



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LA DE URIDINA 5'-
MONOFOSFATO SINTASA DE *Coffea arabica*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q. ALEXIS HINOJOSA CRUZ

Dra. LILIAN GONZALEZ SEGURA
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LA DE URIDINA 5'-MONOFOSFATO
SINTASA DE *Coffea arabica***

que presenté para obtener el grado de ----Maestría----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Alexis Hinojosa Cruz', written in a cursive style.

**Alexis Hinojosa Cruz
No. De cuenta: 311004777**

HINOJOSA CRUZ ALEXIS
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión extraordinaria **de octubre de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización funcional y estructural de la uridina 5'-monofosfato sintasa de Coffea arabica**", dirigida por el/la Dr(a). **GONZÁLEZ SEGURA LILIAN**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

MONTIEL PACHECO CARMINA	PMDCBQ	PRESIDENTE
GONZALEZ ANDRADE MARTIN	PMDCBQ	SECRETARIO
ARREGUIN ESPINOSA ROBERTO	PMDCBQ	VOCAL
GARCÍA TREJO JOSÉ DE JESÚS	PMDCBQ	VOCAL
RAMÍREZ SILVA LETICIA HAYDEE	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de octubre de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

El presente trabajo experimental se realizó en el laboratorio 125 del Departamento de Bioquímica en el Edificio F de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Lilian González Segura. Este trabajo fue apoyado con una beca de maestría por CONAHCYT y apoyo financiero por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (proyectos IN227920, IN211223) y Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP 5000-9129.

ÍNDICE

1. Introducción.....	14
1.1 Planta de café.....	14
1.2 Enfermedades del café.....	15
1.3 Síntesis de pirimidinas en plantas.....	16
1.4 UMP sintasa.....	18
1.5 Orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa).....	18
1.6 Mecanismo químico de la reacción catalizada por las OPRTasas.....	19
1.7 Propiedades cinéticas de las OPRTasas.....	20
1.8 Estructura tridimensional de las OPRTasas.....	22
1.9 Cambio conformacional de las OPRTasas.....	27
1.10 Orotodina 5'-monofosfato descarboxilasa (ODCasa).....	28
1.11 Mecanismo químico de la reacción catalizada por las ODCasas.....	29
1.12 Propiedades cinéticas de la ODCasa.....	31
1.13 Estructura tridimensional de las ODCasas.....	32
1.14 Cambio conformacional de las ODCasas.....	34
1.15 Importancia de las pirimidinas en plantas.....	35
2. Planteamiento del problema.....	37
3. Objetivo general.....	38
4. Objetivos específicos.....	38
5. Materiales y métodos.....	39
5.1 Transformación de las células BL21pGro7 con el vector pET28b-CaUMPS.....	39
5.2 Sobreexpresión y producción de la enzima recombinante CaUMPS en células de E. coli BL21pGro7.....	40
5.3 Purificación de la CaUMPS recombinante.....	40
5.4 Ensayos enzimáticos y determinación de los parámetros cinéticos.....	41
5.5 Dicroísmo circular.....	43
5.6 Ensayos de estabilidad térmica.....	43
5.7 Obtención de cristales de la CaUMPS.....	43
5.8 Difracción de los cristales por rayos X y procesamiento de datos.....	44

5.9 Análisis de las estructuras tridimensionales.....	44
6. Resultados y discusión.....	44
7. Conclusiones.....	72
8. Perspectivas.....	73
9. Anexo	

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Enfermedad del tizón bacteriano del halo, en hoja de <i>Coffea arabica</i>	15
2. Vía de la síntesis <i>de novo</i> para pirimidinas en plantas.....	17
3. Reacción catalizada por la OPRTasa.....	19
4. Mecanismo SN1 de dos pasos, para la reacción catalizada por la OPRTasa.....	20
5. Mecanismo secuencial al azar de la OPRTasa de <i>S. typhimurium</i>	21
6. Mecanismo tipo Mono-iso bi bi ordenado de la OPRTasa de <i>M. tuberculosis</i>	22
7. Monómero de la OPRTasa de <i>S. cerevisiae</i> (PDB_id 2PS1).....	23
8. Estructuras tridimensionales de los diferentes complejos de la OPRTasa de <i>S. cerevisiae</i>	24
9. Dímero de la OPRTasa de <i>S. cerevisiae</i> en el complejo ternario con los sustratos unidos (2PS1).....	24
10. Sitio activo del dímero de la estructura de OPRTasa de <i>S. cerevisiae</i> , con sus ligandos.....	25
11. Asas catalíticas en la familia de las PRTasas.....	26
12. Interacción entre el ión Mg ²⁺ , el PRPP y el residuo aspártico 131.....	27
13. Superposición de los monómeros de OPRTasa de <i>S. cerevisiae</i>	28
14. Reacción catalizada por la ODCasa.....	29
15. Mecanismos químicos de reacción propuestos para la ODCasa.....	30
16. Mecanismo de reacción para la descarboxilación de un derivado del OMP por medio de la ODCasa.....	31
17. Mecanismo cinético de la descarboxilación del OMP por medio de la ODCasa de <i>S. cerevisiae</i>	31
18. Estructura general de las ODCasas.....	32
19. Estructura tridimensional de monómero de la ODCasa de <i>B. subtilis</i>	33
20. Diagrama de la topología de la ODCasa de <i>B. subtilis</i> (PDB_id 1DBT).....	33

21. Superposición de la ODCasa de <i>S. cerevisiae</i> en su forma apo (en color verde), con la ODCasa unida al análogo del estado de transición BMP (en color azul).....	34
22. Esquema de los residuos que participan en la unión del OMP en la ODCasa de <i>S. cerevisiae</i>	35
23. Vía de síntesis de novo de pirimidinas en compartimentos celulares.....	36
24. Mapa del vector recombinante pET28b-CaUMPS.....	45
25. Secuencia de aminoácidos de la CaUMPS.....	45
26. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del ensayo de sobreexpresión de la CaUMPS en <i>E. coli</i> BL21pGro7.....	46
27. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del resultado de la purificación de la CaUMPS, mediante el uso de la resina Ni-TED Protino.....	47
28. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del resultado de la purificación de la CaUMPS, mediante el uso de la cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 HR-10/30.....	48
29. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200, para la CaUMPS.....	48
30. Espectro de dicroísmo circular para la CaUMPS.....	50
31. Desnaturalización térmica de la CaUMPS en Tris 20 mM pH 8.0 NaCl 300 mM....	51
32. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) de la CaUMPS purificada con amortiguador HEPES.....	52
33. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%, purificación de la CaUMPS, utilizando el amortiguador HEPES.....	53
34. Desnaturalización térmica de la CaUMPS en HEPES 20 mM, pH 8.0 y NaCl 300 mM.....	54
35. Curvas de saturación de la CaOPRTasa purificada con el amortiguador HEPES.....	56
36. Curva de saturación de la CaODCasa purificada con el amortiguador HEPES.....	57
37. Cristales de la CaUMPS.....	59
38. Estructura tridimensional de la CaODCasa.....	61
39. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del cristal de la CaUMPS.....	63
40. Sitio activo de la CaODCasa.....	65

41. Comparación entre el modelo y la estructura cristalográfica de la CaODCasa.....	66
42. Asas catalíticas de la estructura del dímero de la CaODCasa.....	67
43. Residuos catalíticos del sitio activo.....	67
44. Modelo del monómero de las CaOPRTasa obtenido por AlphaFold2.0.....	68
45. Modelo del dímero de la CaOPRTasa.....	69
46. Residuos que podrían estar involucrados en la unión con el PRPP.....	70
47. Residuos que podrían estar involucrados en la unión del OA y el Mg ²⁺	70
48. Modelo de la CaUMPS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

1. Purificación de la CaUMPS en amortiguador Tris a partir de 2L de cultivo.....	49
2. Purificación de la CaUMPS en amortiguador HEPES a partir de 2L de cultivo.....	54
3. Parámetros cinéticos para la OPRTasas de algunos organismos.....	57
4. Parámetros cinéticos para la reacción catalizada por el dominio de la CaODCasa..	58
5. Parámetros estadísticos de la estructura tridimensional de la CaODCasa.....	61

ABREVIATURAS

ATCasa	aspartato transcarbamilasa
ATP	adenosín trifosfato
BMP	6-hidroxiuridina 5'-fosfato
CaOPRTasa	orotato fosforribosiltransferasa de <i>Coffea arabica</i>
Carbamoil-P	carbamoil fosfato
CaUMPS	uridina 5'-monofosfato sintasa de <i>Coffea arabica</i>
C-terminal	carboxilo terminal
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRP	1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato
EDO	etilenglicol
FOA	ácido 5-fluoroorotico
GOL	glicerol
ICO	organización internacional del café
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido
LB	Luria-Bertani
MoPyr5	OPRTasa del hongo <i>Magnaporthe oryzae</i>
mRNA	RNA mensajero
MtOPRTasa	orotato fosforribosiltransferasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Nu	nucleofilo
N-terminal	amino terminal
OA	ácido orótico
ODCasa	orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa
OMP	orotidina-5'-monofosfato
OPRTasa	orotato fosforribosiltransferasa
PEG	polietilenglicol
PMSF	fenilmetilsulfonilo
PPi	pirofosfato

PRPP	fosforribosil pirofosfato
PRTasas	fosforribosiltransferasas
RNA	ácido ribonucleico
R5P	ribosa-5-fosfato
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SIAP	Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera
UMP	uridina 5'-monofosfato
UMPS	uridina 5'-monofosfato sintasa
UTP	uridina 5'-trifosfato

RESUMEN

Los nucleótidos de purina y pirimidina son esenciales en todas las formas de vida, no solo como precursores de RNA y DNA, sino también son requeridos como cofactores del metabolismo energético y para la síntesis continua de polisacáridos, fosfolípidos y glicolípidos. Estos nucleótidos se pueden sintetizar a partir de rutas *de novo*, o del reciclado de nucleósidos preformados por rutas de recuperación. La biosíntesis de uridina 5´monofosfato (UMP) es una vía altamente conservada tanto en procariontes como en eucariontes. En plantas, los últimos dos pasos de la vía de síntesis *de novo* del UMP, son catalizadas por una proteína quimérica bifuncional llamada UMP sintasa (UMPS). Esta proteína bifuncional posee dos actividades catalíticas, la orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa) y la orotidina 5´-monofosfato descarboxilasa (ODCasa). La OPRTasa cataliza la condensación del orotato (OA) con el fosforribosil pirofosfato (PRPP) dependiente de Mg^{2+} para producir PPI y la orotidina-5´-monofosfato (OMP), la cual es descarboxilada por la ODCasa para producir UMP, que es el nucleótido de entrada para la biosíntesis de todos los nucleótidos de pirimidina. En eucariontes, como por ejemplo en las plantas, la porción del N-terminal de este polipéptido bifuncional corresponde a la OPRTasa, mientras que la región del C-terminal a la ODCasa. A pesar de que la UMPS es una enzima clave en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas, en las plantas se han llevado a cabo muy pocos estudios. El café es uno de los principales productos agrícolas que se consumen a nivel mundial. Existen más de 100 especies de café, pero las principales son dos: café arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*). En México, es posible cultivar y producir variedades de la especie *C. arabica* clasificadas entre las mejores del mundo. A nivel internacional, México se encuentra en el noveno lugar en la producción de café, y es considerado como uno de los principales países productores de café orgánico del mundo.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización funcional y estructural de la UMPS de *Coffea arabica* (CaUMPS). Se estandarizó un protocolo para la purificación de la proteína bifuncional recombinante CaUMPS. Con el fin de realizar su caracterización se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular y de

termofluorescencia. La caracterización cinética del dominio OPRTasa de *C. arabica* (CaOPRTasa) se realizó por medio de ensayos de velocidad inicial en estado estacionario, los cuales mostraron que el mecanismo cinético de esta enzima es Bi Bi al azar. Además, para el caso del dominio ODCasa de *C. arabica* (CaODCasa) se determinaron los parámetros cinéticos como k_{cat} , V_{max} y K_m para el OMP.

En cuanto a la caracterización estructural de la CaUMPS, a pesar de que se realizaron varios intentos por obtener la estructura tridimensional completa con los dos dominios, solo se obtuvo el dímero de la CaODCasa a una resolución de 1.4 Å, la cual representa la primera estructura de una ODCasa de plantas. La CaODCasa es un dímero con un plegamiento tipo barril TIM similar al que se ha encontrado en otras ODCasas. En el sitio activo de una subunidad se encontró una molécula de 1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato unida, la cual indujo un cambio conformacional al estado cerrado; mientras que en la otra subunidad adyacente, la ausencia de esta molécula, produjo una conformación abierta. Las estructuras tridimensionales de la CaOPRTasa y de la CaUMPS completa se modelaron utilizando AlphaFold2. Este trabajo contribuye a la elucidación del mecanismo de acción de una clase de enzimas quiméricas que son críticas para el metabolismo y adaptación de las plantas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planta de Café

Los países europeos, son los mayores consumidores de café en el mundo, ya que en el periodo 2022-2023 consumieron 53.1 millones de costales de 60 kg de café. Por otra parte, Centroamérica, el Caribe y México consumieron 6.0 millones de costales de café con las mismas características (ICO, 2023).

Dos de las especies dominantes en la producción de café a nivel mundial, de acuerdo con *International Coffee Organization* (ICO) en el 2009, fueron *Coffea canephora* en un 40% y *Coffea arabica* en un 60% (Davis P. A. *et al.*, 2020). Estos porcentajes se modificaron ligeramente con el tiempo, ya que en el 2023 *C. canephora* representó un 42.58%, mientras que *C. arabica* un 57.41% (ICO, 2023).

En México, gracias a la geografía nacional, es posible cultivar y producir variedades clasificadas entre las mejores del mundo en 15 estados de la república, en una superficie de 737 376.45 hectáreas, de acuerdo con el Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) en el 2014. A nivel internacional, México fue el octavo productor mundial de café, de acuerdo con ICO en el 2014 (Medina J. A. *et al.*, 2016), mientras que, en el año 2022, pasó a ocupar el décimo lugar (Orús A., 2023).

Los principales estados productores de café en México son Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Guerrero, Nayarit, Hidalgo, Querétaro, Colima, Jalisco y Tabasco. Chiapas es el principal productor de café con una superficie sembrada de 260,129.43 hectáreas, con aproximadamente 180,856 productores cafetaleros y 402,099.78 T de producción en el ciclo 2014, de acuerdo con SIAP (Medina J. A. *et al.*, 2016).

Dentro de las variedades de la especie *Coffea arabica* que están sembradas en la región Frailesca de Chiapas están, *Typica* (30.27%), *Bourbón rojo* (13 %), *Bourbón amarillo*

(29.07%), (18%), Catuai (11.33%), Catimor (6.33%) y Mundo novó (5%) (Medina J. A. *et al.*, 2016).

1.2 Enfermedades del Café

En el cultivo del café se tienen problemas fitosanitarios durante todo el ciclo anual, a cualquier estrato y desde la emergencia de las plántulas. Dentro de las enfermedades que afectan principalmente a *Coffea arabica*, se encuentran: la bacteriosis en vivero o quemadura bacteriana (Rivero-Rodriguez, L. *et al.*, 2015), el tizón bacteriano del halo (Bender, C.L. *et al.*, 1999), la mancha de hierro (Souza V., P. A. *et al.*, 2020), el ojo de gallo (Zamora K. *et al.*, 2017), la antracnosis (Kejela, T. *et al.*, 2016), y la roya (Herrera, M. S. *et al.*, 2019).

La bacteriosis en vivero es causada por la bacteria *Pseudomonas cichorii* (Rivero-Rodriguez, L. *et al.*, 2015) y el tizón bacteriano es causado por una bacteria de la misma familia, *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae* (Bender, C.L. *et al.*, 1999).

Por ejemplificar una enfermedad, *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*, causa degradación de la membrana de los tilacoides y los cloroplastos (Rivero-Rodriguez, L. *et al.*, 2015; Bender, C.L. *et al.*, 1999), lo cual deja a las células vegetales sin energía para su metabolismo y conlleva a la muerte de la planta (Rivero-Rodriguez, L. *et al.*, 2015) (Figura 1).

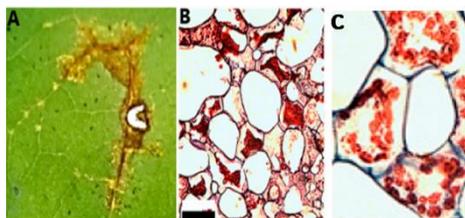


Figura 1. Enfermedad del tizón bacteriano del halo, en hoja de *Coffea arabica*. A) Signos externos. B) Ruptura de los cloroplastos del parénquima esponjoso. C) Imagen control de los cloroplastos del parénquima esponjoso Tomada de Rivero R. *et al.*, (2015).

El café arábica se asocia con una alta calidad en la taza, pero es más susceptible a plagas y enfermedades, por lo que requiere de más cuidados. Existen algunos estudios enfocados en plantas, sus patógenos y la vía de síntesis de pirimidinas, en los cuales se ha visto que cuando se afecta a algún intermediario de esta vía, como lo puede hacer alguna mutación, se disminuye la patogenicidad del hongo o bacteria en el hospedero (Qi, Z. *et. al.*, 2016).

La vía de síntesis de pirimidinas es de vital importancia. Santoso, D., y Thornburg, R. 1998, encontraron que cuando se inhibe catalíticamente a la enzima uridina 5'-monofosfato sintasa (UMPS), se deja a las células en un estado de inanición, por lo que se induce la muerte celular.

1.3 Síntesis de pirimidinas en plantas

El primer paso en la vía de síntesis de pirimidinas, en plantas, es la formación del carbamoil fosfato (Carbamoil-P) por la carbamoil fosfato sintetasa II, a expensas de amonio, bicarbonato y dos moléculas de ATP. Luego, el carbamoil-P, reacciona con el aspartato en una reacción catalizada por la aspartato transcarbamilasa (ATCasa) (segundo paso). El producto carbamoilaspartato se convierte en dihidro-orotato por la dihidroorotasa. Posteriormente, el dihidroorotato es convertido a orotato por la dihidro-orotato deshidrogenasa (tercer paso). En el cuarto paso, se requiere una enzima llamada orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa), la cual cataliza la reacción de condensación del 5' fosforribosil pirofosfato (PRPP) con el ácido orótico (OA), dependiente del ion magnesio (Mg^{2+}), para dar como productos al pirofosfato (PPi) y orotidina-5'-monofosfato (OMP). Luego, este último, debe descarboxilarse por la orotidin 5'-fosfato descarboxilasa (ODCasa), para llegar a la formación de uridina 5'monofosfato (UMP) (quinto paso). Ahora, el producto anterior, se debe fosforilar consecutivamente por 2 cinasas específicas para llegar a la uridina 5'trifosfato (UTP) (sexto paso) que, en el sexto paso, puede formar CTP por una reacción dependiente de glutamina (Figura 2) (Moffatt, B. A. y Ashihara, H. 2002.) Cabe señalar que estos nucleótidos de piridina, sintetizados mediante esta vía, son esenciales para la formación de ADN y la reproducción celular.

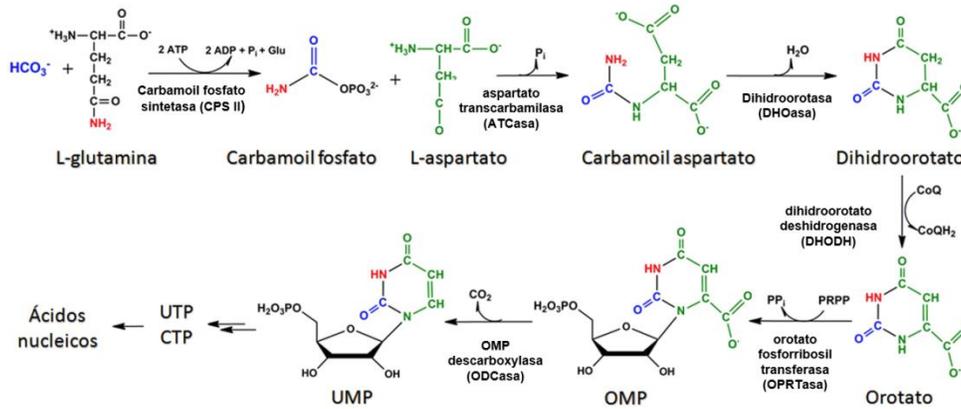


Figura 2. Vía de la síntesis *de novo* para pirimidinas en plantas. Figura tomada y modificada de Zhang, Y. et al., (2013).

La síntesis de nucleótidos depende de la acción de las fosforribosiltransferasas (PRTasas), un grupo de enzimas que utilizan el fosforribosil pirofosfato (PRPP) y una base nitrogenada para formar un *N*-ribósido monofosfato y pirofosfato (PPi). Estas enzimas juegan un papel muy importante tanto en las vías de síntesis *de novo* como en el reciclaje de purinas, pirimidinas y en el metabolismo de pirimidinas, como en la biosíntesis de histidina y triptófano (Musick W. *et al.*, 1981). Además de su papel fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos, también son requeridos como cofactores para el metabolismo energético y para la síntesis continua de fosfolípidos, polisacáridos y glicolípidos (Ross C., 1981; Traut T. y Jones M., 1996; Stasolla C. *et al.*, 2003; Kafer C. *et al.*, 2004). Los nucleótidos de uridina son, por ejemplo, importantes cofactores involucrados en el uso de azúcares para la síntesis de glucógeno en mamíferos (Stryer L., 1996) y para el almidón y la síntesis de la pared celular en plantas (Heldt H., 1997).

1.4 UMP sintasa

La biosíntesis de UMP es una vía altamente conservada tanto en procariontes como en eucariontes, en casi todos los organismos son seis enzimas las que llevan a cabo la biosíntesis *de novo* de UMP. En procariontes, estas actividades enzimáticas están codificadas por seis enzimas. Mientras que, en eucariontes superiores como lo son las

plantas y animales, estas seis actividades enzimáticas están codificadas por tres genes únicamente. Los dos últimos pasos en esta vía son codificados por un solo gen que produce una enzima bifuncional llamada uridin-5'-monofosfato sintasa (UMP sintasa) con dos actividades enzimáticas, la OPRTasa y la ODCasa (Jones M., 1980).

El origen de la UMPS es debido a que los mRNA's de la OPRTasa y ODCasa, se fusionaron en algún punto de la evolución, para dar lugar a un solo transcrito, que codifica para la UMPS (Jones, 1980).

En muchos organismos la porción del N-terminal, de este polipéptido bifuncional, corresponde a la OPRTasa, mientras que la región del C-terminal a la ODCasa (Suttle, D. *et al.*, 1988; Schoeber, S. *et al.*, 1993; Nasr, F. *et al.*, 1994; Maier T. *et al.*, 1995). Existen algunas excepciones, en las cuales la actividad de las regiones se puede invertir, como en el caso de eucariontes unicelulares: *kinetoplastids Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi*; y también en el caso de las cianobacterias: *Nostoc punctiforme* y *Oscillatoria spp* (Paojinda, P. *et al.*, 2018; Makiuchi, T. *et al.*, 2007; French, J. *et al.*, 2011).

1.5 Orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa)

La orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa; EC 2.4.2.10) es clave en el metabolismo de la síntesis de pirimidinas, la cual cataliza la condensación del orotato (AO) con el fosforribosil pirofosfato PRPP, dependiente de Mg^{2+} para producir PPi y la OMP (Figura 3). Este último, es descarboxilado por la ODCasa para producir UMP que, es el nucleótido de entrada para la biosíntesis de todos los nucleótidos de pirimidina.

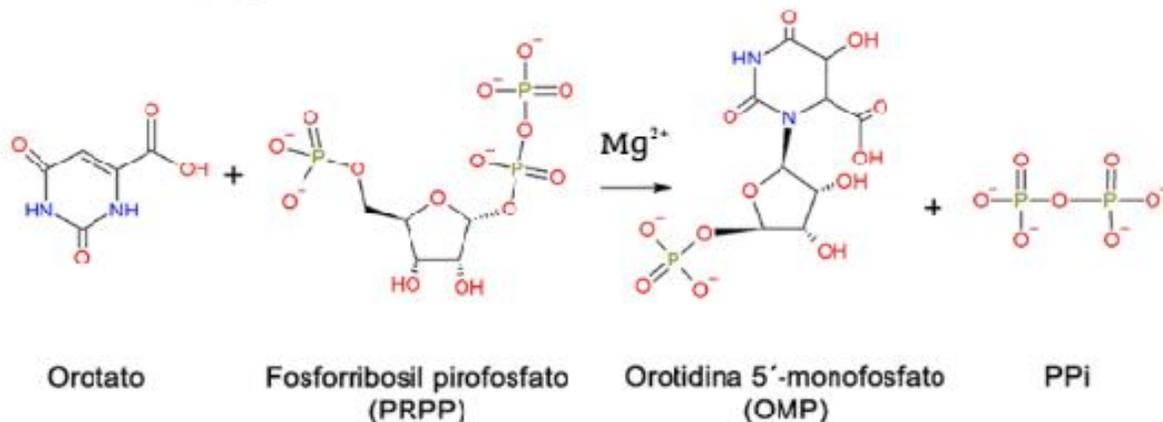


Figura 3. Reacción catalizada por la OPRTasa. Tomada y modificada de González-Segura, L. y Carrizosa-Carbajal, E. (2020).

1.6 Mecanismo de la reacción catalizada por las OPRTasas

El mecanismo químico de la reacción catalizada por la OPRTasa que se ha propuesto es de tipo S_N1 de dos pasos. En el primer paso, el ion Mg^{2+} , ayuda a disociar y a estabilizar al PPI que en un inicio se encuentra en forma de PRPP (Wen, T. y Grubmeyer, C. 1996; González-Segura, L. y Carrizosa-Carbajal, E. 2020). En este primer paso, es donde se forma el estado de transición del ion oxocarbenio. El oxígeno que conforma el anillo de furanosa, desplaza sus electrones hacia el C1', dejando allí una carga negativa, después esos electrones son entregados al grupo saliente PPI, que se encuentra estabilizado gracias al Mg^{2+} . El anillo de furanosa al realizar ese movimiento de electrones, se queda con un doble enlace entre el oxígeno del anillo y el C1', formándose como resultado una carga positiva (González-Segura *et al.*, 2007).

En el segundo paso, el ataque nucleofílico inicia gracias a una molécula de agua que está unida a través de puentes de hidrógeno a la lisina 76 (2.7 Å) y a la lisina 109 (2.9 Å), para el caso de la estructura de la OPRTasa de *Saccharomyces cerevisiae* (2PRY, 2PS1, 2PRZ) (González-Segura, L. *et al.*, 2007). Esta molécula de agua toma el protón ácido del AO, dejando una carga negativa sobre el oxígeno. Ahora esa carga negativa va a tener una hiperconjugación entre el oxígeno y el átomo de nitrógeno que tiene su par electrónico libre. Para finalmente, llevar el ataque nucleofílico del AO hacia el

intermediario oxocarbenio sobre su átomo C1', ahora ese par electrónico proveniente del AO pasa al oxígeno del anillo de furanosa, formando al OMP.

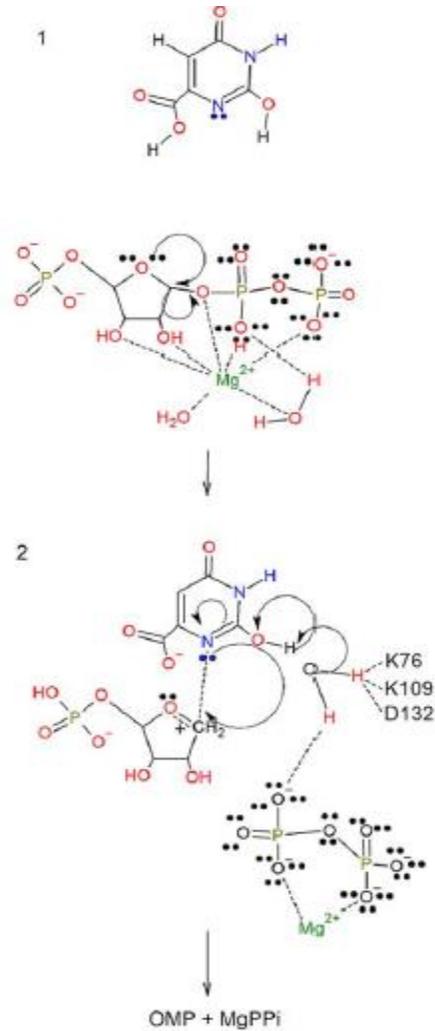


Figura 4. Mecanismo SN₁ de dos pasos, para la reacción catalizada por la OPRTasa. Tomada de González-Segura, L. *et al.*, 2007.

1.7 Propiedades cinéticas de la OPRTasa

A la fecha, hay pocos mecanismos cinéticos descritos para las OPRTasas, entre los cuales encontramos los de las enzimas de *Salmonella typhimurium* (Wang, G. P. *et al.*, 1999), de *Plasmodium falciparum* (Krungkrai, S. R. *et al.*, 2004), de *S. cerevisiae* (McClard R. W. *et al.*, 2006) y de *Mycobacterium tuberculosis* (Breda, A. R. *et al.*, 2012), los cuales se describen a continuación.

