

ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE LAS ENZIMAS GLUCOQUINASAS/ HEXOQUINASAS DE PHYTOPHTHORA INFESTANS

RODRIGUEZ DE SARRAZIN. Natalia M. Tutora. Dra. Luisana AVILÁN

U.E. Don Bosco Mérida Edo. Mérida, 2011

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo analizar genéticamente las enzimas glucoquinasas/hexoquinasas del patógeno *Phytophthora infestans*, con el fin de determinar si estas enzimas pueden representar un blanco de ataque al patógeno. El análisis de estas enzimas se realizó utilizando herramientas de bioinformática, y se determinó a través de esta investigación que las glucoquinasas/hexoquinasas de *P. infestans* son posibles blanco de ataque al patógeno debido a que no presentan grandes similitudes con las enzimas del hospedero. La bioinformática es una herramienta muy importante en los estudios genéticos de toda clase de organismos, por lo tanto se recomienda la utilización de esta herramienta en futuras investigaciones por parte de alumnos del colegio "San Juan Bosco".

Palabras Clave: Estudio, Bioinformática, enzimas, investigación.

INTRODUCCIÓN

Desde la prehistoria, el ser humano comenzó a utilizar la genética para mejorar distintos tipos de plantas, pero al no existir suficiente información sistematizada ni desarrollo para la época, estas pequeñas prácticas de genética no pasaron de ser sencillos experimentos.

Hoy en día para analizar gran parte de la información genética, se utiliza una herramienta muy conocida en la biología: la bioinformática, en la cual se utilizan herramientas de computación para el análisis de los genes de los organismos; también se realizan alineamientos de secuencias, predicción de genes y de estructuras, entre muchas otras acciones que se pueden realizar mediante la bioinformática. En este sentido, el campo bioinformático, está fuertemente ligado a la matemática y a la tecnología de la información, para poder analizar en base a modelos y trabajos ya realizados la información requerida.

Gracias a la bioinformática se han podido realizar muchos avances en la biología. Uno de los proyectos que tienen estrecha relación con la bioinformática son los Proyectos Genomas, los cuales consisten en el secuenciamiento

total del genoma del individuo, lo que nos permite obtener la información que necesitamos acerca de su taxonomía, su composición genética, celular, molecular, sus estructuras, entre muchas otras características.

Se han realizado una gran cantidad de Proyectos Genomas de muchos organismos tanto en organismos procariotas como en eucariotas (los proyectos genomas son realizados en grandes consorcios científicos de esta actividad específica). En la actualidad, la cantidad de organismos secuenciados es grandísima y se encuentran secuenciados la mayoría de organismos de interés como el de muchos animales, plantas, bacterias, hongos, etc.

En el año 2009 se realizó el secuenciamiento total del genoma de *Phytophthora infestans* debido a su importancia en el área agrícola. *Phytophthora infestans* es un organismo perteneciente a la clase de los *Oomycetes* dentro del grupo de los *Stramenopiles*, un grupo de eucariotas que comparten características tales como la presencia de mastigonemas en alguna estructura de su ciclo de vida. Los *Oomycetes* están fuertemente ligados a la humedad, ata-

can animales acuáticos y plantas y son muy específicos para los organismos que atacan. Jaramillo (2003) (Cfr.)

Desde hace muchos años se consideraba a *Phytophthora infestans* como un hongo. Sin embargo, estudios de filogenia molecular determinaron que pertenecía al grupo de los *Stramenopiles*, por lo tanto los fungicidas utilizados para atacar hongos no tenían el efecto deseado en este organismo. *Phytophthora infestans* ataca principalmente a solanáceas, específicamente a papas y tomates y ocasiona en su hospedero una enfermedad llamada tizón tardío o mildiu de la papa, esta enfermedad es muy común en este tipo de cultivos de papa, pero es muy difícil de diagnosticar a tiempo, debido a que cuando las plantas empiezan a tener características propias de la enfermedad ya es muy tarde para erradicarla.

