños de las espirales. Sólo cuando se arma un giro completo de dímeros surge la superficie D, que permite la elongación espiral de los filamentos. La superficie E se encuentra únicamente en las espirales cortas auto-terminadas [17].

Todos los miembros de la superfamilia nitrilasa comparten un sitio activo común Glu-Lys-Cys. El posicionamiento crítico de estos residuos y el acceso de moléculas de agua, crea la diversa gama de reacciones hidrolíticas C-N dentro de esta familia. Las estructuras cristalográficas de varios miembros de la superfamilia muestran que los monómeros se asocian en una estructura oligomérica espiral. Los monómeros terminales en el oligómero de la  $\beta$ -alanina sintasa (Figura 8C) tienen los sitios activos incompletos, por lo que se ha propuesto que la formación de la espiral es un prerequisite indispensable para que las nitrilasas conformen un sitio activo completo y funcional [47].

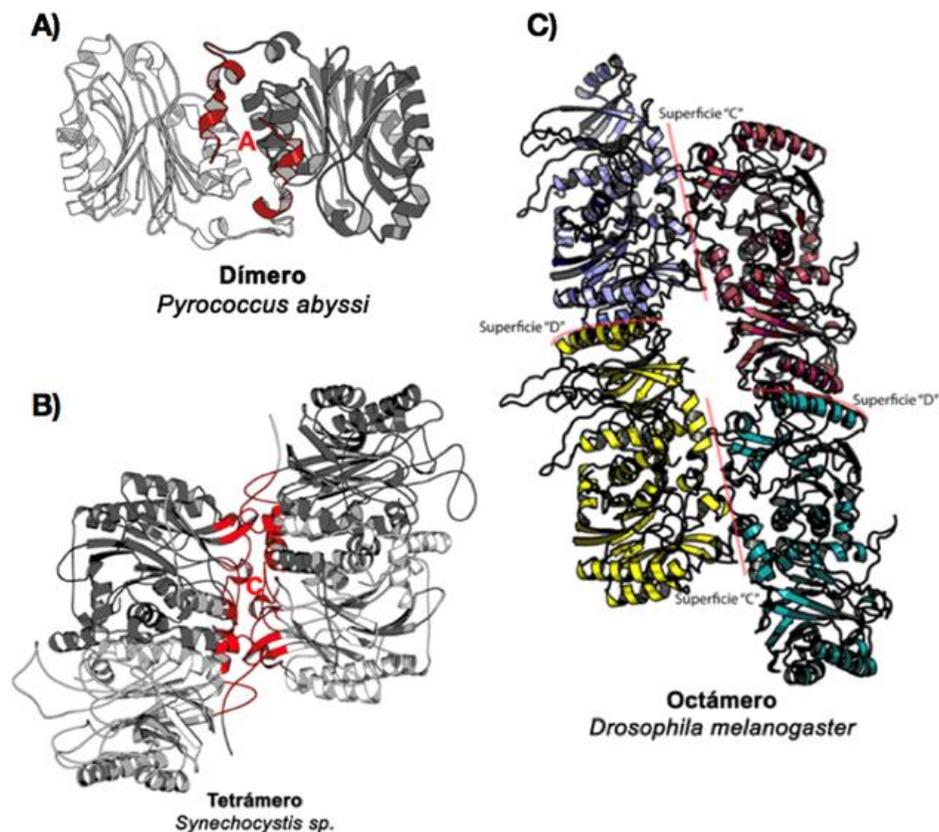
### Conclusiones

Los resultados obtenidos con las mutantes truncadas de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B, confirman que los residuos determinantes de los diferentes estados oligoméricos de la nitrilasa se encuentran entre las posiciones 328-366 del extremo C-terminal, y que la activación es un efecto dependiente de la oligomerización enzimática. A pesar del desorden inherente y la falta de conservación en la región C-terminal de las nitrilasas microbianas, se puede concluir que esta región tiene dos papeles posibles. La longitud del extremo facilita la formación de espirales colocando muy cerca los residuos de las interfaces. Como resultado de esto, se forman nuevas interacciones que fortalecen las interfaces. Además, la flexibilidad inherente del extremo C-terminal le permite interactuar con otra parte de la subunidad cercana al sitio activo, de una manera que influye en la actividad y la estabilidad de la espiral.

