



Memoria del 47º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Orotato fosforribosiltransferasa. Pasado, presente y futuro en el estudio estructural de las proteínas.

Orotate phosphoribosyltransferase. Past, present and future in the structural study of proteins.

González-Segura, Lilian^{1*} y Carrizosa-Carbajal, Esdras I.¹

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

*Correspondencia. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Edificio F Circuito escolar s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5622-3145, liliang@unam.mx

Resumen

La orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa; EC 2.4.2.10) cataliza la condensación del orotato con el fosforribosil pirofosfato dependiente de Mg^{2+} para producir pirofosfato y orotidina 5'-monofosfato. Esta enzima es clave en la síntesis de nucleótidos de pirimidinas y se encuentra ampliamente distribuida en bacterias, arqueas y eucariotes. Las OPRTasas tienen un gran cambio conformacional, clave para su actividad, el cual involucra el cierre de una asa flexible sobre los sustratos unidos para generar el sitio activo durante cada ciclo catalítico. El conocimiento de las diferentes estructuras tridimensionales de las OPRTasas en los procariotes, ha permitido aportar información muy valiosa de los sitios activos de estas enzimas, el cual representa un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Palabras clave: Fosforribosiltransferasas; estructura tridimensional; cambio conformacional; inhibición; síntesis de pirimidinas.

Abstract

Orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase; EC 2.4.2.10) catalyzes the Mg^{2+} dependent condensation of orotate with phosphoribosyl pyrophosphate to yield pyrophosphate and orotidine 5'-monophosphate. It is a key enzyme in the pyrimidines nucleotide synthesis that is widely distributed in bacteria, archaea and eukaryotes. The OPRTases have a large conformational change, key for their activity, which involves the closure of the flexible loop on the substrates bound to generate the active site each catalytic cycle. The knowledge of the different three-dimensional structures of the OPRTases in prokaryotes, has allowed to provide valuable information of the active sites of these enzymes, which represents an attractive target for the development of new drugs for the treatment of different diseases.

Key words: Phosphoribosyltransferase; three-dimensional structure; conformational change; inhibition; pyrimidines synthesis.

Introducción

La síntesis de nucleótidos depende de la acción de las fosforribosiltransferasas (PRTasas), un grupo de enzimas que catalizan el desplazamiento del pirofosfato (PP_i) del fosforribosil pirofosfato (PRPP) por un nucleófilo que contiene nitrógeno, como el amoníaco, adenina, guanina, hipoxantina, xantina, orotato o uracilo para formar un *N*-ribósido monofosfato y PP_i [1]. Estas enzimas juegan un papel muy importante tanto en las vías de síntesis *de novo*, en el reciclaje de nucleótidos de purinas, pirimidinas y en el metabolismo de pirimidinas, así como en la biosíntesis de histidina y triptófano [2-4].

La orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa; EC 2.4.2.10) cataliza la condensación del orotato con el PRPP dependiente de Mg²⁺ para producir PP_i y la orotidina 5'-monofosfato (OMP) (Fig. 1), la cual es descarboxilada por la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (ODCasa) para producir la uridina 5'-monofosfato (UMP), que es el nucleótido de entrada para la biosíntesis de todos los nucleótidos de pirimidina. Estas dos reacciones, son las últimas en la vía biosintética *de novo* de pirimidinas, conocida como vía del orotato (Fig. 2).

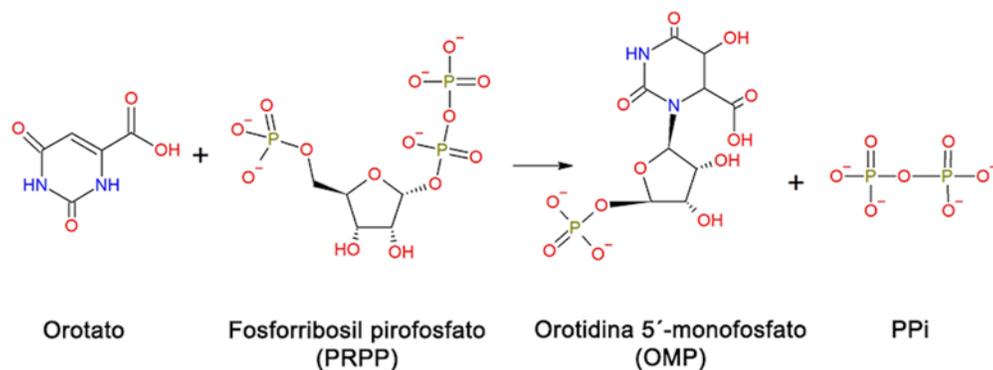


Figura 1. Reacción catalizada por la OPRTasa

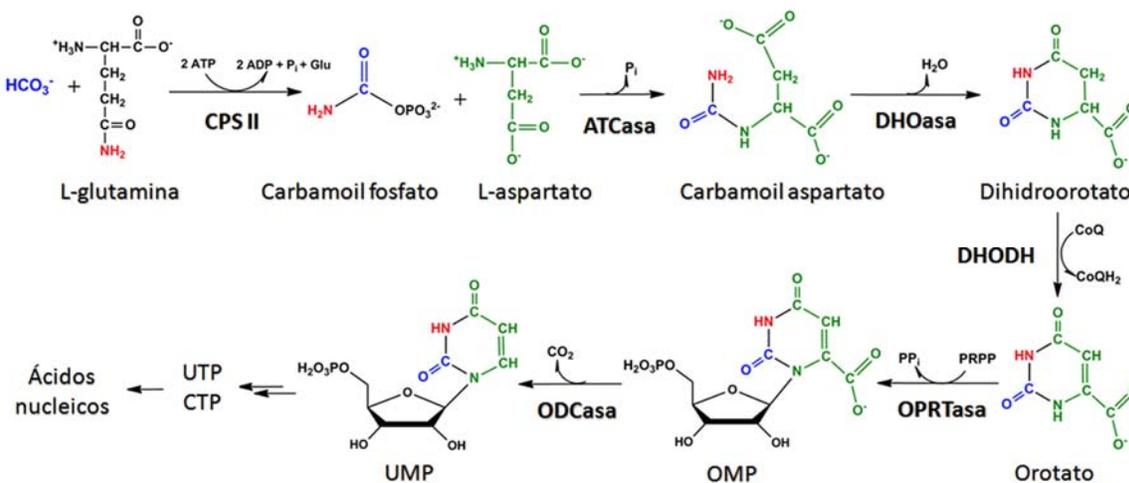


Figura 2. Vía de síntesis de pirimidinas. CPS II, Carbamoil fosfato sintetasa II; ATCasa, aspartato transcarbamilasa; DHOasa, dihidroorotata; DHODH, dihidroorotato deshidrogenasa; OPRTasa, orotato fosforribosiltransferasa; ODCasa, OMP descarboxilasa; PRPP, fosforribosil pirofosfato. Figura modificada de la referencia [38]