Experimentos de unión de los sustratos al equilibrio, realizados con la OPRTasa de *S. typhimurium* (Wang, G. P. *et al.*, 1999), mostraron que esta enzima presenta un mecanismo secuencial al azar, ya que los autores encontraron que hay una unión de los cuatro ligandos a la apoenzima: E.PRPP, E.OROTATO, E.OMP y E.PPi. Además, probaron que eran catalíticamente competentes. Otro requisito esencial para el mecanismo secuencial al azar, es que debe haber dos rutas de unión para el sustrato y otras dos, para la liberación de los productos (Figura 5).

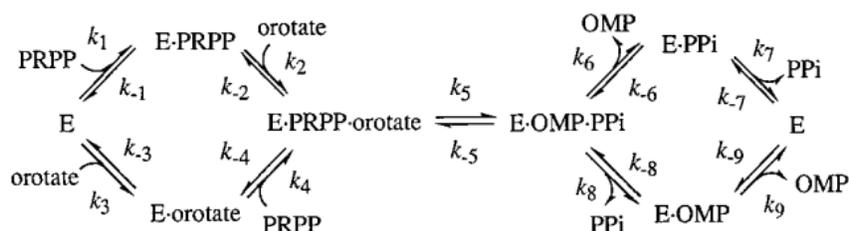


Figura 5. Mecanismo secuencial al azar de la OPRTasa de *S. typhimurium*. Tomada de Wang, G. P. *et al.*, 1999.

Otra enzima que presenta un mecanismo al azar es la OPRTasa de *P. falciparum*. Con esta enzima se realizó un estudio, en el cual midieron la velocidad inicial de reacción sin inhibición y con inhibición por producto. Al analizar los gráficos de dobles recíprocos, de la reacción sin inhibición, observaron un patrón de intersección de rectas que sugería un mecanismo secuencial (Krungrai, S. R. *et al.*, 2004).

Finalmente, otra OPRTasa que también ha sido caracterizada cinéticamente es la de *M. tuberculosis*, la cual presenta un mecanismo Mono-Iso bi-bi ordenado (Breda, A. R. *et al.*, 2012). Los autores midieron la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato y graficaron los dobles recíprocos, obteniendo un patrón de líneas paralelas que sugiere un mecanismo tipo ping-pong. Después, realizaron experimentos de inhibición de la enzima y encontraron que cuando no hay AO, no hay liberación de PPI. Este acontecimiento, indica que la enzima no puede transferir la ribosa del PRPP al sitio activo cuando hay ausencia del segundo sustrato (Figura 6).



Figura 6. Mecanismo tipo Mono-iso bi bi ordenado de la OPRTasa de *M. tuberculosis*. Tomada y modificada de Breda, A. R. *et al.*, 2012.

1.8 Estructura tridimensional de las OPRTasas

Las OPRTasas pertenecen a la familia de tipo I de las PRTasas, son homodiméricas con 180 a 230 residuos de aminoácidos por subunidad. La estructura en general de estas enzimas se divide en tres regiones: amino terminal, la parte central y el carboxilo terminal (Scapin *et al.*, 1994; González-Segura *et al.*, 2007; González-Segura, L. y Carrizosa-Carbajal, E. 2020).

La región del amino terminal (residuos 1-66) está formada por 2 hélices α (A1 y A2) y 2 hebras β antiparalelas (B1 y B2), tal como se observa en la figura 7 (color azul). Cabe señalar que estas hebras β , comprenden el dominio “cubierta” que, envuelve parcialmente al anillo AO, en el complejo ternario.

La región central (residuos 67-73), está formada por 6 hebras β (B3-B8) tal como se observa, en la figura 8 en color verde. Además, en esta zona, sólo hay 4 hebras para las estructuras de *S. typhimurium* y *Escherichia coli*; mientras que para la de *S. cerevisiae* hay 5. Finalmente, en estas 3 estructuras, las hebras β están rodeadas por 3 hélices α (A3-A5) (Scapin *et al.*, 1994; Henriksen *et al.*, 1996; González-Segura *et al.*, 2007; y Chao, L. *et al.*, 2010).

La región del carboxilo terminal está comprendida por los residuos 174-209, como se observa en la figura 7, en magenta. Esta zona está formada por 2 hélices alfa antiparalelas (A6-A7) que están conectadas por un asa (Scapin *et al.*, 1994; Chao, L. *et al.*, 2010).

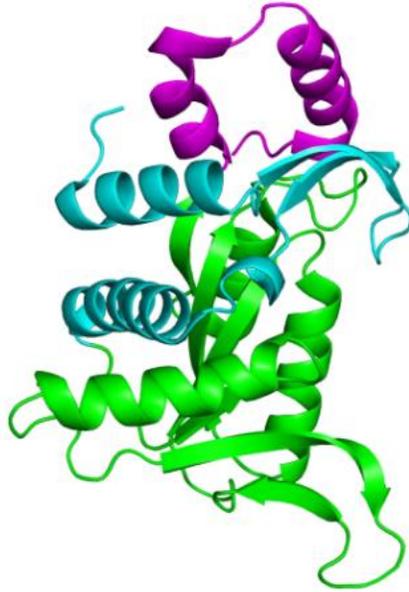


Figura 7. Monómero de la OPRTasa de *S. cerevisiae* (PDB_id 2PS1). Regiones: amino terminal (en azul), central (en verde) y carboxilo (en magenta).

A la fecha se han reportado 33 estructuras tridimensionales de las OPRTasas determinadas por difracción de rayos X en diferentes conformaciones, lo cual ha permitido el avance en el entendimiento de la catálisis de estas enzimas. Sin embargo, aún no se conoce ninguna estructura tridimensional de las OPRTasas de plantas.

Una de las enzimas, en la cual se ha obtenido la estructura tridimensional en las diferentes conformaciones es la OPRTasa de *S. cerevisiae*. Para esta enzima se obtuvo la estructura en la forma apo (libre), en complejo ternario unida con Mg-PRPP-AO y en complejo con el producto OMP unido (González-Segura *et al.*, 2007) (Figura 8).

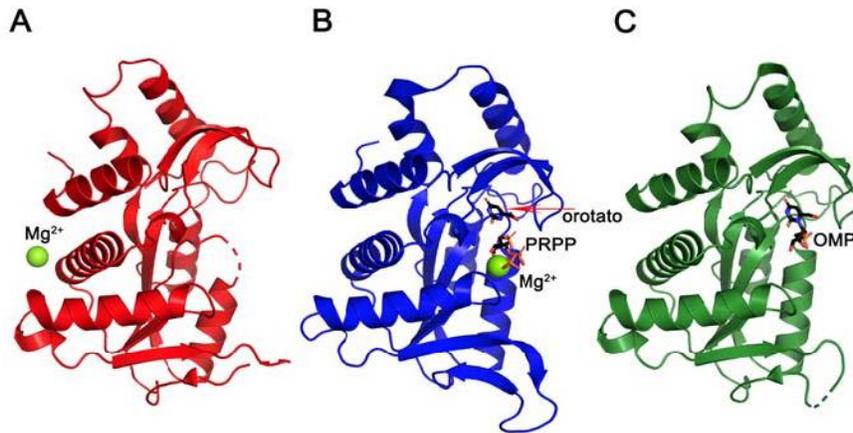


Figura 8. Estructuras tridimensionales de los diferentes complejos de la OPRTasa de *S. cerevisiae*. A) Monómero de la forma Apo (PDB_id 2PRY), B) monómero en el complejo ternario (PDB_id 2PS1) y C) monómero con el producto OMP unido (PDB_id 2PRZ). Tomada y modificada de González-Segura *et al.*, 2007.

Estas estructuras permitieron observar por primera vez una molécula de AO y una de PRPP unida por subunidad en un dímero (Figura 9).

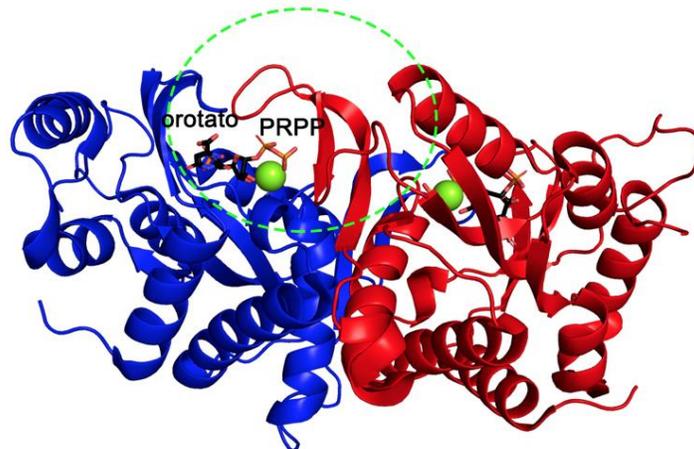


Figura 9. Dímero de la OPRTasa de *S. cerevisiae* en el complejo ternario con los sustratos unidos (PDB_id 2PS1). El PRPP y el AO se encuentran representados en varillas en color de átomos y el Mg^{2+} en esferas de color verde. En líneas punteadas se encuentra el sitio activo. Tomada y modificada de González-Segura *et al.*, 2007

Como se observa en la figura 10, la molécula de AO, está apilada en contra del residuo Phe 38; y uno de sus oxígenos, está enlazado por puentes de hidrógeno a 2 moléculas de agua localizadas en el sitio activo. Cabe señalar que estas moléculas, a su vez, se encuentran interaccionando con los residuos de Lys76, Lys109 y Asp132 (González-Segura, L. *et al.*, 2007).

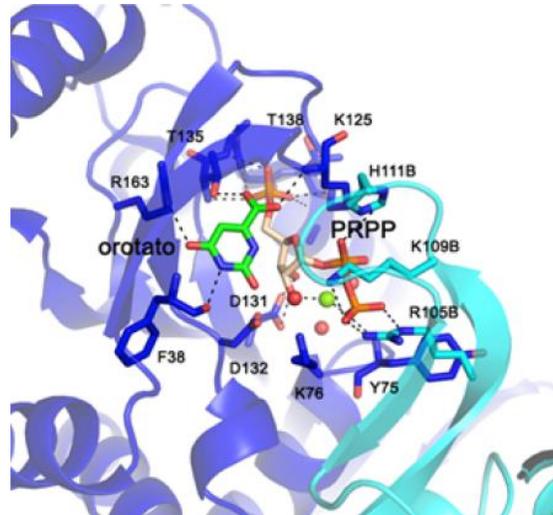


Figura 10. Sitio activo del dímero de la estructura de OPRTasa de *S. cerevisiae*, con sus ligandos. La subunidad A se encuentra en color azul y la subunidad B en color cian. Los residuos están representados como varillas en el color de la subunidad a la que corresponde. El OA y el PRPP se encuentran con los átomos de carbono en color verde y naranja, respectivamente. Los átomos de N, O, P se encuentran en los colores convencionales, el Mg^{2+} está representado como una esfera verde, mientras que las moléculas de agua lo están en color rojo. Finalmente, los puentes de hidrógeno están representados en líneas punteadas de color negro.

El motivo de enlace del 5-fosfato del PRPP está entre $\beta 3$ y $\alpha 3$ (Santoso D. y Thornburg R. 1998; Henriksen, A. *et al.*, 1996). A la secuencia conservada, $^{120}VMLVDDVITAGT^{131}$, cuya enumeración corresponde a la OPRTasa de *E. coli*, se le conoce como “asa de unión al 5-fosfato del PRPP” (Henriksen, A. *et al.*, 1996). Esta asa se puede observar en color azul en la Figura 11.

Esta asa no es la única, ya que existen otras 2 más: “asa de unión al PPI” que se encuentra entre $\beta 1$ y la $\alpha 2$; y el “asa de unión al PRPP” que se localiza entre $\beta 3$ y $\alpha 3$ (González-Segura, L. y Carrizosa-Carbajal, E. 2020 (Figura 11).

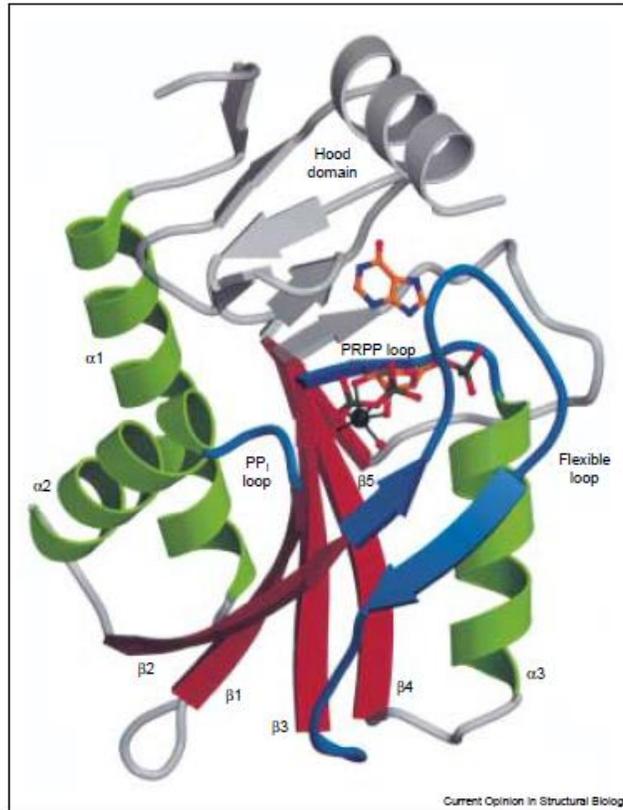


Figura 11. Asas catalíticas en la familia de las PRTasas. El asa de unión al PPI, el asa de unión del PRPP y el asa flexible se encuentran en color azul. La región central se encuentra representada por α hélices (en verde) y β hebras (en rojo). El modelo pertenece a la OPRTasa de *Trypanosoma cruzi*, con sus ligandos hipoxantina y el PRPP (PDB_id 1TC2). Los ligandos se encuentran representados en varillas en color de átomos y el Mg^{2+} en color negro en esferas. Tomada de Sinha, S. C. y Smith, J. L. 2001.

El asa de unión al PPI tiene una conformación conservada en la familia de las PRTasas. Su ubicación, se encuentra adyacente al asa del PRPP. Aquí, hay un elemento clave de reconocimiento Mg^{2+} -PRPP, que consta de un péptido inusual cis (no prolina), entre el segundo y tercer residuo del asa del PPI (González-Segura, L. *et al.*, 2007).

El asa de unión al PRPP, es un motivo flexible que puede tener diferentes longitudes y es muy importante durante la catálisis (Henriksen, A. *et al.*, 1996).

En cuanto al sitio de unión del Mg^{2+} , al analizar la estructura del compuesto ternario, se observó que el ion metálico forma un complejo de coordinación octaédrico. Dos de estos enlaces pertenecen a los hidroxilos de la ribosa; dos más, pertenecen a los oxígenos de

la parte del difosfato; y finalmente, los dos restantes son dos moléculas de agua (González-Segura, L. *et al.*, 2007) Figura 12.

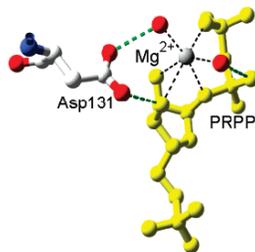


Figura 12. Interacción entre el ión Mg^{2+} , el PRPP y el residuo aspártico 131. Mg^{2+} (gris) PRPP (amarillo) y el residuo aspártico 131. Tomada y modificada de González-Segura, L. *et al.*, (2007).

Por último, el sitio de unión al AO se encuentra localizado entre la “cubierta” y la región central α/β de la proteína, (Figura 10). Por esta razón, la región podría ser determinante para la especificidad enzimática (González-Segura, L. *et al.*, 2007; Scapin, G. *et al.*, 1994)

1.9 Cambio conformacional de las OPRTasas

Las OPRTasas durante la reacción catalítica, pasan de una conformación abierta (forma apo) a una cerrada (con los sustratos unidos). En esta gran transición, el dominio de la cubierta y del asa flexible, son los que presentan mayor movimiento (González-Segura, L. *et al.*, 2007; Wang, G. P. *et al.*, 1999; Donini S. *et al.*, 2017).

El dominio de la cubierta rota para quedar sobre los ligandos. Esta rotación, sobre el OMP (en el complejo binario) es de 19.5° , mientras que, para el complejo ternario, fue de 24.6° en el caso de la OPRTasa de *S. cerevisiae* (Figura 13).

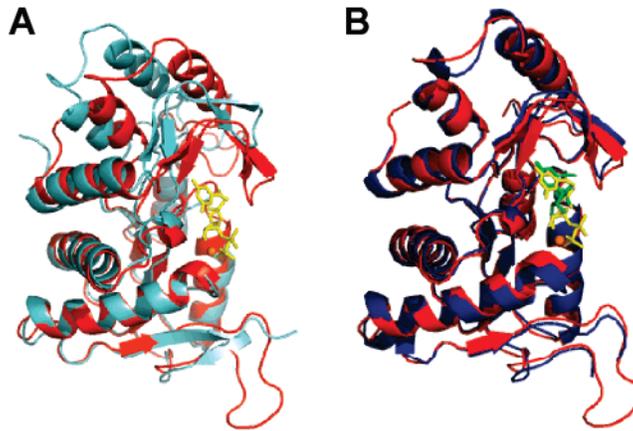


Figura 13. Superposición de los monómeros de OPRTasa de *S. cerevisiae*. A) OPRTasa apo (azul, PDB_id 2PRY) y el complejo ternario (rojo, PDB_id 2PS1); B) Complejo ternario (rojo, PDB_id 2PS1) y Complejo binario (azul, PDB_id 2PRZ). En color verde se muestra la molécula de OMP y el AO y el PRPP en color amarillo. El Mg^{2+} se muestra en esferas de color naranja. Tomada y modificada de González-Segura *et al.*, (2007)

Este gran cambio conformacional en el complejo ternario, provoca el secuestro de los sustratos para excluir a las moléculas de agua y, además, los posiciona para que reaccionen de una forma catalíticamente efectiva.

Cuando la enzima se encuentra en su estructura cerrada, el asa flexible tiene una estructura ordenada con el PRPP. Esto origina una apropiada orientación y proximidad, facilitando que el átomo N1 del OA ataque al C1 de la molécula de PRPP. Con la estructura cerrada, se logra estabilizar al estado de transición del oxocarbenio. Finalmente, los responsables de estabilizar esta estructura cerrada parecen ser el asa flexible, la molécula de PRPP y el dominio de la cubierta (González-Segura, L. *et al.*, 2007). Al unirse los sustratos, el asa flexible de una subunidad se extiende para actuar y cubrir el sitio activo formado por la subunidad vecina.

1.10 Orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (ODCasa)

La orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (ODCasa; EC 4.1.1.23) es de vital importancia para la vía de síntesis de pirimidinas. Esta enzima cataliza la descarboxilación de orotodina 5'-monofosfato (OMP) sin la dependencia de algún ion metálico o cofactor para dar como producto uridina-5'-monofosfato (UMP) (figura 14).

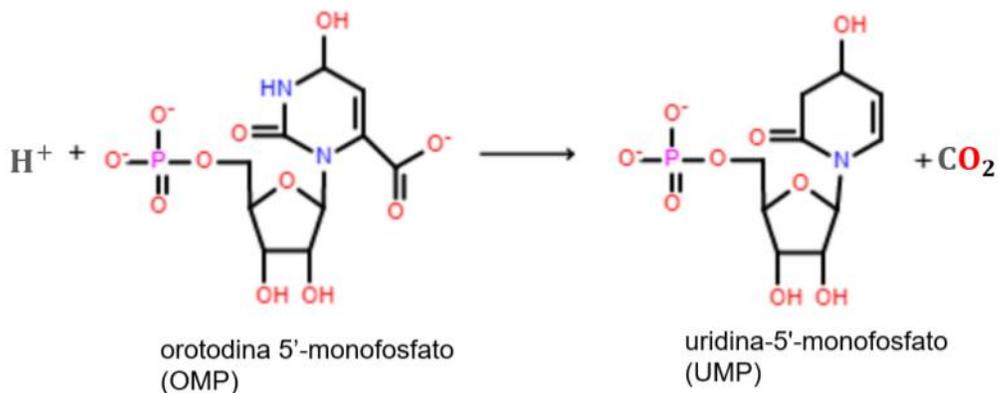


Figura 14. Reacción catalizada por la ODCasa

1.11 Mecanismo químico de la reacción catalizada por las ODCasas.

El mecanismo de la reacción catalizada por la ODCasa, no se ha determinado con certeza. Sin embargo, existen varias propuestas entre las cuales se pueden mencionar, el mecanismo ilida, el mecanismo de adición nucleofílica y la descarboxilación directa, como se muestra en la figura 15.

En cuanto al mecanismo tipos ilida (A), el oxígeno del carbonilo 2 se protona. Luego, hay un movimiento de electrones del N1 hacia el C2 y así, queda un grupo hidroxilo y un doble enlace entre el N1 y C2. Después, la inestabilidad de este intermediario ocasiona la salida del grupo carbonilo del C6, en el cual se añade un H^+ . Por otra parte, el mecanismo de adición nucleofílica (B), consiste en un ataque del nucleófilo (Nu) hacia uno de los C5 del doble enlace, lo cual resulta en una adición anti-Markovnikov.

El intermediario reactivo es inestable, por lo que el C6 pierde su carboxilo, y el par de electrones extra se desplazan hacia el C5, donde son entregados al Nu y finalmente, este es el grupo saliente.

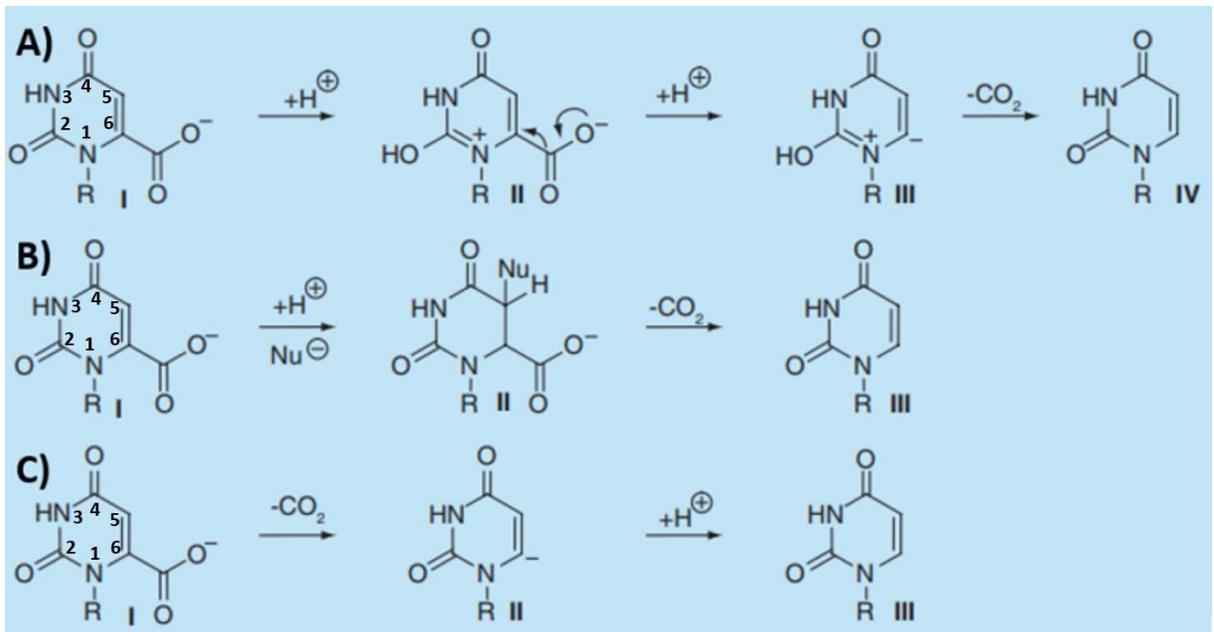


Figura 15. Mecanismos químicos de reacción propuestos para la ODCasa. A) Mecanismo ilida, B) mecanismo de adición nucleofílica y C) mecanismo de descarboxilación directa. Tomada y modificada de Mundra y Kotra, 2014.

Aunque los mecanismos anteriormente descritos tienen coherencia, el mecanismo con mayor evidencia es el de descarboxilación directa. Este mecanismo, es el que ha tenido una mayor aceptación después de conocer y analizar las estructuras cristalográficas de la enzima (Mundra, S. y Kotra, L. P.; Miller *et al.*, 2014; y Mojgan A. y Arie W. 2023).

En cuanto a la descarboxilación directa, se lleva a cabo como se muestra en la figura 16. El grupo carboxilo experimenta una repulsión al tener contacto cercano con los residuos aspártico 91 y aspártico 96 (numeración de la ODCasa de *S. cerevisiae*), lo cual causa una desestabilización del estado basal y facilita una descarboxilación directa. La lisina 93 (numeración de la ODCasa de *S. cerevisiae*) que se encuentra protonada, transfiere un protón al C6 para dar como producto al UMP (Wu N. *et al.*, 2000; Asadi, M., y Warshel, A. 2023.; y Mundra S. y Kotra L. P., 2014). Cabe señalar que todo el mecanismo se lleva a cabo de manera concertada (Rao, N., y Deshpande, P. 2015).

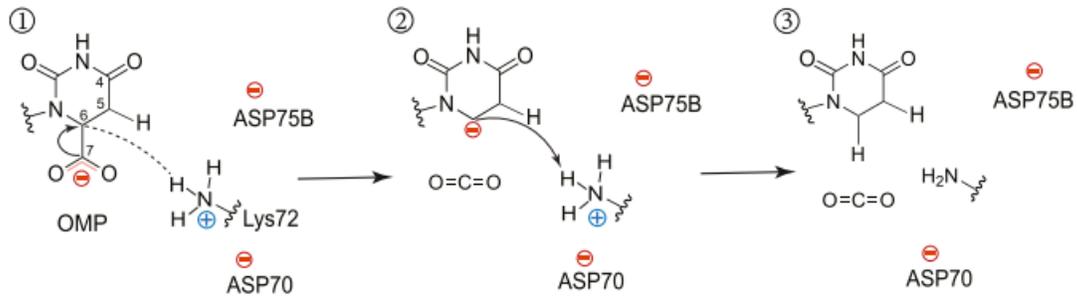


Figura 16. Mecanismo de reacción para la descarboxilación de un derivado del OMP por medio de la ODCasa. Los residuos corresponden a la estructura de *S. cerevisiae*. Tomada y modificada de Mojgan A. and Arieh W. 2023.

1.12 Propiedades cinéticas de la ODCasa

El mecanismo propuesto para la ODCasa de *S. cerevisiae* se puede observar en la figura 17. Porter, D. J., y Short, S. A. (2000), encontraron que la enzima existe como dímero, pero cada monómero actúa de manera independiente (Rao, N. and Deshpande, P. 2015).

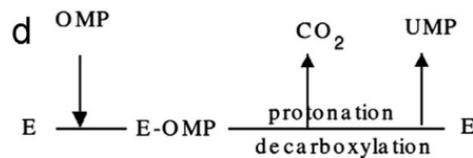


Figura 17. Mecanismo cinético de la descarboxilación del OMP por medio de la ODCasa de *S. cerevisiae*. Tomada y modificada de Rao, N. and Deshpande, P. (2015).

Las ODCasas son diferentes de otras descarboxilasas, ya que su actividad catalítica es independiente de la presencia de cualquier cofactor y además, no es necesaria la formación de ningún enlace covalente para que se lleve a cabo la catálisis. La ODCasa es capaz de llevar a cabo la descarboxilación de un sustrato en tan sólo un tiempo de vida media de 18 ms, mientras que esta misma reacción con la ausencia de la enzima, se llevaría a cabo en un tiempo de vida media de 78 millones de años en disolución neutra (Miller B. y Wolfenden, R. 2002).

Esta enzima es una de las que presenta mayor eficiencia catalítica, ya que puede mejorar la descarboxilación de un sustrato hasta por 17 órdenes de magnitud (Radzicka, A. y Wolfenden, R. 1995).

En cuanto a los parámetros cinéticos, la ODCasa de *Homo sapiens* tiene una K_m para el OMP de 16.6 ± 1.7 mM y una k_{cat} de 0.75 s⁻¹ y la de *S. cerevisiae*, K_m para el OMP de 0.7 mM y $k_{cat} = 44$ s⁻¹ (Wittmann, J. *et al.*, 2008).

Con base a esto se puede observar que la ODCasa de *Homo sapiens* no es tan eficiente en comparación con la de *S. cerevisiae*. Por esta razón, se cree que la UMPS de humano, tiene la OPRTasa y la ODCasa en una misma proteína, ya que así se puede canalizar el OMP producido por la OPRTasa directamente a la ODCasa y esto, incrementaría la eficiencia de la reacción total (Wittmann, J. *et al.*, 2008).

1.13 Estructura tridimensional de las ODCasas

Las ODCasas tienen un plegamiento tipo barril TIM o $(\beta\alpha)_8$, esta estructura consiste en 8 láminas β paralelas, las cuales forman el barril central que se encuentra rodeado de 8 hélices α . Las regiones que comprenden la estructura de las ODCasa son dos, como se muestra en la figura 18. La región de la cara catalítica, en la cual se encuentra el sitio activo, está formada por los extremos C-terminal de las láminas β y las asas que unen las láminas β y las hélices α ; y la región de la cara de estabilidad que, consiste en asas de unión de las hélices α con las láminas β subsecuentes. Ésta última región, es de vital importancia, ya que es la encargada de estabilizar el plegamiento de la estructura (Reinhard S. y Birte H. 2005).

