



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudios estructurales sobre la proteína PyrR”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ROBERTO ALEXANDER BAHENA CERON

Tutor Principal
Dr. Alfredo Torres Larios
Instituto de Fisiología
Celular (UNAM)

Miembros del comité tutor
Dr. Enrique García
Hernández
Instituto de Química (UNAM)
Dr. Roberto Arreguín
Espinosa de los Monteros
Instituto de Química
(UNAM)



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:

En especial al Dr. Alfredo Torres Larios. Tenerme como estudiante fue una demostración de su resiliencia como asesor académico.

Al comité tutor de los estudios de mi maestría. A los Doctores Enrique García Hernández y Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros.

A los técnicos académicos que me ayudaron en todo momento. A Hugo Aníbal Santamaría Suárez, Marilú Torres Martínez y Elizabeth Nallely Cabrera González.

Agradecimientos especiales a la Dra. Adela Rodríguez Romero por ayudarnos a difractar los cristales obtenidos de la proteína PyrR en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) en el instituto de Química de la UNAM.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares, del Laboratorio de Estructura Función y Evolución de Proteínas por apoyarnos con el uso del equipo de dispersión de luz dinámica.

Al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), por permitirnos hacer uso del equipo Nanotemper.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), gracias por la beca de manutención durante mis estudios dentro del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) CB-253323 y PDCPN2014-47543.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-DGAPA) IN202416 e IN204820.

Contenido:

Introducción.....	1
PyrR es homóloga a PRTasas.....	1
Dímero	2
Tetrámero	3
Cambios oligoméricos inducidos por ligando en PRTasas y PyrR	4
Antecedentes.....	6
PyrR une en realidad a GTP, UTP y UMP en sitios distintos.....	6
Hipótesis:	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Metodología:.....	8
Transformación de células.....	8
Aislamiento por cromatografía de afinidad.....	10
Aislamiento por cromatografía hidrofóbica	10
Ensayo de desplazamiento térmico.....	10
Dispersión de luz dinámica y estática en SEC-MALS.....	12
Dispersión dinámica de luz en placa (DynaPro Plate Reader II):	12
Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento	13
Resultados y discusión	14
Nucleótidos de guanina y uridina estabilizan a la proteína PyrR.....	14
La estabilización de PyrR por UMP es dosis dependiente	15
PyrR es un dímero en solución en presencia de UMP y un tetrámero en presencia de GTP	16
Los sitios de unión de nucleótidos encontrados por cristalografía explican el cambio oligomérico en PyrR inducido por nucleótidos.....	17
Estabilización térmica de PyrR silvestre y mutantes mediada por nucleótidos	19
PyrR Δ UMP no cambia su estabilidad térmica en presencia de GMP	19
PyrR Δ UMP y PyrR Δ GTP no incrementan Tm en presencia de GTP.....	19

PyrR Δ UMP no cambia su temperatura de desnaturalización en presencia de UMP	20
- Unión de ligandos a las proteínas mutantes:	21
Búsqueda de la condición para evaluar el cambio dímero-tetrámero	23
EL tetrámero de PyrR Δ UMP es diferente al tetrámero inducido por GTP	26
Los tetrámeros inducidos por GTP en PyrR silvestre y PyrR Δ UTP son idénticos	26
Discusión	27
Conclusiones	29
Perspectivas	30
Información suplementaria:	31

Figuras:

Figura 1 Estructura del monómero de PyrR (1NON) y monómero de PRTase (1HGX).....	1
Figura 2. Interfaz dimerica de PyrR.....	2
Figura 3. Potencial electrostático de dímero de proteína PyrR en estado dimérico.....	3
Figura 4. Proteína PyrR en estado tetramérico de B. subtilis.	4
(PDB 1NON).....	4
Figura 5. Cambios sugeridos de estado oligomérico de la proteína PyrR inducidos por nucleótidos. .	4
Figura 6. Unión de GMP y UMP en la proteína PyrR.....	5
Superposición de PDB 4P83: Proteína en complejo con UMP y PDB 4P86: GMP.....	5
Figura 7. PyrR en complejo con GTP.	6
Figura 8. PyrR en complejo con UTP.	7
Esquema 1. Fundamento de técnica de desplazamiento térmico.....	11
Esquema 2. Fundamento de técnica dispersión de luz dinámica.	12
Gráfica 1. Nucleótidos de guanina y uridina estabilizan a la proteína PyrR.	15
Gráfica 2. La estabilización de PyrR por UMP es dosis dependiente.....	15
Figura 9. PyrR sin ligandos añadidos es un tetrámero.....	16
Gráfica 3. La influencia de UMP y UTP sobre el estado de oligomerización de la proteína PyrR.....	17
figura 10. Mutaciones realizadas a la proteína PyrR.....	18
Gráfica 4. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PYRR SILVESTRE y mutantes en presencia de GMP.	19
Gráfica 5. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PyrR en complejo con GTP.	20
Gráfica 6. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PyrR silvestre y mutantes en complejo con UMP.....	20
Gráfica 8. UMP no induce dimerización en las mutantes Δ UMP y Δ UTP.	22
Gráfica 9. GTP no induce tetramero en PyrR Δ GTP.	22
Figura 11. PyrR en cloruro de sodio 100 mM más acetato de sodio 100 mM pH 4.2 sin ligandos añadidos es dímero.....	23
Gráfica 10. GTP no induce el tetrámero en PyrR Δ GTP.	24
Figura 12. Modelo de PyrR Δ UMP.	25

Figura 13. Representación de monómeros de PyrR silvestre y PyrRΔUMP.....	25
Figura 14. Sobreposición de tetrameros PyrR en complejo con GTP.....	26
Figura 15. PyrRΔUTP en complejo con GTP es un tetramero.	27

Resumen

La proteína PyrR es el regulador transcripcional del operón de la biosíntesis de las pirimidinas, la cual ejerce su acción represora mediante su unión a una molécula específica de mRNA. La unión al mRNA está determinada por el estado oligomérico de la proteína en un equilibrio dímero-tetrámero, mismo que depende de la interacción que tenga PyrR con nucleótidos de guanina y uridina, los cuales se pensaba compartían el mismo sitio de unión en la proteína. Habiéndose determinado en el laboratorio de adscripción, por medio de cristalografía de rayos X, que existe un sitio de unión a UMP y dos sitios independientes de unión de GTP y UTP que correlacionan con la existencia de un tetrámero y un dímero respectivamente, en este trabajo se investigó, a través de experimentos de dispersión de luz, desplazamiento térmico y cristalografía de rayos X: 1) conocer el comportamiento de la proteína en solución a través del cambio de estado oligomérico mediado por nucleótidos; 2) Evaluar los sitios de unión de estos ligandos por medio de mutagénesis sitio dirigida, y 3) Determinar si hay comunicación entre los sitios de unión de los ligandos por medio de cambios conformacionales. Se observó que: 1) PyrR interacciona en solución con nucleótidos de guanina y uridina; 2) La dimerización inducida por UTP requiere la presencia de UMP en el sitio catalítico; 3) La tetramerización inducida por GTP es independiente de los sitios de unión a UMP y UTP; 4) la dimerización inducida por UTP se ve afectada por mutaciones en el sitio de unión de GTP.

Introducción

El operón de pirimidinas en algunas bacterias se regula a través de la proteína PyrR

La atenuación de la transcripción es una de las formas por las cuales se puede regular la expresión genética en un amplio número bacterias (Henkin & Yanofsky, 2002). Este mecanismo depende de la estructura secundaria que se forme en el mRNA (Switzer *et al.*, 1998) y de la interacción con proteínas que permitan la formación de la estructura de terminación o antiterminación de la transcripción (Switzer *et al.*, 1998). El operón de las pirimidinas (*pyr*) se regula por este mecanismo, siendo la proteína PyrR un represor de la transcripción de los genes para la síntesis de enzimas necesarias para la producción de nucleótidos de uridina (Turner *et al.*, 1994).

PyrR es homóloga a PRTasas

Se han resuelto las estructuras cristalográficas de la proteína PyrR de los siguientes microorganismos como: *Bacillus subtilis* (1A4X), *Bacillus caldolicus* (1NON), *Mycobacterium tuberculosis* (1W30), etc. El monómero de PyrR tiene una arquitectura similar a otras proteínas pertenecientes al grupo de las fosforribosil transferasas (PRTasas) del grupo I (Figura 1), las cuales catalizan la reacción de conversión de uracilo y 5-fosforribosil-pirofosfato (PRPP) a uridina monofosfato (UMP) y difosfato (Tomchick *et al.*, 1998). (Sinha & Smith, 2001).

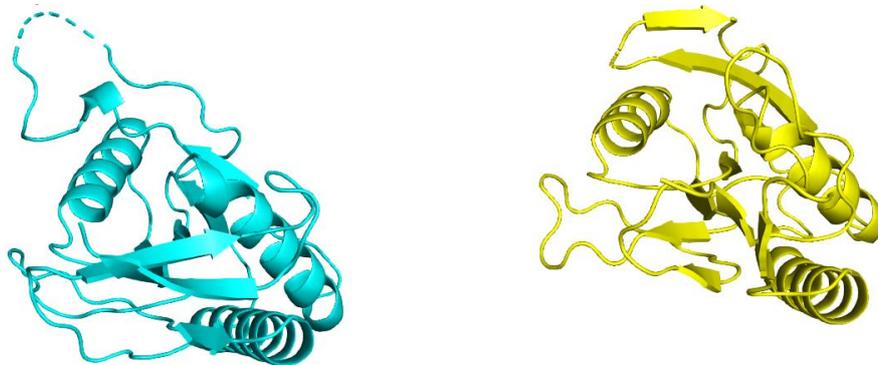


Figura 1 Estructura del monómero de PyrR (1NON) y monómero de PRTase (1HGX).

PyrR muestra mayor actividad catalítica de fosforribosil transferasa a pH 7.7. La K_m para el uracilo es $990 \pm 144 \mu\text{M}$ (Turner *et al.*, 1998). La baja actividad catalítica de PyrR como PRTasa se debe a que el sitio de unión del sustrato se encuentra más expuesto, y a que la cavidad del sitio activo carece de residuos hidrofóbicos necesarios para estabilizar la unión del uracilo y llevar a cabo la catálisis (Kantardjieff *et al.*, 2005).

Las estructuras tridimensionales de PyrR determinadas por cristalografía de rayos X muestran una diversidad de estructuras cuaternarias:

Dímero:

La forma dimérica de PyrR tiene una disposición espacial de disco aplanado, con dimensiones máximas de $73 \times 49 \times 34 \text{ \AA}$. El sitio de actividad PRTasa de cada monómero están separados entre sí por 30 \AA . La dimerización se lleva a cabo por la interacción de la hélice alfa 3, la hebra beta 6 y el asa entre las hebras beta 6 y 7 (Figura 2).

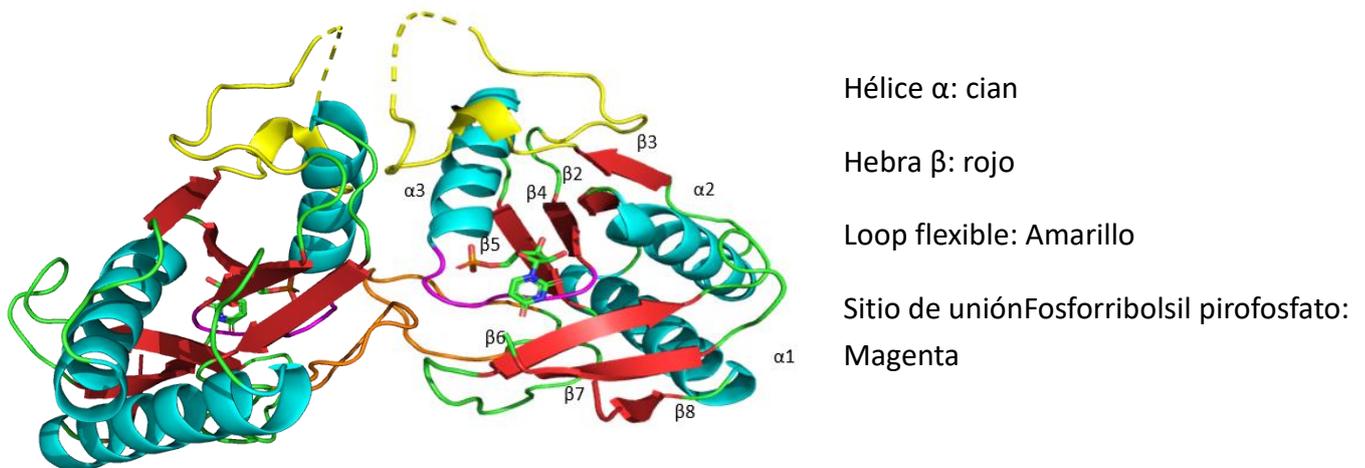


Figura 2. Interfaz dimerica de PyrR.

La intercara dimérica entre los monómeros de PyrR es diferente a las que se observan en las UPRTasas. Además, la región exterior del dímero posee un potencial electrostático que facilitaría la unión al RNAm. Por su parte, el tetrámero oculta la cara de interacción con ácidos ribonucleicos. (Kantardjieff *et al.*, 2005) (Figura 3).