En la mayoría de los procariontes y eucariotes menos complejos, la OPRTasa y la ODCasa son codificadas por genes separados, mientras que en las plantas como en los animales, estas enzimas son codificadas por un gen que produce una sola cadena polipeptídica que recibe el nombre de UMP sintasa

[5]. En muchos organismos la región del N-terminal de este polipéptido bifuncional corresponde a la OPRTasa, mientras que la región del C-terminal a la ODCasa [6-8].

Pasado y presente

Importancia de la OPRTasa

La OPRTasa es la PRTasa más importante en el metabolismo de la síntesis de pirimidinas. Análisis filogenéticos han revelado una amplia distribución de la OPRTasa en bacterias, arqueas y eucariotes [9]. La vía de síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina involucra la síntesis del anillo de pirimidina antes que la unión del grupo ribosilo, por lo tanto, la OPRTasa es una enzima esencial en todos los organismos que utilizan la biosíntesis *de novo* de pirimidinas. Esta vía se encuentra más extendida que la síntesis *de novo* de purinas. Los protozoarios parásitos obtienen las purinas de los depósitos de purinas de sus células huésped, y las pirimidinas solo las pueden obtener a través de la síntesis *de novo* [10,11], por lo que esta vía es esencial para estos organismos, mientras que los mamíferos sintetizan purinas y pirimidinas *de novo*.

En humanos, la reacción de la UMP sintasa favorece la conversión de 5-fluorouracilo, que es un fármaco que se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama y de colon. Defectos genéticos en la UMP sintasa pueden causar patologías humanas, como la aciduria orótica. Esta enfermedad es causada por mutaciones que conducen a la pérdida de la actividad catalítica de la OPRTasa, que ocasiona un exceso en la eliminación del orotato por la orina [6].

En la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se encontró que la mutación en el gen (*pyrE*) que codifica para la OPRTasa produce una acumulación y secreción del orotato, es similar a lo que ocurre en la aciduria orótica. Además, se observó una reducción significativa en la producción de factores de virulencia como la hemolisina, la caseína y la elastasa [12].

Recientemente se demostró que la interrupción genética de la OPRTasa de *Magnaporthe oryzae* (*MoPyr5*), hongo patógeno de plantas, inhibe el crecimiento del micelio y la penetración en tejidos vegetales, el crecimiento hifal invasivo y la patogenicidad. En las mutantes deficientes de *MoPyr5* se demostró que la OPRTasa también está involucrada en la hidrofobicidad de la superficie del micelio. Al administrar UMP exógeno a la mutante se restauró el crecimiento vegetativo, la habilidad de infectar y la patogenicidad en la cebada y la hoja de arroz. Estos resultados muestran que *MoPyr5* es una OPRTasa importante para la biosíntesis de UMP en *M. oryzae*, la cual se encuentra estrechamente relacionada con la patogenicidad del hongo. Además, se sugiere que la inhibición de la biosíntesis de UMP a través de alterar la función de la OPRTasa sería un buen blanco

para el desarrollo de nuevos fungicidas contra este hongo [13].

Mecanismo químico de la reacción

El mecanismo químico por el cual las PRTasas catalizan sus reacciones ha sido cuestionado por muchos años. Aunque ha habido mucho debate sobre el mecanismo químico exacto de la OPRTasa, ahora se piensa que procede a través de un mecanismo tipo SN_1 de dos pasos con estados de transición o intermediarios similares al oxocarbenio como el mecanismo más probable [14]. Sin embargo, todavía hay mucho debate sobre el papel exacto de los residuos involucrados. Este mecanismo consta de dos pasos, en el primero, el grupo difosfato (activado por el ión metálico divalente Mg^{2+}) se disocia del sustrato PRPP, formando un intermediario ion oxocarbenio [15]. En el segundo paso, una molécula de agua activada por uno o dos residuos de Lys, extrae un protón del sustrato orotato, el cual inicia el ataque nucleofílico sobre el ion oxocarbenio para formar los productos finales (Fig. 3) [16].

Propiedades cinéticas

Los estudios de las propiedades cinéticas de las OPRTasas son muy escasos. El mecanismo cinético solo se ha determinado en las enzimas de *Salmonella typhimurium* [4,17], de *Plasmodium falciparum* [18], de *Saccharomyces cerevisiae* [19,20] y de *Mycobacterium tuberculosis* [21,22]. Las OPRTasas de *S. typhimurium* y *P. falciparum* siguen un mecanismo secuencial al azar, en el que la rápida transferencia química del fosforribosilo en la enzima es seguida por un proceso de liberación del producto más lento (Fig. 4A). En cambio, la enzima de *S. cerevisiae* presenta una variación del mecanismo cinético denominado Theorell-Chance, único para catálisis en sitios alternos, al cual le llamaron doble Theorell-Chance. Este mecanismo propone que la unión co-temporal del orotato y la liberación del difosfato, así como la unión del PRPP y la liberación del OMP que se produce a través de los complejos ternarios en forma de sitio alterno se lleva a cabo a través de las dos subunidades altamente cooperativas de la enzima [19,20] (Fig. 4B). En el caso de la enzima de *M. tuberculosis* se ha reportado que presenta un mecanismo cinético Mono-Iso Bi Bi ordenado en el que la enzima sufre una isomerización en el complejo ternario transitorio antes de la liberación de los productos [21,22].