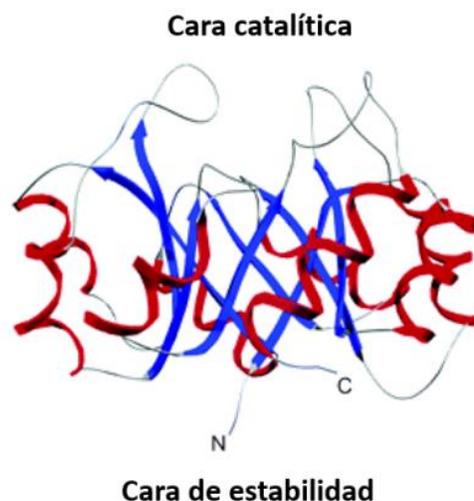


Figura 18. Estructura general de las ODCasas. Regiones de la cara catalítica y de la cara de estabilidad. (Tomada y modificada de Reinhard S. and Birte H. 2005).

En las ODCasas, las hélices α tienen una longitud aproximada de 6 a 15 residuos, mientras que las láminas β , constan de 4 a 8 residuos. Cabe señalar que aparte de las 8 hélices α y las 8 láminas β , también puede haber otras hélices α adicionales cortas, como en el caso de la ODCasa de *Bacillus subtilis*. En las figuras 19 y 20, se puede observar estas 3 hélices α adicionales, indicadas como $\alpha 2a$, $\alpha 5a$ y $\alpha 8a$.

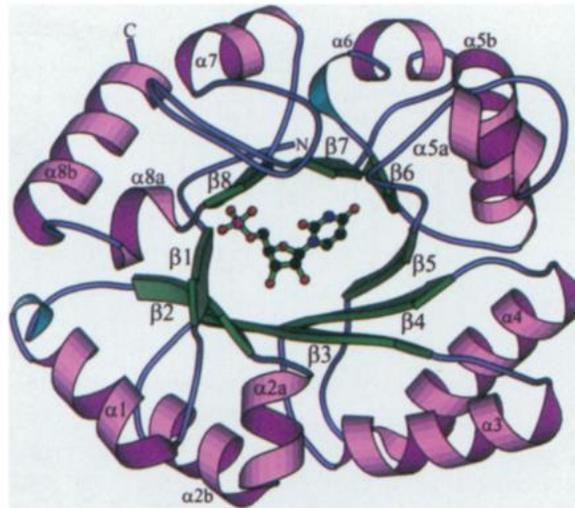


Figura 19. Estructura tridimensional de monómero de la ODCasa de *B. subtilis*. (PDB_id 1DBT) Las once hélices α están representadas en color morado, mientras que las 8 láminas β se muestran en color verde; en el sitio activo se encuentra, representado en modelo de varillas, al producto UMP (Tomada y modificada de Appleby T. *et al.*, 2000)

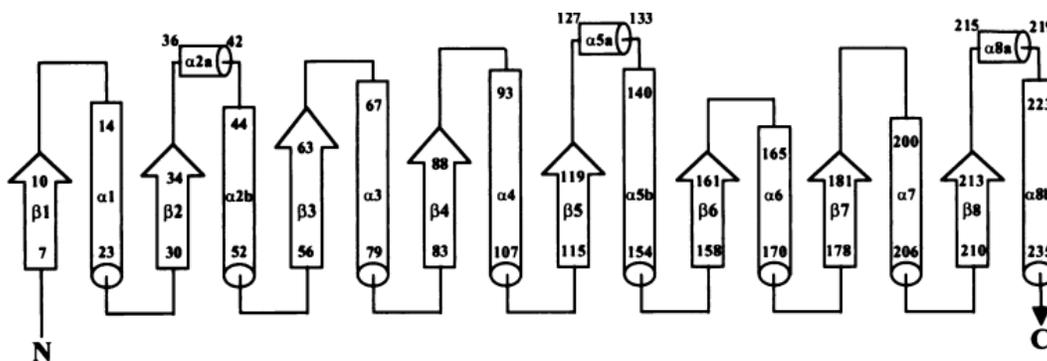


Figura 20. Diagrama de la topología de la ODCasa de *B. subtilis* (PDB_id 1DBT). Diagrama que consiste en 8 láminas β alternadas de 8 hélices α , además de que se encuentran 3 hélices α adicionales cortas, indicadas como $\alpha 2a$, $\alpha 5a$ y $\alpha 8a$. (Tomada y modificada de Appleby T. *et al.*, 2000).

1.15 Cambio conformacional de las ODCasas

La ODCasa tiene un dominio móvil, el cual es un asa que comprende los residuos 207-217, en la estructura de *S. cerevisiae*. Esta asa se encuentra desordenada en la estructura apo, mientras que, en la estructura unida al ligando, se observa un asa bien organizada como se muestra en la figura 21. Además, esta misma asa forma dos puentes de hidrógeno, uno del residuo de tirosina 217 hacia el grupo fosforilo y otro de la glutamina 215 hacia el O2 del anillo de pirimidina, tal como se observa en la figura 22. Este cambio conformacional causa que las asas 151-165 y 207-217, tengan contacto con el 6-hydroxiuridina 5'-fosfato (BMP), análogo del estado de transición, para excluir a las moléculas del disolvente. Por las razones anteriores, se considera que el grupo fosforilo es de vital importancia para el reconocimiento molecular del ligando y los posibles inhibidores (Miller, B. *et al.*, 2000)

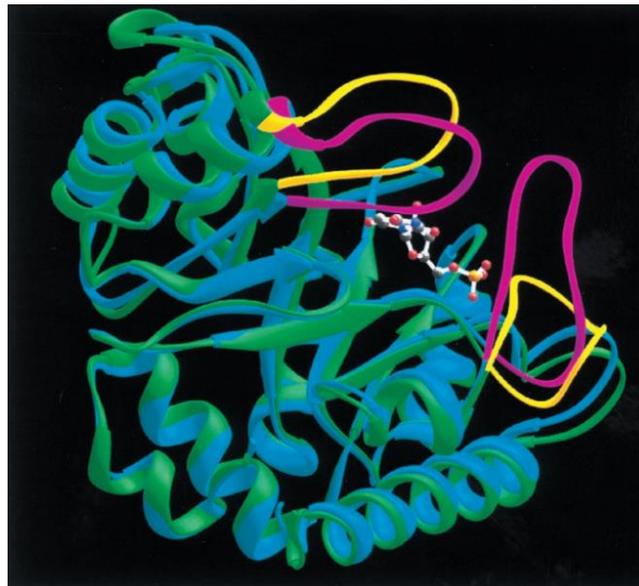


Figura 21. Superposición de la ODCasa de *S. cerevisiae* en su forma apo y con el BMP unido. La forma apo se encuentra en color verde y la que tiene el BMP (análogo del estado de transición) en color azul. (PDB_id 1DQW y 1DQX) El asa de la estructura apo (en color amarillo) se cierra para quedar como el asa que tiene contacto con el inhibidor (en color morado). Tomada de Miller, B. *et al.*, 2000.

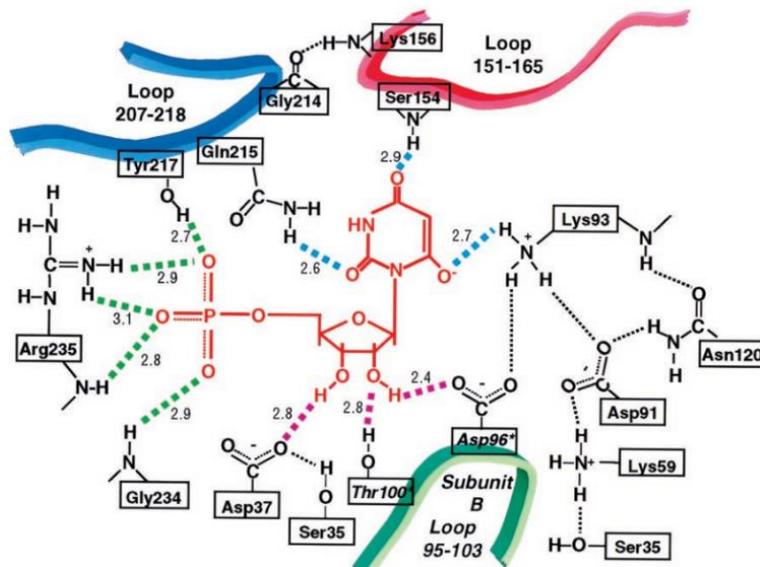


Figura 22. Residuos que participan en la unión del OMP en la ODCasa de *S. cerevisiae*. El OMP se muestra en color rojo. En azul se muestra el asa 207-218 en donde se encuentran los residuos que participan en la unión del OMP, principalmente la tirosina 217, en rojo el asa 151-165 y el asa 95-183 que corresponde a la subunidad B (verde). Figura tomada de Miller, B. *et al.*, 2000.

1.15 Importancia de las pirimidinas en plantas

La vía de síntesis *de novo*, es vital para la formación de nucleótidos de pirimidina, ya que son útiles para el metabolismo celular. Cuando se forma el UTP y el CTP que, son producto de esta vía, después son usados para la formación de RNA o DNA.

A la fecha se han realizado pocos estudios en plantas acerca de la síntesis y el metabolismo de purinas y pirimidinas. La mayoría siguen el destino metabólico de las purinas y pirimidinas marcadas radioactivamente, las cuales son fácilmente absorbidas por el tejido y en su parte, son degradados a CO_2 y NH_3 . Estos estudios han sido de gran utilidad para determinar la actividad de biosintética *de novo*, de salvamento y degradación de purinas y pirimidinas, durante las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas.

En sí no hay estudios enfocados en la ODCasa ni en la OPRTasa de plantas, pero sí en la UMPS, dentro de ellos está el de Santoso, D., y Thornburg, R. 1998, en donde estudiaron la UMPS de la planta de *Nicotiana plumbaginifolia*. Estos autores hicieron ensayos de inhibición catalítica, con el inhibidor de la UMPS, el ácido 5-fluoroorotico

(FOA) y encontraron que éste, deja a las células en condiciones de inanición de timina y, en consecuencia, hay muerte celular.

En otros estudios realizados en cultivos celulares de *Nicotiana plumbaginifolia* con el ácido 5-fluoroorótico, el cual es el inhibidor de la OPRTasa. Midieron la concentración de UMP producido. En este estudio, se encontró que la gran mayoría de las plantas presentaba niveles bajos de UMP, y otras cuantas, un nivel elevado de UMP, debido a un nivel alto del mRNA que codifica para dicha proteína, hablándose así de una sobreexpresión del gen de la UMPS (Santoso, D., y Thornburg, R. 2000).

También se realizaron estudios enfocados en temas como la maduración y germinación de embriones somáticos y zigóticos, organogénesis de brotes *in vitro*, desarrollo de órganos de almacenamiento, maduración del fruto y senescencia foliar (Stasolla, C. *et al.*, 2003).

Otros estudios relevantes, indican que para producir UMP, el dihidroorotato (DHO) debe ser transportado desde el cloroplasto hasta la mitocondria para que se convierta en ácido orótico (OA), el cual es el sustrato de la UMPS. Después, el ácido orótico debe regresar al cloroplasto donde el sustrato será convertido en UMP por la enzima UMPS (figura 23). (Kafer, C. *et al.*, 2004.)

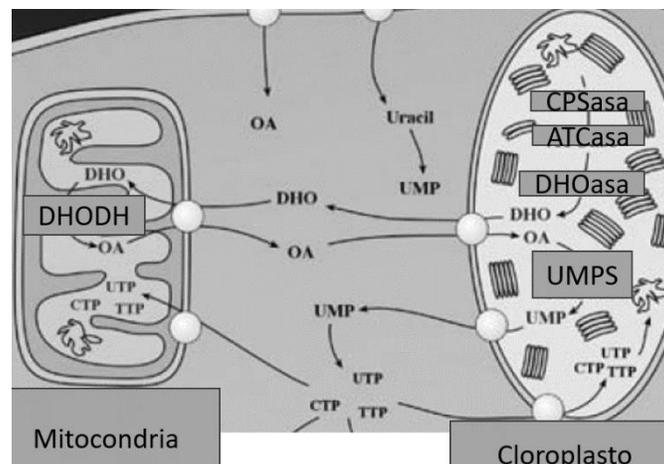


Figura 23. Vía de síntesis de novo de pirimidinas en compartimentos celulares. CPSasa: Carbamoil fosfato sintetasa; ATCasa: aspartato transcarbamilasa; DHOasa: Dihidroorotasa; DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa; OPRTasa: orotato fosforribosiltransferasa; y ODCasa: OMP descarboxilasa. Figura tomada y modificada de Kafer, C. *et al.*, 2004

Finalmente, Geigenberger, P. *et al.*, (2005), analizaron a la UMPS en tubérculos de papa, *Solanum tuberosum*, que estaban en germinación. Encontraron que cuando hay una disminución en la expresión de la UMPS, hay una expresión compensatoria de la uridina cinasa y la uracil fosforribosiltransferasa.

2 Planteamiento del problema

En años recientes, los precios bajos en el mercado mundial de café, aunados a la incidencia de la roya, provocaron una reducción de casi 50 % de la producción nacional. En el cultivo del café se tienen problemas fitosanitarios a través de todo el ciclo anual, a cualquier estrato y desde la emergencia de las plántulas. Además de la roya causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, existen otras enfermedades de carácter endémico que adquieren importancia regional ya que se presentan en alguna fase del cultivo y épocas marcadas que contribuyen a la limitación de desarrollo y producción de la planta tales como el ojo de gallo, mancha de hierro, el requemo de las hojas del café, broca del cafeto y la bacteriosis en vivero o quemadura bacteriana. Esta última es causada por la bacteria *Pseudomonas cichorii*.

Qi, Z. *et. al.*, 2016, caracterizaron a Ura5, la cual es la OPRTasa del hongo patógeno de plantas *Magnaporthe oryzae* (*MoPyr5*). En mutantes deficientes de *MoPyr5*, observaron que esta enzima es esencial para el crecimiento micelial, penetración en los tejidos de la planta, crecimiento de las hifas y la patogenicidad. Consecuentemente, procedieron a añadir UMP exógeno, el cual restauró el crecimiento vegetativo y rescató el defecto en la patogenicidad sobre las vainas y hojas de arroz. Estos resultados muestran que *MoPyr5* es una OPRTasa importante para la biosíntesis de UMP en *M. oryzae* y está estrechamente relacionada con la patogenicidad del hongo. Además, sugieren que la inhibición en la biosíntesis de UMP por medio de la OPRTasa, sería un buen blanco para el desarrollo de fungicidas en contra del hongo *M. oryzae*.

Estudios previos realizados con bacterias (Niazy, A. y Hughes, L. 2015), parásitos (Donini, S. *et al.*, 2017) y protozoarios (French, J. *et al.*, 2011) han demostrado la importancia de la vía de síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina y su influencia

en la virulencia bacteriana. En el caso particular de *Pseudomonas aeruginosa* se ha demostrado que la carencia de la OPRTasa reduce su virulencia (Niazy, A. y Hughes, L. 2015).

Cabe señalar que la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina es de vital importancia cuando la demanda de estos nucleótidos es alta, por ejemplo, durante la replicación celular, tanto del patógeno como del hospedero (Lewis, M. *et al.*, 2011). Es por esta razón que la ODCasa ha sido objeto de estudio, ya que se busca su inhibición para erradicar la proliferación de organismos patógenos en un hospedero (Lewis, M. *et al.*, 2011; Thirumalairajan, S. *et al.*, 2010; y Jeffrey A. *et al.*, 1999).

Con el fin de combatir a las infecciones bacterianas en *Coffea arabica*, es necesario conocer los mecanismos de crecimiento de estas bacterias, así como los mecanismos que hay en el hospedero que permiten su proliferación. Uno de estos mecanismos, es el involucrado en la síntesis de pirimidinas por la vía *de novo*.

Por lo anterior, se considera necesario conocer la estructura tridimensional y el funcionamiento de la UMPS (OPRTasa y ODCasa) de *Coffea arabica*, para compararla con la de sus patógenos y así, poder proponer un potencial fármaco que combata la proliferación de estos organismos.

3 Objetivo general

Caracterizar funcional y estructuralmente a la UMP sintasa de *Coffea arabica* (CaUMPS), la cual comprende a la orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa) y a la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (ODCasa).

4 Objetivos específicos

- Inducir la sobreexpresión de la CaUMPS en células competentes BL21 pGro7, con el fin de obtener a la CaUMPS recombinante pura a homogeneidad y activa.

- Determinar algunos parámetros fisicoquímicos y cinéticos de la CaOPRTasa purificada (peso molecular de la subunidad y de la proteína nativa, estructura cuaternaria, valores de K_m para los sustratos y V_{max}).
- Determinar la estructura tridimensional de la CaUMPS por difracción de rayos X.

5 Materiales y métodos

5.1 Transformación de las células BL21pGro7 con el vector pET28b-CaUMPS

La transformación bacteriana se realizó mediante el método de choque térmico, para lo cual se utilizaron células competentes de la cepa BL21pGro7 de *E. coli*, la cual contiene un complejo de chaperonas GroEL-GroES y el vector pET28b-CaUMPS. Este plásmido fue sintetizado comercialmente por la compañía GenScript y posee la secuencia del gen que codifica para la UMP sintasa de *Coffea arabica* (CaUMPS), que contiene a las enzimas OPRTasa y ODCasa entre los sitios de *NdeI* y *XhoI* del sitio de clonación múltiple del vector pET28b. Este plásmido permite producir una proteína con una etiqueta de histidinas en el amino terminal, lo cual facilita su purificación en una columna de afinidad a iones níquel. Se transformaron 100 μ L de células de la cepa BL21pGro7, añadiendo 2 μ L del vector pET28b-CaUMP-sintasa, se mezcló invirtiendo el tubo para después dejarlo en hielo por 30 min. Posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, sin agitar. Luego, se agregaron 450 μ L de medio Luria-Bertani (LB) y las células se incubaron por 60 minutos a 37 °C con agitación (225-250 rpm). Después de este tiempo, las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 μ L de medio LB. Posteriormente estas bacterias se esparcieron en las cajas con el medio de selección (Agar-LB-kanamicina) con ayuda de una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 37 °C toda la noche. Al siguiente día se corroboró la existencia de colonias aisladas, las cuales fueron utilizadas para la obtención de la CaUMPS.

Se seleccionaron tres clonas, las cuales fueron crecidas a 37°C toda la noche, en 5 mL de LB con 50 μ g/mL de kanamicina y 34 μ g/mL de cloranfenicol. Posteriormente, se

extrajo el plásmido pET28b-CaUMPS utilizando un kit comercial y se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM.

5.2 Sobreexpresión y producción de la enzima recombinante CaUMPS en células de *E. coli* BL21pGro7

Luego de comprobar la existencia del gen de la CaUMPS en la clona 1, se procedió a crecer estas células en 200 mL de medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, a 37°C durante toda la noche con agitación a 220 rpm. Posteriormente, se tomaron 20 mL de estas bacterias para inocular 500 mL de LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y 1 mg/mL de arabinosa y se dejaron crecer a 37°C con agitación de 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6. Posteriormente, se agregó isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM y se dejaron 20 horas a 15 °C.

Cabe señalar que se seleccionaron estas condiciones ya que previamente, se realizaron pruebas de sobreexpresión dentro de un rango de temperatura de 15-37 °C, en un intervalo de 15-20 horas y con IPTG 0.5-1.0 mM, y como resultado se observó que la mejor condición fue la de 20 horas a 15 °C y con IPTG 0.5 mM.

Finalmente, las bacterias se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se guardó a -70°C.

5.3 Purificación de la CaUMPS recombinante

Las células fueron lisadas en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y glicerol 10% usando un sonicador. La ruptura de las células se llevó a cabo en intervalos de 20 s encendido y 20 s apagado para completar un tiempo total de 15 min de sonicación a una amplitud de 29%. El lisado fue clarificado por centrifugación a 15,000 rpm por 20 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de cromatografía de afinidad de níquel (Ni-TED Protino) de 10 mL previamente equilibrada con 100 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, después se realizaron dos lavados de 100 ml cada uno utilizando en el mismo amortiguador. Para separar a la CaUMPS del complejo GroEL-GroES, se llevó a cabo un segundo lavado al cual se le adicionó ATP 5 mM y MgCl₂ 10 mM al amortiguador, en este paso se dejó a la CaUMPS unida a la resina en presencia de este amortiguador

toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados adicionales de 100 mL cada uno con un amortiguador que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, glicerol 10% e imidazol 40 mM. Finalmente, la proteína se eluyó utilizando el amortiguador anterior adicionado con imidazol 300 mM.

Las fracciones que contenían a la CaUMPS se concentraron usando un filtro Ultra 30 (Millipore, Alemania). Posteriormente esta muestra se sometió a otro paso de purificación utilizando una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 HR-10/30. La columna se equilibró con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol 10%. La proteína se eluyó a temperatura ambiente utilizando el mismo amortiguador. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente usando la absorptividad molar de las proteínas a 280 nm deducida a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando el método de Gill y von Hippel, 1989 y por el método de Bradford (1976).

La pureza de la enzima se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Cabe señalar que, con el fin de comparar los resultados de purificar a la CaUMPS con dos amortiguadores diferentes, se repitió lo anterior con HEPES de la siguiente manera. La preparación del amortiguador para la lisis celular, hasta la elución por la columna Ni-TED Protino, se realizó con HEPES 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM y glicerol 10%; mientras que los lavados, la concentración de la CaUMPS con los filtros Ultra 30 (Millipore, Alemania) y la cromatografía de exclusión molecular se realizaron utilizando el amortiguador HEPES 20 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%.

5.4 Ensayos enzimáticos y determinación de los parámetros cinéticos

La actividad de la CaOPRTasa se determinó espectrofotométricamente, monitoreando la disminución de la absorbancia a 295 nm causada por la conversión del ácido orótico ($\epsilon_{295}=3950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a orotidina-5'-monofosfato (OMP). Se utilizó una mezcla de reacción que contenía 5 mM MgCl_2 , 50 mM ácido orótico variando la concentración de PRPP de 10 a 300 μM (Sigma Aldrich) en un amortiguador 500 mM HEPES a pH 8.0 (Donini, S. *et al.*, 2017). Los ensayos fueron iniciados al agregar la enzima y las mediciones de

actividad se realizaron por triplicado. Los datos de velocidad inicial se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1):

$$V_0 = \frac{V_*[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ecuación 1}),$$

en donde la [S] es la concentración de sustrato variable, K_m es la concentración de sustrato a la que se tiene la mitad de la velocidad máxima y V es la velocidad máxima.

En los estudios para obtener los patrones de velocidad inicial, se varió la concentración del PRPP y se mantuvo la concentración fija-variable del OA. Los datos fueron analizados mediante un ajuste de regresión no lineal a cada una de las curvas, con el fin de obtener parcialmente el mecanismo cinético. Los datos de velocidad inicial (V_0) obtenidos se ajustaron de forma global a la ecuación correspondiente a un mecanismo tipo Bi-Bi al azar (ecuación 2).

$$V_0 = \frac{V_*[\text{PRPP}][\text{OA}]}{K_A[\text{OA}] + K_B[\text{PRPP}] + [\text{PRPP}][\text{OA}]} \quad (\text{Ecuación 2}),$$

en donde K_A y K_B son las constantes de Michaelis-Menten para el PRPP y el OA, respectivamente.

La actividad de la CaODCasa se determinó al medir espectrofotométricamente a 30 °C, el decremento en la absorbancia a 279 nm ($\epsilon = 2400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), el cual es causado por la descarboxilación del OMP en una mezcla de 1 mL que contenía 100 mM de HEPES, pH 8.0, OMP 50 μM (Wittmann, J. G. *et al.*, 2008). Una unidad de actividad está definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de OMP en UMP por minuto. Todas las unidades de actividad fueron corregidas a mg de proteína usada. Los datos de velocidad inicial se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se analizaron mediante regresión no lineal.

5.5 Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de la CaUMPS fue obtenido al realizarse un barrido de la proteína, en un intervalo en la región del ultravioleta lejano (195-260 nm) a 25°C, utilizando una celda con un paso de luz de 0.1 cm en un espectropolarímetro de dicroísmo circular modelo Chirascan (Marca Applied Photophysics) que contiene un baño de recirculación. La proteína, se preparó a una concentración de 0.15 mg/mL en un amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol 10%. Los espectros, se realizaron en intervalos de 1 nm cada 2 s. El espectro fue el resultado del promedio de 4 barridos y este se corrigió restando el espectro promedio del amortiguador.

5.6 Ensayos de estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la CaUMPS recombinante se llevó a cabo midiendo el cambio en la intensidad de fluorescencia del colorante Sypro Orange (Sigma-Adrich) durante el desplegamiento térmico de la CaUMPS. Los ensayos se realizaron a una concentración de 0.84 µg/µL utilizando los amortiguadores Tris 20 mM pH 8.0 NaCl 300 mM y HEPES 20 mM, pH 8.0 y NaCl 300 mM. Estos ensayos de desnaturalización térmica se llevaron a cabo utilizando el equipo de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

5.7 Obtención de cristales de la CaUMPS

La CaUMPS se cristalizó utilizando el método de difusión de vapor en la modalidad de gota apoyada con gotas de 2 µl de proteína (10 mg/ml) y 2 µl de solución precipitante (González-Segura L, *et al.*, 2007). Las pruebas de cristalización se realizaron utilizando los kits de cristalización de la compañía Hampton Research (Aliso Viejo, CA) y de Jena Bioscience. Los cristales fueron crecidos a una temperatura de 18° C en presencia del ácido orótico 2.5 mM, PRPP 5 mM y Mg²⁺ 5 mM.

5.8 Difracción de los cristales por rayos X y procesamiento de datos

Los cristales obtenidos fueron difractados en el sincrotrón *Advanced Photon Source*, Argonne, Illinois, Estados Unidos. Para el procesamiento de los datos obtenidos se usaron los programas XDS (Kabsch, 2010) y CCP4 (Collaborative, 1994). Las estructuras se determinaron por el método de reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y como molde se utilizó un modelo obtenido por medio de AlphaFold 2.0. Los diferentes ciclos de afinamiento se llevaron a cabo utilizando el programa Phenix (Adams *et al.*, 2002). La inspección visual y las correcciones manuales de las estructuras resultantes se realizaron con el programa Coot (Emsley y Cowtan, 2004).

5.9 Análisis de las estructuras tridimensionales

La visualización de las estructuras tridimensionales se realizó con los programas computacionales Coot, PyMOL (<http://www.pymol.org>) y Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

6 Resultados y discusión

Transformación de células BL21pGro7 con el vector pET28b-CaUMPS

Se transformaron las células de *E. coli* BL21pGro7 con el vector pET28b-CaUMPS (figura 24) que contiene el gen que codifica para la proteína bifuncional CaUMPS, la cual comprende dos dominios, CaOPRTasa en el N-terminal y CaODCasa en el C-terminal (figura 25). Se seleccionaron 3 clonas que crecieron en kanamicina y cloranfenicol, a las cuales se les extrajo el plásmido para enviarlo a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM. Después de secuenciar el plásmido, se comprobó la existencia del gen de la CaUMP-sintasa en la clona 1.

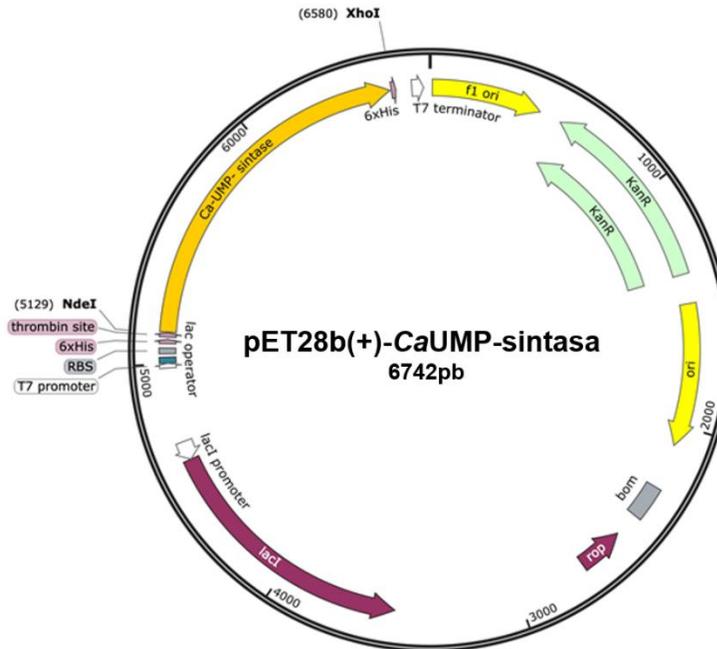


Figura 24. Mapa del vector recombinante pET28b-CaUMPS. La secuencia del gen que codifica para la CaUMPS se encuentra entre los sitios NdeI y XhoI.