Tal es la gravedad de las cosechas que poseen este patógeno, que *P.infestans* ocasionó la gran hambruna irlandesa entre los años 1845-1850 y la gran hambruna escocesa entre los años 1846-1857, responsable de que cerca de un tercio de la población irlandesa perdiera su alimento y de esta manera tuvieron que movilizarse a otros países. La mejor medida que se puede tomar para combatir a *P.infestans* es limitar las posibles fuentes de infección, como por ejemplo: los tubérculos dejados en el terreno de la temporada pasada y revisar las condiciones meteorológicas para el día de siembra y días aledaños, es decir, comprobar que la humedad sea menor de un 75% por lo menos por dos días después de la siembra.

Hasta el presente, no se ha encontrado una manera eficiente de atacar a *P.infestans* debido a su rápida mutación, por lo tanto, se debe buscar un elemento diferente entre el hospedero y su huésped para atacar ese elemento diferente y no ocasionarle daños al huésped, en este caso a la papa. Una manera de atacar a *P.infestans* podría ser interviniendo en su metabolismo. El metabolismo es un proceso que ocurre a nivel celular, mediante el cual un organismo consume energía y realiza sus

funciones vitales como crecer, reproducirse, etc. Este proceso se divide en dos partes: el catabolismo y el anabolismo. En el catabolismo se libera energía y en el anabolismo se utiliza la energía ya liberada mediante el catabolismo y se recomponen los enlaces para poder continuar con el ciclo. Wikipedia (2010) (cfr.)

En el presente trabajo se analizarán genéticamente las enzimas glucoquinasas/hexoquinasas de *P.infestans*, las cuales son las primeras enzimas involucradas en la glucólisis. La glucólisis es un proceso catabólico, por lo tanto es el primer paso del metabolismo, si se desea atacar dicho proceso eliminando la enzima, se necesita conocer sus características genéticas y sus diferencias con las glucoquinasas/hexoquinasas de su huésped. Debido a lo anteriormente explicado, la pregunta de investigación del presente trabajo es: ¿Cuáles son las características genéticas de las glucoquinasas/hexoquinasas del patógeno *Phytophthora infestans*?

Objetivo general

Analizar genéticamente las enzimas glucoquinasas/hexoquinasas de *P.infestans*.

Objetivos específicos

1. Cuantificar el número de genes que codifican para glucoquinasas/hexoquinasas de *Phytophthora infestans*.
2. Determinar su estructura genética. (Genes continuos o conteniendo intrones).
3. Analizar comparativamente los genes de *Phytophthora infestans* para conocer su identidad y similitud.
4. Determinar para cada gen su homología con genes de otros organismos.
5. Determinar para cada gen su relación filogenética.
6. Predecir la estructura terciaria para cada glucoquinasa/hexoquinasa de *Phytophthora infestans*.

MARCO TEÓRICO

Phytophthora infestans, un organismo patógeno

Phytophthora infestans, es un importante patógeno relativamente especializado que ataca principalmente a solanáceas. Las solanáceas son un grupo muy extenso de plantas que se encuentran principalmente en América del Sur y que comprenden más de 2700 especies como: la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*) entre muchos otros.

Tabla 1: Tomada de López. P (2009). Clasificación taxonómica de *P.infestans*:

REINO	Chromista (grupo Stramenopiles)
PHYLUM	Oomycota
CLASE	Oomycete
SUBCLASE	Peronosporomycetidae
ORDEN	Pythiales
FAMILIA	Pythiaceae
GÉNERO	<i>Phytophthora</i>

El género *Phytophthora* pertenece al Reino Chromista. Este reino puede considerarse como un reino independiente o como un reino integrado a Protista, y comprende todos los organismos que no pueden ser clasificados ni dentro del reino Animalia, Plantae o Fungi. Kamoun (2000) Margulis and Schwartz (2000) (Cfr.)

A su vez, el género *Phytophthora* pertenece al grupo de los *Stramenopiles*, el cual es uno de los 8 mayores grupos de eucariotas y que incluye organismos tan diversos como algas multi y unicelulares y las células semejantes a hongos y parásitos. Moreno (2006) (Cfr.)