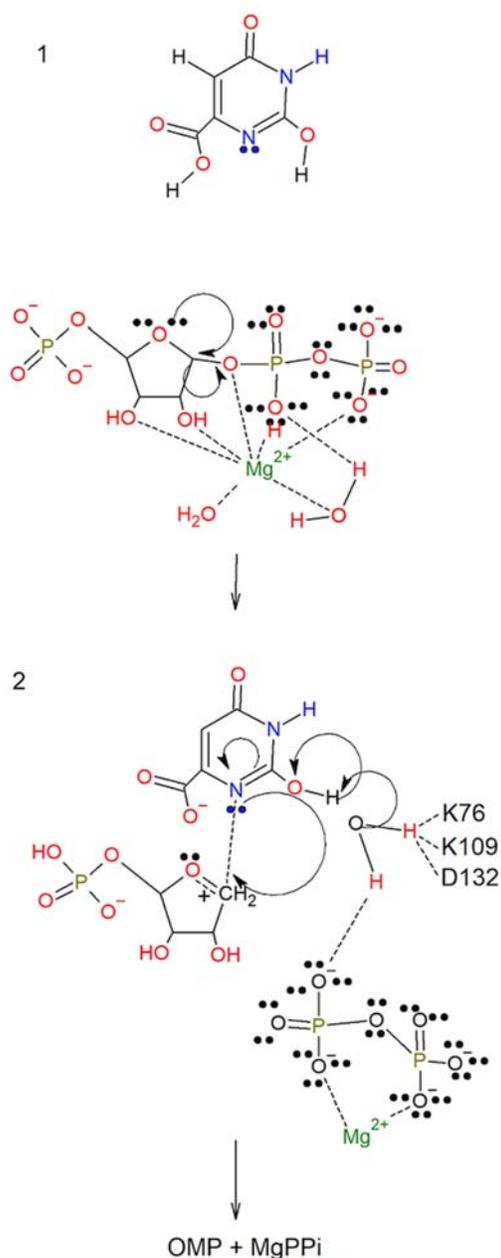


Figura 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por la OPRTasa. Figura modificada de la referencia [16]

Estructura

Las PRTasas constituyen dos familias evolutivas llamadas tipo I y tipo II que se caracterizan por presentar una arquitectura distinta en el plegamiento. El plegamiento de las PRTasas tipo II consiste en un N-terminal de cuatro hebras de cara abierta a un dominio β -sándwich y el C-terminal con un dominio de barril α/β [23]. En el caso de las de tipo I, todas poseen una región central con un plegamiento

formado por una hoja β de cinco hebras paralelas rodeadas por hélices α [23].

Las OPRTasas pertenecen a la familia tipo I de las PRTasas, son enzimas homodiméricas que tienen aproximadamente de 180 a 230 residuos de aminoácidos por subunidad. La estructura de estas enzimas se divide en tres regiones: el N-terminal, la región central y el C-terminal. La región del N-terminal está formada por dos hélices α antiparalelas conectadas por dos hebras β antiparalelas. A estas hebras β de la región del N-terminal se les conoce como la “cubierta” [24,25], la cual envuelve parcialmente el anillo del ácido orótico [16]. Como otros miembros de la familia I, las OPRTasas contienen una región central con una topología similar al plegamiento tipo Rossmann α/β de unión a nucleótidos encontrado en muchas aldehído deshidrogenasas [26]. La región central puede dividirse en dos mitades similares: la primera contiene dos hebras β paralelas y una hélice α y está conectada a la segunda mitad por una asa altamente flexible (llamada asa catalítica). Esta asa provee varios residuos esenciales para la unión del PRPP y la catálisis [16,27]. La región del C-terminal está compuesta de dos hélices α antiparalelas conectadas por un asa (Fig. 5).

A la fecha se han reportado 23 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. Estas estructuras pertenecen a diferentes microorganismos u organismos patógenos como son las de *Aeropyrum pernix* (PDB 2YZK), de *Bacillus anthracis* str (PDBs 3M3H y 4RV4), de *Burkholderia cenocepacia* (PDB 4OHC), de *Corynebacterium diphtheriae* (PDB 2P1Z), de *Escherichia coli* (PDB 1ORO, [28]), de *Francisella tularensis* (PDB 3MJD), de *Mycobacterium tuberculosis* (PDBs 5HKF, 5HKL y 5HKL, [29]), de *P. falciparum* (PDB 4FYM, [30]), de *S. typhimurium* (PDB 1STO [24]; PDB 1OPR; [25] y PDB 1LH0, [27]), de *Streptococcus mutans* (PDB 3DEZ, [31]), de *Streptococcus pyogenes* (PDB 2AEE) y de *Vibrio cholerae* (PDB 3N2L). Además de las estructuras de estos microorganismos, también se conocen las estructuras de *S. cerevisiae* (PDBs 2PS1, 2PRY y 2PRZ, [16]; PDBs 4WML y 4WN3) y la de humano (PDB 2WNS).

También se ha determinado la estructura tridimensional de la UMP sintasa completa de *Leishmania donovani*, que contiene a la OPRTasa en la región del N-terminal y a la ODCasas en la región del carboxilo terminal [32].

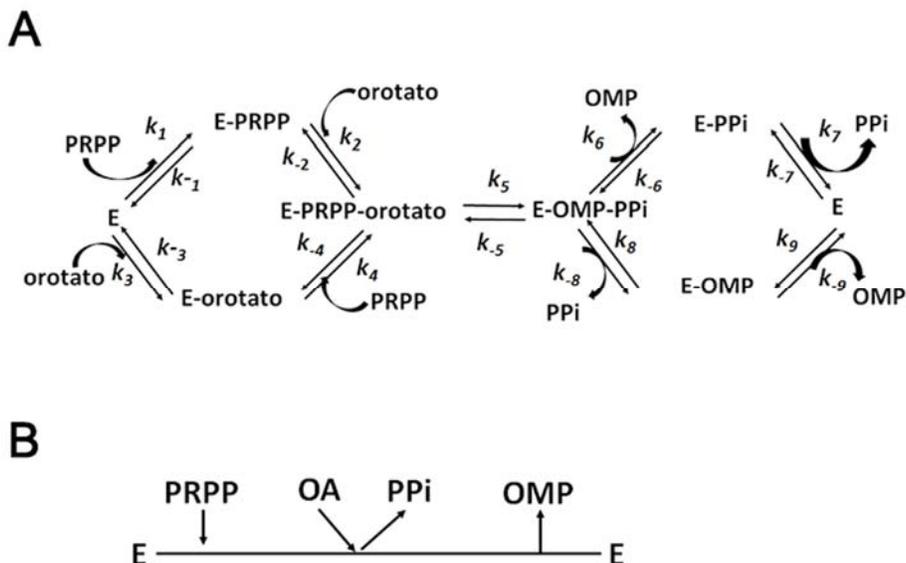


Figura 4. Mecanismo cinético de la OPRTasa de *S. typhimurium* (A) [4] y de *S. cerevisiae* (B). Figura modificada de la referencia [20].