La oligomerización es una propiedad física común de las proteínas y representa una característica recurrente y ventajosa en los sistemas biológicos. Muchos oligómeros contribuyen a numerosos procesos celulares, proporcionando estabilidad, aumentando la actividad enzimática al

concentrar sitios activos o facilitando un aumento en la concentración local de moléculas [48]. Sin embargo, pueden ser parte también de un proceso patogénico como el de la amiloidogénesis. Los fenómenos biológicos de auto-ensamble han inspirado el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de ensamblajes proteicos que llevan a la formación de complejos supramoleculares. Los avances más recientes incluyen el diseño de proteínas que se ensamblan en forma de filamentos, cajas simétricas o matrices regulares. Los diversos tipos de ensamblajes han llevado a la producción de nanomateriales útiles con aplicación biotecnológica, por ejemplo, la producción de nanofibras de péptidos

alquilados que inducen la mineralización de hidroxiapatita [49] o de cápsides virales como vectores moleculares sistémicos [50], entre otros. Los filamentos catalíticos de las nitrilasas constituyen un prototipo ideal para el desarrollo de un sistema biocatalizador eficiente de la hidrólisis de nitrilos. Encontrar un “interruptor” que controle la formación de agregados, espirales o fibras helicoidales a partir de los protómeros de las nitrilasas, permitirá construir diversas estructuras supramoleculares estables y activas para una posible implementación en procesos biotecnológicos y en la síntesis enantioselectiva de ácidos carboxílicos.



**Figura 8. Modo de oligomerización de las nitrilasas.** A) Los monómeros se ensamblan entre sí a través del extremo C-terminal dando lugar a la superficie “A” (PDB 3ivz). B) Los dímeros se asocian entre sí formando la superficie “C” (PDB 3wuy). C) La superficie “D” surge cuando se ha completado un giro de la espiral y se encuentra formada por la interacción de la subunidad dimérica de un piso abajo de la espiral con otra subunidad dimérica un piso arriba (PDB 2vhi).

### Agradecimientos

El trabajo recopila los resultados obtenidos por el M. en C. Agustín Gómez Aguilar como parte de su tesis de maestría. Sergio Aguirre Sampieri es estudiante del Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, se agradece al CONACyT la beca para la

realización de estudios de posgrado. Se agradece el apoyo técnico del Dr. Fernando García Hernández de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los experimentos presentados se realizaron con donativos de la Dirección General del Personal Académico, UNAM (PAPIIT IN216413-2 y IN218318).