Margulis and Schwartz, Kamoun, Latijhouwers et al, Moreno. (2010) (Cfr.) *Phytophthora* pertenece al *Phylum Oomycota*, un grupo muy diverso de organismos con similitudes importantes con los hongos y que

comprende más de 700 especies. Este grupo presenta ciertas características únicas, entre ellas: no poseen pigmentos fotosintéticos, producen zoosporas biflageladas, poseen paredes celulares que aunque tienen quitina, están constituidas principalmente por celulosa o polímeros similares y, además, necesitan en cualquier circunstancia la presencia de agua en el medio para sobrevivir.

Debido a las semejanzas superficiales de este grupo con los hongos, los Oomicetes fueron tradicionalmente incluidos dentro del Reino *Fungi*. Sin embargo, análisis taxonómicos recientes han demostrado que hongos y Oomicetes se hallan en grupos filogenéticamente distantes y que incluso desarrollaron la habilidad de infectar plantas de maneras independientes. Jaramillo (2003), López (2009), Kamoun (2003) (Cfr.)

Phytophthora infestans está ubicada dentro de la subclase Peronosporomycetidae, la cual comprende una gama de más de 120 especies que producen enfermedades en plantas, donde los mildus y las rayas blancas representan el grupo más grande. Dentro de la subclase Peronosporomycetidae el género *Phytophthora* ha sido ubicado en el orden de los Pythiales, el cual está conformado en su mayoría por mohos que causan enfermedades en distintos vegetales y son muy importantes económicamente debido a las pérdidas que generan.

Características generales de *Phytophthora*

En estado vegetativo este género exhibe un crecimiento micelial filamentososo, constituido por hifas hialinas y generalmente cenocíticas, pero que en cultivos viejos pueden presentar algunos septos.

La característica que ha hecho más conocido e importante a nivel mundial el género, es que incluye patógenos de una enorme variedad de plantas tanto silvestres, como ornamentales y de consumo, cuyo control e impacto en pérdidas para los agricultores se traduce en costos exorbitantes.

Reproducción

El género *Phytophthora* es capaz de reproducirse tanto sexual como asexualmente. La reproducción asexual origina zoosporangios. Los zoosporangios de esta especie tienen la habilidad de formar zoosporas o germinar directamente. La temperatura es determinante en la germinación de estas estructuras. Temperaturas entre 18 y 24°C favorecen la germinación directa de los zoosporangios, mientras que temperaturas inferiores de 12 a 16°C estimulan la liberación de las zoosporas móviles. La reproducción sexual por otra parte involucra la producción del oogonio y el anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan y forma oosporas, estos a su vez producen el esporangio.

El problema con *Phytophthora infestans*

La papa (*Solanum tuberosum* L.) originaria de los Andes Suramericanos, es uno de los alimentos más populares del mundo. Fue llevada por los conquistadores españoles a Europa y era, en un principio, catalogada como comida para cerdos. Actualmente es el cuarto cultivo más importante del mundo y es la base de la alimentación de millones de personas.

En el 2003 se realizaron distintos estudios de la ingesta per cápita de papa en las principales ciudades de los Andes Suramericanos. El promedio de ingesta fue de 50-60 Kg por persona, lo cual es una tasa muy alta, si se le compara con la ingesta per cápita en el resto del mundo, que es de un valor aproximado de 33 Kg, con lo cual podemos observar la importancia de la papa en la dieta básica de los Andes Suramericanos.

Se cree que esta enfermedad que ocasiona *P.infestans*, la candelilla tardía, el tizón tardío o mildú de la papa, se conoce desde la época precolombina, pero no se le dio la debida importancia sino hasta el año 1845 cuando ocasionó la gran hambruna irlandesa, arrasando con la

base de la alimentación de dicho país, se estima que la cifra de personas que emigraron en ese período de tiempo es de un millón y medio de personas, y la cifra de gente que murió es cercana al millón. Jaramillo (2003) (Cfr.)

Hoy en día, este problema sigue presente en gran parte de los cultivos de papa en todas partes del mundo, y ocasiona pérdidas millonarias cada año, además de que su control requiere grandes esfuerzos por partes de muchísimos entes.