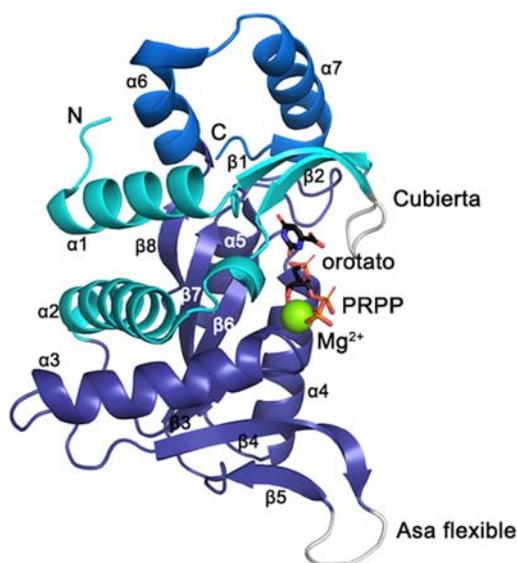


Figura 5. Monómero A de la OPRTasa de *S. cerevisiae* en complejo con orotato, PRPP y Mg^{2+} (PDB 2PS1). El monómero muestra las tres regiones características en las que se dividen las OPRTasas, la región del N-terminal (azul celeste), región central (azul medio) y el C-terminal (azul marino). Los átomos de carbono del orotato y del PRPP se muestran en color negro. Los átomos de N, O, P se encuentran en los colores de átomos convencionales. El Mg^{2+} está representado como una esfera de color verde.

Localización de los sitios funcionales

Sitio de unión a PRPP

El sitio de unión al PRPP comprende tres asas: el asa del PP_i localizado entre la $\beta 1$ y la $\alpha 2$; una “asa flexible” entre la $\beta 6$ y $\beta 7$; y el asa del PRPP entre la

$\beta 3$ y $\alpha 3$. El PRPP se une al borde del C-terminal de la hoja β central entre las asas del PP_i y del PRPP. Las secuencias de estas tres asas del sitio de unión del PRPP están altamente conservadas [1].

El asa del PRPP está formada por los últimos nueve residuos, DDVMTAGTA (residuos que corresponden a la OPRTasa de *S. cerevisiae*) de una secuencia de trece residuos del motivo PRT, la cual une al grupo 5-fosfato de la ribosa del PRPP. La longitud, secuencia y conformación del asa del PRPP está altamente conservada en los sitios de unión del PRPP en toda la familia de las PRTasas.

Los grupos hidroxilo de la ribosa del PRPP forman puentes de hidrógeno con dos residuos ácidos altamente conservados en las OPRTasas, los cuales se encuentran al inicio del asa del PRPP [1].

El grupo 5-fosfato de la ribosa del PRPP se une a una cavidad con carga positiva que está formada por las amidas de las cadenas principales de Gly y Thr, cadenas laterales polares y el dipolo de la hélice $\alpha 3$ [1].

El asa del PP_i de cuatro residuos (generalmente Gly, Ala o Ser) une al grupo PP_i del PRPP. La conformación de esta asa está conservada en la familia de PRTasas. Este asa se encuentra adyacente al asa del PRPP. Otro elemento clave para el reconocimiento Mg -PRPP es un péptido inusual *cis* (no prolina) entre el segundo y el tercer residuo del asa del PP_i . Los grupos N-H y C=O del péptido *cis* están dirigidos hacia el sitio de unión del PRPP.

El asa flexible se encuentra entre las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$, la cual puede tener diferentes longitudes en estas enzimas. En ausencia del PRPP esta asa generalmente se encuentra desplegada y muy móvil, mientras que en presencia del Mg-PRPP unidos se cierra sobre estos.

Sitio de unión del Mg^{2+}

La reacción de la OPRTasa requiere de iones Mg^{2+} , estos iones están asociados con el PP_i del PRPP y parecen ser esenciales para la unión del PP_i en el sitio del PRPP. En las estructuras tridimensionales de las OPRTasas en donde se encuentra el asa flexible en la conformación cerrada, el Mg^{2+} se encuentra coordinado por interacciones que involucran a los dos hidroxilos de la ribosa del PRPP, oxígenos del difosfato del PRPP y dos moléculas de agua [1,16]. Una de estas moléculas está formando un puente de hidrógeno con el C=O del péptido *cis* en el asa del PP_i .

Sitio de unión del orotato

Las OPRTasas tienen una estructura conocida como la “cubierta”, que se encuentra localizada por encima de la región central. La “cubierta” de estas enzimas tiene su origen en la región del N-terminal y está compuesta de dos hebras β antiparalelas. El sitio de unión del orotato se localiza entre esta “cubierta” y la región central α/β de la proteína, por lo que esta región parece ser una determinante para la especificidad de estas enzimas [24].

Cambio conformacional

El cambio conformacional es clave en el ciclo catalítico de ciertas enzimas. Para las OPRTasas, cuyos sitios activos son generados por un cambio conformacional en la enzima durante cada ciclo catalítico, las estructuras relevantes para la catálisis son transitorias. Para visualizar el sitio activo intacto y entender la catálisis, las estructuras transitorias deben ser atrapadas de alguna forma [33]. Se han utilizado sustratos no reactivos y análogos de los productos para atrapar las diferentes conformaciones de las OPRTasas, las cuales exhiben un cambio conformacional clásico, en donde un asa flexible se cierra sobre los sustratos unidos para formar el sitio activo. Este cambio conformacional excluye al solvente de la reacción para realizar la catálisis. Después de que se lleva a cabo la catálisis, el asa flexible se abre para liberar los productos.

La mayoría de las estructuras de las OPRTasas se encuentran en la conformación abierta, en donde los

residuos que forman el asa flexible no presentan densidad electrónica, por lo que estos residuos no están en estas estructuras. Existen otras estructuras que presentan una conformación cerrada de esta asa flexible en uno de los monómeros que conforman el dímero, mientras que el otro monómero se encuentra en una conformación abierta, tal es el caso de las OPRTasas de *E.coli* (PDB 1ORO), *B. cenocepacia* (PDB 4OHC), *S. typhimurium* (PDB 1LH0) y de *M. tuberculosis* (PDB 5HKI).