MSSSSSSVSSTMENLILQLHDISAVKFGNFKLKSGISSPIYIDLRLIVSYPTLLRQISQTLVSTLPTSTRY
 DVVCGVPYTALPIATCVSVANNIPMLMRRKEVKDYGTAKAIEGAFEPNQICLIIEDLVTSGASVLETASP
 LRHAGLKVTDAAVMIDREQGGRENLAENGITLHSMVKLTEMVRILKEKGRVSEETEKMMVMQFLEENR
 KVAVPVAAPEKVKFRLPYGERVRLAKNPTGKKLFEIMIQTETNLCLAADVATAAELLDIADKVGPEICM
 LKTHVDILPDFTPDFGSKLRSIAEKHNFLIFEDRKFADIGNTVTMQYEGGIFKILDWADIVNAHIVSGPGI
 VDGLKLGKLPGRGRLLLAEMSSSGNFAKGDYTA AAVKIAEGHSDFVIGFISVNPASWPSGPGNPALI
 HATPGVQLAKGGDALGQQYNTPFVVISERGSIIIVGRGIIKAANPAEVAREYRLQGWDAYLLHCK

Figura 25. Secuencia de aminoácidos de la CaUMPS. Secuencia de la CaOPRTasa (N-terminal) se muestra en color rojo, mientras que la secuencia para la CaODCasa (C-terminal) en color gris.

Sobreexpresión del gen CaUMPS y producción de la enzima recombinante CaUMPS en células de *E. coli* BL21pGro7

La primera prueba de sobreexpresión se llevó a cabo utilizando IPTG 1 mM durante 20 horas a 15 °C en las células BL21pGro7 en un cultivo de 5 mL El cultivo se centrifugó, el sobrenadante y se procedió a resuspender las células en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, para después, proceder a lisarlas y a

centrifugarlas. A partir de la secuencia de aminoácidos de la CaUMPS y utilizando el servidor *ExPASy* la herramienta *ProtParam* (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>), se determinó que la masa molecular para esta enzima, en su forma monomérica, es de 52.36 kDa. En la Figura 26, podemos observar en el lisado bacteriano una banda enriquecida en presencia de IPTG que, corresponde a la CaUMPS recombinante (52 kDa). También, podemos observar otras dos bandas enriquecidas que probablemente pueden corresponder a GroEL (60 kDa) y a GroES (10 kDa).

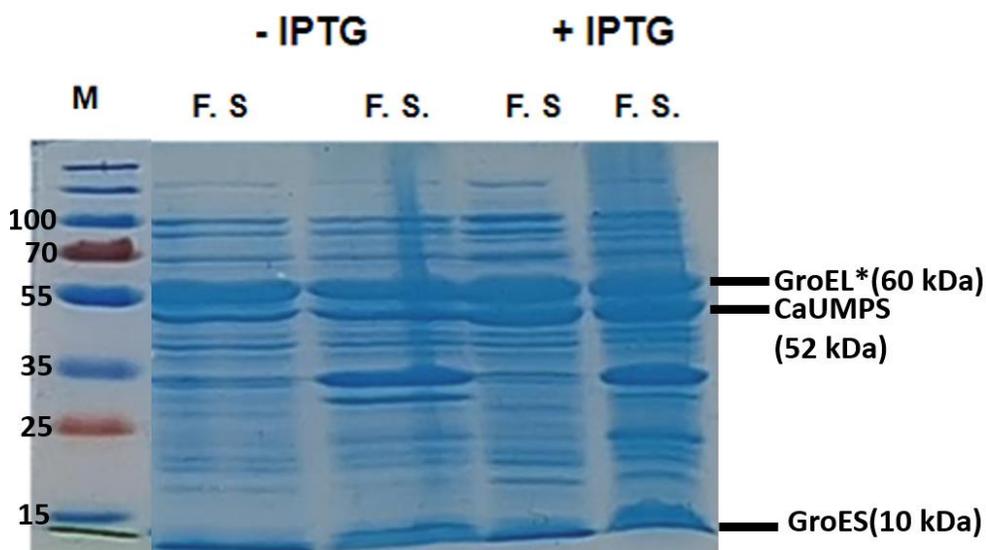


Figura 26. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del ensayo de sobreexpresión de la CaUMPS en *E. coli* BL21pGro7. Abreviaturas: fracción soluble (FS), marcador de peso molecular (M) y CaUMPS. *Se presume la posible presencia de GroEL, ya que, durante la sobreexpresión del gen, al medio de cultivo de las bacterias *E. coli* BL21pGro7 se les añadió arabinosa.

Purificación de la CaUMPS

El sobrenadante producto del lisado y la centrifugación se aplicó en la resina Ni-TED Protino previamente equilibrada con 100 mL de Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0 y glicerol al 10%. Después, se le hizo un primer lavado (L1) a la resina con 100 mL del mismo amortiguador y se realizó otro lavado con el amortiguador mencionado anteriormente adicionado con ATP 5 mM y MgCl₂ 10 mM (L2). En este paso se dejó a la CaUMPS unida a la resina en presencia de este amortiguador toda la noche. Posteriormente, se hicieron 2 lavados con 100 mL cada uno de Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0, glicerol al 10% e imidazol 40 mM (L3 y L4, respectivamente). Para eluir, se

añadieron 100 mL de Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0, glicerol al 10% e imidazol 300 mM y se colectaron 10 fracciones de 10 mL cada una (F1N-F10N).

Las fracciones 1 y 2 provenientes de la cromatografía Ni-TED Protino se juntaron (F1N y F2N), para ser concentrados y lavados en un tubo Amicon con corte de 30 kDa. Las fracciones concentradas fueron lavadas con 10 mL de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0 y glicerol al 10%. Finalmente, después de la cromatografía de afinidad se comprobó la pureza de la enzima al realizar un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Cabe señalar que sólo se escogieron las fracciones F1N y F2N, ya que, a partir de la tercera fracción, la banda que pertenece a la CaUMPS, se desvanece considerablemente.

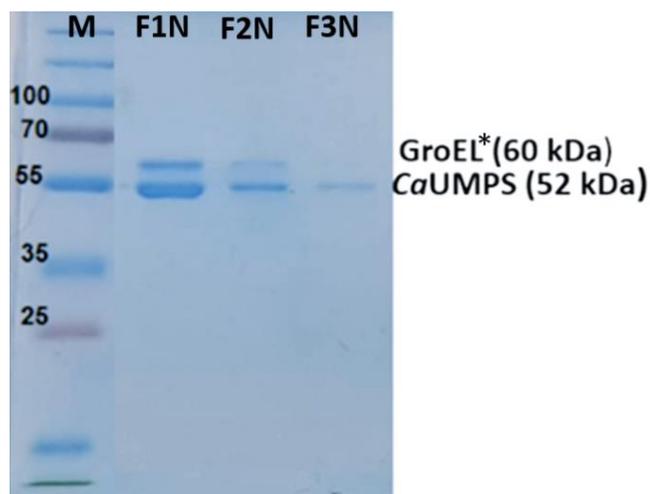


Figura 27. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del resultado de la purificación de la CaUMPS, mediante el uso de la resina Ni-TED Protino. Marcador (M), fracción 1, 2 y 3 producto de la cromatografía de afinidad Ni-TED Protino (F1N, F2N y F3N). *La posible presencia de GroEL

En la figura 27 se puede observar una banda enriquecida a 52 kDa que corresponde a la CaUMPS en las fracciones obtenidas por la Ni-TED Protino (fracciones F1N, F2N y F3N). Además de esta banda se observa otra banda de un peso molecular de 60 kDa, la cual probablemente corresponde a la proteína GroEL. Esta proteína fue eliminada al pasar a la CaUMPS por la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200, tal como se muestra en la figura 28 (fracciones F1S y F2S).

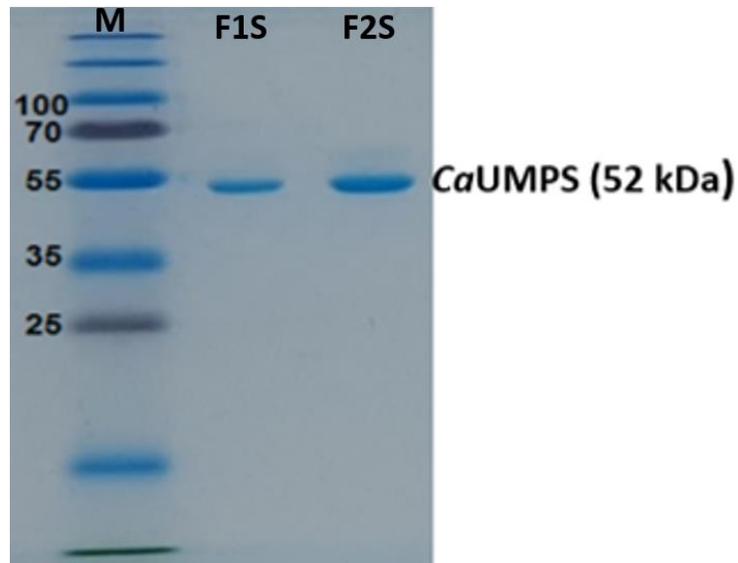


Figura 28. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del resultado de la purificación de la CaUMPS, mediante el uso de la cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 HR-10/30. Marcador (M), fracción 1 y 2 producto de la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 (F1S y F2S).

Los resultados de la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) se muestran en la figura 29.

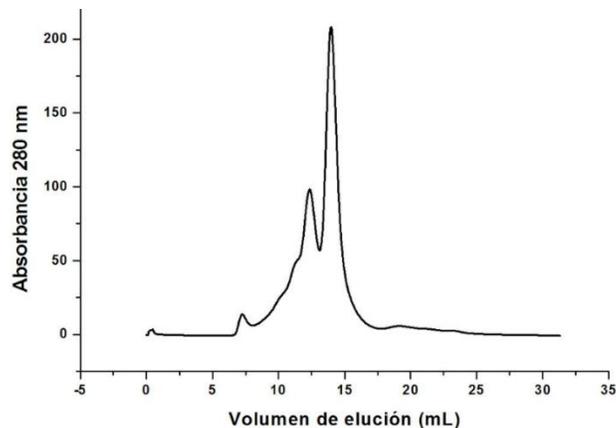


Figura 29. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200, para la CaUMPS. Purificación con Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0 y glicerol al 10%.

En este perfil de elución, se pueden observar dos picos, el primero con un volumen de elución de 12 ml y el segundo pico que corresponde a un volumen de elución de

aproximadamente 15 mL, el cual es simétrico y más abundante que el primero. De acuerdo con la curva de calibración utilizada, este segundo es el de una proteína de un peso molecular de 108 kDa, lo que corresponde a un dímero de la CaUMPS, la cual viene acompañada de otro pico, probablemente pueda ser la presencia de otra proteína como GroEL.

El rendimiento obtenido en la purificación de la CaUMPS a partir de 2 litros de cultivo de *E. coli* BL21p7Gro fue de 5.31 mg de proteína pura (Tabla 1). Cabe mencionar que, para otras proteínas reportadas en la literatura, como en el caso de la OPRTasa de *Mycobacterium tuberculosis* (MtOPRTasa) el rendimiento fue de 2.2 mg por litro de cultivo (Breda, A. *et al.*, 2012). Al hacer el comparativo, podemos ver que, para el caso de la CaUMPS, obtenemos 2.65 mg por un litro, lo cual nos indica una cantidad de proteína ligeramente mayor a la obtenida para MtOPRTasa.

Tabla 1. Purificación de la CaUMPS en amortiguador Tris a partir de 2L de cultivo. Purificación con el amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM y NaCl 100 mM desde la lisis hasta la elución por la columna Ni-TED Protino y Tris-HCl 50 mM con NaCl 300 mM previo a la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200). Cabe señalar que como volumen final, obtuvimos 3 fracciones de 1 mL cada una.

	Proteína total [mg]	Actividad total [U]	Actividad específica [U/mg]	Rendimiento [%]	Veces de purificación
Extracto crudo	1536.00	209.62	0.14	100.00	1.00
Ni-TED Protino	40.15	120.76	3.01	57.61	22.04
Superdex 200	5.31	24.88	4.69	11.87	34.33

Propiedades estructurales de la CaUMPS

El plegamiento correcto de la CaUMPS recombinante se comprobó por dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en la región del UV lejano (195-260 nm). Para ello, se tomaron las fracciones correspondientes a los 15 mL del volumen de elución de la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200), la

proteína se diluyó hasta alcanzar una concentración de 0.15 mg/mL. Los espectros se realizaron a 25 °C, la línea base fue obtenida utilizando el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%, en el que se encontraba la enzima. El espectro que se observa en la figura 30 fue el resultado del promedio de 4 barridos, el cual se corrigió restando el espectro promedio del amortiguador.

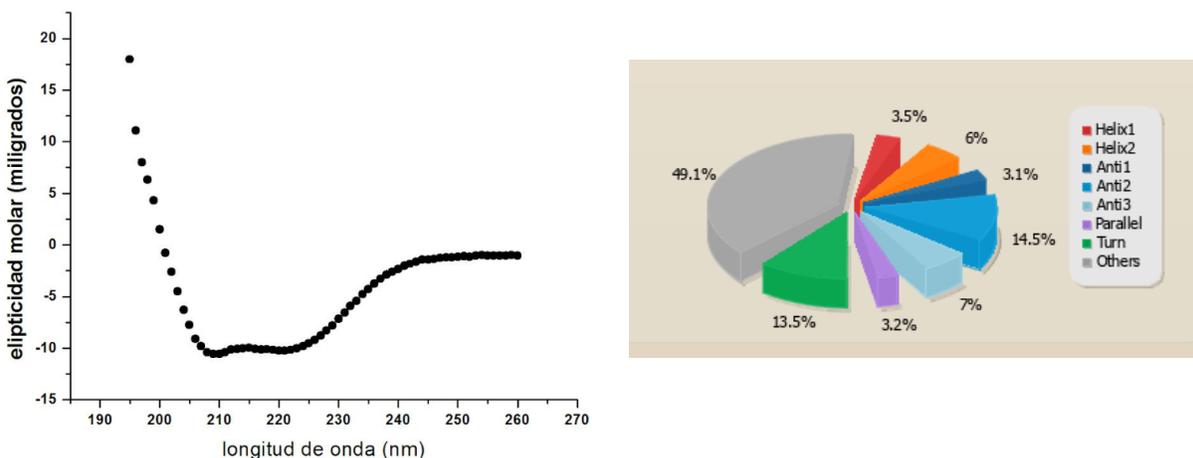


Figura 30. Espectro de dicroísmo circular para la CaUMPS. A) La proteína se preparó a una concentración de 0.15 mg/mL, en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%. Los espectros se realizaron en intervalos de 1 nm cada 2 s. El espectro final fue el resultado del promedio de 4 barridos y se corrigió restando el espectro promedio del amortiguador. B) Análisis de estructura secundaria mediante BESTSEL v1.3 Helix1 (hélices regulares), Helix2 (hélices regulares), Anti1 (hojas β antiparalelas torcidas a la izquierda), Anti2 (hojas β antiparalelas relajadas), Anti3 (hojas β antiparalelas torcidas a la derecha), Parallel (hojas β paralelas), turn (giros), others (otros).

En la figura 30A, podemos observar la contribución que tiene las estructuras secundarias de la CaUMPS a la elipticidad molar, cerca de 195-205 nm existe una disminución abrupta de la elipticidad molar, la cual nos indica que hay presencia de hélices alfa en la proteína. Por otra parte, cerca de la región de 220 nm, se observa que la curvatura típica para las hélices alfa no está tan pronunciada, debido a la contribución por parte de las láminas beta. Estos resultados nos indican que la CaUMPS recombinante se encuentra plegada debido a la presencia de estructuras secundarias. En la figura 30B se observa el contenido estimado de estructura secundaria mediante BETSEL v1.3. La CaUMPS presenta un estimado de hélices α de 9.5%, hojas β antiparalelas de 24.6%, hojas β paralelas de 3.2%, giros de 13.5% y otros de 49.1%.

Estabilidad de la CaUMPS en amortiguador Tris

Los resultados de diroísmo circular mostraron que la CaUMPS se encuentra plegada, sin embargo, con el paso de sólo 15 minutos, la enzima se vuelve inestable ya que se empieza a observar la formación de pequeños agregados.

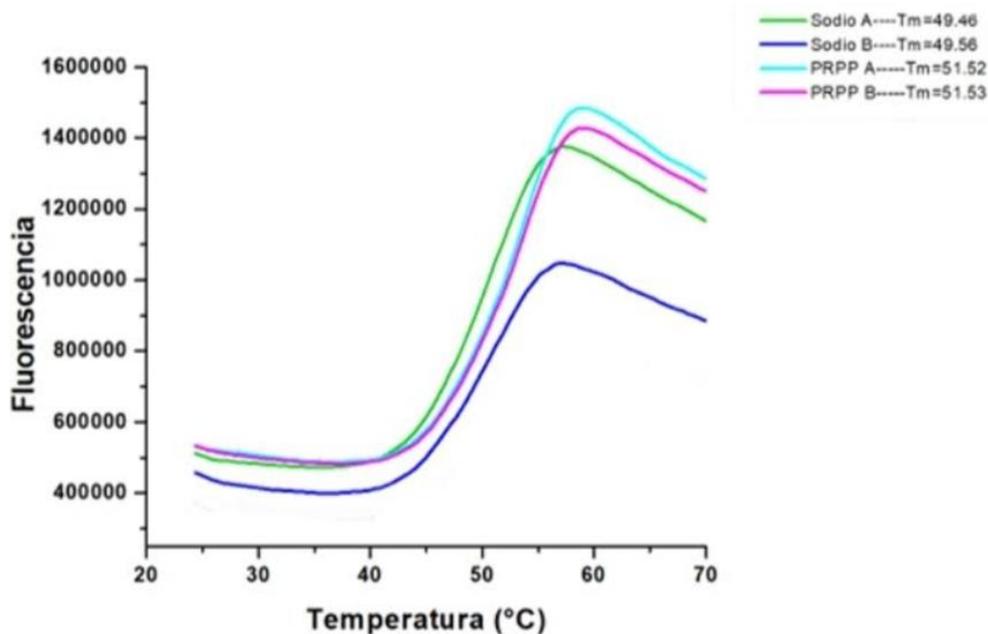


Figura 31. Desnaturalización térmica de la CaUMPS en Tris 20 mM pH 8.0 NaCl 300 mM. La desnaturalización se monitoreó por medio de la fluorescencia en el equipo Thermal Shift, usando como colorante Sypro Orange (Sigma-Adrich). Las líneas verde y azul muestran a la proteína en presencia de NaCl 300 mM y las líneas cian y magenta, en presencia de PRPP 0.2 mM.

Los resultados de los ensayos de estabilidad térmica llevados a cabo en la CaUMPS utilizando el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y NaCl 300 mM (figura 31), muestran que en aproximadamente 49 °C la proteína se empieza desplegar y esta se agrega a los 55 °C. Mientras que en presencia de PRPP 0.2 mM la temperatura media se desplaza a 51.5 °C y esta se despliega a los 58°C, por lo que el PRPP, ligando del dominio de la CaOPRTasa estabiliza ligeramente a la CaUMPS.

Purificación de la CaUMPS en amortiguador HEPES

Debido a que se requiere de una enzima muy estable para la cristalización se llevó a cabo un cambio de amortiguador de Tris por HEPES. El cambio se realizó desde el buffer de lisis hasta la elución por la columna Ni-TED protino, en donde se utilizó el amortiguador HEPES 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM y al glicerol 10%; mientras que para el concentrado y lavado previo a la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200), se usó el amortiguador HEPES 20 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%.

Después de haber obtenido las fracciones de elución F2N, F3N y F4N, de la cromatografía de afinidad Ni-TED Protino, se concentraron en un tubo Amicon de 30 kDa hasta alcanzar un volumen de 500 μ L, para después pasar la proteína a través de una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200). Como resultado, se obtuvo el perfil de elución mostrado en la figura 32.

Como se puede observar en este perfil de elución, hay un pico bien definido el cual es simétrico cerca de los 15 mL de elución, lo cual indica que la proteína está pura.

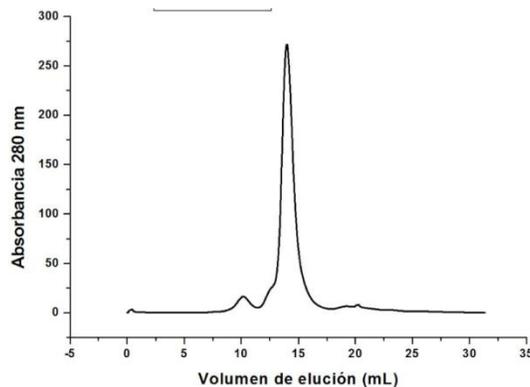


Figura 32. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) de la CaUMPS purificada con amortiguador HEPES. Purificación con el amortiguador que contiene HEPES 20 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%.

Las fracciones de elución obtenidas de las cromatografías de afinidad Ni-TED Protino y de exclusión molecular Superdex 200, fueron llevadas a un gel de poliacrilamida al 15% SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes (figura 33).

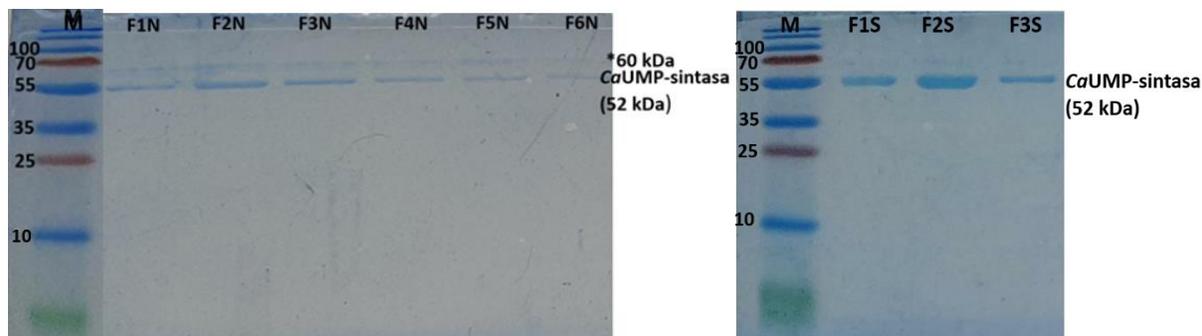


Figura 33. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%, purificación de la CaUMPS, utilizando el amortiguador HEPES. Marcador (M), fracción 1, 2, 3, 4, 5 y 6, producto de la cromatografía de afinidad Ni-TED Protino (F1N, F2N, F3N, F4N, F5N Y F6N); y fracción 1, 2 y 3 producto de la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 (F1S, F2S Y F3S).

En la figura 33, se puede observar una banda enriquecida de 52 kDa que corresponde al peso molecular calculado para la CaUMPS en las fracciones obtenidas de la Ni-TED Protino (fracciones F1N a la F6N), aunque la muestra contenía una banda de aproximadamente 60 kDa que puede corresponder a GroEL. Esta proteína de 60 kDa fue prácticamente eliminada al pasar la proteína por la cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 (fracciones F1S, F2S y F3S).

Después de haber realizado la purificación con el protocolo utilizando HEPES, se procedió a construir la tabla de purificación correspondiente (Tabla 2). El rendimiento obtenido en la purificación de la CaUMPS a partir de 2 litros de cultivo de *E. coli* BL21p7Gro fue de 1.46 mg de proteína pura, el cual 3.63 veces menor que el que se había obtenido anteriormente en el amortiguador Tris, aunque estas diferencias pueden deberse a que en el protocolo de purificación que se llevó a cabo con Tris, la inducción de la producción de la proteína recombinante CaUMPS se llevó a cabo con 1 mM de IPTG, mientras que en la purificación con HEPES se utilizó IPTG 0.5 mM.

Tabla 2. Purificación de la CaUMPS en amortiguador HEPES a partir de 2L de cultivo. Purificación con el amortiguador que contiene HEPES 50 mM, NaCl 100 mM desde la lisis hasta la elución por la columna Ni-TED Protino y HEPES 20 mM con NaCl 300 mM previo a la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200).

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Veces de purificación
Extracto crudo	1519.000	402.835	0.265	100.000	1.000
Ni-TED	53.000	238.177	4.494	59.125	16.946
Superdex	1.460	10.208	6.992	2.534	26.364

Estabilidad de la CaUMPS en amortiguador HEPES

Para comprobar la estabilidad de la CaUMPS se realizó el desplegamiento térmico utilizando el amortiguador HEPES 20 mM, pH 8.0 y NaCl 300 mM (figura 34). Los resultados muestran un aumento en la estabilidad de la enzima, la cual presentó valores más altos de T_m (51 °C) a diferencia de los que se había obtenido anteriormente en el amortiguador Tris (49 °C). Este valor se incrementó en la presencia del sustrato del dominio de la CaOPRTasa el PRPP 0.2 mM.

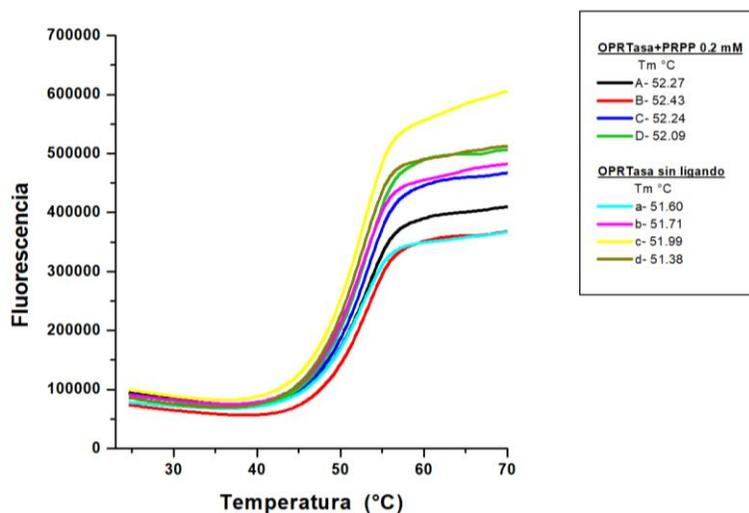


Figura 34. Desnaturalización térmica de la CaUMPS en HEPES 20 mM, pH 8.0 y NaCl 300 mM. El seguimiento de la desnaturalización se llevó a cabo en el equipo Thermal Shift, usando como colorante

Sypro Orange. Notación: Las líneas cian, magenta, amarilla y verde olivo muestran a la proteína en ausencia del PRPP. Las líneas negra, roja, azul oscuro y verde en presencia de 0.2mM de PRPP.

En la figura 34 se puede observar que a pesar de que la temperatura se eleva hasta 70 °C, no logra verse la agregación de la proteína, lo cual nos habla de una proteína muy estable, en comparación con la CaUMPS en el amortiguador con Tris (figura 31). Por esta razón, los ensayos cinéticos y de cristalización se realizaron utilizando el amortiguador HEPES.

El uso del amortiguador correcto es clave para la estabilidad de la proteína en disolución acuosa. En un estudio reciente, llevado a cabo por Sandi Brudar and Barbara Hribar-Lee (2021), demostraron que los iones del buffer se enlazan a los residuos, de la proteína, con carga opuesta. Así que, de esta manera, se reduce la superficie cargada de las moléculas de la proteína, lo cual es uno de los factores determinantes en la estabilidad de la proteína en disolución.

Ensayos de actividad del dominio CaOPRTasa de la CaUMPS

Después de obtener a la CaUMPS recombinante de forma pura, mediante el protocolo con el amortiguador HEPES, se procedió a medir la actividad de la CaOPRTasa. En la Figura 35 se observa la curva de saturación, realizada por triplicado, con la concentración fija-variable de ácido orótico en 12.5, 25, 50 y 75 μM ; y con la concentración variable de PRPP de 10 a 300 μM .

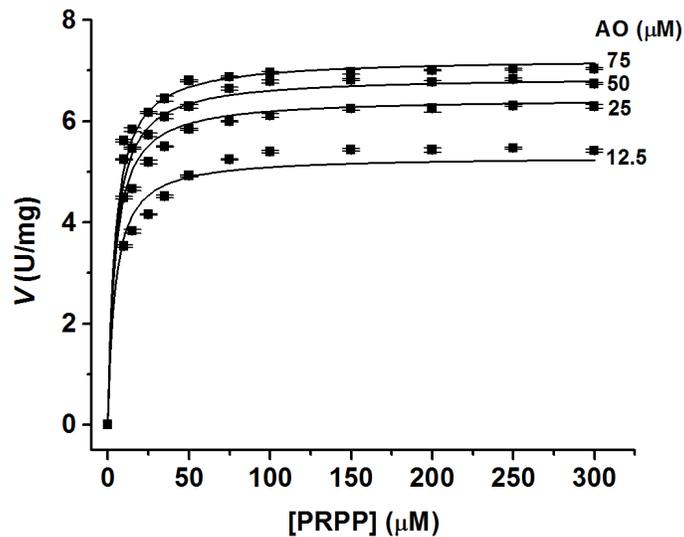


Figura 35. Curvas de saturación de la CaOPRTasa purificada con el amortiguador HEPES. La actividad de la CaOPRTasa se midió en un amortiguador HEPES 50 mM con $MgCl_2$ 5 mM, utilizando una concentración para el ácido orótico (AO) fija variable 12.5, 25, 50 y 75 μM , mientras que la concentración para el PRPP fue variable 10-300 μM . Los parámetros cinéticos \pm los errores estándar, fueron estimados mediante un ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación global correspondiente a un mecanismo tipo Bi-Bi al azar (Ecuación 2).