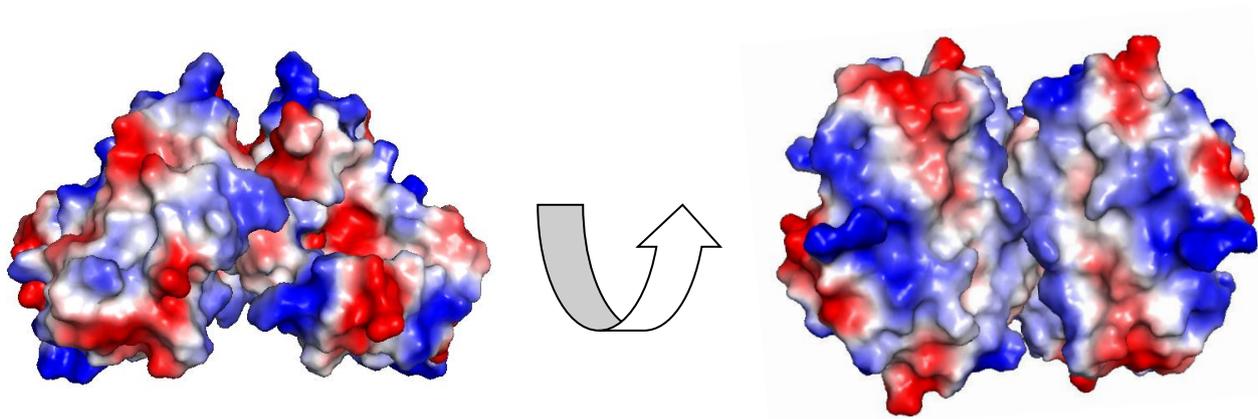


Figura 3. Potencial electrostático de dímero de proteína PyrR en estado dimérico.

Mutaciones sitio dirigidas de PyrR en *B. subtilis* en los residuos de aminoácidos de la superficie básica cóncava han demostrado que son necesarios para la unión al RNA, Arg 19, His 22 y Arg 141, y para la regulación del operón *pyr* (Savacool & Switzer, 2002), mientras que la región opuesta posee carga negativa o neutra (Chander *et al.*, 2005).

Tetrámero:

La estructura tetramérica de PyrR fue resuelta en *B. caldolyticus* (Perica, 2019). La conformación del tetrámero está dada por la interacción de dos homodímeros. La forma tetramérica de PyrR es idéntica a la de *M. tuberculosis* y posee una gran similitud con su homólogo *T. thermophilus* (Chander *et al.*, 2005) (Figura 4). Se cree que la formación del tetrámero se debe a una rotación inducida por la unión de GMP a la proteína PyrR que provoca una interacción adecuada de dos dímeros, induciendo un cambio conformacional en los monómeros, los cuales se orientan hacia la interfase formada por las hélices $\alpha 3$ (Perica *et al.*, 2014).

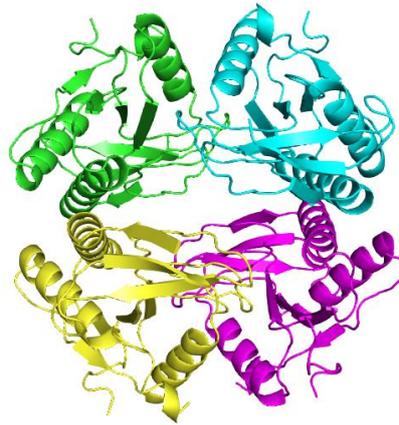


Figura 4. Proteína PyrR en estado tetramérico de *B. subtilis*.

(PDB 1NON)

Cambios oligoméricos inducidos por ligando en PRTasas y PyrR

El GTP favorece las estructuras tetraméricas en las fosforribosil transferasas. En presencia de GTP la proteína pasa de la forma de dímero a la de tetrámero. Además, la influencia de GTP no sólo se limita al cambio de estado oligomérico de las PRTasa, sino que también disminuye la K_d de la proteína por su ligando, la fosforribosa pirofosfato. Además, la enzima fosforribosil transferasa incrementa la afinidad por GTP cuando se encuentra fosforribosil pirofosfato en el medio, lo cual sugiere que el GTP ejerce un rol regulatorio en la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis de purinas y pirimidinas, las cuales son proteínas homólogas a PyrR (Schumacher *et al.*, 2002). Caso contrario sucede con la influencia de UMP y UTP, ya que se sugiere que en PyrR la unión de estos nucleótidos estimula el estado oligomérico que interactúa con RNA, el dímero (Jørgensen *et al.*, 2008) (Figura 5).

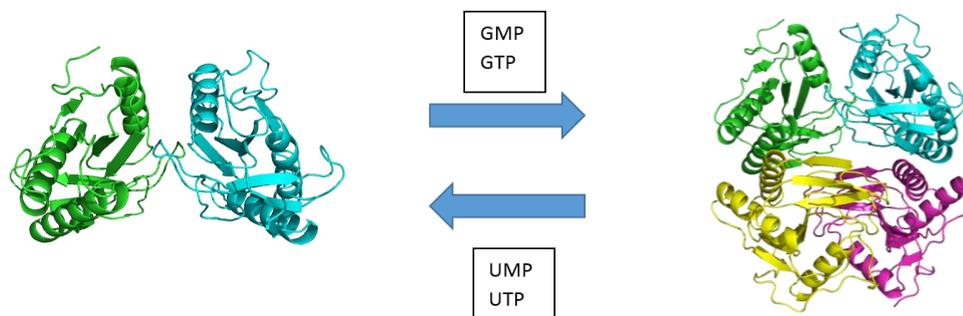


Figura 5. Cambios sugeridos de estado oligomérico de la proteína PyrR inducidos por nucleótidos.

PyrR une GMP y UMP en el mismo sitio, entonces ¿cómo podrían ejercer efectos tan dispares en la oligomerización?

La unión de UMP a PyrR se lleva a cabo por la interacción del fosfato 5' con la cavidad formada por los residuos Thr 109, Gly 110, Arg 111 y Thr 112. La ribosa por su parte se une a la región conservada fosforribosil transferasa, que va del residuo 100 al 112, y la base nitrogenada interacciona por puentes de hidrógeno con el dominio tapa (Chander *et al.*, 2005).

La unión de GMP y de UMP se ha descrito como idéntica (Figura 6) a pesar de que cada metabolito tiene un efecto diferente sobre la proteína PyrR. Específicamente, el N1 y el O6 de la guanina y el N3 y el O4 del uracilo se unen a los mismos residuos de la proteína, la Ile 161 y la Arg 137. No existen cambios conformacionales de ningún tipo en las estructuras con GMP y UMP unido, lo que representa el punto más intrigante hasta el momento acerca del funcionamiento de este sistema.

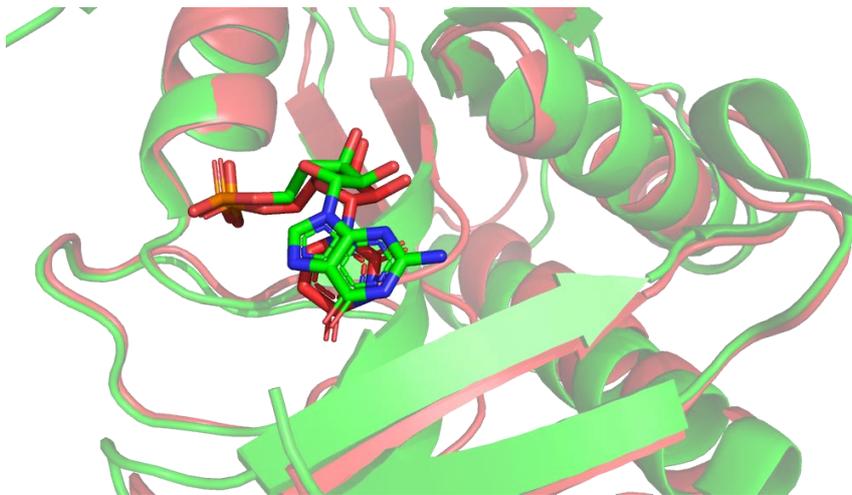


Figura 6. Unión de GMP y UMP en la proteína PyrR.

Superposición de PDB 4P83: Proteína en complejo con UMP y PDB 4P86: GMP

Antecedentes

PyrR une en realidad a GTP, UTP y UMP en sitios distintos

En nuestro grupo de trabajo se hallaron, por medio de cristalografía de rayos X, dos sitios donde los nucleótidos trifosfatados pueden unirse a PyrR de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (datos por publicar). El sitio de unión a GTP involucra los residuos His 136, Arg 154 y Asp 156 (Figura 7).

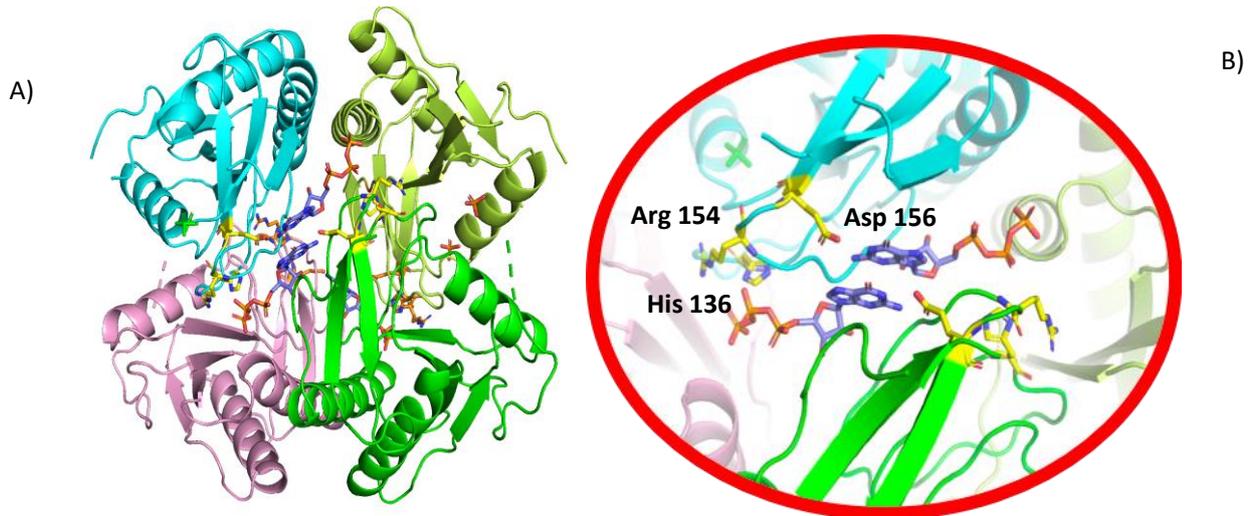


Figura 7. PyrR en complejo con GTP.

Panel A. Tetrámero de PyrR inducido por GTP. Panel B. Acercamiento al sitio de reconocimiento del nucleótido.

Por su parte, el sitio de unión de UTP se encuentra muy cerca del sitio catalítico, donde siempre se encuentra una molécula de UMP, acomodándose de forma que el anillo de la pirimidina del nucleótido trifosfatado sirve para la unión de dos monómeros de PyrR. Los residuos que interactúan con el UTP son Asp 73, Asp 74 y Arg 123. El residuo que funge como puente entre los dos monómeros es la Arg 123. Por su parte, el UMP que se encuentra en el sitio catalítico pareciera fungir como andamio para la unión de UTP y la posterior dimerización (Figura 8).

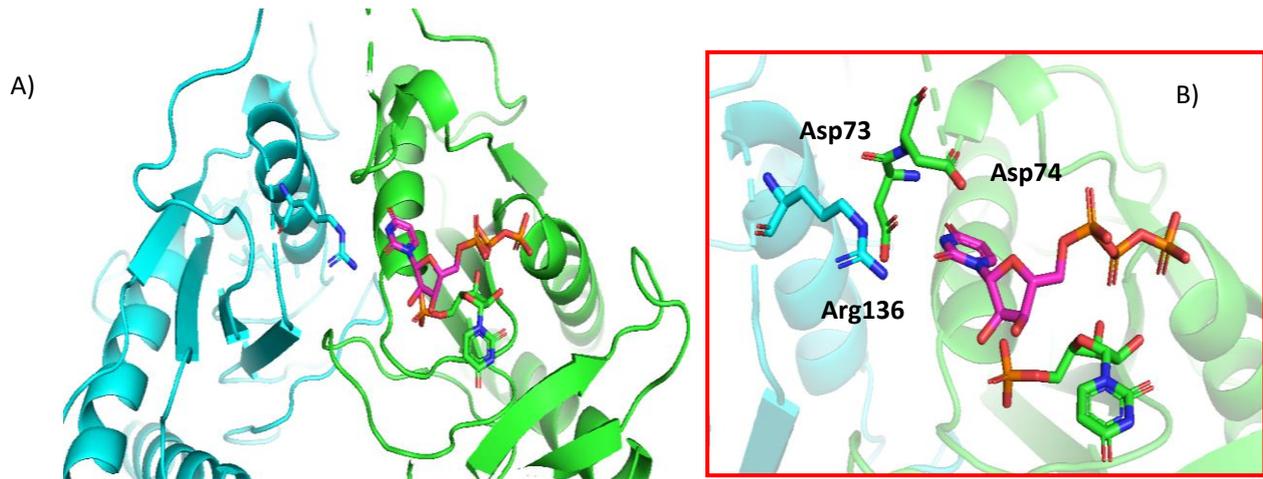


Figura 8. PyR en complejo con UTP.

Panel A. Dímero de PyR inducido por UTP. Panel B. Acercamiento al sitio de reconocimiento del nucleótido.

Con base en los estudios descritos, se propone realizar experimentos para elucidar la influencia de los nucleótidos de guanina y uridina sobre el estado oligomérico de PyR en solución y corroborar los sitios de unión de nucleótidos trifosfatados por medio de mutaciones sitio-dirigidas.