## Referencias

1. Barry, R. M., Bitbol, A. F., Lorestani, A., Charles, J. E., Habrian, C. H., Hansen, J. M., Li, H. J., Baldwin, E. P., Wingreen, N. S., Kollman, J. M. y Gitai, Z. (2014) *eLife* 3:e03638 doi: 10.7554/eLife.03638.
2. Ali, M. H. y Imperiali, B. (2005) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 5013–5020.
3. Hunkeler, M., Stutfeld, E., Hagmann, A., Imseng, S. y Maier, T. (2016) *Nature Communications* **7**:11196
4. Kim, C. W., Moon, Y. A., Park, S. W., Cheng, D., Kwon, H. J. y Horton, J. D. (2010) *PNAS* **107**, 9626–9631
5. Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E. y Lee, W. M. (2006) *Biochemical Society Transactions* **34**, part 2
6. Ingerson-Mahar, M., Briegel, A., Werner, J. N., Jensen, G. J. y Gitai, Z. (2010) *Nature Cell Biology* **12**, 739-746
7. Noree, C., Sato, B. K., Broyer, R. M y Wilhelm, J. E. (2010) *J. Cell Biol.* **190**, 541–551
8. Petrovska, I., Nüske, E., Munder, M. C., Kulasegaran, G., Malinowska, L., Kroschwald, S., Richter, D., Fahmy, K., Gibson, K., Verbavatz, J. M. y Alberti, S. (2014) *eLife* 3:e02409 doi: 10.7554/eLife.02409 1
9. Lu, G., Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G., y König, S. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 861-868
10. Höttl, S., Fiebig, J., Kutter, S., Hause, G., Lilie, H., Spinka, M. y König, S. (2012) *FEBS Journal* **279**, 275–284
11. Alvarez, M. E., Rosa, A. L., Temporini, E. D., Wolstenholme, A., Panzetta, G., Patrino, L. y Maccioni, H. J. F. (1993) *Gene* **130**, 253-258
12. Piotrowski, M. (2008) *Phytochemistry* **69**, 2655–2667
13. Cutler, S. R. y Somerville, C. R. (2005) *BMC Plant Biology* **5**:4, DOI:10.1186/1471-2229-5-4
14. Dickman, M., Williams, B., Li, Y., de Figueiredo, P. y Wolpert, T. (2017) *Nature Plants* **3**, 773–779
15. Doskocilová, A., Kohoutová, L., Volc, J., Kourová, H., Benada, O., Chumová, J., Plihal, O., Petrovská, B., Halada, P., Bögre, L. y Binarová, P. (2013) *New Phytologist* **198**, 685–698
16. Pace, H. C. y Brenner, C. (2001) *Genome Biology*, **2**(1):reviews0001.1–0001.9
17. Thuku, R. N., Brady, D., Benedik, M. J. y Sewell, B. T. (2009) *J. of Applied Microbiology* **106**, 703–727
18. Gong, J. S., Lu, Z. M., Li, H., Shi, J. S., Zhou, Z. M. y Xu, Z. H. (2012) *Microbial Cell Factories* **11**:142
19. Ricaño, J. (2014) *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* **5**:1, 8-25
20. Martinková, L., Rucká, L., Nesvera, J. y Pátek, M. (2017) *World J Microbiol Biotechnol* **33**:8
21. Thimann, K. y Mahadevan, S. (1964) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**, 133-141
22. Thuku R. N., Weber, B. W., Varsani, A. y Sewell, B. T. (2007) *FEBS Journal* **274**, 2099–2108
23. Yeom, S. J., Kim, H. J., Lee, J. K., Kim, D. E. y Oh, D. K. (2008) *Biochem. J.* **415**, 401–407
24. O'Reilly, C. y Turner P. D. (2003) *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1161–1174
25. Robertson, D. E., Chaplin, J. A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D. P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L. A., Tan, X., Snead, M. A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P. L., Burk, M. J. y Short, J. M. (2004) *Applied and Environmental Microbiology* **70**:4, 2429–2436
26. Podar, M., Eads, J. R. y Richardson, T. H. (2005) *BMC Evolutionary Biology* **5**:42 doi:10.1186/1471-2148-5-42
27. Seffernick, J. L., Samanta, S. K., Louie, T. M., Wackett, L. P. y Subramanian, M. (2009) *Journal of Biotechnology* **143**, 17–26
28. Martinková, L. y Kren, V. (2010) *Current Opinion in Chemical Biology* **14**:130–137
29. Sharma, N., Thakur, N., Raj, T., Savitri y Bhalla, T. C. (2017) *BioMed Research International*, Article ID 7039245, doi:10.1155/2017/7039245
30. Raczynska, J. E., Vorgias, C. E., Antranikian, G. y Rypniewski, W. (2011) *Journal of Structural Biology* **173**, 294–302