A partir del ajuste de los datos que se muestran en la figura 35 a la ecuación global correspondiente a un mecanismo Bi-Bi al azar (ecuación 2), se determinó que la V_{max} es de $8.24 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg$ de proteína $^{-1}$, la K_m para PRPP de $4.25 \pm 0.27 \mu M$ y la k_{cat} es de $0.23 s^{-1}$.

Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos (tabla 3), es posible ver que la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la CaOPRTasa, para el PRPP, es de $5.47 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$. Este valor es dos órdenes de magnitud menor en comparación con la OPRTasa de *S. cerevisiae*, por lo que se podría decir que la eficiencia catalítica es un poco menor.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para la OPRTasas de algunos organismos.

Los parámetros cinéticos fueron estimados por regresión no lineal del promedio de la velocidad inicial obtenida de tres ensayos independientes de cinética, ajustados a la ecuación global correspondiente a un mecanismo Bi Bi al azar (ecuación 2). Las velocidades iniciales fueron obtenidas a 30 °C, 50 mM de HEPES a pH 8.0. El símbolo \pm indica el error (desviación estándar) de los valores estimados. *Datos tomados de Breda *et al.* 2012.

OPRTasas		OA	PRPP
<i>Homo sapiens</i> *	K_m [μM]	2.1	-
	k_{cat} [s^{-1}]	4	-
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K_m [μM]	18.7	18
	k_{cat} [s^{-1}]	111	-
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	5.90×10^6	6.10×10^6
<i>Coffea arabica</i>	K_m [μM]	6.91 ± 0.42	4.25 ± 0.27
	k_{cat} [s^{-1}]	0.23	0.23
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	3.36×10^4	5.47×10^4

Ensayos de actividad del dominio CaODCasa de la CaUMPS

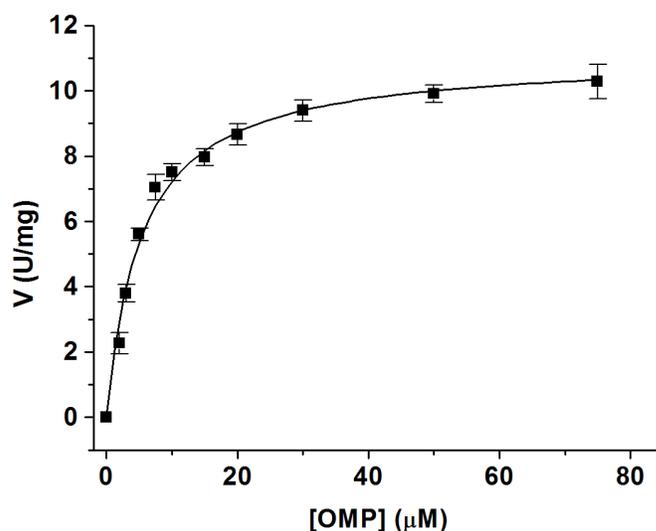


Figura 36. Curva de saturación de la CaODCasa purificada con el amortiguador HEPES. Cinética de saturación del dominio de la CaODCasa con el OMP. Los parámetros cinéticos \pm los errores estándar, fueron estimados mediante un ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación Michaelis-Menten (ecuación 1).

A partir del ajuste de los datos que se muestran en la figura 36 a la ecuación de Michaelis Menten (ecuación 1), se determinó que la V_{\max} es de $6.22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$, la K_m para OMP de $17.87 \pm 2.10 \mu\text{M}$ y la k_{cat} es de 0.35 s^{-1} . Al comparar los datos cinéticos con los que se han obtenido para otras ODCasas (Tabla 4) encontramos que la eficiencia catalítica es muy parecida a la que se reporto para la enzima de *Homo sapiens*. Al comparar nuestros datos con la ODCasa de *S. cerevisiae* encontramos que la eficiencia catalítica de la CaODCasa es tres órdenes de magnitud menor. Debido a que tanto en la CaUMPS como la UMPS humana, la OPRTasa y la ODCasa se sintetizan como un solo polipéptido, la canalización del producto OMP formado por la OPRTasa, el cual es sustrato de la ODCasa, entre los sitios activos sin disociarse de la enzima podría estar favoreciendo la eficiencia de la reacción (Wittmann, J. et al., 2008).

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la reacción catalizada por el dominio de la CaODCasa

*Datos tomados de Wittman *et al.*, 2008.

ODCasas		OMP
<i>Homo sapiens</i> *	K_m [μM]	16.6 ± 0.20
	k_{cat} [s^{-1}]	0.75
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	4.51×10^4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K_m [μM]	0.7
	k_{cat} [s^{-1}]	44
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	6.28×10^7
<i>Coffea arabica</i>	K_m [μM]	17.87 ± 2.1
	k_{cat} [s^{-1}]	0.35
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	2.01×10^4
	V_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	6.22 ± 0.20

Determinación de la estructura tridimensional de la CaUMPS

Para la cristalización de la CaUMPS pura, se realizaron varias pruebas utilizando diferentes kits como Wizard I, II, III y IV de Jena Bioscience. Primero se lavó la proteína, con un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 5%. Las pruebas iniciales de cristalización se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de proteína de 5mg - 25 mg/mL por el método de difusión de vapor en la modalidad de gota apoyada. Las gotas, en su mayoría eran formadas con 2 μ l de proteína más 2 μ l de la solución precipitante, las cuales fueron incubadas a 18 °C.

Después de haber realizado varias pruebas de cristalización en donde no se obtuvieron cristales utilizando el amortiguador Tris y de que los resultados de estabilidad térmica de las CaUMPS mostraron un aumento en la estabilidad de la proteína utilizando HEPES, se decidió utilizar este amortiguador. La CaUMPS se concentró y se lavó con el amortiguador HEPES 20 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM y glicerol al 10%, hasta alcanzar una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente, la enzima fue incubada con los sustratos del dominio CaOPRTasa PRPP 5 mM, AO 25 mM y MgCl₂ 5mM durante 10 min antes de realizar las pruebas de cristalización. Para las pruebas de cristalización se usó el método de difusión de vapor en la modalidad de gota apoyada con 1 μ L de proteína + 1 μ L de solución precipitante, usando el kit WIZARD III.

Después de 2 semanas, se observaron cristales (figura 37) en la condición 48 que contenía PEG 10,000 al 20% (w/v) y 100 mM de HEPES a pH 7.5..



Figura 37. Cristales de la CaUMPS. Cristales obtenidos en la condición de cristalización PEG 10,000 al 20% (w/v) y 100 mM de HEPES a pH 7.5, en presencia de los sustratos del dominio CaOPRTasa PRPP 5 mM, AO 25 mM y MgCl₂ 5mM utilizando una concentración final de proteína de 9 mg/mL.

Estos cristales fueron difractados en el sincrotrón *Advanced Photon Source*, Argonne, Illinois, Estados Unidos. Se colectaron 700 imágenes, las cuales fueron procesadas con el programa XDS (Kabsch, 2010). Los datos fueron escalados usando el programa CCP4 (Collaborative, 1994). La estructura se determinó por el método de reemplazo molecular con el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y utilizando como molde el modelo de la CaUMPS obtenido por AlphaFold2.0. Se realizó un afinamiento de cuerpo rígido con Refmac y posteriormente se realizaron diferentes ciclos de afinamiento utilizando el programa Phenix (Adams *et al.*, 2002).

Como resultado de los procedimientos anteriores, obtuvimos sólo la estructura tridimensional del dímero de la CaODCasa a 1.4 Å de resolución (Figura 38) y no la estructura completa de la proteína bifuncional CaUMPS (CaOPRTasa en el amino terminal y CaODCasa en el carboxilo terminal) como era lo esperado, ya que después de poner las pruebas de cristalización, la CaUMPS se proteolizó y sólo la CaODCasa se cristalizó. En la tabla 4 se muestran los resultados de los parámetros estadísticos de la estructura de la CaODCasa. Esta estructura se depositó en el Protein Data Bank con el código 8U0Z.

Tabla 5. Parámetros estadísticos de la estructura tridimensional de la CaODCasa

^aLos valores en paréntesis pertenecen a la faja de mayor resolución. ^br.m.s.d es la desviación media cuadrática.

Colecta de datos^a	
Longitud de onda (Å)	0.97918
Grupo espacial	P21 21 21
Celda unitaria	
a, b, c (Å)	50.00, 95.70, 112.20
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00

Número de moléculas en la unidad asimétrica	2
Rango de resolución (Å)	48.40-1.4
Reflexiones únicas	103,974 (12,799)
Reflexiones totales	1,118,181 (63,282)
Integridad (%)	97.3 (83.7)
R merge (%)	5.6 (45.0)
I/σ (I) Promedio	20.4 (3.0)
Multiplicidad	11.4 (4.9)
CC _{1/2}	99.9 (89.1)
Estadística de afinamiento	
Intervalo de resolución (Å)	48.40-1.4
R _{work} /R _{free} (%)	15.81/17.80
Número de átomos	
Proteína	4,036
Glicerol	18
1,2-Etanediol	20
PEG	7
1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato	13
Agua	605
Promedio de factores B (Å²)	
Proteína	20.7
Glicerol	32.2
1,2-Etanediol	33
PEG	41
1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato	23.6
Agua	35.7
r.m.s.d de estequiometría ideal^b	
Longitud de enlace (Å)	0.016
Angulos de enlace (°)	1.402
Gráfico de Ramachandran (%)	
Regiones favorecidas/permitidas/no permitidas	97.62/23.8/0
Código PDB	8U0Z

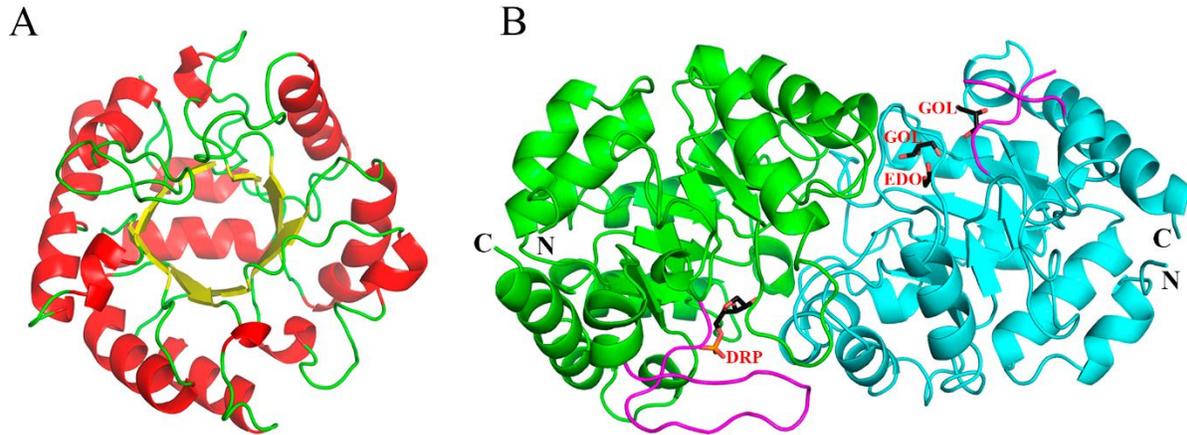


Figura 38. Estructura tridimensional de la CaODCasa. Representación en caricatura del monómero de la CaODCasa, mostrando los elementos secundarios de la estructura. Las hélices están representadas en color rojo, las láminas β en amarillo y las asas en color verde. B) Representación en caricaturas del dímero de la CaODCasa (la subunidad A y la B están representadas en verde y cian, respectivamente). 1-desoxiribofuranosa-5'-fosfato (DRP), glicerol (GOL) y etilenglicol (EDO); están representadas en varillas y átomos de carbono en color negro, oxígeno en rojo y fósforo en naranja. El asa (420-437) que cierra el sitio activo está representada en magenta.

La CaODCasa contiene 260 residuos por subunidad con un plegamiento tipo barril β con 8 hebras β rodeadas de hélices α como se muestra en la figura 38A. Los elementos de la estructura secundaria son similares a los de otras ODCasas como la de *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (PDB_id 1DVJ, 1DV7; Wu *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (PDB_id 1DBT; Appleby *et al.*, 2000), *Escherichia coli* (PDB_id 1EIX; Harris *et al.*, 2000), *Saccharomyces cerevisiae* (PDB_id 1DQW, 1DQX; Miller *et al.*, 2000), *Plasmodium falciparum* (PDB_id 2F84), *Homo sapiens* (PDB_id 2QCC, 2QCD, 2QCE; Wittmann *et al.*, 2008) y *Leishmania donovani* (PDB_id 3QW3, 3QW4; French *et al.*, 2011). A pesar de que los ensayos de cristalización se realizaron con la CaUMPS completa, solo se logró determinar la estructura cristalográfica del dominio de la CaODCasa, una posible explicación es que durante la cristalización se hidrolizó el enlace peptídico de la región que conecta a los dos dominios en donde se encuentra un residuo de fenilalanina que pudo ser reconocido por trazas de una proteasa que se encontraba en el medio de cristalización que fue preparado. Para tratar de evitar esta ruptura proteolítica, realizamos el mismo protocolo de purificación con HEPES, con una adición

PMSF 5 mM, desde la lisis de las células hasta el segundo paso de purificación. Esa misma adición del inhibidor de proteasas, se conservó en la incubación de la proteína para la formación de cristales, haciendo uso de la misma condición de cristalización: PEG 10,000 al 20% (w/v) y 100 mM de HEPES a pH 7.5.

Después de que aparecieron los cristales, se lavaron y se disolvieron en el amortiguador de carga. Esta muestra se corrió en un gel SDS-PAGE al 15% en condiciones desnaturalizantes (figura 39).

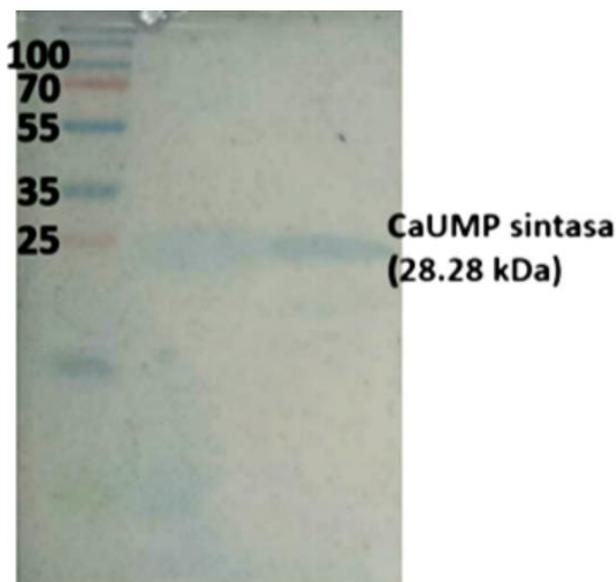


Figura 39. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% del cristal de la CaUMPS. Marcador (M) y carril 1. Para preparar la muestra se tomó uno de los cristales de la CaUMPS y se lavó dos veces con 2 μ L cada una, con amortiguador de carga para geles. Después, se disolvió el cristal en 10 μ L del mismo buffer.

De acuerdo con lo observado en la figura 39, la CaUMPS (52 kDa) no se encuentra, en su lugar, sólo hay una banda que corresponde al peso molecular de la CaODCasa (28 kDa), a pesar de que se añadió PMSF 5 mM al protocolo. Esto nos indica que hay un mecanismo de proteólisis, en el cual no se encuentra involucrada alguna proteasa.

En el sitio activo de la subunidad A se encuentra unida una molécula que no corresponde a ninguno de los ligandos con los cuales se había incubado la enzima. Al hacer un acercamiento al sitio activo, como se muestra en la figura 40 A, se puede ver que el ligando que está unido sólo tiene el grupo fosforilo y el anillo de ribosa que corresponde la molécula 1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato (DRP), por lo que proponemos que debido

a que los cristalización de la CaUMPS se llevó a cabo en presencia de OA, PRPP y Mg^{2+} , el dominio CaOPRTasa llevó a cabo la reacción de condensación del OA con el PRPP, formando el OMP y posteriormente este se unió al dominio de la CaODCasa. Debido a que en la estructura no se observa el anillo de nicotinamida no podemos saber si en el sitio activo se encuentra OMP o el producto de la reacción de la CaODCasa UMP.

Por otra parte, la unión del fosfato de la molécula de DRP al sitio activo permitió que la Arg454 y la Gln433 pudieran adoptar una conformación que permite la organización del asa que cierra el sitio activo, la cual comprende los residuos 420-437 (Figura 40).

En la figura 40B se observa el sitio activo de la subunidad B, el cual tiene unidas dos moléculas de glicerol y una de etilenglicol. La posición de una de las moléculas de glicerol simula la posición del anillo de ribofuranosa de la 1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato que se encuentra en el sitio activo de la subunidad A, haciendo los mismos puentes de hidrógeno con la Asp257, Lys279, His281 de la subunidad B y con la Thr319 y Asp315 de la subunidad A. Esto ya se había observado previamente en otras ODCasas como la ODCasa humana (PDB_id 2QCC; Wittmann *et al.*, 2008). El segundo glicerol se encuentra en la posición que ocupa el grupo fosforilo del sustrato o el producto, sin embargo, este glicerol no lo logra atraer a la Arg454, adoptando una conformación afuera del sitio activo, por lo que el asa que comprende los residuos 420-437 se desestabiliza y el sitio activo se encuentra abierto como si esta subunidad estuviera en la conformación apo (Figura 40).

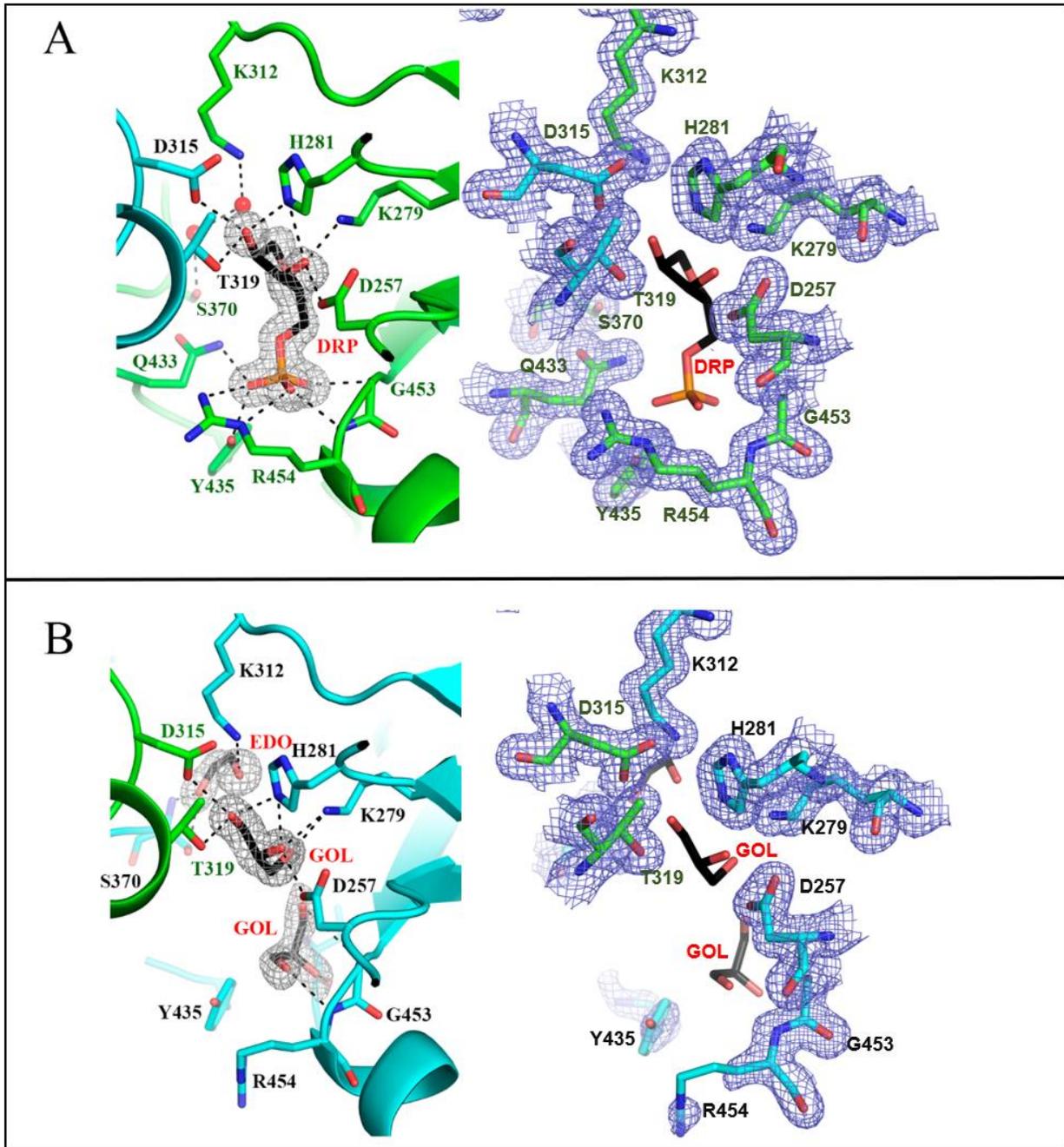


Figura 40. Sitio activo de la CaODCase. A) Sitio activo de la subunidad A con la 1-ribofuranosa-5'-fosfato (DRP) unida. El mapa de omisión ($F_o - F_c$) de la molécula de DRP se muestra a 3σ (malla gris). El mapa de densidad electrónica ($2F_o - F_c$) de los residuos del sitio activo se muestra a 1σ (malla azul) B) Sitio activo de la subunidad B con las moléculas de glicerol (GOL) y etilenglicol (EDO) unidas. Los mapas de omisión ($F_o - F_c$) de las moléculas de GOL y EDO, se muestran a 3σ (malla gris). Los puentes de hidrogeno están representados como líneas punteadas negras con un corte a 3.2 \AA . El mapa de densidad electrónica ($2F_o - F_c$) de los residuos del sitio activo se muestra a 1σ (malla azul). Los residuos están representados en color verde (subunidad A) y azul (subunidad B). DRP, GOL, y EDO están representados en varillas y átomos de carbono en negro, oxígeno en rojo y fósforo en naranja.

En la figura 41 podemos observar la comparación entre el modelo obtenido por AlphaFold2.0 y la estructura tridimensional del monómero de la *CaODCasa*, en donde encontramos ciertas diferencias importantes en el sitio catalítico (figura 41C), ya que se puede observar que una de las asas catalíticas del modelo que interacciona con el grupo fosforilo del sustrato, tiene un plegamiento de lámina β a diferencia de la estructura que está en forma de asa.

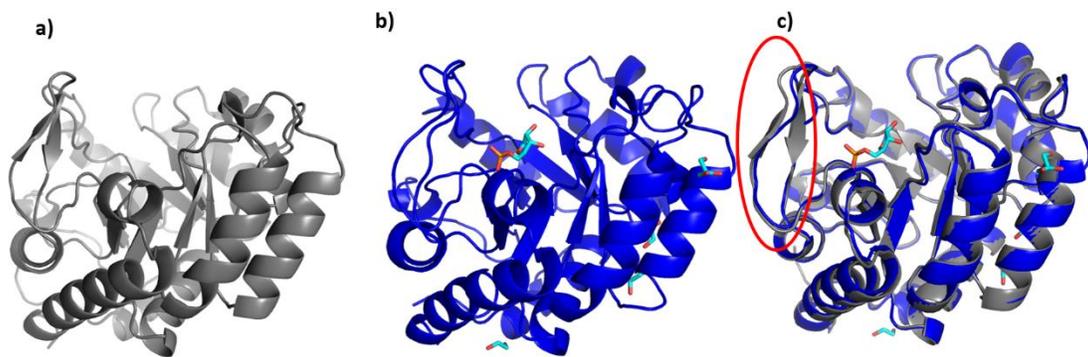


Figura 41. Comparación entre el modelo y la estructura cristalográfica de la *CaODCasa*: A) Modelo obtenido por medio de AlphaFold 2.0 (color gris); B) Estructura tridimensional de la *CaODCasa* (color azul); y C) Superposición del modelo con la estructura, indicando en un ovalo rojo las diferencias en una de las asas catalíticas. El DRP se muestra en representación de varillas en color de átomos con los carbonos en color azul claro.

Al observar el sitio catalítico del dímero de la estructura tridimensional de la *CaODCasa* figura 42, se pueden observar las tres asas catalíticas, una que va de los residuos 199-223 (azul claro), otra de los residuos 145-156 (rojo) y otra que pertenece a la subunidad vecina de los residuos 114-127 (verde). En la figura 43 se observa cuáles son los residuos del asa catalítica que están interaccionando con el sustrato DRP. En este caso, el único que está interaccionando es la Tyr214, ya que la Gly212, Ser149 y el Asp129; interaccionarían con el anillo de la nicotinamida, el cual no se observó en la estructura.

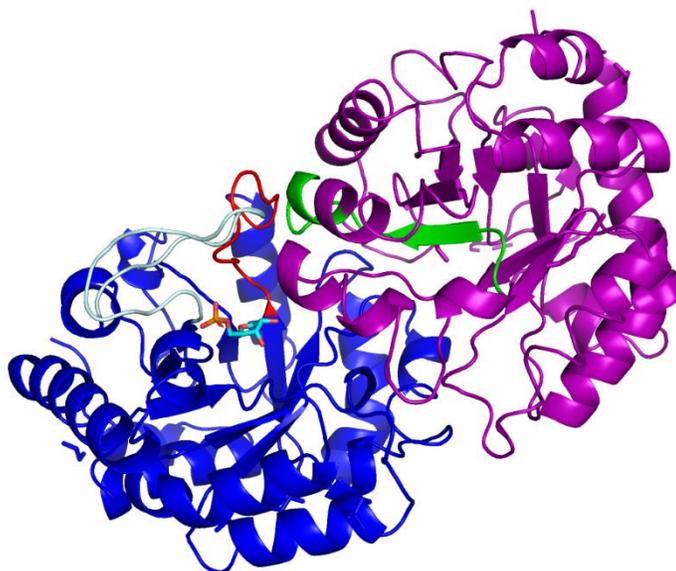


Figura 42. Asas catalíticas de la estructura del dímero de la CaODCasa. En color azul se observa la subunidad A, en color morado se encuentra la subunidad B. El asa que comprende los residuos 199-223 (color azul claro), el asa de 145-156 (color rojo) y el asa de 114-127 (color verde) de la subunidad vecina. El DRP se muestra en varillas en color de átomos con los carbonos en color azul claro.

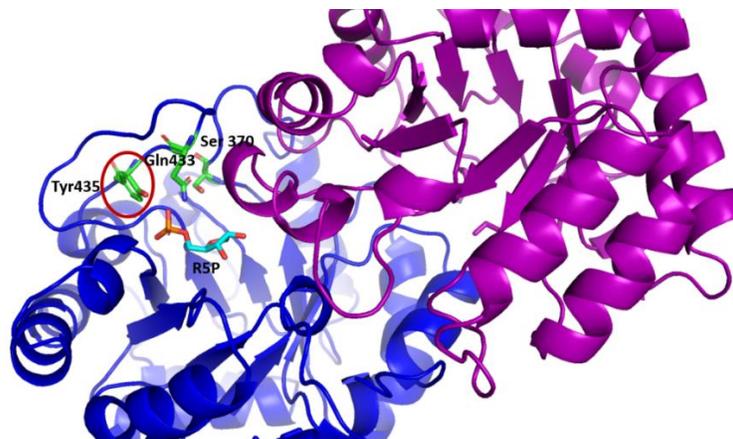


Figura 43. Residuos catalíticos del sitio activo. En color azul se observa la subunidad A, en color púrpura se encuentra la subunidad B. En representación de varillas de color verde se muestran los residuos importantes para la unión del OMP. El DRP, se muestra en varillas en color de átomos con los carbonos en color azul claro.

Modelo tridimensional de la CaOPRTasa

Los modelos de la CaOPRTasa y de la CaUMP-sintasa, fueron obtenidos haciendo uso del servidor AlphaFold2.0. En la figura 44 podemos observar el modelo correspondiente al monómero de la CaOPRTasa, donde se muestran las tres regiones que han sido previamente descritas para otras OPRTasas, la región del amino terminal (rojo), la región central (azul) y la región del carboxilo terminal (morado). La región del amino terminal comprende una hélice α regular, cuatro hebras β antiparalelas y una hélice α corta. Dos de estas hebras β constituyen el dominio de la “cubierta”. La región central contiene 4 hebras β rodeadas por cuatro hélices α . La primera mitad de esta región central está formada por dos hebras β paralelas y una hélice α conectada a la segunda mitad por un asa flexible que está formada por los residuos 99-111. AlphaFold2.0 fue capaz de modelar esta asa flexible completa. Y por último la región del carboxilo terminal está formada por dos hélices α antiparalelas conectadas por un asa.

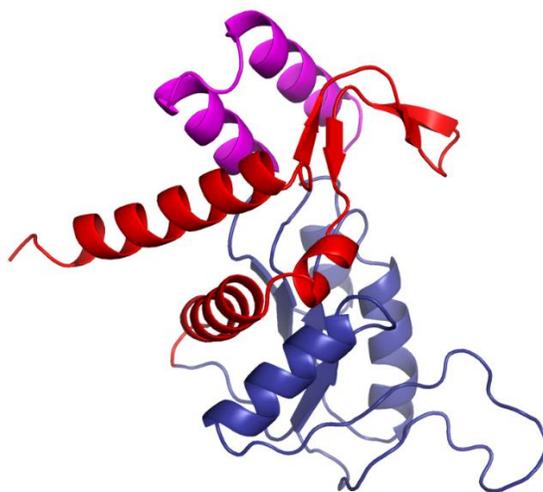


Figura 44. Modelo del monómero de las CaOPRTasa obtenido por AlphaFold2.0. Representación en caricaturas. Región del amino terminal (rojo), región central (azul) y región del carboxilo terminal (morado) construido *de novo*.