Hipótesis:

- En solución, PyR forma un tetrámero en presencia de GTP y un dímero en presencia de UTP y UMP.

Objetivo general: Elucidar experimentalmente la influencia de GTP, UMP y UTP en el estado oligomérico de PyR y en sus mutantes en solución.

Objetivos específicos:

- Producir plásmido de DNA recombinante para obtener la proteína PyR de *T. tengcongensis* y sus respectivas mutantes: PyR Δ UMP, PyR Δ UTP y PyR Δ GTP para la validación de los sitios de unión de nucleótido.
- Transformar bacterias competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS para internalizar el vector.
- Cultivar bacterias para producción de proteína recombinante PyR.

- Purificar la proteína PyrR
- Realizar ensayos de desplazamiento térmico de las proteínas PyrR para conocer condiciones de estabilidad.
- Observar el efecto de la unión de nucleótidos sobre el tamaño de PyrR por dispersión dinámica de luz.
- Obtener la estructura cristalográfica de alguna(s) mutantes de PyrR.

Metodología:

Transformación de células:

Se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS con el plásmido que codifica para la proteína PyrR de la bacteria *T. tengcongensis*.

Metodología:

- Se descongelaron las células competentes *Escherichia coli* BL21(DE3)-pLysS.
- De cada plásmido se tomó 1 microlitro con concentración de 206 nanogramos/microlitro y se mezcló con 100 microlitros de KCM (500 mM de KCL, 150 mM de CaCl₂ y 250 mM de MgCl₂) frío.
- A la mezcla se le agregó el mismo volumen de células competentes que de KCM.
- La mezcla se agitó con cuidado y se mantuvo en hielo durante 15 minutos.
- Posteriormente, la mezcla se sometió a choque térmico durante dos minutos a 42 grados Celsius.
- Después del choque térmico a la mezcla se le añadieron 500 microlitros de medio SOC (2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa).
- El tubo con medio SOC y mezcla se puso a incubar a 37 grados Celsius en agitación (250 rpm) durante una hora.

- Se preparó una alícuota de las células, tomando 90 microlitros de medio LB y 10 microlitros de células.
- Se sembró en cajas Petri y se alojó en la incubadora a 37° durante toda la noche.
- Al día siguiente se observó la caja y se tomó una colonia, la cual se pasó a un tubo con 10 ml de medio LB con antibióticos en proporción 1:1000 kanamicina (35 mg/ml) y cloranfenicol 1:1000 (100 mg/ml).
- Este tubo se dejó en crecimiento nocturno.

Cultivos de bacterias e inducción de expresión de proteína PyrR:

- Alícuotas de 5 ml de crecimiento nocturno se depositaron en matraces con 500 ml de medio LB con antibióticos kanamicina (35 mg/ml) y cloranfenicol (100 mg/ml), ambos en proporción 1:1000. Estos matraces fueron puestos en incubación, a 37 grados Celsius con agitación (250 rpm), hasta que se alcanzó una OD de 0.5.
- Una vez que se alcanzó la OD deseada se agregó al matraz IPTG. Se agregaron 500 microlitros de IPTG de concentración de 1 M para que se alcanzara una concentración final de 1 mM. Los matraces se volvieron a incubar durante 3 horas a 37 grados Celsius y 250 rpm de agitación.
- Una vez que se cumplieron las 3 horas de agitación se centrifugó el contenido de los matraces a 6500 rpm en el rotor JA-10 de Beckman durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se conservó el precipitado de bacterias.
- A cada precipitado se le añadieron 25 ml de amortiguador de lisis (50 mM de NaH_2PO_4 + 300 mM KCl + 10 mM imidazol) y se resuspendió el precipitado.
- Se pasó el precipitado resuspendido al vaso metálico en el cual se sonicó.
- Se programó el sonicador 5 min con pulsos de 30 s encendido y 30 s apagado y una amplitud de 40%. Este proceso se realizó 2 veces.
- Una vez que se sonicó la muestra se vertió sobre tubos de plástico y se centrifugó a 13000 rpm en el rotor JA-25.5 de Beckman durante 30 minutos.

Una vez que terminó el tiempo de centrifugación conservamos el sobrenadante el cual se sometió a proceso de purificación.

Aislamiento por cromatografía de afinidad.

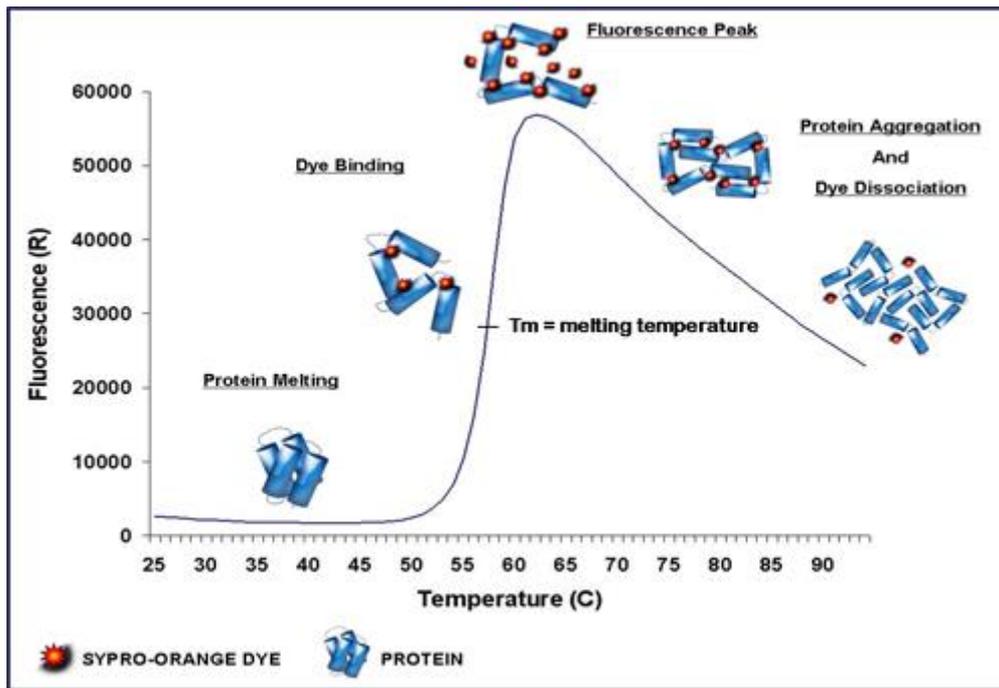
- El aislamiento por cromatografía con resina con níquel se basa en la unión de los residuos de histidina, añadidos a la proteína desde el diseño del plásmido, con los componentes de la columna, específicamente el níquel (columna HisTrap GE Healthcare de 5 ml). Cuando la proteína pasa por la columna se une al metal, mientras que las demás proteínas pasan por la columna. Para que la proteína salga del sistema se necesita imidazol, mismo que se une al níquel y desplaza a la proteína para que esta se desplace por la columna.

Aislamiento por cromatografía hidrofóbica:

En este procedimiento se busca que la proteína tenga una exposición relativa de sus regiones hidrofóbicas gracias a una acción de “salting out” mediante sulfato de amonio. Las regiones hidrofóbicas expuestas se unen a la resina que se encuentra en la columna. Para la elución de la proteína se alimenta el sistema con un amortiguador sin sulfato de amonio y así pueda desprenderse de la resina.

Ensayo de desplazamiento térmico:

El desplazamiento térmico se basa en la detección de fluorescencia producida por las interacciones de un colorante con los residuos hidrofóbicos expuestos de la proteína debido a la desnaturalización mediada por el incremento de temperatura. Esta metodología nos brinda información sobre las condiciones y compuestos con los cuales la proteína alcanza una mayor estabilidad, misma que se refleja en el aumento en la temperatura de desnaturalización (Esquema 1).



Esquema 1. Fundamento de técnica de desplazamiento térmico.

El experimento se lleva a cabo en una placa de 96 pozos especial para desplazamiento térmico (Applied Biosystems; I2675).

La mezcla que va dentro de cada pozo está compuesta por:

- 9 microlitros de amortiguador en el que se analizará la proteína.
- 1 microlitro de proteína a 2 mg/ml
- 0.6 microlitros de colorante SYPRO Orange

La placa con la mezcla se cubrió con una película de plástico de la marca Greiner VIEWseal (CTP-102)

Antes de hacer el ensayo la placa se agitó con vortex y se centrifugó por pulso hasta 1000 rpm con el rotor SX4750 en la centrifuga Allegra X-12B.

En el equipo Step One Plus (Thermo Fisher) se realizó el análisis por desplazamiento térmico en 40 minutos, con incremento de temperatura constante de 1% a partir de 25 grados Celsius hasta alcanzar 99 grados Celsius.

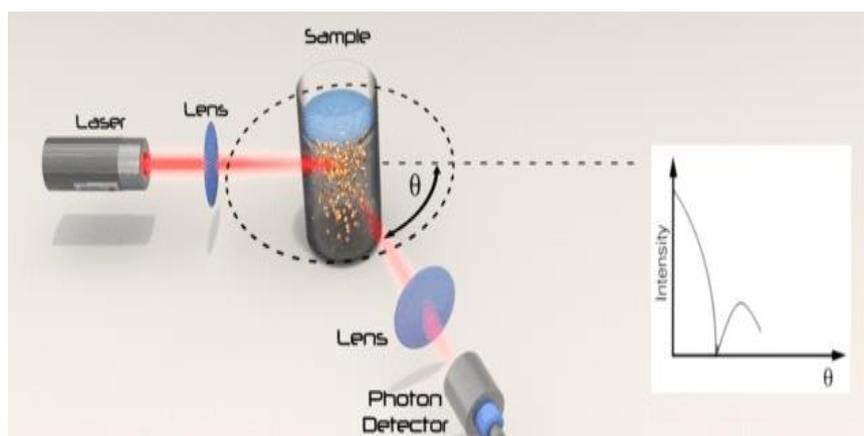
Dispersión de luz dinámica y estática en SEC-MALS:

La técnica se realizó en equipo SEC-MALS (WYATT; Dawn, Trex) para esto, se dejó toda la noche equilibrando la columna con el amortiguador que se quiera realizar la elución. En este caso fue con cacodilato 100 mM pH 6 más NaCl 100 mM (para el tetrámero) y acetato de sodio 100 mM pH 4.2 (para el dímero)

La cantidad máxima en volumen que se debe inyectar, para una columna Superdex 200 (GE Healthcare) es de 300 microlitros tomados de una alícuota cuya concentración era 20 mg/ml de proteína.

Dispersión dinámica de luz en placa (DynaPro Plate Reader II):

El fundamento del experimento de dispersión dinámica de luz se basa en la caracterización del coeficiente de difusión de una molécula que se encuentra en solución. Este coeficiente de difusión está relacionado con la facilidad con la cual una partícula atraviesa por difusión una membrana de 1 cm^2 . Este experimento nos arroja datos relacionados con el tamaño de una partícula, pues las moléculas más pequeñas difunden más rápido que las moléculas más grandes. Estos resultados se obtienen a partir de la correlación que existe entre la variación de la intensidad de la luz dispersa y el tiempo de la fluctuación de la misma (Esquema 2).



Esquema 2. Fundamento de técnica dispersión de luz dinámica.

El ensayo se realizó en placa negra de 384 pozos (Corning, ref 3540).

La mezcla de reacción que se añadió en cada pozo fue de 30 microlitros.

La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente:

3 microlitros de PyrR a 2 100 μ M.

3 microlitros de nucleótidos, GTP, UTP y UMP, todos a una concentración de 10 mM.

24 microlitros de solución amortiguadora de análisis (descrita en tablas de resultados)

La placa de 384 pozos se centrifugó durante 45s.

El análisis se realiza en equipo de dispersión dinámica de luz (WYATT)

Cristalización:

La técnica de cristalización que se utilizó fue de difusión de vapor en gota sentada. Los pasos fueron los siguientes:

La proteína se concentró a 20 mg/ml, en amortiguador de fosfato de sodio monobásico 20 mM pH 8 y 300 mM KCl, en tubos amicon ultra con tamiz de 30 kDa.

Las placas para cristalografía que se utilizaron fueron de difusión de vapor de gota sentada de 96 pozos.

En el experimento se colocó una gota de 1 μ l de proteína a 20 mg/ml y 1 μ l de solución madre. Después de llenados los pozos, se selló la placa con la película (HR3-609, Crystal Clear Sealing Film). Las placas fueron resguardadas en una habitación a 20 °C.

Los cristales crecieron en una semana. Previo al sobre enfriamiento en nitrógeno líquido, los cristales se sumergieron por 1 min en una solución crio protectora que contenía 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) al 35%.

Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento

Los experimentos de difracción de rayos X arrojaron como resultado dos juegos de datos, uno correspondiente para PyrR Δ UMP y otro para PyrR Δ UTP más GTP. Ambos datos se procesaron, por separado, con el programa iMosfl, con el

cual se llevó a cabo la indexación e integración de los datos. Para el proceso de escalado y selección de imágenes se utilizó el programa Aimless. Ambos programas se encuentran dentro de la suite CCP4.

Las estructuras PyrR Δ UMP y PyrR Δ UTP en complejo con GTP se determinaron por el método de reemplazo molecular con el uso del programa PHASERMR de CCP4. El modelo estructural de PyrR que se usó como modelo de búsqueda fue el de *B. subtilis* con código PDB 1NON. Los modelos iniciales se inspeccionaron de forma manual con el programa Coot y el afinamiento del modelo se realizó con el programa PHENIX.