En Venezuela existe una gran variedad de plagas y enfermedades importantes en las siembras de papa, pero el tizón tardío representa la principal amenaza del género en nuestra región, éste se encuentra presente en la mayoría de las regiones agrícolas de nuestro país y sigue causando grandes estragos en las cosechas de papa, ocasionando en algunas ocasiones pérdidas de hasta el 100% en los cultivos.

Proyecto para el desarrollo de nuevas estrategias para el manejo del patógeno desde el área del metabolismo energético

Debido a la situación planteada anteriormente, y a que prácticamente no existe información referente al metabolismo energético de *P. infestans*, se ha planteado una estrategia para el desarrollo de nuevas metodologías en el manejo del patógeno. En esta estrategia, se pretende comparar las enzimas de las rutas metabólicas esenciales en el organismo que difieran con las del hospedero. Una vez encontradas esas enzimas diferentes y corroboradas sus funciones distintivas, se espera utilizarlas como blanco de ataque a través de químicos específicos que sólo puedan atacar las enzimas del patógeno y no las del hospedero.

Un comienzo de esta estrategia fue realizada en el laboratorio de Fisiología de la Universidad de Los Andes. En este trabajo previo se estudió una enzima esencial en los metabolismos de todos los organismos: la en-

zima malato deshidrogenada. Sin embargo, esta enzima no mostró ser un blanco de ataque ideal, sus diferencias no eran marcadas con las malato deshidrogenasas de plantas. Por lo tanto se comenzó a estudiar otra enzima: la glucoquinasa/hexoquinasa. Para realizar este trabajo se requiere conocer previamente a través de un trabajo de bioinformática cuántas enzimas están codificadas en el genoma de *P. infestans* y qué características teóricas poseen estas enzimas.

La bioinformática

La bioinformática es una disciplina en la cual están unidas: la biología, la informática y la buena manera de manejar la información. En un principio se utilizaba simplemente para procesar datos biológicos, pero gracias a los avances tecnológicos, hoy en día se pueden realizar diversas actividades que antes requerían de muchísimo más esfuerzo y que tenían una gran complicación.

Los programas de bioinformática que se utilizaron en el presente trabajo son los siguientes: Blast, Clustal X, Mega.

Blast por sus siglas en inglés "Basic Local Alignment Search Tool" es un programa que se encarga principalmente de alinear y comparar secuencias, tanto de nucleótidos como de proteínas y las compara contra una gran cantidad de genomas que están contenidos en el banco de genes del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica

El programa Clustal X es un programa utilizado para el alineamiento múltiple de secuencias divergentes de ADN o de proteínas, de manera tal que las identidades, similitudes y diferencias puedan ser vistas.

El programa Mega es un programa que entre otras cosas permite la realización de árboles filogenéticos o cladogramas, que es lo que realizaremos en este caso.

Proyectos Genomas

Los proyectos genomas consisten en la secuenciación completa de todos los cromosomas de un organismo. En estos cromosomas se encuentra la molécula de ADN que codifica la información genética del organismo. El ADN está formado por los nucleótidos Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Timina (T). Estas moléculas forman el código genético. Los proyectos genomas permiten identificar los genes de una especie, la organización de estos genes y las relaciones filogenéticas de todos los organismos para entender su origen evolutivo.

Proyecto genoma de *P. infestans*

El genoma completo de *P. infestans* fue secuenciado por Hass y colaboradores en el 2009 y ha permitido obtener nueva información acerca de este organismo. La información del genoma está disponible en la Web (<http://www.broadinstitute.org>). Anteriormente había sido igualmente secuenciados otros organismos relacionados como *P. sojae* y *P. ramorum*.

Con respecto a la organización del genoma del género, quizás la característica más resaltante detectada hasta ahora, es la enorme abundancia de secuencias repetidas. En *P. infestans* se estima que por lo menos el 50% de su genoma corresponde a secuencias repetidas.

Familia de las glucoquinasas/hexoquinasas

La familia de las glucoquinasas/hexoquinasas son un grupo de enzimas que catalizan la fosforilación de la glucosa y otras hexosas (azúcares de seis carbonos) a partir de ATP principalmente, pero pueden utilizar otras fuentes de fosfato tales como: ADP, PPI y polifosfatos inorgánicos. Esta familia de enzimas puede poseer dos tipos de enzimas: a) glucoquinasas, cuando el sustrato es únicamente glucosa, y b) hexoquinasas cuando el sustrato puede ser diferentes hexosas.