Hasta la fecha, la única estructura que se conoce de estas enzimas en la conformación cerrada del asa flexible en los dos monómeros que conforman el dímero, es la OPRTasa de *S. cerevisiae* (PDB 2PS1), que obtuvimos formando el complejo ternario con el orotato, PRPP y Mg^{2+} unidos. Además de esta estructura, también logramos obtener una estructura en la forma apo (PDB 2PRY) y otra con el producto OMP unido (PDB 2PRZ). Estas tres estructuras representan un resultado estructural claro que nos permite ver los diferentes intermediarios enzimáticos en el proceso catalítico de las OPRTasas tipo I [16] (Fig. 6).

En este trabajo se encontraron grandes transiciones conformacionales que ocurren entre las estructuras de la apoenzima y de los complejos con los sustratos y el producto (Figs. 7A y 7B). Estos cambios incluyen una rotación del dominio de la “cubierta” superior de 19.5° sobre el producto OMP unido, mientras que en la estructura con el complejo ternario, la rotación fue de 24.6° . En el caso del asa flexible, esta se mueve ampliamente para adoptar una conformación estable durante el ciclo catalítico para secuestrar a los sustratos y excluir al solvente del complejo ternario y contribuir con residuos conservados que sirven para estabilizar al estado de transición de la reacción enzimática. El asa flexible de una subunidad se extiende para actuar y cubrir el sitio activo de la subunidad vecina (Fig. 7B). El orotato y las moléculas de PRPP- Mg^{2+} unidos en el complejo ternario, están orientados para un ataque apropiado del átomo N1 del orotato sobre el átomo C1 del anillo de la ribosa (Fig. 8A). Esta orientación de los sustratos, combinada con el posicionamiento del asa flexible proporcionó una imagen clara de un complejo de reacción catalítico para las PRTasas tipo I (Fig. 8B).

Estas estructuras, junto con la asimetría estructural que se encontró en la OPRTasa de *S. typhimurium*, resultó consistente con los datos cinéticos que demostraban la no equivalencia y la cooperatividad de la OPRTasa [16].

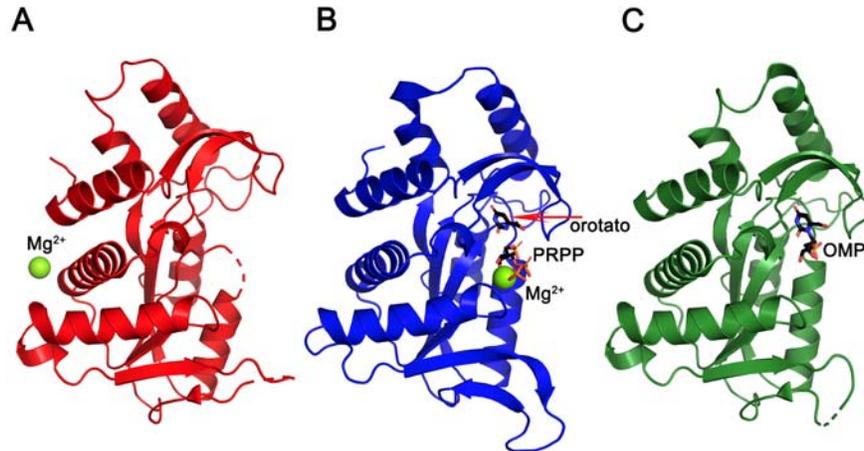


Figura 6. Estructuras tridimensionales de la OPRTasa de *S. cerevisiae*. (A) Monómero de la forma Apo (PDB 2PRY). (B) Monómero en el complejo ternario (2PS1). (C) Monómero con el producto OMP unido (2PRZ). El orotato, el PRPP y el OMP se encuentran representados como varillas con los átomos de carbono en color negro. Los átomos de N, O, P se encuentran en los colores de átomos convencionales. El Mg^{2+} está representado como una esfera de color verde. Figura modificada de la Referencia [16].

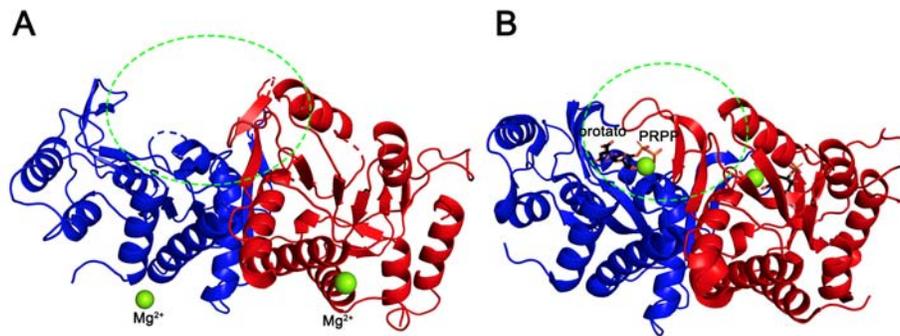


Figura 7. Estructura tridimensional del dímero de la OPRTasa de *S. cerevisiae*. (A) Dímero de la forma Apo (PDB 2PRY). (B) Dímero en el complejo ternario (2PS1). El círculo discontinuo verde indica la región del cambio en las asas flexibles y la “cubierta” en las dos estructuras. El orotato y el PRPP se encuentran representados como varillas con los átomos de carbono en color negro. Los átomos de N, O, P se encuentran en los colores de átomos convencionales. El Mg^{2+} está representado como una esfera de color verde.