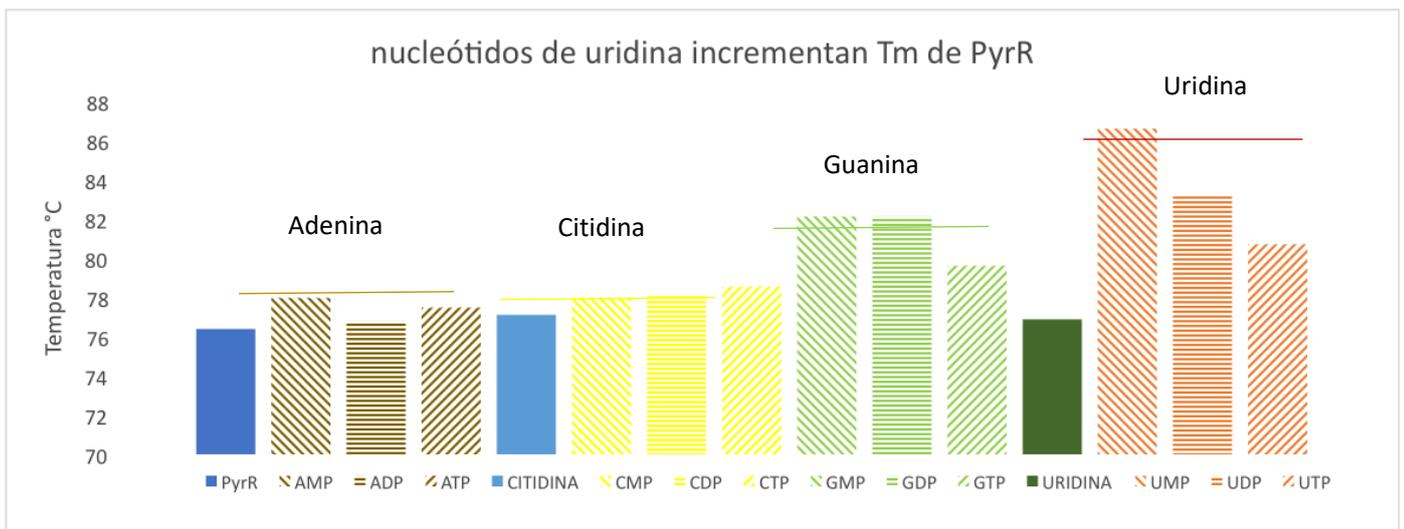
Producción de mutantes:

Para la producción de las proteínas mutantes se realizó un análisis de secuencia en el cual se buscó identificar los residuos conservados que interaccionan con los ligandos. Posterior a la identificación de los residuos, se seleccionaron las siguientes mutantes: Mutante Δ GTP: H136A, E136A; Mutante Δ UTP: D74A, D75, R124A; Mutante Δ UMP: D103A, D104A, T108A, T11A, R136A. Los genes se mandaron sintetizar a la compañía ATUM (las construcciones se anexan en material suplementario).

Resultados y discusión

Nucleótidos de guanina y uridina estabilizan a la proteína PyrR

De acuerdo con los resultados mostrados en la gráfica 2, se analizó la influencia de diversos nucleótidos sobre la proteína PyrR utilizando el kit de nucleótidos de Sigma (K10025A-1KT). El experimento se realizó con la proteína PyrR a 10 μ M en solución amortiguadora de 100 mM de cacodilato de sodio pH 6 más 100 mM de NaCl y los nucleótidos en un exceso de 10 mM. Tanto nucleótidos de guanina como de uridina estabilizan a PyrR, siendo estos últimos los que promueven un mayor desplazamiento de la Tm. De manera notable, la uridina por sí misma no promueve el incremento de la Tm, lo que indica la necesidad de un grupo fosfato para la estabilización de la proteína.

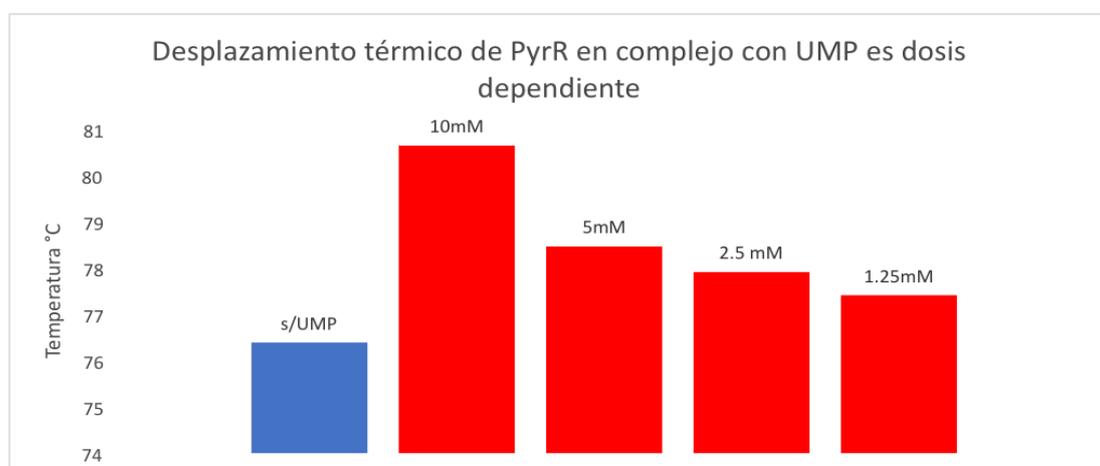


Gráfica 1. Nucleótidos de guanina y uridina estabilizan a la proteína PyrR.

La Tm de PyrR incrementa en particular con GMP y UMP, siendo el último el que produce el mayor incremento.

La estabilización de PyrR por UMP es dosis dependiente

De acuerdo con lo mostrados en la gráfica 2, se monitoreó enseguida la influencia del UMP, ya que fue el nucleótido que más incrementó la Tm de PyrR. El experimento se realizó con la proteína PyrR a 10 μ M en solución amortiguadora de 100 mM de cacodilato de sodio pH 6 más 100 mM de NaCl y se añadieron las siguientes cantidades de UMP: 10 mM, 5 mM, 2.5 mM y 1.25 mM. Se observó un incremento en la Tm que es dosis dependiente y a partir de la concentración más baja utilizada, cercana a 1 mM.



Gráfica 2. La estabilización de PyrR por UMP es dosis dependiente.

En el experimento se observó una estabilización dosis-dependiente de PyrR en complejo con UMP.

PyrR es un dímero en solución en presencia de UMP y un tetrámero en presencia de GTP

Con objeto de conocer la influencia en la oligomerización de los nucleótidos que estabilizan la Tm de la PyrR, realizamos una serie de ensayos en solución utilizando técnicas de dispersión de luz. En primera instancia realizamos ensayos de SEC-MALS (Size Exclusion Multi-Angle Light Scattering) sobre la proteína sin ligandos añadidos, la cual tiene una composición tetramérica (80 kDa) y un tamaño de 4.1 nm a pH 6 (Figura 10)

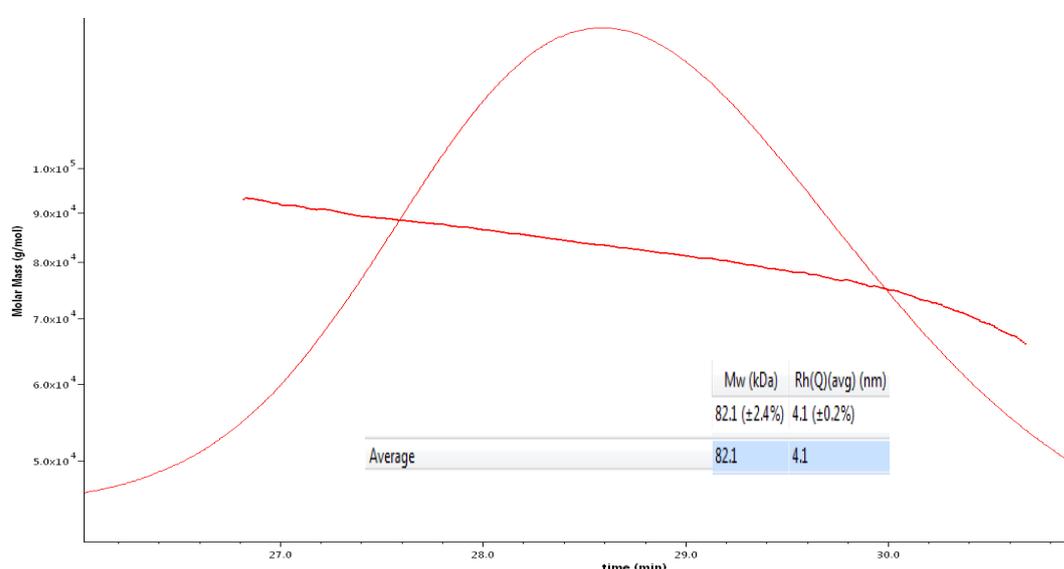
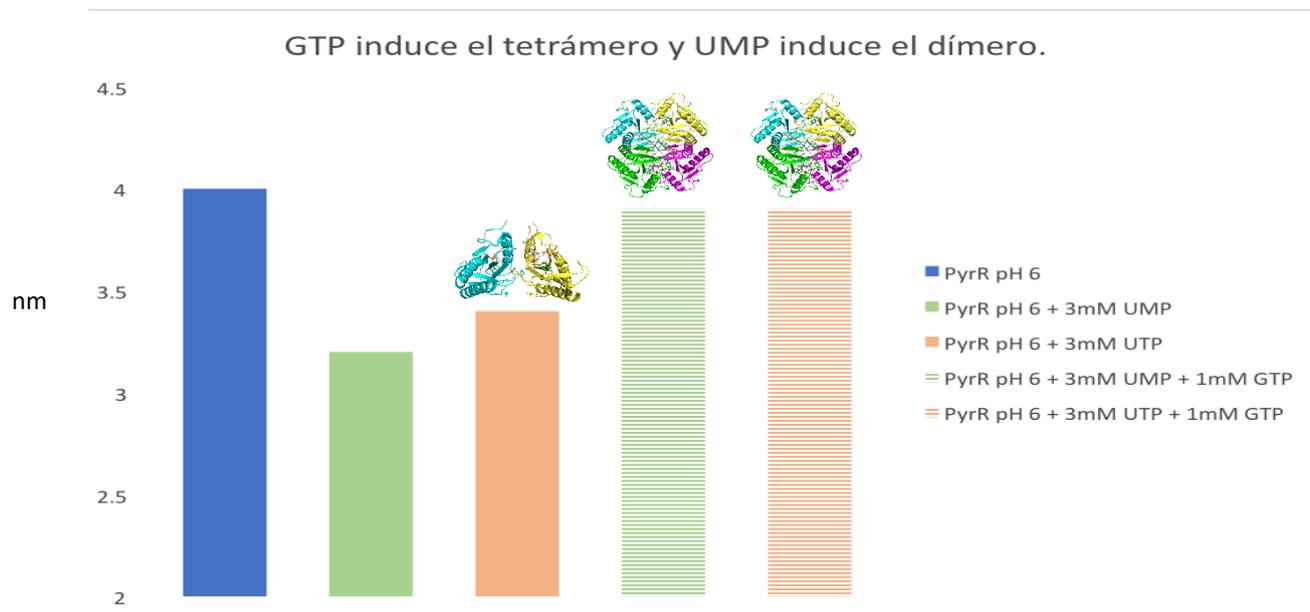


Figura 9. PyrR sin ligandos añadidos es un tetrámero.

Perfil de SEC-MALS de PyrR la cual tiene una masa y un tamaño que corresponde a un tetrámero (el monómero tiene una masa aproximada de 20 kDa) de 82.1 kDa y un radio de giro de 4.1 nm.

Por limitaciones en la cantidad de nucleótidos disponibles, procedimos a realizar ensayos de dispersión de luz dinámica (DLS) en placas de 384 pozos (ver Métodos), los cuales permiten analizar las muestras utilizando volúmenes y cantidades muy pequeñas en comparación con el análisis por SEC-MALS. Posteriormente se realizaron experimentos para observar la influencia de los nucleótidos GTP, UTP y UMP en el tamaño de partícula de PyrR. La

concentración de los nucleótidos fue de 3 mM para los nucleótidos de uridina y de 1 mM para GTP (gráfica 3).



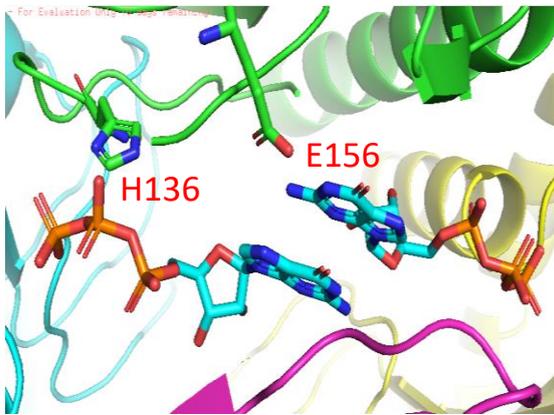
Gráfica 3. La influencia de UMP y UTP sobre el estado de oligomerización de la proteína PyrR.

Se observó una disminución del tamaño de partícula de PyrR en respuesta a nucleótidos pirimídicos y púricos. Experimentos realizados por DLS. UMP (verde) y UTP (naranja) provocan en la proteína el cambio de estado oligomérico de tetrámero (4.1 nm) a dímero (3.2 nm) en solución. Por su parte, el GTP puede revertir esta disminución del tamaño de partícula, devolviendo a PyrR a un tamaño de tetrámero (3.8 nm).