Las glucoquinasas/hexoquinasas catalizan la siguiente reacción:



(Esta reacción requiere magnesio).

En la figura 1 se muestra un esquema simplificado de la clasificación de la familia de las glucoquinasas/hexoquinasas.

Familia de las glucoquinasas/hexoquinasas

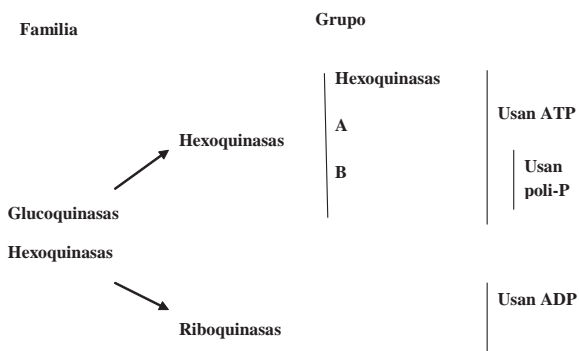


Figura 1.-Esquema de clasificación de las glucoquinasas/hexoquinasas:

Los organismos eucariotas tales como las plantas, los cuales son los hospederos de nuestro patógeno de estudio, poseen hexoquinasas del grupo hexoquinasa.

Función de las glucoquinasas/hexoquinasas

Las enzimas glucoquinasas/hexoquinasas tienen una función principal en la ruta de la glucólisis. Esta es una de las ruta principales para la obtención de energía en todos los organismos a partir de carbohidratos. Las glucoquinasas/hexoquinasas catalizan la primera reacción de esta ruta fosforilando la glucosa y por lo tanto son enzimas altamente reguladas. Adicionalmente se ha demostrado que ellas también participan en diversos procesos fisiológicos; Por ejemplo: estas enzimas son capaces de interactuar entre sí, con otras proteínas y con lípidos. También se han encontrado

hexoquinasas en el retículo endoplasmático, en la membrana plasmática y asociados a membranas externas de la mitocondria. Estas ubicaciones subcelulares variables revelan la diversidad funcional de esta enzima.

Glucoquinasas/hexoquinasas en *P.infestans*

Actualmente no se conocen las características de las glucoquinasas/hexoquinasas de *P. infestans*. Debido a su importancia metabólica, esta enzima podría ser blanco de ataque contra el patógeno si posee diferencias con las glucoquinasas/hexoquinasas del hospedero *Solanum tuberosum* (la papa). Conocer estas características es el objetivo principal de este trabajo.

Del hospedero, la papa, se conoce que posee varias enzimas de esta familia, todas pertenecen al grupo hexoquinasa de la familia hexoquinasa, estas tienen diferentes localizaciones subcelulares encontrándose en el cloroplasto, citoplasma y membrana plasmática.

HIPÓTESIS

Phytophthora infestans posee genes que codifican para la enzima glucoquinasa/hexoquinasa, las cuales tienen características diferentes a las del hospedero planta y pueden ser blanco de estrategias de ataque al patógeno.

VARIABLES

Tipo de Variable	Variable	Dimensiones	Indicadores
Dependiente	Genes que codifiquen para glucoquinasa/hexoquinasa en <i>Phytophthora infestans</i> .	-Número de genes. -Similitud entre genes. -Homología. -Isoformas. -Mutaciones. -Secuencia. -Características.	-Tamaño -Similitud de secuencia. -Repeticiones en el genoma. -Utilización de ADP, ATP o Poli-P.
Independiente	Genes de <i>Phytophthora infestans</i> que no codifiquen para glucoquinasa/hexoquinasa.		

ALCANCE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este proyecto es una investigación con un nivel o alcance descriptivo debido a que consiste en la caracterización de una familia de genes de un organismo particular (*Phytophthora infestans*). El diseño de esta investigación es de carácter cuasi experimental, entendiéndose por ello que se realizaron experimentos virtuales utilizando la herramienta de la bioinformática, que se basó en toda la información que proporciona el genoma de este organismo.