Después, se procedió a obtener el modelo correspondiente para el dímero de la CaOPRTasa, como se muestra en la figura 45, donde una subunidad se observa de color verde y la otra de color azul claro. Cabe señalar que este dímero se encuentra en su forma abierta, ya que si estuviera en su forma cerrada el asa flexible de una subunidad tendría que estar cubriendo el sitio activo de la subunidad vecina.

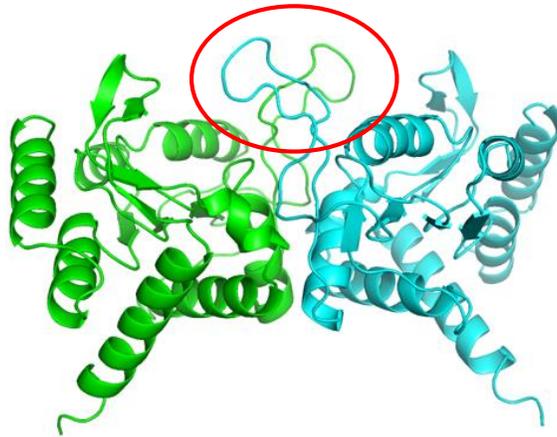


Figura 45. Modelo del dímero de la CaOPRTasa. Representación en caricaturas del dímero de la CaOPRTasa. La subunidad A se muestra en color verde y la subunidad B en color azul claro. En un círculo rojo se observa el asa flexible.

Ya que contamos con los modelos de la CaOPRTasa llevamos a cabo un alineamiento estructural con la enzima de *S. cerevisiae* (PDB_id 2PS1), la cual tiene a todos los ligandos unidos al sitio activo, con esto pudimos predecir los residuos que podrían estar involucrados en la unión con los sustratos. Para el caso del PRPP, los residuos que podrían estar participando en su unión son la Thr130, Lys33, Thr80 y Arg100 de la subunidad A, mientras que los residuos del asa flexible de la subunidad B serían los residuos Thr108, Tyr106 y Lys104 (Figura 46). Como podemos observar existen cadenas laterales que no se encuentran en una conformación que permitan participar en la unión de este sustrato, esto es porque AlphaFold2.0 nos puede predecir la posición de las cadenas alfa de una manera muy confiable, sin embargo, en la conformación de las cadenas laterales no es tan preciso.

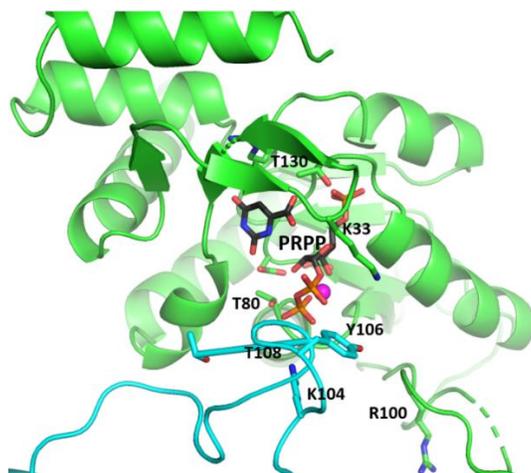


Figura 46. Residuos que podrían estar involucrados en la unión con el PRPP. Representación en caricaturas del dímero de la CaOPRTasa. La subunidad A se muestra en color verde y la subunidad B en color azul. Los residuos que podrían participar en la unión del PRPP se encuentran en varillas con los átomos de carbono del color de la subunidad a la que corresponden. El OA y el PRPP se encuentran representados en varillas con los átomos de carbono en negro. El Mg²⁺ se encuentra representado como una esfera de color magenta.

En la figura 47, podemos observar que el residuo que podrían estar involucrado en la unión con el OA es Arg158. Sin embargo, podemos observar que la cadena lateral se encuentra en la posición contraria al sitio activo, por lo que para participar en la unión de este sustrato debería de adoptar otra conformación. Para el caso del Mg²⁺, los que podrían estar involucrados en su unión podrían ser el Asp127 y el Glu126 (Figura 47).

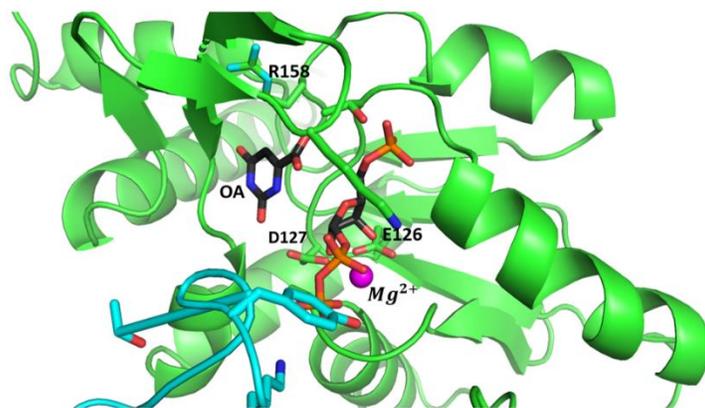


Figura 47. Residuos que podrían estar involucrados en la unión del OA y el Mg²⁺. Representación en caricaturas del dímero de la CaOPRTasa. La subunidad A se muestra en color verde y la subunidad B en color azul. Los residuos que podrían participar en la unión del OA y el Mg²⁺ se encuentran en varillas con los átomos de carbono del color de la subunidad a la que corresponden. El OA y el PRPP se encuentran representados en varillas con los átomos de carbono en negro. El Mg²⁺ se encuentra representado como una esfera de color magenta.

Modelo tridimensional de la CaUMPS obtenido por AlphaFold2.0

Finalmente, también se obtuvo el modelo tridimensional para la CaUMPS, como se puede observar en la figura 48. La CaUMPS es un solo polipéptido bifuncional en el cual el amino terminal, representado en rojo, corresponde a la CaOPRTasa; mientras que la región del carboxilo terminal, representada en color gris, corresponde a la CaODCasa.

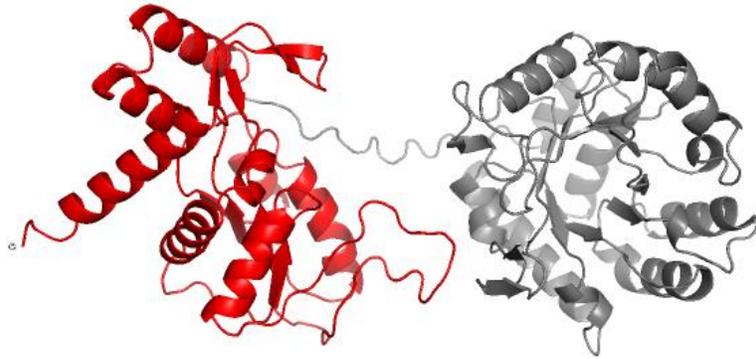


Figura 48. Modelo de la CaUMPS. Representación en caricaturas de la CaUMPS. La CaOPRTasa se encuentra en color rojo, mientras que la CaODCasa en color gris.

El dominio de la CaOPRTasa se encuentra en el amino terminal con 208 residuos mientras que el dominio de la CaODCasa se encuentra en el carboxilo terminal y comprende los residuos 220 al 482. Estos dos dominios se encuentran unidos por un asa larga de 12 residuos. A la fecha solo se conoce la estructura tridimensional de la UMPS completa de *Leishmania donovani* (PDB_id 3QW4), sin embargo, esta tiene los dominios invertidos, ya que el dominio de la ODCasa se encuentra en la región del amino terminal y el dominio de la OPRTasa en el carboxilo terminal.

7 Conclusiones

De acuerdo con nuestros resultados encontramos que la CaUMPS recombinante es más estable en amortiguador HEPES que cuando se encuentra en Tris, esto se concluye al observar que en Tris se agrega fácilmente, además de que en los ensayos de termo estabilidad logra verse esa agregación proteica, mientras que en HEPES no se observa, aunque se eleve la temperatura hasta 70 °C.

En cuanto a la caracterización cinética del dominio de la CaOPRTasa, esta enzima presenta un mecanismo Bi Bi al azar, con unas constantes cinéticas que son comparables con los de otras enzimas eucariontes caracterizadas previamente.

La caracterización cinética del dominio de la CaODCasa nos muestra que los parámetros cinéticos son comparables a los obtenidos para otras enzimas como la ODCasa humana que también se encuentra formando parte de la UMPS.

La estructura tridimensional obtenida del dímero de la CaODCasa nos permitió conocer los residuos que participan en la unión de los sustratos, así como las dos conformaciones que puede adoptar esta enzima, tanto abierta como cerrada, y la participación de los residuos Arg454 y Gln433 en el cierre del sitio activo.

8 Perspectivas

Encontrar la condición en la cual se pueda cristalizar a la CaUMPS completa o al menos el dominio faltante de la CaOPRTasa, para obtener su estructura tridimensional.

Utilizar otra técnica para determinar la estructura tridimensional de la CaUMPS como criomicroscopía electrónica (crio-EM) o resonancia magnética nuclear (RMN).

Realizar la construcción solo del dominio de la CaOPRTasa para obtener su estructura tridimensional.

Por otra parte, ahora que ya se tiene la estructura de la CaODCasa, obtener la estructura tridimensional de la ODCasa de cualquier patógeno de importancia para la planta de café (*Coffea arabica*), para poder comparar ambas estructuras y así, poder proponer algún inhibidor que sea lo más específico para la ODCasa del patógeno; todo esto con el objetivo de que la proliferación de estos organismos se vea disminuida de manera importante.

Realizar estudios de inhibición, tanto para la CaODCasa como para la CaOPRTasa

Referencias

- Aaron P. Davis, Roberta Gargiulo, Michael F. Fay, Daniel Sarmu, & Jeremy Hagggar. (2020). Lost and Found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the Forgotten Coffee Crop Species of West Africa. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Appleby, T. C., Kinsland, C., Begley, T. P., & Ealick, S. E. (2000). The Crystal Structure and Mechanism of Orotidine 5'-monophosphate Decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2005–2010.
- Asadi, M., & Warshel, A. (2023). Analyzing the Reaction of Orotidine 5'-Phosphate Decarboxylase as a Way to Examine Some Key Catalytic Proposals. *Journal of the American Chemical Society*, 145(2), 1334–1341–1341.
- Bender, C.L.; Alarcon-Chaidez, F.; Gross, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v.63, n.2 p.266–292, 1999.
- Bradford, M.M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-254.
- Breda, A., Rosado, L. A., Lorenzini, D. M., Basso, L. A. & Santos, D. S. (2012) Molecular, kinetic and thermodynamic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase. *Molecular BioSystem*. 8, 572–586.
- Chao-Pei Liu, Rui Xu, Zeng-Qiang Gao, Jian-Hua Xu, Hai-Feng Hou, Li-Qin Li, Zhun She, Lan-Fen Li, Xiao-Dong Su, Peng Liua, & Yu-Hui Dong. (2010). Structure of orotate phosphoribosyltransferase from the caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallographica, Section F (Structural Biology and Crystallization Communications)*, F66(5), 498–502.
- Donini, S., Ferraris, D. M., Miggiano, R. Massarotti, A. & Rizzi, M. (2017). Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of the de novo pyrimidine biosynthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- French, J. B., Yates, P. A., Soysa, D. R., Boitz, J. M., Carter, N. S., Chang, B., Ullman, B., & Ealick, S. E. (2011). The *Leishmania donovani* UMP Synthase Is Essential for Promastigote Viability and Has an Unusual Tetrameric Structure That Exhibits Substrate-controlled Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20930–20941.
- Geigenberger, P., Regierer, B., Nunes-Nesi, A., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E., Springer, F., Van Dongen, J. T., Fernie, A. R., and Kossmann, J. (2005). Inhibition of de novo pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance. *Plant Cell*, 17(7), 2077–2088.
- González-Segura y Carrizosa-Carbajal (2020). Orotato fosforribosiltransferasa. Pasado, presente y futuro en el estudio estructural de las proteínas, *Mensaje bioquímico.*, 44 (2020), 54 - 64.

González-Segura, L., Witte, J. F., McClard, R. W., & Hurley, T. D. (2007). Ternary complex formation and induced asymmetry in orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 46(49), 14075–14086.

Heldt HW (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. (Oxford: Oxford University Press).

Henriksen, A., Aghajari, N., Gajhede, M. & Jensen, K. F. (1996) A flexible loop at the dimer interface is a part of the active site of the adjacent monomer of *Escherichia coli* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 35(12), 3803–3809.

Herrera Monroy, S., Castro Brindis, R., Pérez Moreno, J., & Valdés Velarde, E. (2019). Diversidad endomicorrícica en plantas de café (*Coffea arabica* L.) infestadas con roya (*Hemileia vastatrix*). *Nova Scientia*, 11(22), 102–123

ICO, Organización Internacional del Café (2023). Coffee Report and Outlook. [En línea]. Disponible en <https://icocoffee.org/resources/public-market-information/>. Fecha de consulta: 6 de febrero del 2024.

Jones, M. E. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis. *Annual review of biochemistry*. 49,253-279

Kafer C., Zhou L, Santoso D, Guirgis A, Weers B, Park S, Thomburg R (2004). Regulation of pyrimidine metabolism in plants, *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 9, 1611-1625.

Karen Zamora, Leida Castro, Amy Wang, Luis Felipe Arauz, & Lidieth Uribe. (2017). Uso potencial de lixiviados y tés de vermicompost en el control del ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 33–51.

Kejela, T., Thakkar, V. R., y Thakor, P. (2016). *Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–13.

Krungkrai, S. R., Aoki, S., Palacpac, N. M., Sato, D., Mitamura, T., Krungkrai, J. y Horii, T. (2004) Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. *Molecular and biochemical parasitology*. 134, 245–255.

Jeffrey A. Smiley, and Lana Y. Saleh. (1999). Active Site Probes for Yeast OMP Decarboxylase: Inhibition Constants of UMP and Thio-Substituted UMP Analogues and Greatly Reduced Activity toward CMP-6-Carboxylate. *Bioorganic Chemistry*, 27, 297–306.

Lewis, M., Meza-Avina, M. E., Wei, L., Bello, A. M., Poduch, E., Pai, E. F., Kotra, L. P., Paige, C. J., Liu, Y., Crandall, I. E., & Kain, K. C. (2011). Novel interactions of fluorinated nucleotide derivatives targeting orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(8), 2891-2901.

Maier T, Zhou L, Thornburg R (1995) Nucleotide sequence of a cDNA encoding UMP synthase from *Nicotiana tabacum* (GenBank U22260) (PGR 95–025). *Plant Physiology* 108: 1747.

Makiuchi, T., Nara, T., Annoura, T., Aoki, T., and Hashimoto, T. (2007). Occurrence of multiple, independent gene fusion events for the fifth and sixth enzymes of pyrimidine biosynthesis in different eukaryotic groups. *Gene*, 394(1–2), 78–86.

Medina-Meléndez, José Alfredo, Ruiz-Nájera, Ramiro Eleazar, Gómez-Castañeda, Julio César, Sánchez-Yáñez, Juan Manuel, Gómez-Alfaro, Gabriela, and Pinto-Molina, Omar. (2016) Estudio del sistema de producción de café (*Coffea arabica* L.) en la región Frailesca, Chiapas. *CienciaUAT*, 10(2), 33-43.

McClard, R. W., Holets, E. A., MacKinnon, A. L. y Witte, J.F. (2006) Half-of-sites binding of orotidine 5'-phosphate and α -D-5-phosphorylribose 1-diphosphate to orotate phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae* supports a novel variant of the Theorell-Chance mechanism with alternating site catalysis. *Biochemistry* 45, 5330–5342.

Meyer, R., & Wagner, K. G. (1985). Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia*: I. Changes during growth of the batch culture. *Planta*, 166(4), 439–445.

Miller, B. G., Hassell, A. M., Wolfenden, R., Milburn, M. V., & Short, S. A. (2000). Anatomy of a Proficient Enzyme: The Structure of Orotidine 5'-monophosphate Decarboxylase in the Presence and Absence of a Potential Transition State Analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2011–2016.

Miller, B. G., & Wolfenden, R. (2002). Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annual review of biochemistry*, 71, 847–885.

Moffatt, B. A., & Ashihara, H. (2002). Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 1, e0018.

Mundra, S., & Kotra, L. P. (2014). Design of inhibitors of ODCase. *Future Medicinal Chemistry*, 6(2), 165–177.

Musick, W. D. L., & Nyhan, W. L. (1981). Structural features of the phosphoribosyl-transferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry*, 11(1), 1-34.

Nasr, F., Bertauche, N., Dufour, M-E., Minet, M. y Lacroute, F. (1994) Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the novo pyrimidine biosynthesis pathway. *Molecular and general genetics*. 244, 23–32.

Niazy, A.A., & Hughes, L.E. (2015). Accumulation of Pyrimidine Intermediate Orotate Decreases Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology*, 71, 229 - 234.

Orús Abigail (2023). Ranking de los 15 principales países productores de café a nivel mundial en 2022. [En línea]. Disponible en <https://es.statista.com/estadisticas/600243/ranking-de-los-principales-productores-de-cafe-a-nivel-mundial/>. Fecha de consulta: 12 de febrero del 2024

Paojinda, P., Imprasittichai, W., Krungkrai, S. R., Palacpac, N. M. Q., Horii, T., & Krungkrai, J. (2018). Bifunctional activity of fused *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Parasitology International*, 67(1), 79–84.

Porter, D. J., & Short, S. A. (2000). Yeast orotidine-5'-phosphate decarboxylase: steady-state and pre-steady-state analysis of the kinetic mechanism of substrate decarboxylation. *Biochemistry*, 39(38), 11788–11800.

Qi Z, Liu M, Dong Y, Yang J, Zhang H, Zheng X y Zhang Z (2016) Orotate phosphoribosyl transferase MoPyr5 is involved in uridine 5-phosphate synthesis and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. Applied microbiology and biotechnology. 100, 3655– 3666.

RADZICKA, A., & WOLFENDEN, R. (1995). A proficient enzyme. Science (Washington, D.C.), 267(5194), 90–93.

Rao, N. N. S., & Deshpande, P. A. (2015). A mechanistic model for uridine 5'-monophosphate nucleotide synthesis. Chemical Engineering Science, 134, 504–509.

Reinhard Sterner, & Birte Höcker. (2005). Catalytic Versatility, Stability, and Evolution of the ($\beta\alpha$)8-Barrel Enzyme Fold. Chemical Reviews, 105, 4038–4055.

Rivero-Rodrigues, L. M. R., Queiroz-Voltan, R. B., & Guerreiro Filho, O. (2015). Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. Garcae.. Summa Phytopathologica, 41(4), 256–261.

Ross, C. W. (1981). Biosynthesis of nucleotides. The Biochemistry of Plants, Volume 6". Academic Press, New York pp. 169-205.

Sandi Brudar and Barbara Hribar-Lee (2021). Effect of Buffer on Protein Stability in Aqueous Solutions: A Simple Protein Aggregation Model. The Journal of Physical Chemistry B 2021 125 (10), 2504-2512

Santoso, D. & Thornburg, R. (1998). Uridine 5'-Monophosphate Synthase Is Transcriptionally Regulated by Pyrimidine Levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Physiology, 116(2), 815–821.

Santoso, D., & Thornburg, R. (2000). Fluoroorotic acid-selected *Nicotiana plumbaginifolia* cell lines with a stable thymine starvation phenotype have lost the thymine-regulated transcriptional program. Plant physiology, 123(4), 1517–1524

SCAPIN, G., GRUBMEYER, C., & SACCHETTINI, J. C. (1994). Crystal structure of orotate phosphoribosyltransferase. Biochemistry (Easton), 33(6), 1287–1294.

Schoeber, S., Simon, D., & Schwenger, B. (1993). Sequence of the cDNA encoding bovine uridine monophosphate synthase. Gene, 124(2), 307–308.

Sinha, S. C., & Smith, J. L. (2001). The PRT protein family. Current Opinion in Structural Biology, 11(6), 733–739.

Souza Vale, P. A., Vilela de Resende, M. L., dos Santos Botelho, D. M., Lage de Andrade, C. C., Alves, E., Ogoshi, C., Costa Guimaraes, S. da S., & Pfenning, L. H. (2020). Epitypification of *Cercospora coffeicola* and its involvement with two different symptoms on coffee leaves in Brazil. European Journal of Plant Physiology 159, 399-408

Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A., and Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. Journal of plant physiology, 160(11), 1271–1295

Stryer L. (1996) Biochemistry. (Weinheim, Germany: VCR Weinheim).

Suttle, D. P., Bugg, B. Y., Winkler, J. K., and Kanalas, J. J. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1754–1758.

Thirumalairajan, S., Mahaney, B., and Bearne, S. L. (2010). Interrogation of the active site of OMP decarboxylase from *Escherichia coli* with a substrate analogue bearing an anionic group at C6. *Chemical Communications*, 46(18), 3158-3160–3160

Traut, T. W., and Jones, M. E. (1996). Uracil metabolism--UMP synthesis from orotic acid or uridine and conversion of uracil to beta-alanine: enzymes and cDNAs. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 53, 1–78.

Wang, G. P., Lundegaard, C., Jensen, K. F. y Grubmeyer, C.(1999) Kinetic mechanism of OMP synthase: A slow physical step following group transfer limits catalytic rate. *Biochemistry* 38, 275–283

Wen Tao, & Grubmeyer, C. (1996). Transition state structure of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 35(1), 14.

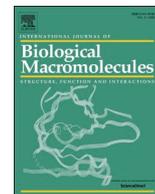
Wu N, Mo Y, Gao J, Pai EF. Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(5), 2017–2022 (2000).

Wittmann, J. G., Heinrich, D., Gasow, K., Frey, A., Diederichsen, U., & Rudolph, M. G. (2008). Structures of the Human Orotidine-5'-Monophosphate Decarboxylase Support a Covalent Mechanism and Provide a Framework for Drug Design. *Structure*, 16(1), 82–92.

Zamora, Karen, Castro, Leida, Wang, Amy, Arauz, Luis Felipe, & Uribe, Lidieth. (2017). Uso potencial de lixiviados y tés de vermicompost en el control del ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 33-51.

Zhang, Y., Evans, G. B., Clinch, K., Crump, D. R., Harris, L. D., Fröhlich, R. F., Tyler, P. C., Hazleton, K. Z., Cassera, M. B., & Schramm, V. L. (2013). Transition state analogues of Plasmodium falciparum and human orotate phosphoribosyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 288(48), 34746–34754.

9. Anexo



Structural and functional properties of uridine 5'-monophosphate synthase from *Coffea arabica*

Alexis Hinojosa-Cruz^a, Ángel G. Díaz-Sánchez^b, Adelaida Díaz-Vilchis^c, Lilian González-Segura^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

^b Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez 32310, Chihuahua, Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62240, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein crystallography
Structure-function relationships, enzyme kinetics

ABSTRACT

In higher eukaryotes and plants, the last two sequential steps in the *de novo* biosynthesis of uridine 5'-monophosphate (UMP) are catalyzed by a bifunctional natural chimeric protein called UMP synthase (UMPS). In higher plants, UMPS consists of two naturally fused enzymes: orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase) at N-terminal and orotidine-5'-monophosphate decarboxylase (ODCase) at C-terminal. In this work, we obtained the full functional recombinant protein UMPS from *Coffea arabica* (CaUMPS) and studied its structure-function relationships. A biochemical and structural characterization of a plant UMPS with its two functional domains is described together with the presentation of the first crystal structure of a plant ODCase at 1.4 Å resolution. The kinetic parameters measured of CaOPRTase and CaODCase domains were comparable to those reported. The crystallographic structure revealed that CaODCase is a dimer that conserves the typical fold observed in other ODCases from prokaryote and eukaryote with a 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate molecule bound in the active site of one subunit induced a closed conformation. Our results add to the knowledge of one of the key enzymes of the *de novo* biosynthesis of pyrimidines in plant metabolism and open the door to future applications.

1. Introduction

Purine and pyrimidine nucleotides are essential cellular compounds that participate in many critical biochemical processes. Pyrimidine nucleotides are fundamental biomolecules in all life forms, not only as RNA and DNA precursors, but are also required as cofactors and regulatory molecules in the energetic metabolism, as well for continuous biosynthesis of carbohydrates, phospholipids, and glycolipids [1–4]. The *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway is defined as the formation of uridine 5'-monophosphate (UMP) from carbamoyl phosphate. Although, in almost all organisms this is a highly conserved six catalyzed reactions pathway, in higher eukaryotes, these activities are encoded by only three fused genes, resulting in the fusion of catalytic modules into protein chimeras. In higher eukaryotes and plants, the last two steps of this pathway are encoded by a single gene that produces a chimeric polypeptide called UMP synthase (UMPS). This macromolecule is a bifunctional protein that possesses two catalytic activities: orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase) and orotidine-5'-monophosphate

decarboxylase (ODCase) [5–9]. The OPRTase catalyzes the Mg²⁺-dependent condensation of orotate (OA) with 5- α -D-phosphoribosyl 1-diphosphate (PRPP) to yield pyrophosphate (PPi) and orotidine 5'-monophosphate (OMP), which is subsequently decarboxylated by ODCase, leading to UMP, the entry nucleotide in the biosynthesis of all pyrimidine nucleotides. One of the advantages of fusing catalytic modules into a single polypeptide chain is the channeling of intermediaries between the active sites of the modules without diffusion of intermediaries from the enzyme complexes. Intermediate channeling increases the flux of metabolic pathways, changes regulatory patterns, and prevents the breakdown of relatively unstable intermediates by parallel reactions. The efficiency of reactions catalyzed by UMPS are improved by substrate channeling, where the product of the first reaction is apparently channeled to the second catalytic module without dissociation from the enzyme complex. In most organisms the N-terminal portion of this bifunctional polypeptide corresponds to OPRTase, while the C-terminal region to ODCase [6,10,11]. UMPS is one of the key enzymes of the *de novo* biosynthesis of pyrimidines and is the rate

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México 04510, Mexico.

E-mail address: liliang@unam.mx (L. González-Segura).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129226>

Received 15 September 2023; Received in revised form 23 December 2023; Accepted 2 January 2024

Available online 4 January 2024

0141-8130/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

limiting step of the pathway in mammals [12] and plants [13]. In higher plants, few studies have been carried out on the synthesis and metabolism of purines and pyrimidines compared to those carried out in microorganisms and animals. The role of UMPS in plants has been examined in different studies. In *Nicotiana tabacum*, mutants with reduced levels of UMPS from haploid cells were isolated and characterized [13]. Studies carried out in *Nicotiana glauca* found that UMPS is transcriptionally regulated by pyrimidine levels [7]. In transgenic *Solanum tuberosum* tubers plants with decreased expression of UMPS, it was found that this leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathways, increasing uridine nucleotide pool levels in tubers and improving biosynthetic performance [14].

Recently DNA-based methods have been developed for the reliable and efficient identification of *N. tabacum* in several tobacco samples and its derived products using the sequence of UMPS as a target [15].

Although UMPS is one of the key enzymes of the *de novo* biosynthesis of pyrimidines, in plants has not been characterized neither biochemically nor structurally. In this work we presented the biochemical and structural information of the recombinant UMPS from *Coffea arabica* (CaUMPS) obtained by means of circular dichroism, thermofluorescence assays, enzyme kinetics, *in silico* modeling as well as X-ray-crystallography. To the best of our knowledge, here is presented the first crystallographic structure of a plant ODCase and the characterization of a plant UMPS. This study contributes to the elucidation of the mechanism of action of a class of chimeric enzymes critical for plant metabolism and adaptation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Reagents (kanamycin, chloramphenicol, arabinose, isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside IPTG, glycerol, imidazole, ATP, sinapinic acid, acetonitrile, trifluoroacetic acid and PEG 10000), culture media Luria Bertani (LB), salts (NaCl, phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF, and $MgCl_2$), buffers (HEPES and Tris), OA, PRPP pentasodium salt, OMP trisodium salt were purchased in Sigma-Aldrich unless otherwise stated. All the chemicals and reagents were of the highest quality commercially available. Gene synthesis and plasmid constructions were done by GenScript using the provided nucleotide sequences. Chromatographic columns were acquired from General Electric (GE). *E. coli* strain BL21 (DE3) pGro7 was used for protein expression and was from Takara Bio Inc.

2.2. Cloning and expression of CaUMPS

The CaUMPS full gene was chemically synthesized by the GenScript (CaOPRTase at the N-terminal and CaODCase at the C-terminal) and cloned into pET28b(+) vector, between *NdeI* and *XhoI* restriction sites in the same ORF of a N-Ter 6X-HisTag composing generating the construction named pET-CaUMPS. This plasmid was used for the expression of full-length, N-terminal, His-tagged CaUMPS.