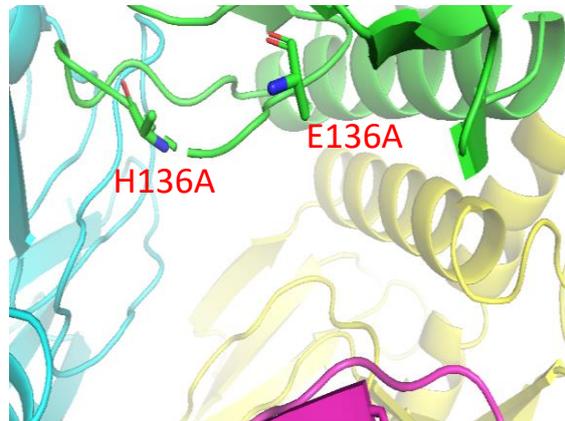
Los sitios de unión de nucleótidos encontrados por cristalografía explican el cambio oligomérico en PyrR inducido por nucleótidos

De acuerdo con el análisis de los sitios de unión encontrados por cristalografía, se identificaron y seleccionaron residuos específicos, los cuales fueron mutados con objeto de comprobar si éstos están relacionados con el cambio oligomérico. Dichas mutantes se describen a continuación:

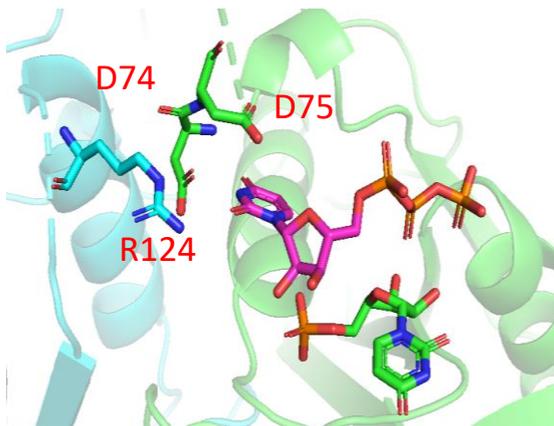
PyrR silvestre



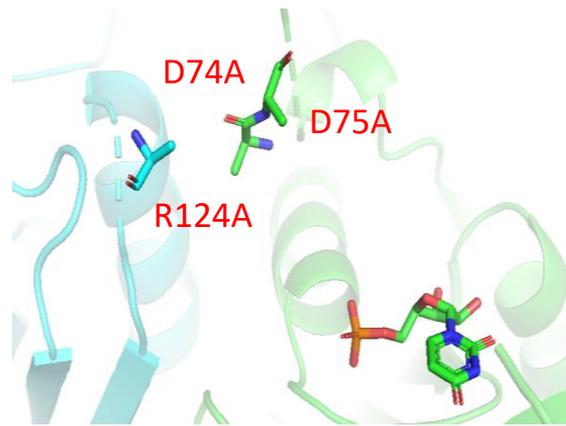
Mutante Δ GTP
H136A, E136A.



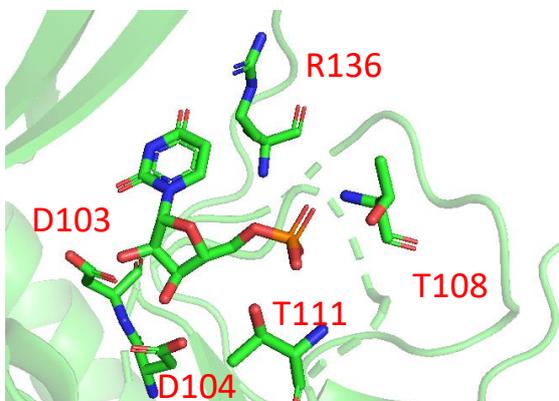
PyrR silvestre



Mutante Δ UTP
D74A, D75, R124A



PyrR silvestre



Mutante Δ UMP
D103A, D104A, T108A, T111A, R136A

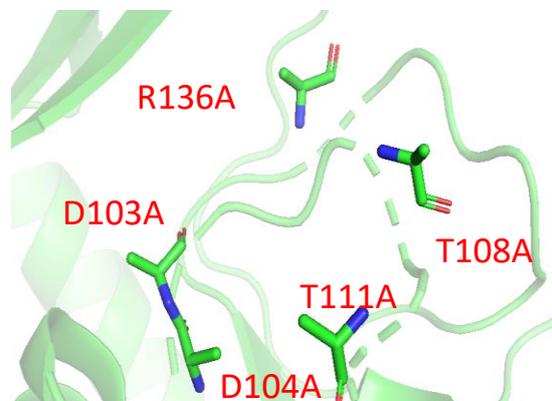


figura 10. Mutaciones realizadas a la proteína PyrR.

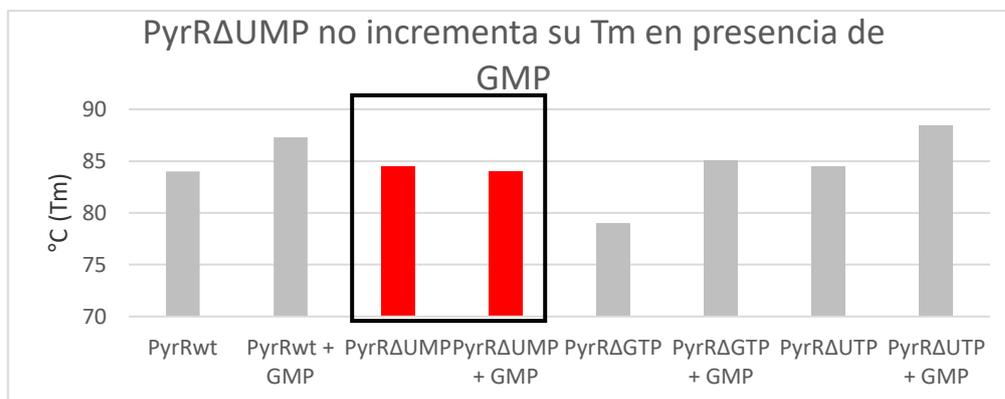
Izquierda. Representación de PyrR silvestre interactuando con los nucleótidos y en representación de barra los residuos que seleccionamos para mutar. Derecha. Representación de las mutantes de PyrR Δ GTP, Δ UTP y Δ UMP con representación de barra en los residuos mutados por alaninas.

Estabilización térmica de PyrR silvestre y mutantes mediada por nucleótidos

Con la intención de conocer cuál era el comportamiento de PyrR y sus mutantes cuando interaccionaban con los nucleótidos que inducen los cambios oligoméricos, se realizaron experimentos de desplazamiento térmico.

PyrR Δ UMP no cambia su estabilidad térmica en presencia de GMP

La T_m de PyrR Δ UMP fue la única que no sufrió cambios a pesar de estar en presencia de GMP.

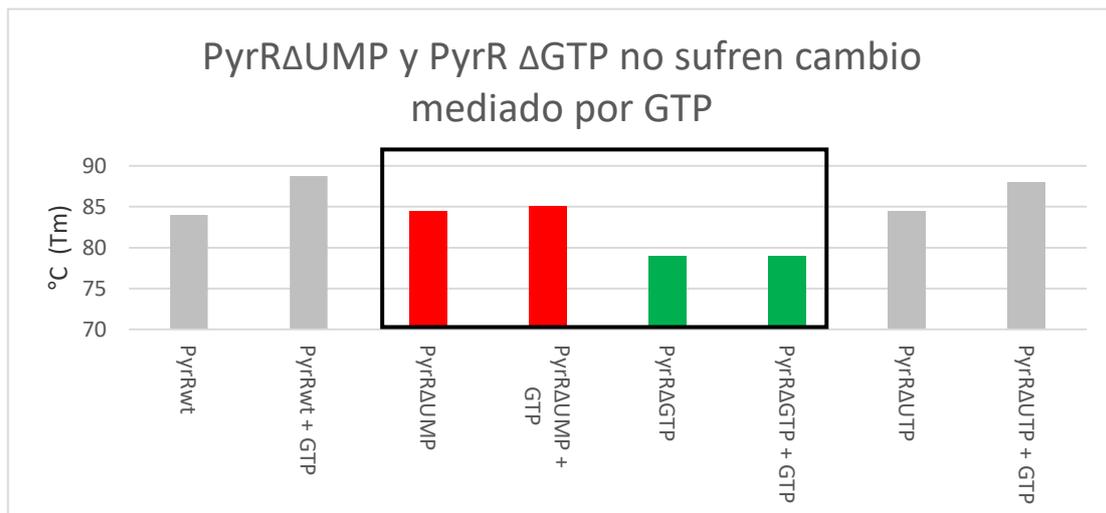


Gráfica 4. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PYRR SILVESTRE y mutantes en presencia de GMP.

La T_m de PyrR Δ UMP (rojo) no se incrementó mientras que las PyrR silvestre y las mutantes Δ UTP y Δ GTP se estabilizaron cuando interaccionaron con GMP.

PyrR Δ UMP y PyrR Δ GTP no incrementan T_m en presencia de GTP

La T_m de PyrR Δ GTP no se modificó cuando la proteína estuvo en presencia de GTP, misma situación que se observó en la mutante PyrR Δ UMP. Por su parte, PyrR silvestre y PyrR Δ UTP sí se estabilizaron al estar en un medio con GTP.

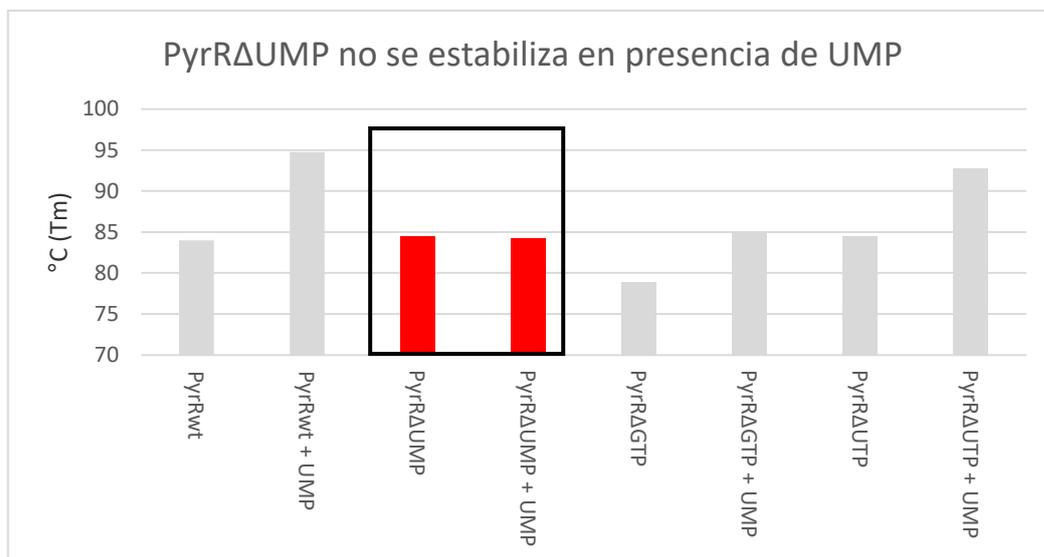


Gráfica 5. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PyrR en complejo con GTP.

PyrR ΔGTP (verde) y PyrR ΔUMP (rojo) no incrementan su Tm al estar en un medio con GTP. Por su parte, PyrR silvestre y la mutante ΔUTP se estabilizaron cuando en el medio se incluye GTP.

PyrR ΔUMP no cambia su temperatura de desnaturalización en presencia de UMP

PyrR ΔUMP fue la única proteína que no se estabilizó cuando se incluyó UMP en el medio. Las proteínas silvestres, ΔUTP y ΔGTP sí se estabilizaron con UMP.

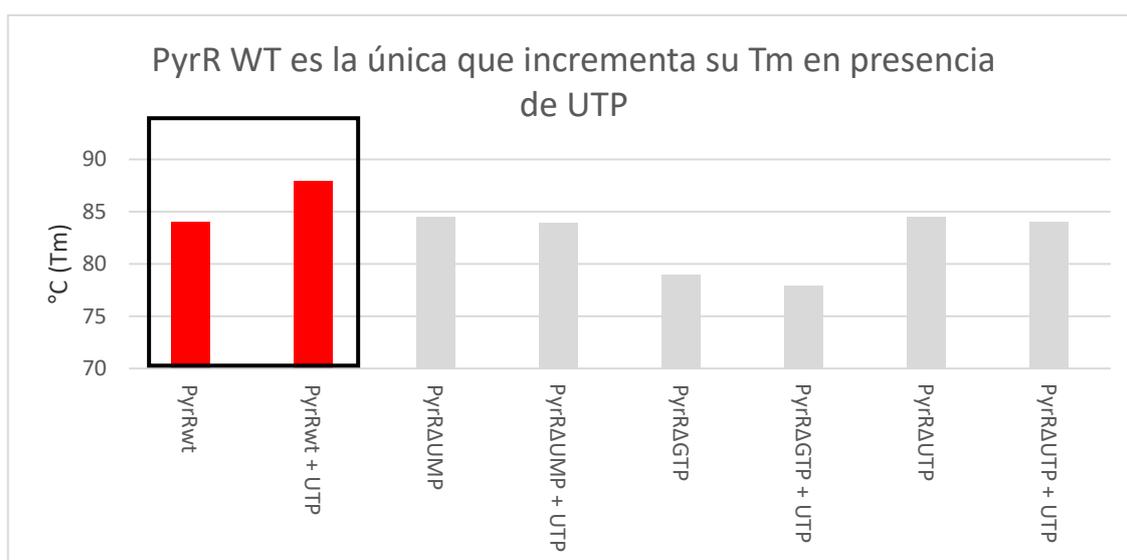


Gráfica 6. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PyrR silvestre y mutantes en complejo con UMP.