Fases de la investigación

1. Se buscó en el proyecto genoma de *P. infestans* (Hass *et al.* 2009) genes que codificaran para la enzima glucoquinasa/hexoquinasa a través del programa "Blast" (de su siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) el cual es un programa que compara genes a partir de un gen típico.

2. Se procedió haciendo un Blast de cada glucoquinasa/hexoquinasa de *P. infestans* contra todos los genomas contenidos en el banco de genes, lo cual permitió conocer con exactitud las similitudes de cada una de las glucoquinasas/hexoquinasas de *P. infestans* con las glucoquinasas/hexoquinasas de todos los organismos contenidos en el banco de genes.

3. Se realizaron comparaciones entre las glucoquinasas/hexoquinasas de *P. infestans* a través del programa "Clustal" el cual realiza alineamientos múltiples entre secuencias y agrupa según similitudes.

4. Se construyeron e interpretaron los árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA que cuantifica las comparaciones entre las secuencias y contruye un cladograma.

5. Por último se determinó cuales de las glucoquinasas/hexoquinasas de *P. infestans* pueden ser blanco de ataque al patógeno y se realizó la predicción de las estructuras terciarias

de las enzimas.

Para la predicción de estructuras se utilizaron programas de comparación con estructuras cristalinas (por difracción de rayos X) de glucoquinasas/hexoquinasas de la base de datos de estructuras (Protein Data Bank).

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas utilizadas para analizar y recolectar los datos, fueron programas que poseen su propio mecanismo de almacenamiento de información y manera de presentar los resultados obtenidos; los mismos fueron explicados anteriormente.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Del primer paso del trabajo de campo, es decir de la búsqueda del proyecto genoma de *P. infestans* y de la determinación de los genes codificantes para glucoquinasa/hexoquinasa se obtuvieron los siguientes resultados:

P. infestans posee 8 genes que codifican para glucoquinasa/hexoquinasa. A continuación se presentan cada uno de ellos y su estructura.

1. **PITG_06015.1** es la primera glucoquinasa de *P. infestans*, esta glucoquinasa posee dos intrones y posee un total de 1209 pares de bases (pb) y 339 aminoácidos (aa).

Glucoquinasa 1 en formato FASTA*:

```
>PITG_06015.1
MKEARMRERLPVACVLACAGPIL-
NNTVEFTNIKDGWKIDGPGLEKEL-
GITTVKLINDFAAMGYGLLTLKPHEYI-
VLNEAEKEEGMPIATIGAGTGLGECY
LTADKHGEYSCYACEGGHTDFAPA-
DEIEIELYNSIKEELGCSRRFSVERIVS-
GPGLATIYKFLAKKFPDKVDKVVHDA-
FVRAKSLQGKIVGDNAKTNELC
NQAMEIFVDAYGREAGCAMLKYL-
PRGGFYITGGLAPKNLDYFTQRDI-
```

FLKACFNKGRVSPALKAIPIYLVLTEDL-
GERGAHYAYQLLQTYNNSLLGNIV
QRERVQRKFATMDHLALYSTVGA VGVA-
AGVVVLGNLLRK*

2. **PITG_21313.1** es la segunda glucoqui-
nasa de *P. infestans*, no posee intrones y posee
933 pb y 311 aa.

Glucoquinasa 2 en formato FASTA:

>PITG_21313.1MSGDCGGTNTNRLSLWN-
IPKDSKHVKGDIAPGSMFLFSKKYLNEDY
ASFAEVCHLFLNEAKLVDQIPEACVLAC
AGPILKNTVDFTNVAFGWKIDGPGLEKE
LGIKKVRLINDFAAMGYGLLTLRPHE-
YIVLNDVPKDETAPMATIGAGTGLGE-
CFLTPGMDGQYSCFACEGGHTDFAPA-
DEIEIELYNEIKAKLGCSQRFS
VERIVSGPGLATIYEFLAKKFPE-
KVDPKVHEEFLQANTQQGKVIGENAKT-
NELCNQTLEIFVGAYGREAGNAMLKYL-
PRGGFYITGGLAPKNLDYFTKKD
IFLMSLFDKG*

3. **PITG_06019.1** es la tercera glucoqui-
nasa de *P. infestans*, no posee intrones y tiene
919 pb y 225 aa.