31. Zhang, L., Yin, B., Wang, C., Jiang, S., Wang, H., Yuan, Y. A. y Wei, D. (2014) *Journal of Structural Biology* **188**, 93–101
32. Williamson, D. S., Dent, K. C., Weber B. W., Varsani, A., Frederick, J., Thuku, R. N., Cameron, R. A., Heerden, J. H., Cowan D. A. y Sewell, B. T. (2010) *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:143–153
33. Fernandes, B. C. M., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., Rantwijk, F., Stolz, A. y Sheldon, R. A. (2006) *Adv. Synth. Catal.* **348**, 2597–2603
34. Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T. y Gekko, K. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 138-144
35. Stalker, D. M., Malyj, L. D. y McBride, K. E. (1988) *Journal of Biological chemistry* **263**:13 6310-6314
36. Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C. E., Boutou, E., Trauthwein, H., Verseck, S. y Antranikian, G. (2006) *Protein Expression and Purification* **47**, 672–681
37. Sewell, B. T., Berman, M. N., Meyers, P. R., Jandhyala, D. y Benedik, M. J. (2003) *Structure* **11**, 1413–1422
38. Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P. R., Sewell, B. T., Willson, R. C. y Benedik, M. J. (2003) *Applied and Environmental Microbiology* **69**:8, 4794–4805
39. Woodward, J. D., Weber, B. W., Scheffer, M. P., Benedik, M. J., Hoenger, A. y Sewell, B. T. (2008) *Journal of Structural Biology* **161** 111–119
40. Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouska, K., Pompach, P., Sulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Kren, V. y Martinková, L. (2008) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **50**, 99–106
41. Kimani, S. W., Agarkar, V. B., Cowan, D. A., Sayed, M. F.-R. y Sewell, B. T. (2007) *Acta Cryst. D* **63**, 1048–1058
42. Andrade, J., Karmali, A., Carrondo, M. A. y Frazão, C. (2007) *The Journal of Biological Chemistry* **282**:27, 19598–19605
43. Pace, H. C., Hodawadekar, S. C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganski, P., Pekarsky, Y., Croce, C. M., y Brenner, C. (2000) *Current Biology* **10**:15, 907-917
44. Crum, M. A., Park, J. M., Sewell, B. T. y Benedik, M. J. (2015) *Journal of Applied Microbiology* doi:10.1111/jam.12754
45. Gómez Aguilar, A. (2016) Tesis, Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México
46. Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Ueki, T., Nanba, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., Sato, M. y Tsukihara, T. (2000) *Structure* **8**:7 729-738
47. Lundgren, S., Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J. y Dobritzsch, D. (2008) *J. Mol. Biol.* **377**, 1544–1559
48. Marianayagam, N. J., Sunde, M. y Matthews, J. M. (2004) *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**:11, 618-625
49. Yeates, T. O. y Padilla, J. E. (2002) *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 464–470
50. Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Palec, M., Dordick, J. S. y Bustos-Jaimes, I. (2012) *Biochimie* **94**, 870-878



## **DRA. GEORGINA GARZA-RAMOS MARTÍNEZ**

Estudió Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM, obtuvo la Maestría en Ciencias en el CINVESTAV del IPN y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Llevó a cabo una estancia posdoctoral en el Center for Pharmaceutical Biotechnology and Molecular

Biology Research de la Universidad de Illinois en Chicago.

Es Profesor titular “B” de tiempo completo, en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Imparte el curso de bioquímica y biología molecular a los estudiantes de 1er año de la carrera de medicina; así como diversos tópicos en el Posgrado de Ciencias Bioquímicas.

Cuenta con 30 publicaciones y 502 citas a sus trabajos. Su área de investigación es la Físicoquímica de Proteínas y las líneas que desarrolla se enfocan al estudio de la estabilidad conformacional y térmica de proteínas; así como en el estudio cinético, estructural y del potencial biocatalítico de enzimas modificadoras de nitrilos.