PyrR Δ UMP (rojo) no incrementa su T_m mientras PyrR silvestre y las mutantes Δ UTP y GTP se estabilizan en el medio con UMP.

PyrR silvestre es la única que se estabiliza en presencia de UTP.

El desplazamiento térmico de PyrR silvestre fue el único que se modificó por la presencia de UTP en el medio. Inesperadamente, la T_m de Δ GTP no cambió en presencia de UTP. Por su parte, se confirmó que Δ UMP no altera su T_m en la presencia de nucleótidos de uridina y guanina.



Gráfica 7. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas PyrR en complejo con UTP.

PyrR silvestre (rojo) es la única que incrementó su T_m en presencia de UTP, mientras que las temperaturas de desnaturalización de todas las mutantes no cambiaron.

- Unión de ligandos a las proteínas mutantes:

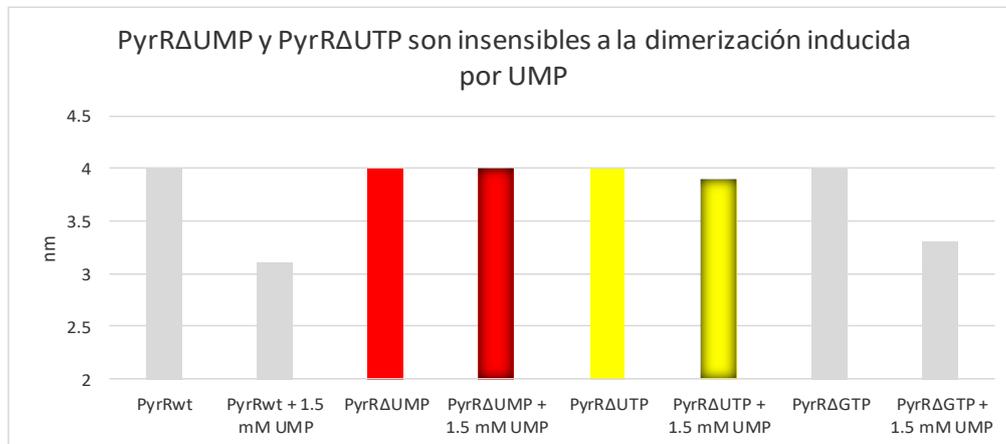
El análisis por desplazamiento térmico de las proteínas mutantes muestra que:

- 1) La T_m de Δ UMP es insensible a la presencia de cualquier nucleótido.
- 2) La T_m de Δ GTP es insensible a la presencia de GTP.
- 3) La proteína silvestre es la única que se estabiliza con UTP.

- Formación de dímero en solución

Para conocer el efecto de las mutaciones sobre la oligomerización, se realizó un experimento de DLS partiendo del tetrámero y buscando la formación del dímero por la adición de UTP y UMP (gráfica 8) observándose que UMP no induce la dimerización de las mutantes Δ UMP y Δ UTP. Las proteínas tuvieron

una concentración de 100 μM y se añadió 5 mM de nucleótido más 3 mM MgCl_2 .

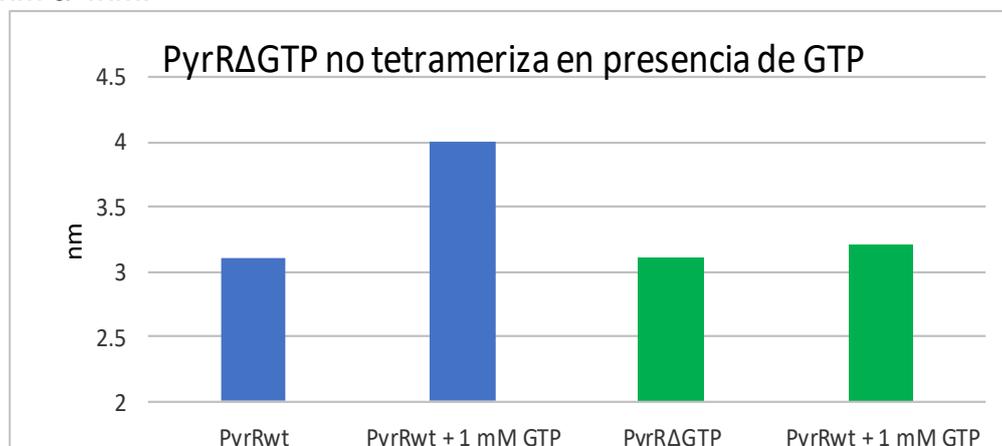


Gráfica 8. UMP no induce dimerización en las mutantes ΔUMP y ΔUTP .

Gris: PyrRWT, PyrRWT más UMP, PyrR ΔUGTP y PyrR ΔUGTP más UMP; Rojo: PyrR ΔUMP y PyrR ΔUMP más UMP; Amarillo: PyrR ΔUTP y PyrR ΔUTP más UMP.

- Formación de tetrámero en solución

Se monitoreó la capacidad de PyrR y de las mutantes de formar tetrámeros una vez que se había inducido el estado oligomérico de dímero por la adición de UMP (gráfica 9). Para esto, partiendo del experimento previo, se añadió GTP a la mezcla previa de PyrR más UMP. En este ensayo se observó que la mutante ΔGTP se mantuvo con un tamaño relacionado a dímero a pesar de la presencia de del GTP. Por su parte, la Proteína silvestre sí cambió su tamaño de partícula de 3 nm a 4nm.



Gráfica 9. GTP no induce tetramero en PyrR ΔGTP .

Azul: PyrRWT+UMP (dímero) y PyrR WT+UMP+GTP (tetramero); Verde: PyrRΔGTP+UMP y PyrRΔUGTP+UMP+GTP.

PyrR silvestre fue capaz de regresar al estado oligomérico de tetramero por la adición de GTP, aun cuando se encontraban en el medio moléculas de UMP. ΔGTP pierde esta capacidad. ΔUTP por su parte, regresa a formar el tetramero al interactuar con GTP.

Búsqueda de la condición para evaluar el cambio dímero-tetramero

Con la finalidad de observar en todas las proteínas el cambio de dímero a tetramero, procedimos a buscar una condición en la cual PyrR se encontrara como dímero y que pudiese convertirse en tetramero cuando interactuara con GTP. La condición que hallamos fue cloruro de sodio 100 mM más acetato de sodio 100 mM pH 4.2. Este amortiguador fue el que mejor resultado nos dio cuando analizamos la proteína a través de SEC-MALS (Figura 11).

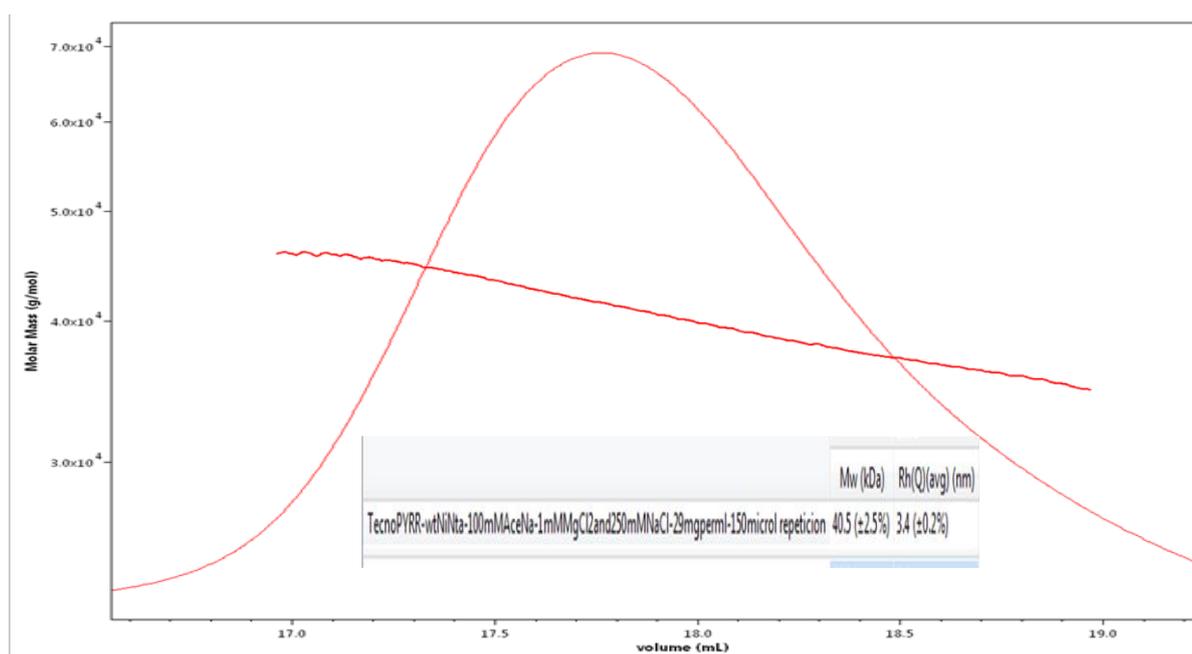
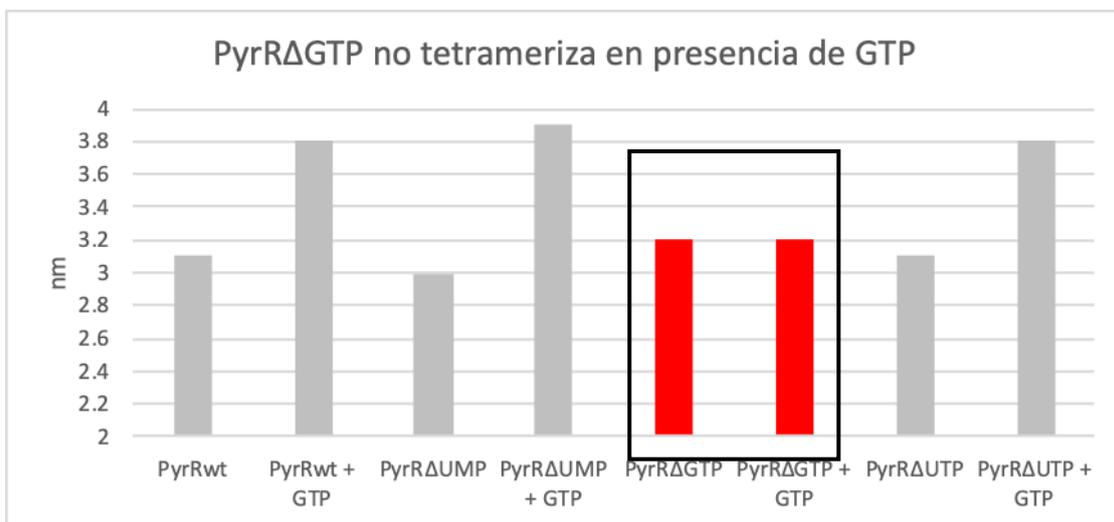


Figura 11. PyrR en cloruro de sodio 100 mM más acetato de sodio 100 mM pH 4.2 sin ligandos añadidos es dímero.

Perfil de SEC-MALS de PyrR la cual tiene una masa molecular y un tamaño representativo de dímero (el monómero tiene una masa aproximada de 20 kDa) de 40.5 kDa y un radio de giro de 3.4 nm.

Posterior a la medición del dímero por SEC-MALS continuamos con los experimentos de DLS para saber cuál era el comportamiento de las mutantes que no habíamos podido evaluar, es decir, de las mutantes PyrR Δ UMP y PyrR Δ UTP. Como resultado obtuvimos que la única PyrR que no cambió su tamaño de dímero a tetrámero, en presencia de GTP, fue la PyrR Δ GTP.



Gráfica 10. GTP no induce el tetrámero en PyrR Δ GTP.

Tanto la PyrR silvestre como las mutantes Δ UMP y Δ UTP pasaron de dímero a tetrámero, mientras que la mutante Δ GTP (rojo) se mantuvo en el tamaño de partícula de dímero.

- La estructura cristalina de Δ UMP es tetramérica

Con objeto de verificar la conformación tetramérica de la mutante PyrR Δ UMP a pH neutro, determinamos su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, la cual muestra como ligando únicamente a un ion fosfato (Figuras 12 y 13) y presenta una conformación tetramérica, pero distinta a la presentada en el complejo silvestre más GTP (Figura 7).



Figura 12. Modelo de PyrR Δ UMP.

El modelo se muestra como un homotetrámero, el cual únicamente posee como ligando un ion fosfato por cada monómero.