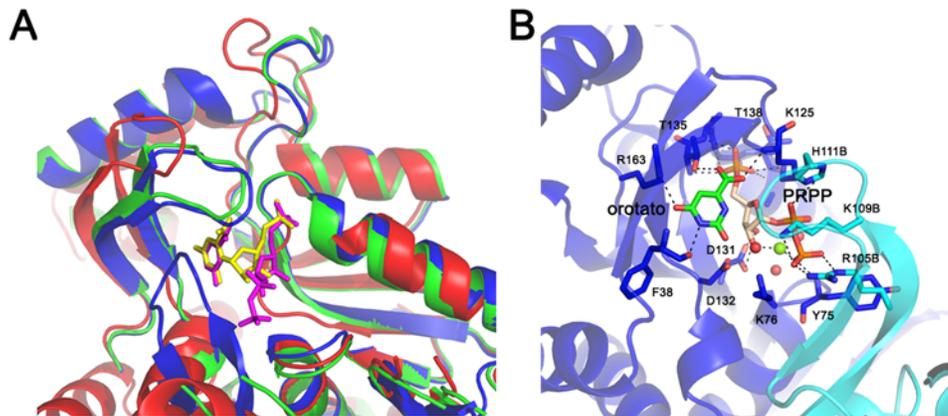


Figura 8. Sitio activo de la OPRTasa de *S. cerevisiae*. (A) Sobreposición de la región del sitio activo de las estructuras tridimensionales de la OPRTasa de *S. cerevisiae*, en la forma Apo (color rojo, PDB 2PRY), en el complejo ternario (color azul, PDB 2PS1) y con el producto OMP unido (color verde, PDB 2PRZ). El orotato y el PRPP se encuentran representados en varillas de color rosa y el OMP de color amarillo. (B) Interacciones de los residuos que participan en la unión del orotato y PRPP. Los residuos están representados como varillas con los átomos de carbono en color azul (subunidad A) o azul celeste (subunidad B). El orotato y el PRPP se encuentran representados como varillas con los átomos de carbono en color verde y arena, respectivamente. Los átomos de N, O, P se encuentran en los colores de átomos convencionales. El Mg^{2+} está representado como una esfera de color verde. Las moléculas de agua están representadas como esferas de color rojo. Los puentes de hidrógeno se encuentran marcados como líneas punteadas negras.

Futuro

Diseño de fármacos basado en las OPRTasas

Los nucleótidos de pirimidina son esenciales para todas las formas de vida no solo como precursores de DNA o RNA, sino también en señalización, ensamblaje de la membrana celular y la biosíntesis de fosfolípidos, lípidos complejos y glicoconjugados.

Estudios experimentales realizados con las OPRTasas de diferentes microorganismos patógenos, han demostrado la importancia de la vía de síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina y su influencia en la patogenidad. A la fecha existen diferentes enfermedades como la toxoplasmosis, la malaria y la tuberculosis, entre otras, que carecen de un tratamiento eficaz y seguro, por lo que la inhibición de la biosíntesis de UMP a través de alterar la función de la OPRTasa parece ser un buen blanco para el desarrollo de nuevos fármacos.

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozooario *Toxoplasma gondii*. El tratamiento estándar para la toxoplasmosis involucra una combinación de pirimetamina y sulfadiazina, lo que resulta en una mejoría clínica en aproximadamente 80 a 90% de los pacientes dentro de los días 2 al 21. El *T. gondii* se divide rápidamente y por lo tanto necesita grandes cantidades de nucleótidos de pirimidina para la síntesis de ácidos nucleicos, por lo que el metabolismo de nucleótidos de pirimidina es un sitio potencial para la intervención quimioterapéutica. Se realizó un estudio de inhibición de la OPRTasa de *T. gondii* (*TgOPRTasa*) utilizando sesenta y siete análogos de la base nitrogenada de pirimidina en los que se evaluó su habilidad para inhibir la actividad de esta enzima “*in vitro*”, determinando los valores de K_i aparentes para los compuestos que inhiben a la *TgOPRTasa* [34]. Estos estudios de inhibición también se realizaron en la OPRTasa de mamíferos [35]. De la comparación de los resultados obtenidos con las dos enzimas se identificaron cuatro compuestos, el 6-clorouracilo, el ácido azaorótico, el ácido 1-deazaorótico y el 6-yodouracilo, los cuales se unen selectivamente a la *TgOPRTasa*. Estos compuestos parecen ser buenos candidatos para que sean probados *in vivo* como agentes potenciales anti-toxoplasmosis en un futuro [34].

La malaria es otra enfermedad importante que mata a un millón de personas aproximadamente cada año [36]. *P. falciparum* es el protozooario parásito más virulento que causa la malaria en humanos. Debido a la falta de una vacuna efectiva y a la resistencia

emergente de *P. falciparum* a los medicamentos de primera línea actuales, se necesitan agentes novedosos para combatir a las cepas resistentes. Este parásito requiere de un suministro importante de precursores de ácidos nucleicos para crecer. Debido a que *P. falciparum* carece de las enzimas para el rescate de pirimidinas, la síntesis de nucleótidos de pirimidina en estos parásitos depende de la vía *de novo*. La OPRTasa es un componente esencial en esta vía, por lo que es un blanco para nuevos fármacos contra la malaria. [18,37-38].

Se han reportado diferentes estudios de inhibición de la OPRTasa de *P. falciparum* (*PfOPRTasa*) utilizando pyrazofurina, un antibiótico de C-ribósido, que inhibe la actividad de la *PfOPRT* y muestra actividades antimalaria con valores de IC_{50} submicromolares. También se han utilizado análogos de orotato 5' sustituidos los cuales se unen a la *PfOPRT* y bloquean el crecimiento de los parásitos con valores de IC_{50} micromolares.

Los inhibidores contra la *PfOPRT* también incluyen a los análogos del estado de transición. Las OPRTasas se caracterizan por presentar estados de transición altamente disociativos. Utilizando las características geométricas y electrostáticas de los estados de transición de la *PfOPRT* se han diseñado análogos del estado de transición, los cuales se unen más fuertemente a las enzimas que sus sustratos. Esta afinidad de unión más estrecha está combinada usualmente con una alta especificidad que hacen que los análogos del estado de transición sean prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos. Los estudios de inhibición mostraron que los análogos del estado de transición con variaciones químicas muestran constantes de disociación (K_d) de niveles nanomolares (Fig. 9). Específicamente se han utilizado iminoribitol cíclico, hidroxipirrolidina, y grupos serinol acíclicos. A pH fisiológico, los átomos de nitrógeno de estos grupos se encuentran protonados, imitando las características ribocatiónicas de los estados de transición. Los derivados de orotato también han sido explorados para aproximar el potencial electrostático en el estado de transición e interferir con los aminoácidos que interactúan con el grupo saliente de la pirimidina [38]. Los estudios con estos análogos de transición han proporcionado nuevos conocimientos sobre el diseño de agentes potenciales antipalúdicos. Sin embargo, falta realizar estudios de estos inhibidores acerca de su permeabilidad, acceso al objetivo y de especificidad de especies [38].