E. coli BL21(DE3) cells pGro7 (Takara Bio Inc.) were transformed with pET-CaUMPS by heat shock. The resulting positive clones were cultivated at 37 °C in LB medium supplemented with 50 μ g/mL kanamycin. For protein expression, cultures were grown in 0.5 L of LB medium supplemented with kanamycin (50 μ g/mL), chloramphenicol (34 μ g/mL) and arabinose (1 mg/mL) at 37 °C and shaking at 225 rpm until the optical density at 600 nm reached 0.6. At this point, the temperature was lowered to 15 °C and protein expression was induced by the addition of 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), and culture was incubated for 20 h at 225 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 7000 rpm at 18 °C for 10 min and stored at -70 °C for subsequent purification.

2.3. Purification of CaUMPS

After thawing the frozen pellet, the cells were resuspended in 50 mM HEPES buffer, pH 8.0, containing 100 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Then cells were lysed by sonication on ice and centrifuged to remove the cellular debris. The resulted supernatant was applied to a column packed with Protino Ni-TED resin (Macherey-Nagel, Düren, Germany) equilibrated with 50 mM HEPES buffer, pH 8.0, containing 100 mM NaCl and 10 % (v/v) glycerol (Buffer A). The column was then washed with two column volumes of Buffer A, ten column volumes of Buffer A supplemented with 5 mM ATP and 10 mM $MgCl_2$ and finally five column volumes of Buffer A supplemented with imidazole 40 mM. The bound protein was eluted by applying imidazole 300 mM in Buffer A. The fractions containing CaUMPS were pooled and concentrated with Amicon Ultra centrifugal filter units (30 kDa MWCO; Merck Millipore). The concentrated protein was loaded on a gel filtration high resolution column (Superdex 200 HR-10/30) coupled to an ÄKTA 25L PURE FPLC system (GE). Superdex column was pre-equilibrated with 50 mM HEPES buffer, pH 8.0, containing 300 mM NaCl and 10 % (v/v) glycerol (Buffer B). Gel filtration was also used to determine the oligomeric state of eluted CaUMPS. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay and CaUMPS purity was assessed by SDS-PAGE 15 % according to Laemmli [16]. The pure 6xHis-tagged recombinant CaUMPS obtained fraction was used in the biochemical assays as well as for crystallization.

2.4. Mass measurements by MALDI-TOF

We determined the molecular mass of recombinant CaUMPS using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Microflex; Bruker Scientific LLC, Billerica, MA, USA). The standard for mass calibration was bovine serum albumin (BSA). The matrix used was a saturated solution of sinapinic acid in 30 % (v/v) aqueous acetonitrile and 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid. Samples were analyzed using FLEX ANALYSIS 3.0TM (Bruker) software.

2.5. Circular dichroism

The circular dichroism spectra of the CaUMPS were obtained by scanning the sample solution in a 0.1 cm light path cuvette, over the far-UV range (195–260 nm) at 25 °C using a Chirascan Spectropolarimeter (Applied Photophysics; Leatherhead, Surrey, UK) equipped with a Peltier-type cell holder. The protein at a final concentration of 0.15 mg/mL was transferred into 50 mM Tris buffer, pH 8.0, containing 300 mM NaCl and 10 % (v/v) glycerol. Scans were collected at 1 nm intervals with a dwell time of 2 s. The spectrum was the average of four repetitive scans and was corrected by subtracting the average spectrum of the buffer.

2.6. Thermal stability determination

The thermal stability of CaUMPS was determined by differential scanning fluorimetry (DSF). Protein preparation used was in buffer B at a final concentration of 0.5 mg/mL. The denaturation curves were obtained by monitoring the heat-induced transition by following the fluorescence changes of the SYPRO Orange reagent (Sigma-Aldrich). The denaturation curves were obtained using a StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Data were harvested and analyzed with a Boltzmann function using the Protein Thermal Shift™ Software v 1.0 (Applied Biosystems).

2.7. Activity assays and kinetic characterization of CaOPRTase

OPRTase activity was measured spectrophotometrically at 30 °C by measuring the decrease in absorbance at 295 nm ($\epsilon = 3950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) caused by the consumption of OA in a mixture (1 mL) consisting of 50

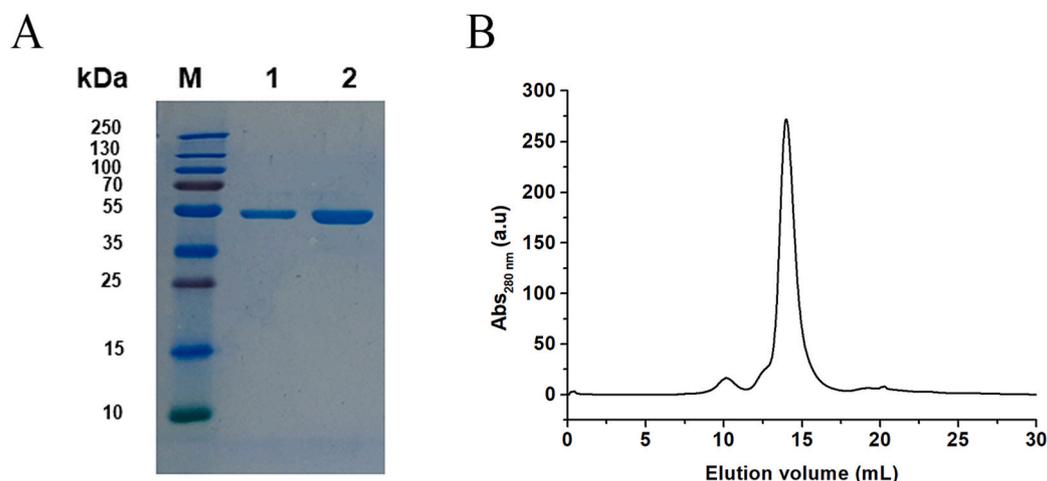


Fig. 1. Purification of CaUMPS. A) SDS-PAGE of CaUMPS. Lanes: M, molecular mass markers (Thermo Scientific); 1 and 2, eluted fractions to size exclusion chromatography (SEC). B) SEC elution profile of CaUMPS.

mM HEPES buffer, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 50 μM OA and variable concentrations of the PRPP, or at fixed concentration of PRPP and variable OA tested [17,18]. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of OA in OMP per minute. All activity units were corrected to mg of protein used.

Kinetic data were analyzed by non-linear regression calculations. In the saturation experiments of the enzyme by the PRPP, the initial velocity data were fitted to the Michaelis-Menten equation (Eq. (1))

$$v = V_{\max} [S] / K_m + [S] \quad (1)$$

where v is the initial velocity, V_{\max} is the maximal velocity, $[S]$ is the concentration of the variable PRPP, and K_m is the concentration of substrate at half-maximal velocity.

In the patterns of initial velocity varying the concentrations of PRPP and at variable-fixed concentrations of OA, data were analyzed by linear regression fit of individual curves to partially diagnose the kinetic mechanism. The family of saturation kinetics curves were globally fitted to a Bi-Bi-random kinetic mechanism equation (Eq. (2))

$$v = V_{\max} [PRPP] [OA] / (K_A [OA] + (K_B [PRPP]) + ([PRPP][OA])) \quad (2)$$

where K_A and K_B are the Michaelis-Menten constants for PRPP and OA, respectively.

2.8. Activity assays of CaODCase

ODCase activity was measured spectrophotometrically at 30 °C by measuring the decrease in absorbance at 279 nm ($\epsilon = 2400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) caused by the decarboxylation of OMP in a mixture (1 mL) consisting of 100 mM HEPES buffer, pH 8.0, 50 μM OMP [19]. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of OMP in UMP per minute. All activity units were corrected to mg of protein used.

2.9. AlphaFold models

We used the AlphaFold2 version (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) to predict the structures of the CaUMPS, CaOPRTase and CaODCase.

2.10. Crystallization, X-ray data collection, structure solution and refinement

Before crystallization trials, the CaUMPS was exchanged for 20 mM HEPES, pH 8.0, 300 mM NaCl and 10 % (v/v) glycerol by ultrafiltration

in Amicon Ultra 30 (Millipore), and the enzyme solution was concentrated to 10 mg/mL. The concentrated enzyme preparation was incubated prior to crystallization with 5 mM PRPP, 2.5 mM OA and 5 mM MgCl₂. Crystals were obtained by the hanging-drop vapor diffusion method at 291 K by mixing equal volumes of protein and reservoir solution, which consisted of 0.1 M HEPES pH 7.5 and 20 % (w/v) PEG 10000. Suitable crystals for diffraction appeared after three weeks and continued to grow for about one month. The crystals were cryoprotected in reservoir solution supplemented with 20 % (v/v) glycerol and cryo-cooled in liquid N₂. X-ray diffraction data of crystals were collected at 100 K at the beamline 19 ID of the Advanced Photon Source of the Structural Biology Center at Argonne National Laboratory, Lemont, IL, USA. The data were indexed and integrated using XDS [20] and scaled and truncated with programs from the CCP4 suite [21]. The initial phases were obtained by molecular replacement with Phaser [22] using the AlphaFold2 model as searching model. Phases were improved by rigid body refinement and geometric constraint performed in REFMAC [23]. Alternating cycles of automatic and manual refinement were carried out with the standard protocols of Phenix [24] monitoring the R_{work} and R_{free} split during the whole process. The model was fitted to the $2F_o - F_c$ electron density map using Coot [25]. The final crystallographic structure displayed good stereochemistry, as analyzed by MOLPROBITY [26]. Structural alignments were performed with Coot [25] and PyMOL (<http://www.pymol.org>). Coordinates and structure factors have been deposited in the RCSB Protein Data Bank (PDB code 8UOZ).

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the recombinant CaUMPS protein

The recombinant CaUMPS protein was purified to homogeneity using affinity and size-exclusion chromatography (SEC) which yielding about 0.73 mg of pure and active protein per liter of bacterial culture. The CaUMPS comprises two domains, OPRTase at the N-terminal with 208 residues and ODCase at the C-terminal from 220 to 482 residues (Supplementary Fig. S1). The subunit molecular mass of the recombinant CaUMPS estimated by SDS-PAGE was 53 kDa (Fig. 1A), corresponding to the predicted molecular mass of 53.2 kDa predicted from the amino acid sequence of the protein by ExPASy ProtParam [27]. The pure recombinant CaUMPS eluted in SEC as a single, symmetric peak (Fig. 1B). The elution volume corresponded to an apparent molecular mass of 108 kDa, consistent with two copies of the CaUMPS. The molecular mass of the CaUMPS SEC eluted fraction was determined by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The results showed three peaks, the second and the

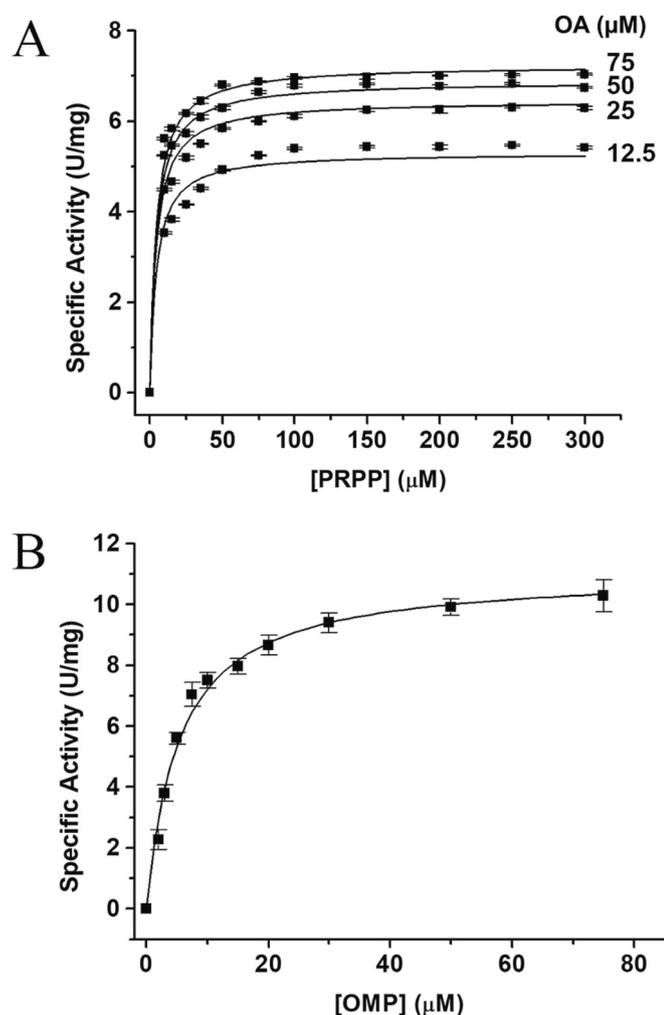


Fig. 2. Saturation kinetics of CaOPRTase and CaODCase domains in bifunctional CaUMPS enzyme. Steady-state initial velocity experiments were carried out as described in Materials and methods. A) Saturation kinetics of CaOPRTase domain with OA. Concentration of PRPP was varied (10–300 μM) in the presence of four fixed different concentration of OA. Points are the average of the data of at least three independent experiments. The kinetic parameters \pm the standard errors were estimated by nonlinear regression fits of the experimental data to Bi-Bi-random kinetic mechanism equation (Eq. (2)). B) Saturation kinetics of CaODCase domain with OMP. The kinetic parameters \pm the standard errors were estimated by nonlinear regression fits of the experimental data to the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)).

mayor peak observed (53.9 kDa) is very close to the value calculated from the amino acid sequence (53.2 kDa). The first peak (27 kDa) corresponded to the mass of one subunit with a charge of ionization of +2. The third peak observed at a mass of 108 kDa (Supplementary Fig. S2), corresponded to a mass of two copies of the CaUMPS, as the value determined previously by SEC.

The conformational integrity of the CaUMPS was demonstrated by circular dichroism spectra (Supplementary Fig. S3), which indicated a correct folding and the observation of catalytic activity in both active sites confirmed a native state of the enzyme preparation used in this study.

3.2. Stability of recombinant CaUMPS protein

The stability of the recombinant protein was analyzed in HEPES and Tris buffers by performing thermal shift assays on CaUMPS in absence and presence of PRPP measuring the protein melting temperatures (T_m).

Table 1
Kinetic parameters of reactions catalyzed by CaUMPS.

Kinetic parameter	CaOPRTase domain		CaODCase domain
	PRPP	OA	OMP
V_{max} (U/mg)	8.24 \pm 0.11		11.06 \pm 0.27
k_{cat} (s^{-1})	0.23		2.18
K_m (μM)	4.25 \pm 0.27	6.91 \pm 0.42	5.31 \pm 0.49
k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	5.47 $\times 10^4$	3.36 $\times 10^4$	4.10 $\times 10^5$

These experiments showed that HEPES buffer (pH 8.0) had a stabilizing effect on CaUMPS with T_m values of 51.7 °C compared with to Tris buffer at pH 8.0 with T_m values of 49.9 °C ($\Delta T_m = 1.8$ °C). On the other hand, the protein stability increased in presence of 0.2 mM of PRPP, the T_m value was 52.3 °C in HEPES buffer, while for the Tris buffer was 51.5 °C with a difference of only 0.8 °C. The CaUMPS aggregates at 60 °C in Tris buffer, while in HEPES buffer it remains soluble up to 70 °C (data not shown).

3.3. Steady-state kinetics

The reaction catalyzed by CaUMPS enzyme consists of two consecutive reactions assisted by two different catalytic domains that are hypothesized to be connected through an interfaced channel between active sites. In our hands, it was possible to measure the catalytic activity of each of the domains apparently independently. We performed kinetic characterization of the CaOPRTase domain reaction using PRPP and OA as substrates (Fig. 2A) and kinetic characterization of the CaODCase domain using OMP as substrate (Fig. 2B). The activity of the CaODCase domain was also measured using the OPRTase substrates. The specific activity of the CaODCase domain in this assay was equal to activity observed when the substrate of CaODCase domain was used. We anticipate the existence of two possibilities in this assay: that the OMP diffuses out of the active site of the OPRTase domain and back into the ODCase domain, where the OMP intermediate completely dissociates from the enzyme molecule; or that the OMP is channeled between active sites without dissociating from the enzyme. In the second case, it is expected a greater apparent catalytic efficiency than that observed when catalysis is measured in only one of the domains. More detailed kinetic studies are necessary to demonstrate substrate channeling.

The kinetic parameters of CaOPRTase are comparable to those observed in other enzymes [17,28–33]. Derived from the initial velocity patterns (Lineweaver-Burk plots), we observed intersecting lines in quadrant II (data not shown). Thus, it was inferred that CaOPRTase follows a simple sequential displacement mechanism. In the case of the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme, others observed a pattern of parallel lines [17], which suggests a double displacement mechanism (ping-pong), characterized by the formation of a modified enzyme intermediate, in this case with PRPP. However, it was concluded through a biochemical characterization of inhibition kinetics and a study of the reverse reaction that an *E*-PRPP intermediate is not formed during the reaction, and that the enzyme follows a Mono-Iso, Bi-Bi ordered mechanism [17]. Although the above is consistent with what was observed here for CaOPRTase, future studies are needed to elucidate the full mechanism of the plant enzyme. The kinetic parameters of the CaODCase domain of CaUMPS are comparable with those observed for other enzymes [19] (Table 1). Initial velocity data were fitted to Eq. (1) (Michaelis-Menten equation). This study is a first approximation for the characterization of a critical and not well-known enzyme in plants; for further comprehension of the structural-functional relations, it is necessary to go deeper kinetically, conduct an inhibition study, establish equilibrium binding parameters with analogs, measure the metabolic intermediate communication between active sites, and elucidate the structural topology of the full chimeric enzyme. All these qualities are necessary to identify the structural determinants of the functional features of UMPS and determine if catalytic domain phusion represents an

Table 2

X-ray diffraction data collection and model-refinement statistics of the CaODCase.

Data collection ^a	
Wavelength (Å)	0.97918
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	50.00, 95.70, 112.20
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Mol/ASU ^b	2
Resolution range (Å)	48.40–1.4
Unique reflections	103,974 (12,799)
Total reflections	1,118,181 (63,282)
Completeness (%)	97.3 (83.7)
<i>R</i> _{merge} (%)	5.6 (45.0)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	20.4 (3.0)
Multiplicity	11.4 (4.9)
CC _{1/2}	99.9 (89.1)
Refinement statistics	
Resolution range (Å)	48.40–1.4
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	15.81/17.80
Number of atoms	
Protein	4036
Glycerol	18
1,2-Ethanediol	20
PEG	7
1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate	13
Waters	605
Average <i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	20.7
Glycerol	32.2
1,2-Ethanediol	33.0
PEG	41.0
1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate	23.6
Waters	35.7
r.m.s.d. from ideal stereochemistry ^c	
Bond lengths (Å)	0.016
Bond angles (°)	1.402
Ramachandran plot statistics (%)	
Favored/allowed/non-allowed regions	97.62/2.38/0
PDB	8UOZ

^a Values in parentheses show the statistics for the highest resolution shell.^b Number of molecules per asymmetric unit (ASU). ^c r.m.s.d. indicates root mean square deviation.

advantage in the metabolic flux of pyrimidine biosynthesis.

Kinetic parameters were estimated by non-linear regression of the average initial velocity obtained from three independent kinetic assays

fit to Eqs. (1) or (2), as appropriate. Initial velocities were obtained at 30 °C, 50 mM HEPES buffer pH 8.0. The symbol \pm indicates the error (standard deviation) of the estimated values.

3.4. Overall description of the CaODCase structure

Initially, we tried to get the crystal structure of the bifunctional CaUMPS, however our attempts to obtain this structure failed because one part of the protein (CaOPRTase) was removed during the crystallization. The crystal obtained and used for diffraction only showed half of the CaUMPS that corresponds to the ODCase domain. One explanation for this phenomenon is that during the crystallization period a peptide bond was hydrolysed from the linker part between the two domains. When analysing the structure of this linker we found a phenylalanine residue that can be recognized by a protease found in a trace manner in the crystallization medium. This was only observed in the crystallization and we did not observe cuts in the preparation of the enzyme stored for long periods as revealed by SDS-PAGE. Therefore, we only obtained the crystal structure of the CaODCase, despite the crystallization assays were carried out with the bifunctional CaUMPS. The structure of the CaODCase was determined in complex with 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate at 1.4 Å resolution. The crystals belong to the P2₁2₁2₁ space group and contained a dimer of the enzyme in the asymmetric unit. The final model has a *R*_{work} value of 15.81 and a *R*_{free} value of 17.80 %. The data collection and refinement statistics are summarized in Table 2. The coordinates and the structure factors have been deposited in the RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) with accession code 8UOZ.

The observed chains of CaODCase contains 260 residues with an overall fold of a TIM barrel with 8 β -strands surrounded by α helices (Fig. 3A). These elements of secondary structure are similar, as are the overall structures, to that of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (PDB codes 1DVJ, 1DV7 [34]), *Bacillus subtilis* (PDB code 1DBT; [35]), *Escherichia coli* (PDB code 1EIX, [36]), *Saccharomyces cerevisiae* (PDB codes 1DQW, 1DQX, [37]), *Plasmodium falciparum* (PDB code 2F84), *Homo sapiens* (PDB codes 2QCC, 2QCD, 2QCE; [19]), *Leishmania donovani* (PDB codes 3QW3, 3QW4; [38]). The average α -carbons r.m.s.d value between the two subunits of the asymmetric unit is 0.245 Å.

Due to the crystallization assays were carried out with the bifunctional CaUMPS in the presence of PRPP, OA and MgCl₂, we assume that CaOPRTase moiety carried out the condensation reaction, forming its product OMP, which entered in the active site of the CaODCase, therefore the subunit A of the crystal structure had a 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate molecule in the active site (Fig. 3B). We suggested that this

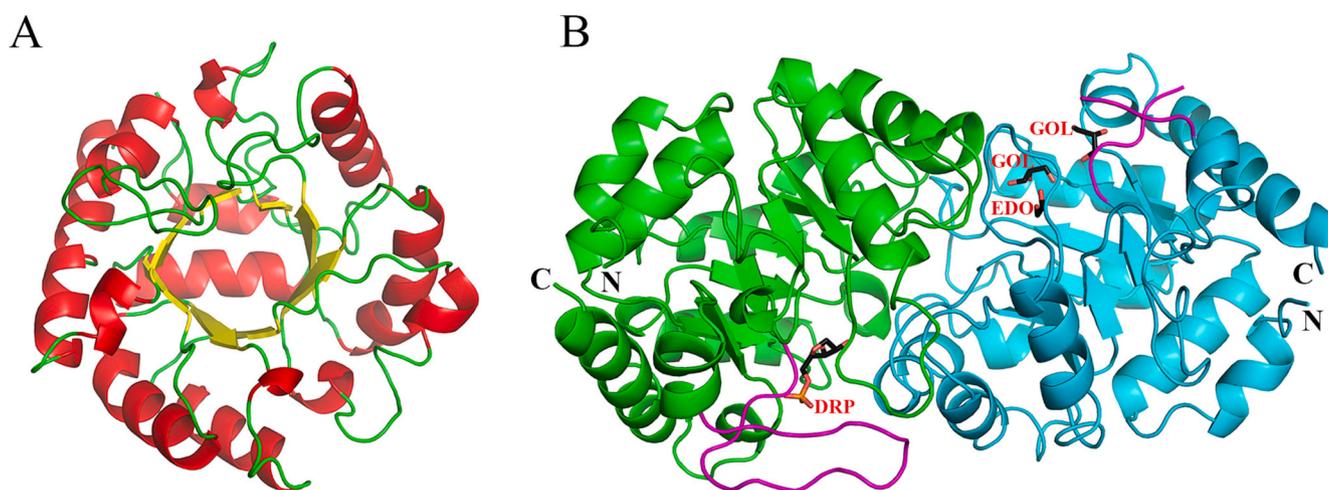


Fig. 3. Crystallographic structure of CaODCase. A) Cartoon representation of the CaODCase monomer showing the secondary structure elements. Helices are shown in red, β -strands are yellow and loops are green. B) Cartoon representation of CaODCase dimer (subunit A and B are colored green and cyan, respectively). 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate (DRP), glycerol (GOL) and ethylene glycol (EDO) are shown as sticks with carbon atoms in black, oxygen in red and phosphorus in orange. The loop (420–437) closing the active site is shown in magenta. Figures were generated using PyMOL.

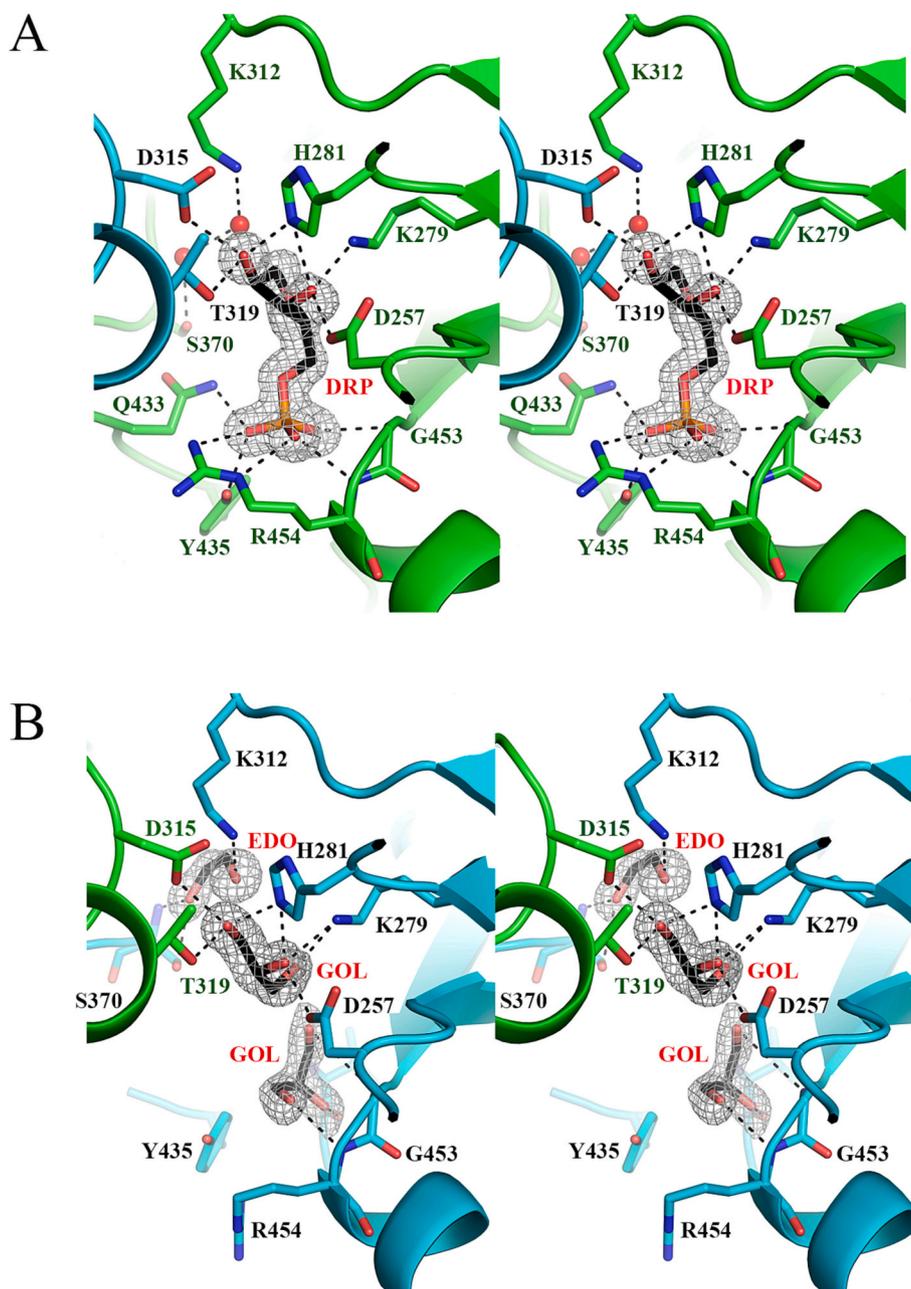


Fig. 4. Active site of CaODCase. A) Stereoview of the active site of subunit A bound with 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate (DRP). The simulated annealing omit map (F_o-F_c) of the bound DRP is shown countered at 3σ (gray mesh). B) Stereoview of the active site of subunit B bound with glycerol (GOL) molecules and ethylene glycol (EDO). The simulated annealing omit map (F_o-F_c) of the bound GOL molecules and EDO are shown countered at 3σ (gray mesh). Hydrogen bonds are depicted as black dashed lines with a cutoff of 3.2 \AA . Residues are colored green (subunit A) or blue (subunit B). DRP, GOL and EDO are shown as sticks with carbon atoms in black, oxygen in red and phosphorus in orange. Figures were generated using PyMOL.

molecule could be OMP or UMP, but the observed electron density in the protein does not support the modeling of the nicotinamide ring moiety, therefore this portion of the ligand was not identified. Glycerol molecules were also found in the active site of the subunit B, as it was previously found in the human ODCase (PDB code 2QCC, [19]). The first two residues at the N-terminal and the last residue at the C-terminal in both subunits could not be defined clearly. Residues 424–434 exhibit weak or nonexistent $2F_o-F_c$ electron density in the subunit B and are not present in the final refined model, in contrast the loop formed by residues 420–437 is well-ordered in the subunit A closing the active site (Fig. 3B).