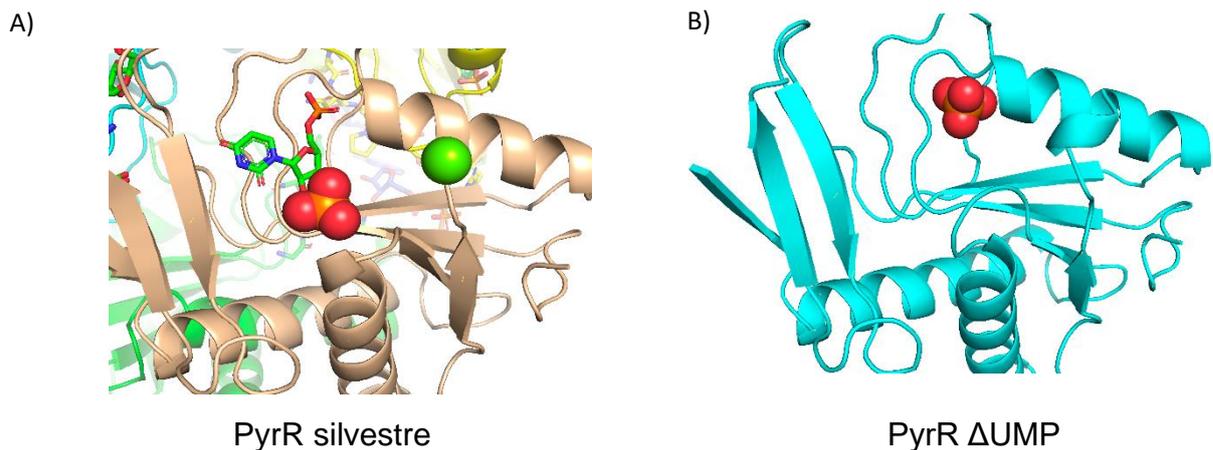


Figura 13. Representación de monómeros de PyrR silvestre y PyrR Δ UMP.

A) Desde una perspectiva general se muestra el sitio de unión de UMP y la presencia de este en la proteína. B) Perspectiva general del sitio de unión de PyrR Δ UMP.

El sitio de unión de UMP tiene una pequeña diferencia en el asa que se encuentra cerca de los hidroxilos de la ribosa del UMP, pues en la proteína silvestre esta asa se encuentra orientada en sentido contrario al ligando, mientras que en la mutante Δ UMP el asa se orienta hacia el sitio catalítico. Cabe resaltar la presencia del ion fosfato en la mutante Δ UMP que se encuentra en el mismo sitio que se coloca el fosfato perteneciente al UMP en la silvestre.

EL tetrámero de PyrRΔUMP es diferente al tetrámero inducido por GTP.

Después de resolver la estructura fue evidente que, a pesar de que ambas proteínas tienen un arreglo cuaternario de tetrámero, existen diferencias significativas en la disposición de los monómeros. Es evidente que PyrR silvestre en complejo con GTP forma un tetrámero que no se superpone exactamente sobre el tetrámero determinado para PyrRΔUMP (Figura 14).

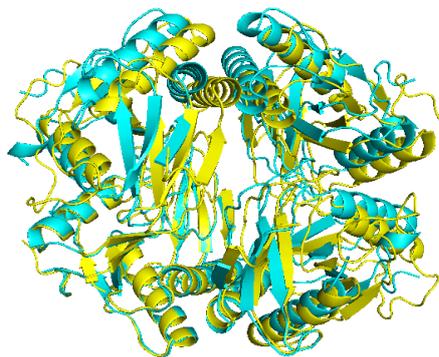


Figura 14. Sobreposición de tetrámeros PyrR en complejo con GTP

Silvestre (amarillo) sobre PyrRΔUMP (cian).

Los tetrámeros inducidos por GTP en PyrR silvestre y PyrRΔUTP son idénticos

Después de observar que PyrRΔUTP cambió su tamaño cuando interactuaba con GTP, fuimos tras la búsqueda de la estructura cristalina del complejo, esto para saber si existían diferencias estructurales entre los tetrámeros inducidos por GTP en PyrR silvestre y PyrRΔUTP. Se obtuvieron cristales de la proteína en el licor madre E2 del kit Natrix de Hapton, el cual contiene 80 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ hexahidratado, 40 mM cacodilato de sodio pH 5.5 y 20 mM hexamina de cobalto (III). La estructura cristalina de PyrRΔUTP resultó ser un tetrámero en complejo con GTP, de forma idéntica a la proteína silvestre. Las interacciones entre residuos-ligando y ligando-ligando (apilamiento de bases) se mantuvieron exactamente iguales (Figura 15).

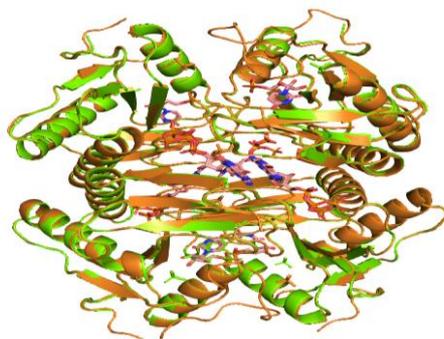


Figura 15. PyrR Δ UTP en complejo con GTP es un tetrámero.

Izquierda: PyrR Δ UTP en complejo con GTP es un tetrámero. Derecha. Sobreposición del tetrámero inducido por GTP en PyrR silvestre (naranja) y en PyrR Δ UTP (verde).

Discusión

-- PyrR interactúa con nucleótidos de guanina y uridina

Previamente se había analizado la interacción de PyrR con UMP, UTP, GTP y GMP y la influencia que éstos tenían sobre la capacidad de la proteína de unirse al RNA (Jørgensen *et al.*, 2008) . Sin embargo, los estudios previos no habían reportado si PyrR era capaz de interactuar con una gama más amplia de nucleótidos. De acuerdo con los resultados obtenidos por desplazamiento térmico, PyrR interactúa con los nucleótidos mono, di y trifosfatados derivados de guanina y uridina. Es importante resaltar que los derivados de estos nucleótidos deben estar fosfatados, o por lo menos así es el caso para la uridina, para la cual no se observó incremento en la T_m a diferencia de la estabilización que se observó con UMP, UDP y UTP. En todos los casos, incluida la PyrR Δ UMP, se encuentra un fosfato interactuando con los residuos Thr 108 y 110 que está rodeado por una superficie de carga positiva. A pesar de que algunos amortiguadores contenían fosfatos, no se observó incremento de la T_m de PyrR, lo que nos podría indicar que para la estabilización de PyrR a mayores temperaturas, se necesita no solo el fosfato, sino también la presencia de ya sea la ribosa, algún derivado de ribosa como fosforribosil pirofosfato, uracilo o UMP.

-- La dimerización inducida por UTP es dependiente del sitio de unión a UMP

En los resultados de DLS, las mutantes PyrR Δ UMP y PyrR Δ UTP resultaron insensibles a la dimerización mediada por nucleótidos de uridina. El hecho de que PyrR Δ UTP se mantuviera como tetrámero era un resultado previsible, pues la mutación de los residuos con los cuales interacciona el nucleótido fue sustituida por alaninas. Sin embargo, la mutante Δ UMP mantiene los residuos que interaccionan con UTP y aun así no logró dimerizar. Con base en lo observado por cristalografía y con los experimentos de DLS, proponemos que la dimerización de PyrR involucra al UMP que se encuentra en el sitio catalítico, ya que, de acuerdo con la estructura, este podría funcionar como andamio para el acoplamiento del UTP y producir así que el anillo heterocíclico del UTP se posicione hacia la intercara del dímero, la cual también es única entre las PRTasas de tipo 1. Con estas observaciones podríamos suponer que el hecho de que PyrR sea casi inactiva y que mantenga unido el producto de su reacción, la habilita para funcionar como represor transcripcional, pues sin el UMP del sitio catalítico y sin la orientación de los monómeros para oligomerizar, no podría dimerizar y unirse a una secuencia de RNA.

-- La tetramerización inducida por GTP es independiente de los sitios de unión a UMP y UTP

Con respecto a la formación del tetrámero, ambas mutantes lograron formar un tetrámero en presencia de GTP, lo cual nos indica que la unión del GTP es independiente de la unión de UTP y de la presencia del UMP en el sitio catalítico. La estructura de PyrR Δ UTP confirma esa observación, pues cuando se comparan las estructuras vemos el mismo arreglo y disposición de los monómeros.

Los experimentos de oligomerización de la mutante GTP corroboraron que los residuos His 140 y Arg 160 son necesarios para que la proteína forme un tetrámero inducido por GTP, pues no se observó tetramerización mediada por GTP en los experimentos de DLS.

-- La dimerización inducida por UTP parece depender del sitio de unión a GTP

Con respecto a la sensibilidad a los nucleótidos de uridina, la proteína sí logró disminuir su tamaño de partícula, pero no de forma tan consistente como la silvestre. Además, la PyrR Δ GTP no se estabilizó por influencia del UTP en los experimentos de desplazamiento térmico. Este hecho resulta interesante, pues la comunicación de los sitios de unión de GTP y UTP no es evidente puesto que tienen al UMP de por medio. Hasta el momento no hemos encontrado ninguna evidencia que nos indique que las modificaciones en los residuos que unen al GTP ejerzan algún cambio en el sitio catalítico o en los residuos que ayudan a la dimerización.

-- Los cambios en la T_m parecen estar regidos por el sitio de unión a UMP

Evaluando los experimentos de desplazamiento térmico y DLS podemos observar que la mutante Δ UMP no sufrió cambio alguno en la temperatura media de desnaturalización cuando interactuó con los nucleótidos de guanina y uridina, sin embargo, la proteína sí tetramerizó por inducción de GTP. Estos resultados parecen indicar que los experimentos de desplazamiento térmico no son sensibles a la oligomerización y son producto de los cambios conformacionales que influyen sobre el sitio catalítico.

-- Papel del asa flexible

Con respecto al asa flexible, es interesante cómo un arreglo conformacional conservado, que es mediado por GTP y que incrementa la actividad en las fosforribosil transferasas ahora sea el punto de inflexión entre el dímero y el tetrámero, pues para la PyrR, el asa es el interruptor que permite o bloquea la unión del UTP.

Conclusiones

- 1) PyrR interacciona en solución con nucleótidos de guanina y uridina.
- 2) La dimerización inducida por UTP es dependiente de la presencia de UMP en sitio catalítico.
- 3) La inducción del tetrámero mediada GTP es independiente de los sitios de unión a UMP y UTP.

4) La inducción del dímero por UTP es sensible a los cambios producidos en el sitio de unión de GTP.

Perspectivas

1. Esclarecer cuál es el papel del asa flexible en el proceso de oligomerización. A pesar de que las estructuras cristalográficas han mostrado las diferentes conformaciones que adopta esta asa, es necesario producir una mutante que no tenga esta asa o que tenga mutada la Tyr 71, la cual es la que se posiciona en el sitio donde se acomoda el UTP para la inducción de la formación del dímero.
2. Obtener las estructuras cristalográficas de PyrR silvestre sin UMP en el sitio catalítico. Las estructuras cristalográficas resueltas de PyrR silvestre siempre cuentan con una molécula de UMP en el sitio catalítico. A pesar de que contar con la estructura de PyrR Δ UMP, es indispensable resolver la estructura cristalográfica de PyrR apo pues nos aportará información de los cambios conformacionales del sitio catalítico, con lo cual podremos hacer un seguimiento más preciso de la dinámica de la proteína, la cual es dependiente de los nucleótidos con los que interactúa.
3. Cristalizar PyrR en complejo con RNA. La estructura de PyrR en complejo con RNA, además de que nos arrojará información relacionada con el reconocimiento molecular de PyrR con su RNA cognado, nos proporcionará datos del arreglo del dímero en la superficie del RNA. Será interesante observar si hay cambios en el dímero, como diferente orientación y distancia entre los monómeros, y cuál es el efecto sobre los residuos que unen GTP.

Información suplementaria:

Tabla 1. Estadísticas de colección de datos y refinamiento de PyrR Δ UMP.

Wavelength	0.976
Resolution range(Å)	37.0 - 2.1 (2.175 - 2.1)
Space group	P 62 2 2
Unit cell (Å)	98.1 98.1 113.0 90 90 120
Total reflections	38201 (3766)
Unique reflections	19244 (1889)
Multiplicity	2.0 (2.0)
Completeness (%)	99.3 (99.9)
Mean I/sigma(I)	8.4 (3.9)
Wilson B-factor(Å ²)	32
R-merge	0.05 (0.15)
CC1/2	0.99 (0.927)
R-work	0.1855 (0.2252)
R-free	0.2097 (0.2601)
RMS (bonds) (Å)	0.008
RMS (angles) (°)	0.88
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.76
Average B-factor	37.78

macromoleculas	36.97
ligands	32.68
solvent	45.14

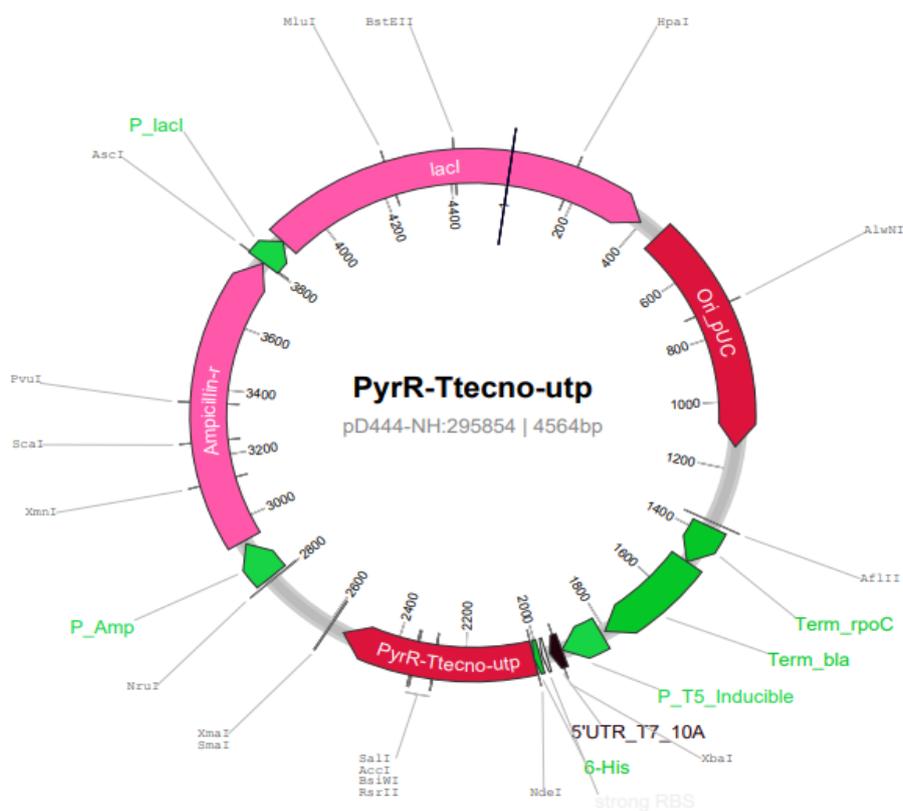
Las estadísticas para la capa de mayor resolución se muestran en paréntesis.