Glucoquinasa 3 en formato FASTA:

>PITG_06019.1MATDLMSGDCGGTNTN-
LSLWNIPKDSKHVKGDIAPGSMFLFSKKY
LNEDYASFAEVCHLFLNEAKLVDQIPEA
CVLACAGPILKNTVDFTNVAFGWKIDG
PGLEKELGIKKVRLINDFAAMGYG-
LLTLRPHEYIVLNDVPKDETAPMATI-
GAGTGLGECFLTPGNDGQYSCFACE-
GGHTDFAPADEIEIELYDEIKAKMG
CSQRFSVERIVSGPGLRVLGQEV*

4. **PITG_06021.1** es la cuarta glucoqui-
nasa de *P. infestans*, no posee intrones y posee
1041 pb y 347 aa.

Glucoquinasa 4 en formato FASTA:

>PITG_06021.1

MSGDCGGTNTNRLALWNIPKSSVYTKG-
DIAPGEMFLFSKKYLNEEHGSFNEVCHL-
FLNEAKLVDEVPAACVLACAGPILS-
NTVDFTNVESGWKIDGTSLEKI
LGIRTVRLINDFAAMGYGLLTLRPHE-
YIVLNDVPKDETAPMATIGAGTGLGE-
CFLTPGNDGQYSCFACEGGHTDFAPA-
DEIEIELYNEIKAKLGCSQRFS
VERIVSGPGLATIYEFLAKKFPE-
KVDPKVHEEFLQANTQQGKVIGENAKT-
NELCNQTLEIFVGAYGREAGNAMLKYL-
PRGGFYITGGLAPKNLDYFTKKD
IFLNSVFDKGRVSPALKACPIYLVLTEDL-
GERGAHFFAYQLLGQCE*

5. **PITG_06016.1** es la quinta glucoqui-
nasa de *P. infestans*, no posee intrones y posee
1245 pb y 354 aa.

Glucoquinasa 5 en formato FASTA:

>PITG_06016.1
MSDYSLIISGDCGGTNTNRLSLWKIPT-
GATQLKGNAPGDVIFAKKYLNEHDHASF-
NEVCHLMNEAKLTDHVPEACVLACAG-
PILNNTVDFTNVEFGWKID
GASLEKELGIKQVQLINDFAAMGY-
GLLTLRPHEYIVLNDAPKDETAPMATI-
GAGTGLGECFLTPGNDGQYSCFACEG-
GHTDFAPADEIEIELYNEIKAKL
GCSQRFSVERIVSGPGLATIYEFLAKKF-
PEKVDPKVHEEFLKANTQQGKVIGENA-
KTNELCNQTLEIFVGAYGREAGNAMLK-
YLPRGGFYITGGLAPKNL
DYFTKKDIFLKSFLDKGRVSPALKACPI-
YLVLTEELGERGAHFYAYQLLHSSA*

6. **PITG_03365.1** es la sexta glucoqui-
nasa de *P. infestans*, posee 8 intrones y posee 1193
pb y 323 aa.

Glucoquinasa 6 en formato FASTA:


```
>PITG_03365.1
MTATMMFAGVDIGATGVKVG-
VNSEGAVVAREQKNYHPEKHEPQDV-
VDLAISVMHNVLETTRLGLG-
DLEAVGVGCPGVLEAGGVIHAAANFP-
SWLDVPLQ
QLFTNTLGRPVTVCNDADAAILAE-
QWVGTAKGDIKDFIMLTGTVGFGV-
VANGELVRGGSNAIEGGHMIVERN-
GRPCGCSQRGCLEAYSSAGALMSQVQ
EHLRAGRDS SLAKYSEADINAE-
FVFKHAAEGDELCKHLVEEAADYLG-
FACVTFCRM LDPEIIVLSGGIAEAGEAY-
IDKIRRAYTKHTWTKFPNPVRIEKA
SAGYDSGIIGAVAVCKKQRKGQ*
```