En otras N-ribosiltransferasas se han diseñado análogos del estado de transición utilizando como

base las estructuras determinadas experimentalmente del estado de transición para obtener inhibidores en el orden de picomolar. Algunos de estos se encuentran actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la leucemia y la gota [39-44].

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica humana causada principalmente por *M. tuberculosis*. Se calcula que esta enfermedad está presente de manera latente en una cuarta parte de la población mundial [45]. La aparición de cepas resistentes a los medicamentos contra tuberculosis de primera y segunda línea, asociados con el creciente número de casos con tuberculosis en sujetos VIH positivos y el gran número de individuos infectados con bacilos latentes, ha dado origen a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de la tuberculosis. Debido a que la biosíntesis de nucleótidos es necesaria para la supervivencia de los bacilos latentes [22] y la OPRTasa es una enzima clave en esta vía, se han realizado estudios con inhibidores de la actividad de esta enzima utilizando análogos de los sustratos [22]. Las estructuras tridimensionales de la OPRTasa de *M. tuberculosis* (*Mt*OPRTasa) recientemente determinadas por difracción de rayos X en complejo con el PRPP (PDB 5HKF), con el Pi (PDB 5HKL) y con el dicitrato férrico (PDB 5HKI) proporcionan una plataforma estructural para el diseño racional de inhibidores de la *Mt*OPRTasa de interés potencial para el desarrollo futuro de nuevos agentes antituberculosos [29].

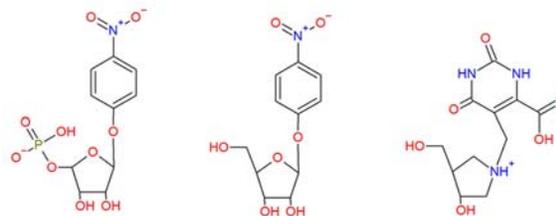


Fig 9. Análogos del estado de transición que se han estudiado como inhibidores de la OPRTasa de *P. falciparum*. Figura modificada de la referencia [38].

Conclusiones

Las OPRTasas son enzimas esenciales en todos los organismos que utilizan la biosíntesis *de novo* de pirimidinas. Estudios con bacterias, protozoarios parásitos y hongos, han demostrado la importancia de esta vía en su patogenicidad, por lo que el estudio de las enzimas que participan en esta vía, específicamente de la OPRTasa ha tomado un gran importancia, sobretodo su caracterización estructural, debido a que parecen ser un buen blanco para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades como la toxoplasmosis, la tuberculosis y la malaria, entre otras, que carecen de un tratamiento eficaz y seguro. Sin embargo, la función de las OPRTasas en los patógenos de plantas aún no está claro y a la fecha no existe una caracterización estructural de estas enzimas, lo cual ofrece una oportunidad para su estudio.