Tabla 1. Estadísticas de colección de datos y refinamiento de PyrR Δ UTP en complejo con GTP.

Wavelength	0.976
Resolution range(Å)	40.4 - 1.4 (1.45 - 1.4)
Space group	P 21 21 21
Unit cell(Å)	68.2 84.9 124.5 90 90 90
Total reflections	270846 (27260)
Unique reflections	140893 (14087)
Multiplicity	1.9 (1.9)
Completeness (%)	98.6 (99.6)
Mean I/sigma(I)	9.3 (2.0)
Wilson B-factor(Å ²)	16.5
R-merge	0.03 (0.19)
CC1/2	0.998 (0.912)
R-work	0.1583 (0.1748)
R-free	0.1814 (0.2143)
RMS(bonds) (Å)	0.009
RMS (angles) (°)	1.41
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.37
Average B-factor	24.22

macromolecules	21.99
ligands	25.87
solvent	39.47

Mapa de construcción PyrRΔUTP



Secuencia PyrR ΔUTP:

Residuos:

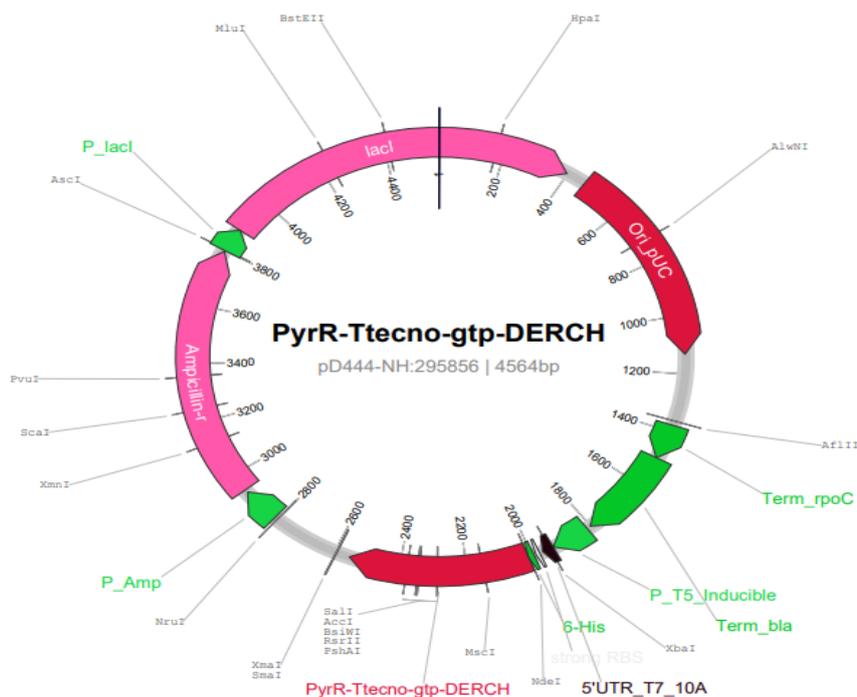
MRVKAIEIMDEKAIDRALIRIAHEIVERNKGIEDVVLVGIKTRGVPLAKRIARYISRI
EGKEPPVGLSDITLYAADLTTDLEQPVVKKKDIGVDVANKIVLVDVVIYTGRTV

RAAMDAIIDLGAPKAIQLAELVDRGHRELPIRPDYVGKNVPTSRSEIIQVMLEEV
 DGVNKVVITEK

DNA:

ATGCGCGTCAAAGCCGAGATTATGGATGAGAAAGCTATCGACCGTGCGCT
 GATTAGAATTGCACACGAAATCGTCGAGCGCAACAAAGGTATTGAAGATGT
 TGTGCTGGTTGGTATCAAGACTCGTGGTGTTCGGCTGGCCAAGCGCATCG
 CCCGTTACATTAGCCGTATCGAAGGCAAAGAACCGCCGGTTGGCTCTCTG
 GATATCACCTGTATGCAGCAGACCTGACGACGGATCTGGAGCAACCGGT
 CGTGAAGAAAAAGACATTGGCGTCGACGTTGCGAATAAGATCGTAGTGTT
 GTTGACGACGTGATTTACACCGGTCGTACGGTCCGTGCGGCGATGGAC
 GCGATTATTGACCTGGGTGCGCCGAAGGCAATTCAGCTGGCTGAACTGGT
 GGATCGTGGCCATCGTGAGTTGCCAATCCGTCCGGACTATGTGGGTAAAA
 ACGTTCCTACCAGCCGCAGCGAGATCATTACAGGTCATGCTGGAAGAGGTC
 GATGGCGTGAATAAAGTTGTGATCACCGAGAAGTAATAA

Mapa de construcción PyrΔGTP



Secuencia PyrR ΔGTP

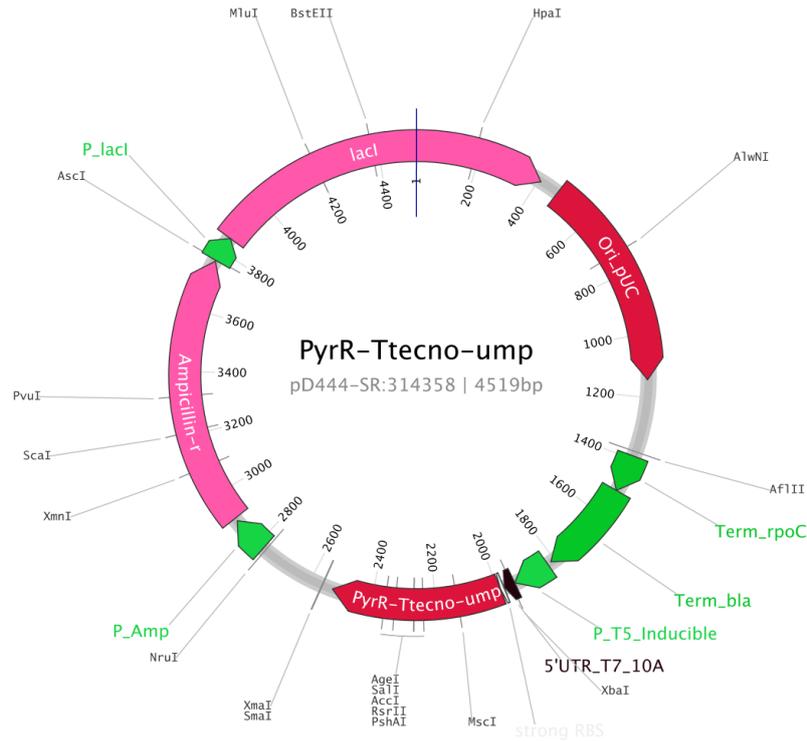
Residuos:

MRVKAEIMDEKAIDRALIRIAHEIVERNKGIEDVVLVGIKTRGVPLAKRIARYISRI
 EGKEPPVGLSDITLYRDDLTDDLEQPVVKKKDIGVDVANRIVLDDVIYTGRT
 VRAAMDALDLGRP KAIQLAELVDRGARELPIRPDYVGKNVPTSRSAIIQVMLEE
 V DGVNKVVITEK

DNA:

ATGCGCGTCAAAGCCGAGATTATGGATGAGAAAGCTATCGACCGTGCGCT
GATTAGAATTGCACACGAAATCGTCGAGCGCAACAAAGGTATTGAAGATGT
TGTGCTGGTTGGTATCAAGACTCGTGGTGTTCGCTGGCCAAGCGCATCG
CCCGTTACATTAGCCGTATCGAAGGCAAAGAACCGCCGGTTGGCTCTCTG
GATATCACCTGTATCGTGATGACCTGACGACGGATCTGGAGCAACCGGT
CGTGAAGAAAAAAGACATTGGCGTCGACGTTGCGAATAAGATCGTAGTGTT
GGTTGACGACGTGATTTACACCGGTCGTACGGTCCGTGCGGCGATGGAC
GCGATTATTGACCTGGGTCGCCCCGAAGGCAATTCAGCTGGCTGAACTGGT
GGATCGTGGCGCGCGTGAGTTGCCAATCCGTCCGACTATGTGGGTAAAA
ACGTTCTACCAGCCGCAGCGCAATCATTGAGGTCATGCTGGAAGAGGTC
GATGGCGTGAATAAAGTTGTGATCACCGAGAAGTAATAA

Mapa de construcción Pyr Δ UMP



Residuos:

MRVKAEIMDEKAIDRALIRIAHEIVERNKGIEDVVLVGIKTRGVPLAKRIARYISRI
 EGKEPPVGLSDITLYRDDLLTTDLQPVVKKKDIGVDVANKIVVLA AVIYAGRA
 VRAAMD A IIDLGRP KAIQLAELVDAGHRELPIRPDYVGKNVPTSRSEIIQVMLEE
 V DGVN K V I T E K

DNA:

ATGCGCGTCAAAGCCGAGATTATGGATGAGAAAGCTATCGACCGTGCGCT
 GATTAGAATTGCACACGAAATCGTCGAGCGCAACAAAGGTATTGAAGATGT
 TGTGCTGGTTGGTATCAAGACTCGTGGTGTTCGCTGGCCAAGCGCATCG
 CCCGTTACATTAGCCGTATCGAAGGCAAAGAACCGCCGGTTGGCTCTCTG
 GATATCACCTGTATCGTGACGACCTGACGACGGATCTGGAGCAACCGGT
 CGTGAAGAAAAAGACATTGGCGTCGACGTTGCGAATAAGATCGTAGTGTT
 GGTTGCAGCAGTGATTTACGCGGGTCGTGCGGTCCGTGCGGCGATGGAC
 GCGATTATTGACCTGGGTCGCCCCGAAGGCAATTCAGCTGGCTGAACTGGT
 GGATGCGGGCCATCGTGAGTTGCCAATCCGTCCGACTATGTGGGTAAAA
 ACGTTCCTACCAGCCGCAGCGAGATCATT CAGGTCATGCTGGAAGAGGTC
 GATGGCGTGAATAAAGTTGTGATCACCGAGAAG

Bibliografía:

- Chander, P., Halbig, K. M., Miller, J. K., Fields, C. J., Bonner, H. K., Grabner, G. K., Smith, J. L. (2005). Structure of the nucleotide complex of PyrR, the pyr attenuation protein from *Bacillus caldolyticus*, suggests dual regulation by pyrimidine and purine nucleotides. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1773-1782.
- Henkin, T. M., & Yanofsky, C. (2002). Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays*, 24(8), 700-707.
- Jørgensen, C. M., Fields, C. J., Chander, P., Watt, D., Burgner, J. W., Smith, J. L., & Switzer, R. L. (2008). pyr RNA binding to the *Bacillus caldolyticus* PyrR attenuation protein—characterization and regulation by uridine and guanosine nucleotides. *FEBS journal*, 275(4), 655-670.
- Kantardjieff, K. A., Vasquez, C., Castro, P., Warfel, N. M., Rho, B.-S., Lakin, T., Rupp, B. (2005). Structure of pyrR (Rv1379) from *Mycobacterium tuberculosis*: a persistence gene and protein drug target. *Acta Crystallographica Section D: Biological crystallography*, 61(4), 355-364.
- Perica, T., Kondo, Y., Tiwari, S. P., McLaughlin, S. H., Kemplen, K. R., Zhang, X., Teichmann, S. A. (2014). Evolution of oligomeric state through allosteric pathways that mimic ligand binding. *Science*, 346(6216), 1254346.
- Savacool, H. K., & Switzer, R. L. (2002). Characterization of the interaction of *Bacillus subtilis* PyrR with pyr mRNA by site-directed mutagenesis of the protein. *Journal of bacteriology*, 184(9), 2521-2528.
- Schumacher, M. A., Bashor, C. J., Song, M. H., Otsu, K., Zhu, S., Parry, R. J., Brennan, R. G. (2002). The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 78-83.
- Sinha, S. C., & Smith, J. L. (2001). The PRT protein family. *Current opinion in structural biology*, 11(6), 733-739.
- Switzer, R. L., Turner, R. J., & Lu, Y. (1998). Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon by transcriptional attenuation: control of gene expression by an mRNA-binding protein. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 62, 329-367.

- Tomchick, D. R., Turner, R. J., Switzer, R. L., & Smith, J. L. (1998). Adaptation of an enzyme to regulatory function: structure of *Bacillus subtilis* PyrR, a pyr RNA-binding attenuation protein and uracil phosphoribosyltransferase. *Structure*, 6(3), 337-350.
- Turner, R. J., Bonner, E. R., Grabner, G. K., & Switzer, R. L. (1998). Purification and characterization of *Bacillus subtilis* PyrR, a bifunctional pyr mRNA-binding attenuation protein/uracil phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5932-5938.
- Turner, R. J., Lu, Y., & Switzer, R. L. (1994). Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *Journal of bacteriology*, 176(12), 3708-3722.