3.5. CaODCase active site

The active site of the CaODCase is located at the end of the TIM barrel, in the crystal structure of the CaODCase an electron density was observed in the active site in subunit A corresponding to a 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate molecule with occupancy of 1.0 (Fig. 4A). The phosphate group interacts with the sidechains of Gln433, Tyr435 and Arg454 as well as with the backbone NH groups of Arg454 and Gly453. The O3'-OH group of the ribofuranose ring is hydrogen bonded to Asp257, Lys279 and His281 sidechains of the same subunit. The O2'-OH group of the ribofuranose ring is hydrogen bonded to His281 side-chain of the same subunit and to sidechains of Asp315 and Thr319 of the subunit B. Three water molecules are in the active site, two waters are

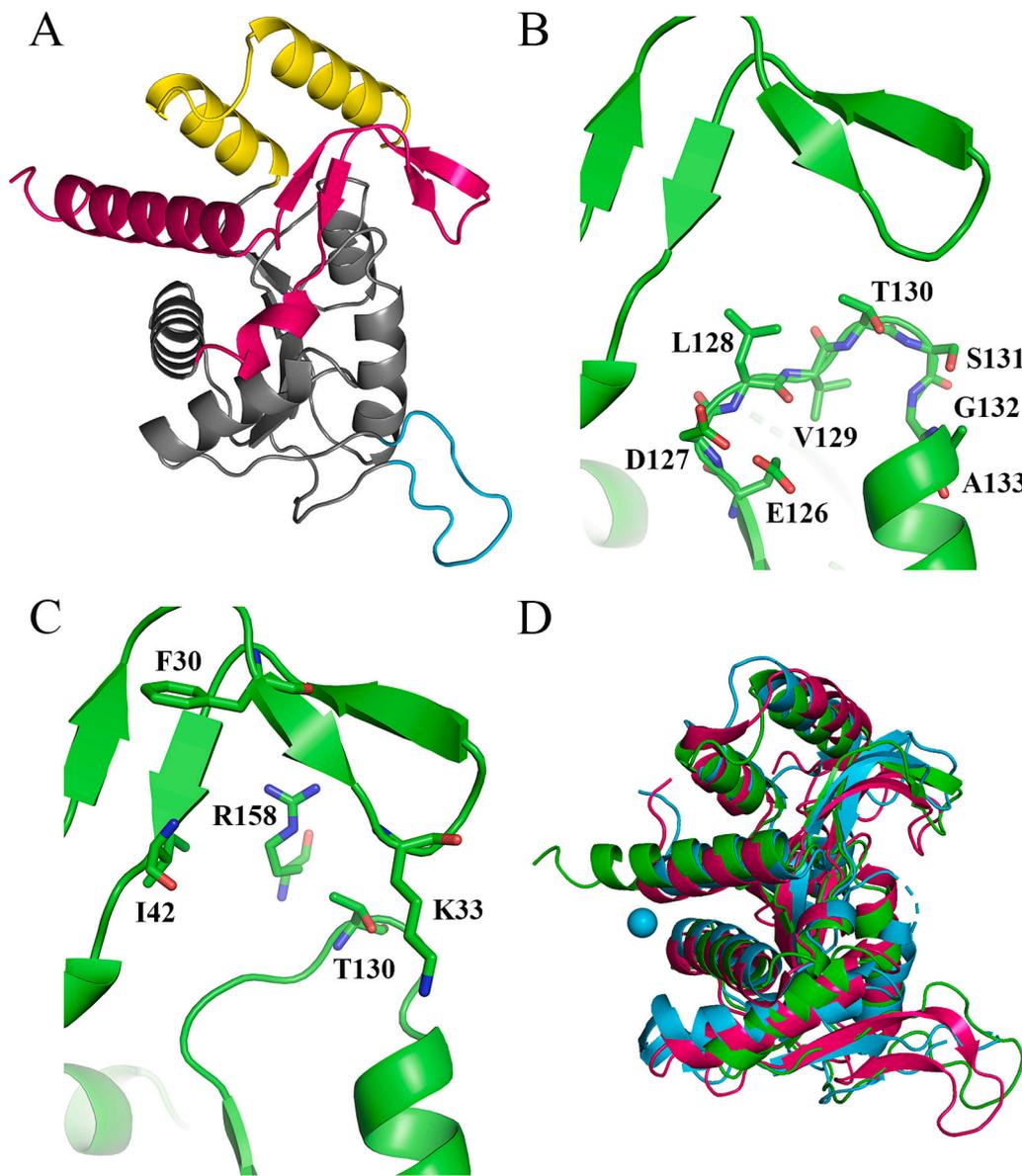


Fig. 5. Model of CaOPRTase. A) Cartoon representation of the CaOPRTase monomer showing the three regions: N-terminal (magenta), core region (gray) and C-terminal (yellow). The flexible loop is shown in colour cyan. B) Close up of the active site showing the PRPP binding motif and the residues involved in the ribose hydroxyl groups of PRPP. C) Close up of the active site showing the residues involved in the OA binding site. D) Superposition of CaOPRTase model (green) with OPRase from *S. cerevisiae* in the apo form (PDB code 2PRY, colour cyan) and ternary complex (PDB code 2PS1, colour magenta). Residues are shown in sticks with carbon atoms in green, oxygen in red, nitrogen in blue. Mg^{2+} ion is shown in sphere. Figures were generated using PyMOL.

almost perfect mimic for C4 and C5 positions of the pyrimidine ring of the OMP or UMP. The water molecule in C4 position is hydrogen bonded to Ser370 sidechain as well as with its backbone NH group. The water molecule in C5 position is hydrogen bonded to water molecule in C4 position and Lys312 sidechain (Fig. 4A).

The active site of the B subunit has an ethylene glycol and two glycerol molecules. The ethylene glycol molecule is placed at the position of the pyrimidine ring. One glycerol molecule is located in the same position of the ribofuranose ring in the subunit A making the same hydrogen bonds that the O2'-OH and O3'-OH groups as the ribofuranose ring. This was also found in the human ODCase (PDB code 2QCC, [19]). The other glycerol molecule was located in the phosphate binding site, the O1 is hydrogen bonded to NH group of Arg454 as phosphate did in the A subunit (Fig. 4B). However, the lack of a negative charge of the phosphate to attract the Arg454 sidechain causes that it takes another conformation outside of the phosphate site. This causes the release of the Asp429 by the loss of the two interactions formed with Arg454 causing

the disorganized of the 429–433 region due to the large number of interactions that Asp429 was forming with these residues. Another important interaction is between Gln433 and the phosphate, due to the lack of the phosphate the Gln433 is also released. Therefore, the active site of the B subunit is open as an apo form (Supplementary Fig. S4). Glycerol and ethylene glycol molecules do not seem to have a functional relevance, since they do not trigger the closed conformation of the enzyme.

3.6. CaOPRTase model

The structure of CaOPRTase modelled with AlphaFold2 is shown in Fig. 5A. The protein model can be divided into the same three structural regions defined in other OPRases: N-terminal, core and C-terminal regions. The N-terminal region (magenta; residues 2-50) contains a regular α -helix, four short antiparallel β -strands and a short α -helix. Two of these β -strands constitutes the hood domain. The core region (gray;

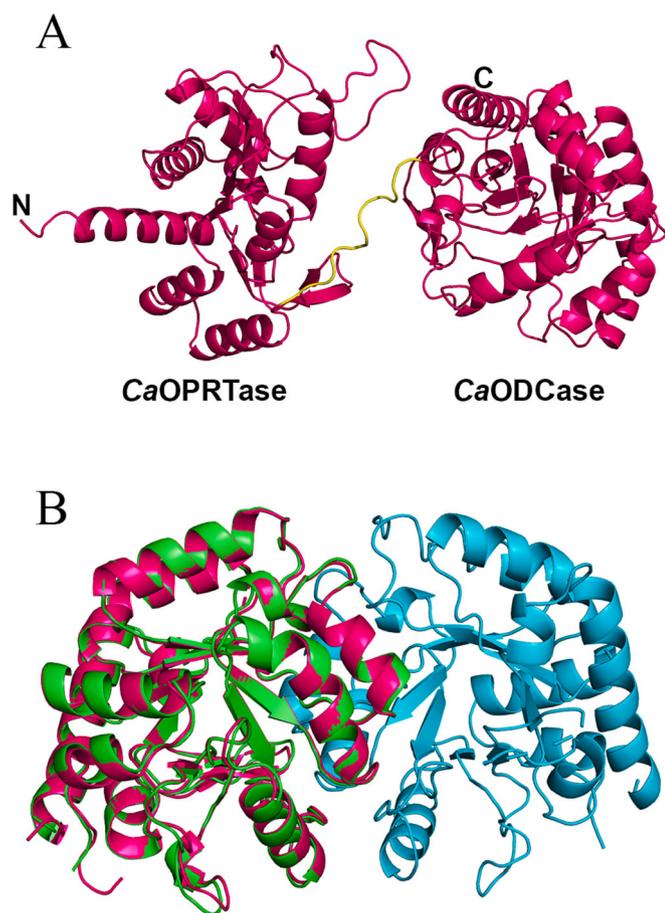


Fig. 6. Model of CaUMPS. A) Cartoon representation of the CaUMPS with the CaOPRTase and CaODCase domains. The link loop is shown in yellow. B) Superposition of CaODCase model (magenta) with the crystal structure of the CaODCase dimer (subunit A and B are colored green and cyan, respectively). Figures were generated using PyMOL.

residues 51–178) contains a four stranded twisted β -sheet surrounded by four α -helices. The first half of the core formed by two parallel β -strands and one α -helix is connected to the second half by a long flexible loop composed of residues 99–111. AlphaFold2 was able to model the complete flexible loop. The C-terminal region (yellow; residues 179–208) is formed by two antiparallel α -helices connected by a loop.

3.7. CaOPRTase active site

The conserved PRPP-binding motif in the CaOPRTase model is formed by residues 128–133 (Fig. 5B) which are equivalent to residues 133–138 in *S. cerevisiae* [39]. The ribose hydroxyl groups of PRPP could be hydrogen bonded with Glu126 and Asp127. The OA binding region site is formed by residues Phe30, Ile42, Arg158, Thr130 and Lys33 (Fig. 5C). The flexible loop is formed by residues Arg100–Ala111, which are equivalent to residues Arg105–Ile116 in *S. cerevisiae* (Fig. 5A).

The model of the CaOPRTase dimer obtained by AlphaFold2 shows that the flexible loop is slightly extended over the neighbouring subunit of the protein, as if it were in an intermediate conformation between open and closed comparing with the *S. cerevisiae* OPRTases structures in the apo (open, PDB code 2PRY, [39]) and ternary complex (closed, PDB code 2PS1, [39]) (Fig. 5D). The closed conformation of the flexible loop could be allowing Arg100, Lys104 and Tyr106 to form interactions with the phosphate oxygens of PRPP of the neighbouring subunit.

3.8. CaUMPS model

The structure of CaUMPS was modelled using AlphaFold2. CaOPRTase domain is found in N-terminal with 208 residues and CaODCase domain at the C-terminal comprises residues from 220 to 482. The two domains are linked by a long loop of 12 residues (Fig. 6A). The structural superposition between the CaODCase crystal structure and the CaODCase modelled with AlphaFold2 showed small differences with an average α -carbons r.m.s.d value between them of 0.399 Å (Fig. 6B). Structure determination of bifunctional CaUMPS and CaOPRTase domains will be necessary to confirm the AlphaFold2 models. As well as the complexes with their substrates and the generation of mutants to obtain information about the reaction mechanism of UMPS.

4. Conclusions

The UMPS enzyme from the *C. arabica* plant can be obtained recombinant, soluble and in its native state with correct folding. The thermal stability of CaUMPS suggests that it is a stable enzyme. Both catalytic domains present biological activity comparable to that observed in other chimeric enzymes and that of individual proteins. The native CaUMPS molecule is a dimer, where each polypeptide chain consists of a OPRTase domain and another ODCase domain. The data from the initial velocity study of the OPRTase domain are consistent with a random Bi-Bi mechanism. Ligand binding at the active site of CaODCase promotes a conformational change to the closed state in one of the subunits while the adjacent subunit may be in the open state. The data presented in this work constitutes the foundation for future studies in the elucidation of the mechanism of action of UMPS. Further studies will be oriented toward determined the structure of the bifunctional CaUMPS by cryo-electron microscopy and molecular dynamics studies.

CRediT authorship contribution statement

Alexis Hinojosa-Cruz: Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Ángel G. Díaz-Sánchez:** Formal analysis, Resources, Writing – review & editing. **Adelaida Díaz-Vilchis:** Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Lilian González-Segura:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare no potential competing interests.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FQ-5000-9129 and UNAM-PAPIIT (IN227920 and IN211223 to LGS). AHC is a recipient of a CONACYT scholarship. Crystallographic results shown in this report are derived from work performed at Argonne National Laboratory, Structural Biology Center at the Advanced Photon Source, operated by UChicago Argonne, LLC, for the U.S. Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research under contract DE-AC02-06CH11357. We are grateful to the staff of the beamline 19-ID for their support during data collection, particularly to Dr. Youngchang Kim. We thank to Dr. Georgina Garza-Ramos, UNAM for her assistance in CD experiments, Dr. Adela Rodríguez-Romero, UNAM for her assistance in MALDI-TOF assays and Dr. Rosario A. Muñoz-Clares, UNAM for her facilities to use her equipment.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129226>.

References

- [1] C.W. Ross, Biosynthesis of nucleotides, in: P.K. Stump, E.E. Conn (Eds.), *The Biochemistry of Plants vol. 6*, Academic Press, New York, 1981, pp. 169–205.
- [2] T.W. Traut, M.E. Jones, Uracil metabolism—UMP synthesis from orotic acid or uridine and conversion of uracil to beta-alanine: enzymes and cDNAs, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 53 (1996) 1–78, [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60142-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60142-7).
- [3] C. Stasolla, R. Katahira, T.A. Thorpe, H. Ashihara, Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants, *J. Plant Physiol.* 160 (2003) 1271–1295, <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01169>.
- [4] C. Kafer, L. Zhou, D. Santoso, A. Guirgis, B. Weers, S. Park, R. Thornburg, Regulation of pyrimidine metabolism in plants, *Front. Biosci.* 9 (2004) 1611–1625, <https://doi.org/10.2741/1349>.
- [5] M.E. Jones, Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 253–279, <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.001345>.
- [6] F. Nasr, N. Bertauche, M.-E. Dufour, M. Minet, F. Lacroute, Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway, *Mol. Gen. Genet.* 244 (1994) 23–32, <https://doi.org/10.1007/BF00280183>.
- [7] D. Santoso, R. Thornburg, Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana glauca*, *Plant Physiol.* 116 (1998) 815–821, <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.815>.
- [8] T. Nara, T. Hshimoto, T. Aoki, Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine-biosynthetic pathway in eukaryotes, *Gene* 257 (2000) 209–222, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00411-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00411-X).
- [9] H. Ashihara, I.A. Ludwig, A. Crozier, *Plant Nucleotide Metabolism Biosynthesis, Degradation, and Alkaloid Formation*, 2020, <https://doi.org/10.1002/9781119476139>.
- [10] D.P. Suttle, B.Y. Bugg, J.K. Winkler, J.J. Kanalas, Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 1754–1758, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.6.1754>.
- [11] S. Schoeber, D. Simon, B. Schewenger, Sequence of the cDNA encoding bovine uridine monophosphate synthase, *Gene* 124 (1993) 307–308, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90412-V](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90412-V).
- [12] T.W. Traut, M.E. Jones, Inhibitors of orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase from mouse Ehrlich ascites cells: a procedure for analyzing the inhibition of a multi-enzyme complex, *Biochem. Pharmacol.* 26 (1977) 2291–2296, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(77\)90293-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(77)90293-3).
- [13] D. Santoso, R.W. Thornburg, Isolation and characterization of UMP synthase mutants from haploid cell suspensions of *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.* 99 (1992) 1216–1225, <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1216>.
- [14] P. Geigenberger, B. Regierer, A. Nunes-Nesi, A. Leisse, E. Urbanczyk-Wochniak, F. Springer, J.T. van Dongen, J. Kossmann, A.R. Fernie, Inhibition of the *de novo* pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance, *Plant Cell* 17 (2005) 2077–2088, <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033548>.
- [15] S. Biswas, W. Fan, R. Li, S. Li, W. Ping, S. Li, A. Naumova, T. Peelen, E. Kok, Z. Yuan, D. Zhang, J. Shi, The development of DNA based methods for the reliable and efficient identification of *Nicotiana tabacum* in tobacco and its derived products, *Int. J. Environ. Anal.* 2016 (2016) 4352308, <https://doi.org/10.1155/2016/4352308>.
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [17] A. Breda, L.A. Rosado, D.M. Lorenzini, L.A. Basso, D.S. Santos, Molecular, kinetic and thermodynamic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase, *Mol. Biosyst.* 8 (2012) 572–586, <https://doi.org/10.1039/c1mb05402c>.
- [18] S. Donini, D.M. Ferraris, R. Miggiano, A. Massarotti, M. Rizzi, Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthesis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1180, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01057-z>.
- [19] J.G. Wittmann, D. Heinrich, K. Gasow, A. Frey, U. Diederichsen, M.G. Rudolph, Structures of the human orotidine-5'-monophosphate decarboxylase support a covalent mechanism and provide a framework for drug design, *Structure* 16 (2008) 82–92, <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.10.020>.
- [20] W. Kabsch, XDS, *Acta Crystallogr. D* 66 (2010) 125–132, <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- [21] Collaborative Computational Project Number 4, the CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763, <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>.
- [22] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R. J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674, <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- [23] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 53 (1997) 240–255, <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>.
- [24] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, et al., PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 66 (2010) 213–221, <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
- [25] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486–501, <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- [26] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 66 (2010) 12–21, <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- [27] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788, <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>.
- [28] S.R. Krungkrai, S. Aoki, N.M.Q. Palacpac, D. Sato, T. Mitamura, J. Krungkrai, T. Horii, Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile *Mol. Biochem. Parasitol.* 134 (2004) 245–255, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.006>.
- [29] R.W. McClard, E.A. Holets, A.L. MacKinnon, J.F. Witte, Half-of-sites binding of orotidine 5'-phosphate and α -D-5-phosphoribulose 1-diphosphate to orotate phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae* supports a novel variant to the Theorell-Chance mechanism with alternating site catalysis, *Biochemistry* 45 (2006) 5330–5342, <https://doi.org/10.1021/bi051650o>.
- [30] M.B. Bhatia, A. Vinitzky, C. Grubmeyer, Kinetic mechanism of orotate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*, *Biochemistry* 29 (1990) 10480–10487, <https://doi.org/10.1021/bi00498a009>.
- [31] G.P. Wang, C. Lundegaard, K.F. Jensen, C. Grubmeyer, Kinetic mechanism of OMP synthase: a slow physical step following group transfer limits catalytic rate, *Biochemistry* 38 (1999) 275–283, <https://doi.org/10.1021/bi982056o>.
- [32] X. Wang, C. Ma, X. Wang, P. Xiu, Orotate phosphoribosyltransferase from *Corynebacterium ammoniagenes* lacking a conserved lysine, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 9030–9036, <https://doi.org/10.1128/JB.01161-07>.
- [33] M.J. Yablonski, D.A. Pasek, B.D. Han, M.E. Jones, T.W. Traut, Intrinsic activity and stability of bifunctional human UMP synthase and its two separate catalytic domains, orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 10704–10708, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10704>.
- [34] N. Wu, E.F. Pai, Crystal structure of inhibitor complexes reveal an alternate binding mode in orotidine-5'-monophosphate decarboxylase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28080–28087, <https://doi.org/10.1074/jbc.M202362200>.
- [35] T.C. Appleby, C. Kinsland, T.P. Begley, S.E. Ealick, The crystal structure and mechanism of orotidine 5'- monophosphate decarboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 2005–2010, <https://doi.org/10.1073/pnas.259441296>.
- [36] P. Harris, J.-C. Navarro Poulsen, K.F. Jensen, S. Larsen, Structural basis for the catalytic mechanism of a proficient enzyme: orotidine 5'-monophosphate decarboxylase, *Biochemistry* 39 (2000) 4217–4224, <https://doi.org/10.1021/bi992952r>.
- [37] B.G. Miller, A.M. Hassell, R. Wolfenden, M.V. Milburn, S.A. Short, Anatomy of a proficient enzyme: the structure of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in the presence and absence of a potential transition state analog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 2011–2016, <https://doi.org/10.1073/pnas.030409797>.
- [38] J.B. French, P.A. Yates, D.R. Soysa, J.M. Boitz, N.S. Carter, B. Chang, B. Ullman, S. E. Ealick, The *Leishmania donovani* UMP synthase is essential for promastigote viability and has an unusual tetrameric structure that exhibits substrate-controlled oligomerization, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20930–20941, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228213>.
- [39] L. González-Segura, J.F. Witte, R.W. McClard, T.D. Hurley, Ternary complex formation and induced asymmetry in orotate phosphoribosyltransferase, *Biochemistry* 46 (2007) 14075–14086, <https://doi.org/10.1021/bi701023z>.

Supplementary Material

Structural and functional properties of uridine 5'- monophosphate synthase from *Coffea arabica*

Alexis Hinojosa-Cruz¹, Ángel G. Díaz-Sánchez², Adelaida Díaz-Vilchis³, Lilian González-Segura^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México. ²Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez 32310, Chihuahua, México. ³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62240, México.

*Corresponding author: Lilian González-Segura. Phone: +52-5556223145. E-mail: lilgonzalezseg@gmail.com

```

001  MSSSSSSVSSTMENLILQLHDISAVKFGNFKLKSGISSPIYIDLRLIVSY  050
051  PTLRQISQTLVSTLPTSTRYDVVCGVPYTALPIATCVSVANNIPMLMRR  100
101  KEVKDYGTAKAIEGAFEPNQICLIIEDLVTSGASVLETASPLRHAGLKVT  150
151  DAVVMIDREQGGRENLAENGITLHSMVKLTEMVRILKEKGRVSEETEMV  200
201  MQFLEENRKVAVPVAAPEKVKFRLPYGERVRLAKNPTGKKLFEIMIQKET  250
251  NLCLAADVATAAELLDIADKVGPEICMLKTHVDILPDFTPDFGSKLRSIA  300
301  EKHNFILIFEDRKFADIGNTVTMQYEGGIFKILDWADIVNAHIVSGPGIVD  350
351  GLKLKGLPRGRGLLLLAEMSSSGNFAKGDYTAAAVKIAEGHSDFVIGFIS  400
401  VNPASWPSGPGNPALIHATPGVQLAKGGDALGQQYNTPFVVISERGSII  450
451  IVGRGIIKAANPAEVAREYRLQGWDAYLLHCK 482

```

Fig. S1. *Ca*UMPS amino acid sequence. *Ca*OPRTase domain (black), link loop (blue) and *Ca*ODCase domain (magenta).

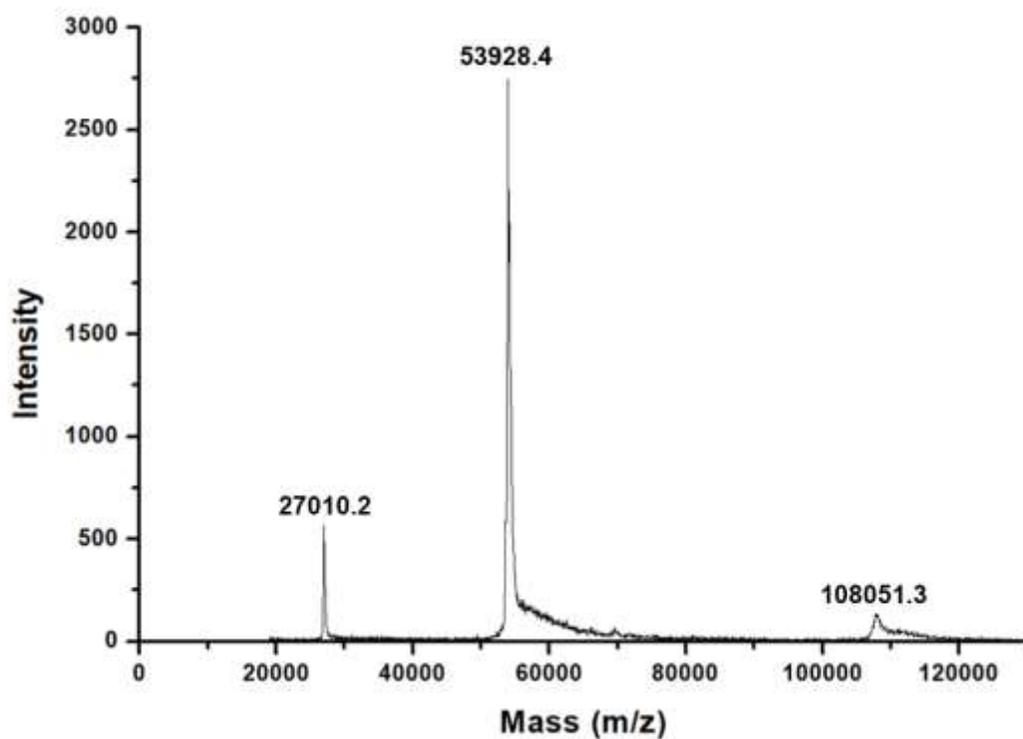


Fig. S2. *CaUMPS* mass spectrometry. A *CaUMPS* size-exclusion chromatography (SEC) eluted fraction was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Three main peaks were detected.

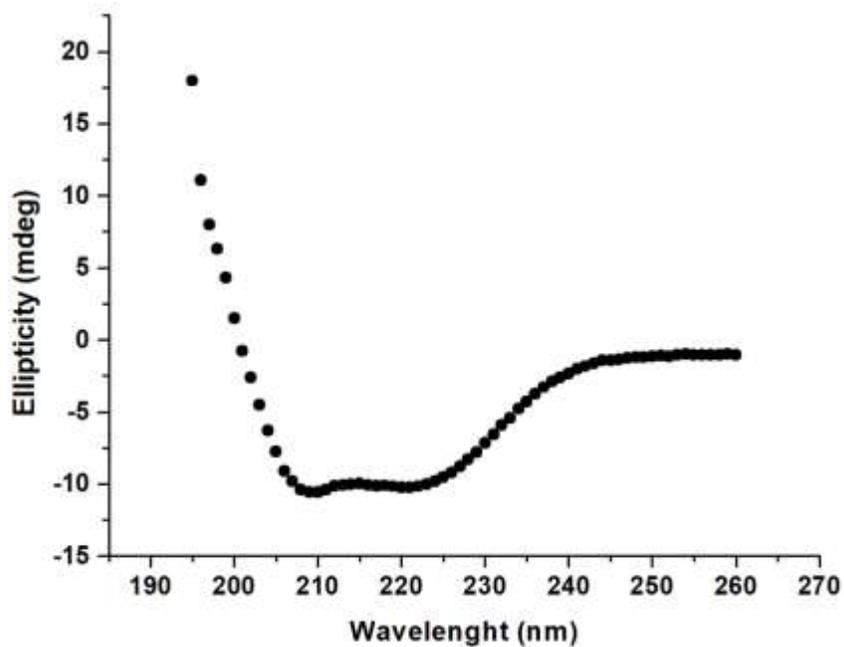


Fig. S3. Far-UV circular dichroism spectra of the *CaUMPS*. The *CaUMPS* was scanning over the far-UV range (195-260 nm) at 25 °C. The spectrum resulted from the average of four repetitive scans and was corrected by subtracting the average spectrum of the buffer.

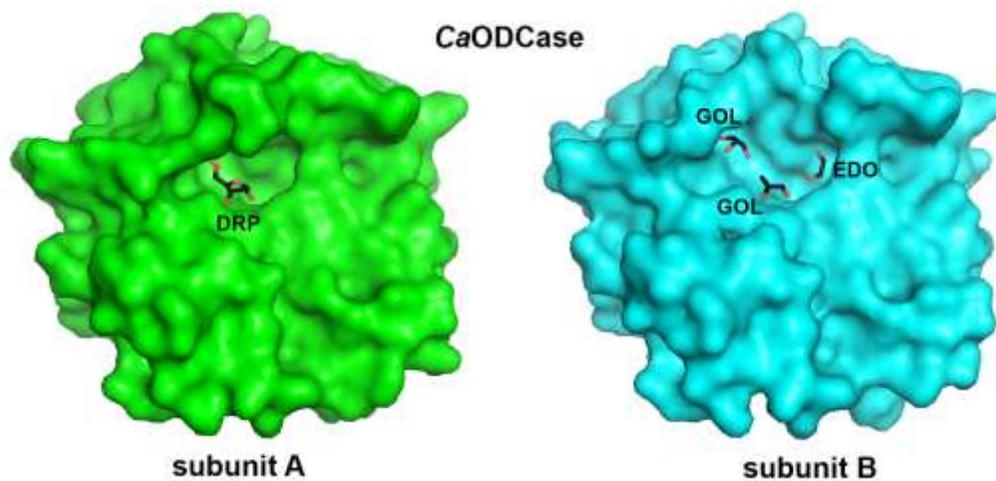


Fig. S4. Surfaces representation of *CaODCase* subunits (PDB 8U0Z). Subunit A is in closed conformation and with 1-deoxy-ribofuranose-5'-phosphate (DRP) molecule bound in its active site. Subunit B is in open conformation with two glycerol (GOL) molecules and one 1,2-Ethenediol (EDO) in its active site. Figure was elaborated with PyMOL.