Referencias

- Sinha, S. C. y Smith, J. L. (2001) The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 733–739. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(01\)00274-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(01)00274-3)
- Musick, W. D. (1981) Structural features of the phosphoribosyltransferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **11**, 1–34.
- Grubmeyer, C., Segura, E. y Dofman, R. (1993) Active site lysines in orotate phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 20299–20304.
- 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. <https://doi.org/10.1021/bi9820560>
- Santoso, J. y Thornburg, R. (1998) Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* **116**, 815–821. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.815>
- Suttle, D. P., Bugg, B. Y., Winkler, J. K. y Kanalas, J. J. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1754–1758. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.6.1754>
- Schoeber, S., Simon, D. y Schwenger, B. (1993) Sequence of the cDNA encoding bovine uridine monophosphate synthase. *Gene* **124**, 307–308. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90412-v](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90412-v)
- 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. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 23–32. <https://doi.org/10.1007/bf00280183>
- Surekha, K., Prabhu, D., Richard, M., Nachiappan, M., Biswal, J. y Jeyakanthan, J. (2016) Investigation of vital pathogenic target orotate phosphoribosyltransferases (OPRTase) from *Thermus thermophilus* HB8: phylogenetic and molecular modeling approach. *Gene* **583**, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.006>
- Gero, A. M. y O'Sullivan, W. J. (1990) Purines and pyrimidines in malarial parasites. *Blood Cells* **16**, 467–484.
- Jones, M. E. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 253–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.001345>
- Niazy, A. y Hughes, L. E. (2015) Accumulation of pyrimidine intermediate orotate decreases virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **71**, 229–234. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0826-6>
- 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3655–3666. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7323-0>
14. Goiten, R. K., Chelsky, D. y Parsons, S. M. (1978) Primary ¹⁴C and α secondary ³H substrate kinetic isotope effects for some phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **253**, 2963–2971.
 15. Tao, W., Grubmeyer, C. y Blanchard, J. S. (1996) Transition state structure of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* **35**, 14–21. <https://doi.org/10.1021/bi951898l>
 16. González-Segura, L., Witte, J. F., McClard, R. W. y Hurley, T. D. (2007) Ternary complex formation and induced asymmetry in orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* **46**, 14075–14086. <https://doi.org/10.1021/bi701023z>
 17. Bhatia, M. B. y Grubmeyer, C. (1993) The role of divalent magnesium in activating the reaction catalyzed by orotate phosphoribosyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 321–325.
 18. 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. *Mol. Biochem. Parasitol.* **134**, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.006>
 19. Witte, J. F., Tsou, R. y McClard, R. W. (1999) Cloning, overproduction, and purification of native and mutant recombinant yeast orotate phosphoribosyltransferase and the demonstration from magnetization inversion transfer that a proposed oxocarboxonium intermediate does not have a kinetic lifetime. *Arch. Biochem. Biophys.* **361**, 106–112. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0971>
 20. 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. <https://doi.org/10.1021/bi051650o>
 21. Breda, A., Rosado, L. A., Lorenzini, D. M., Basso, L. A. y Santos, D. S. (2012) Molecular, kinetic and thermodynamic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase. *Mol. Biosyst.* **8**, 572–586. <https://doi.org/10.1039/c1mb05402c>
 22. Breda, A., Machado, P., Rosado, L. A., Souto, A. A., Santos, D. S., Basso, L. A. (2012b) Pyrimidin-2(1H)-ones based inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase. *Eur. J. Med. Chem.* **54**, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.031>
 23. Sharma, V., Grubmeyer, C. y Sacchetti, J. C. (1998) Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure* **6**, 1587–1599. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00156-7)
 24. Scapin, G., Grubmeyer, C. y Sacchetti, J. C. (1994) Crystal structure of orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* **33**, 1287–1294. <https://doi.org/10.1021/bi00172a001>
 25. Scapin, G., Ozturk, D. H., Grubmeyer, C. y Sacchetti, J. C. (1995) The crystal structure of the orotate phosphoribosyltransferase complexed with orotate and α -D-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. *Biochemistry* **34**, 10744–10754. <https://doi.org/10.1021/bi00034a006>
 26. Schramm, V. L. y Grubmeyer, C. (2004) Phosphoribosyltransferase mechanisms and roles in nucleic acid metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**, 261–304. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(04\)78007-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(04)78007-1)
 27. Grubmeyer, C., Hansen, M. R., Fedorov, A. A. y Almo, S. C. (2012) Structure of *Salmonella typhimurium* OMP synthase in a complete substrate complex. *Biochemistry* **51**, 4397–4405. <https://doi.org/10.1021/bi300083p>
 28. Henriksen, A., Aghajari, N., Jensen, K. F. y Gajhede, M. (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**, 3803–3809. <https://doi.org/10.1021/bi952226y>
 29. Donini, S., Ferraris, D. M., Miggiano, R., Massarotti, A. y Rizzi, M. (2017) Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthesis. *Sci. Rep.* **7**, 1180. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01057-z>
 30. Kumar, S., Krishnamoorthy, K., Mudeppa, D. G. y Rathod, P. K. (2015) Structure of *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyltransferase with autologous inhibitory protein-protein interactions. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 600–608. <https://doi.org/10.1107/S2053230X1500549X>
 31. Liu, C-P., Xu, R., Gao, Z-Q., Xu, J-H., Hou, H-F., Li, L-Q., She, Z., Li, L-F., Su, X-D., Liu, P. y Dong, Y-H. (2010) Structure of orotate phosphoribosyltransferase from the caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr. Sect. F* **66**, 498–502. <https://doi.org/10.1107/S1744309110009243>
 32. French, J. B., Yates, P. A., Soysa, D. R., Boitz, J. M., Carter, N. S., Chang, B., Ullman, B. y 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. *J. Biol. Chem.* **286**, 20930–20941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228213>
 33. Smith, J. L. (1999) Forming and inhibiting PRT active sites. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 502–504. <https://doi.org/10.1038/9266>
 34. Javaid, Z. Z., el Kouni, M., H. e Iltzsch, M. H. (1999) Pyrimidine nucleobase ligands of orotate phosphoribosyltransferase from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1457–1465. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00231-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00231-2)
 35. Niedzwicki, J. G., Iltzsch, M. H., el Kouni, M. H. y Cha, S. (1984) Structure-activity relationship of pyrimidine analogs as ligands of orotate phosphoribosyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 2383–2395, 1984. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90710-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90710-X)
 36. Guerin, P. J., Olliaro, P., Nosten, F., Druilhe, P., Laxminarayan, R., Binka, F., Kilama, W. L., Ford, N., y White, N. J. (2002) Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 564–573. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00372-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00372-9)
 37. Zhang, Y., Deng, H. y Schramm, V. L. (2010) Leaving group activation and pyrophosphate ionic state at the catalytic site of *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17023–17031. <https://doi.org/10.1021/ja107806j>
 38. 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. y Schramm, V. L. (2013) Transition state analogues of *Plasmodium falciparum* and human orotate phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **288**, 34746–34754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521955>
 39. Bantia, S., Parker, C., Upshaw, R., Cunningham, A., Kotian, P., Kilpatrick, J. M., Morris, P., Chand, O. y Babu, Y. S. (2010) Potent orally bioavailable purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-4208 induces apoptosis in B- and T-lymphocytes—a novel treatment approach for autoimmune diseases, organ transplantation and hematologic malignancies. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.04.009>
 40. Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Kim, K. y Schramm, V. L. (2002) Transition state analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 3219–3225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105905200>

41. Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Schramm, V. L. y Kim, K. (2002b) Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3226–3231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105906200>
42. Lewandowicz, A. y Schramm, V. L. (2004) Transition state analysis for human and *Plasmodium falciparum* purine nucleoside phosphorylases. *Biochemistry* **43**, 1458–1468. <https://doi.org/10.1021/bi0359123>
43. Lewandowicz, A., Shi, W., Evans, G. B., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Basso, L. A., Santos, D. S., Almo, S. C. y Schramm, V. L. (2003) Over-the-barrier transition state analogues and crystal structure with *Mycobacterium tuberculosis* purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* **42**, 6057–6066. <https://doi.org/10.1021/bi0343830>
44. Lewandowicz, A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H. y Schramm, V. L. (2003b) Achieving the ultimate physiological goal in transition state analogue inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **278**, 31465–31468. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300259200>
45. Ducati, R. G., Ruffino-Netto, A., Basso, L. A. y Santos, D. S. (2006) The resumption of consumption – a review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 697–714. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000700001>



DRA. LILIÁN GONZÁLEZ SEGURA

Bióloga egresada de la FES Iztacala de la UNAM, en donde recibió la Medalla Gabino Barreda.

Realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en el Posgrado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química de la UNAM. Llevó a cabo dos estancias posdoctorales, una nacional en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y otra en el extranjero, en el Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Indiana University, Indianapolis, USA.

Repatriada en el 2007 al Departamento de

Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, en el que actualmente es Profesor Titular A de Tiempo Completo.

Su línea de investigación se basa en el estudio de la relación estructura y función de proteínas vegetales y de microorganismos que son importantes para su adaptación al medio ambiente utilizando como herramienta la cristalografía de rayos X.

Realiza una intensa labor docente en la Facultad de Química impartiendo los cursos de Bioquímica Experimental (licenciatura), Bioquímica (Posgrado en Ciencias Bioquímicas) y Métodos de Purificación de Proteínas (Diplomado en Bioquímica y Biología Molecular para la Industria Farmacéutica y Biotecnológica).

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) Nivel I y de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ha publicado 21 artículos científicos internacionales y 1 artículo nacional.

Cuenta con 21 estructuras tridimensionales de proteínas depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB), una de las más importantes bases de datos.