7. PITG_06022.1 es la séptima glucoquinasa de *P. infestans*, tiene un intrón y posee 1087 pb y 203 aa.

Glucoquinasa 7 en formato FASTA:

```
>PITG_06022.1
MTADLVMSGDCGGTNTRLSLWNIPKD-
SKHIKGDIA PGSM LFSK KYLNEDYAS-
FAEVCHLFLNEAKLVDQIPEACVLACAG-
PILKNTVDFTNVAFGWKIDG
PGLEKELGIKKVRLINDFAAMGYGLLTL-
RPHEYIVLNDV PKDETAPMATIGAGTGL-
GECFLTPGMDGQYSCFACEGGHTDFA-
PADEIEIELYNEIKAKLG
CS*
```

8. PITG_11459.1 es la octava glucoquinasa de *P. infestans*, tiene un intrón y posee 1596 pb y 532 aa.

Glucoquinasa 8 en formato FASTA:

```
> PITG_11459.1
MYSASQLVALGVSLAICAAAVLYAN-
YFAALFPTREVSLSVTEQQQMLTSL-
VFHASKSGDAAANGADKETRDPPRLA-
FCCSADLDVAVPAVELMQSVQERH
HERIGSLKELQESFAYYFSSGAAAEQS-
```

```
MLSPEQFREVVALADALPQVKRKVGG-
NAATMAERASAEGCVLLGAAMGKD-
MKPYFVDQRIQLVGHLEEHEHE
DVHLVLEYSSGDEFGRGHISPRANRYL-
NHDIHNAQLSVLEEFEKSLDAFQPD-
LVVFGGLQLMEVQTDENARLTRLKAL-
SEVLQNLVARTPTHYEFAAVS
DFSLFDDTVRLVLPWVDSIGLNEQEL-
FILHHYLVGTGEEGTATTSRPTVAEIS-
AQLHDVIQFASKAKKNFQTNSEDK-
DASLALAQLSRIHFHTLQFHIVCQ
KTGSMWEDPKTALVQSALMSSKVA-
CGKPPTPAASDDSDKPKPMRTSAEME-
VDPERIEILLARQQLSKRQDLKVEL-
DPFSPIVTWQEADFQCHLVPMLAC
KKPDHTAGLGDNISGTGVAYHRIQKKS-
DANN*
```

Después se procedió a realizar la comparación en el Blast (programa informático que realiza comparaciones entre un gen determinado y una gran cantidad de secuencias que se encuentren contenidos en una base de datos ó en este caso, el banco de genes) de cada una de las glucoquinasas de *P. infestans*, para determinar su homología con otros organismos. El Blast se realizó a través del portal del NCBI, de manera que las glucoquinasas de *P. infestans* se compararon con todos los organismos contenidos en el banco de genes del NCBI. Del Blast se obtuvieron los siguientes resultados.

Blast de las glucoquinasas/ hexoquinasas de *P. infestans*

En primer lugar, se obtuvo como resultado que la mayoría de las glucoquinasas de *P. infestans* posee mayor homología con los demás genes codificantes para glucoquinasa/hexoquinasa de *P. infestans*, que con genes de otros organismos.

En segundo lugar, se obtuvo como resultado que todas las glucoquinasas, al menos en una ocasión, presentan a otra glucoquinasa de *P. infestans* dentro de los primeros 10 genes con los cuales poseen mayor homología.

En tercer lugar, se identificó un grupo de seis glucoquinazas que poseen grandes similitudes entre sí, correspondientes a las glucoquinazas 1,2,3,4,5 y 7.

Igualmente, se determinó que existen dos glucoquinazas de *P.infestans* que no poseen grandes similitudes con ninguna de las otras glucoquinazas, las cuales son correspondientes a las glucoquinazas 6 y 8. La glucoquinasa número ocho es una enzima dependiente de ADP y no de ATP, lo cual la convierte en una enzima aún más distante y diferente de las demás.

Por último, se obtuvo como resultado que las glucoquinazas de *P.infestans*, son homólogas con genes de distintas bacterias, que representan el 25% de todos los organismos resultantes del Blast, ubicándose en el segundo lugar de los organismos que poseen mayor homología con las glucoquinazas de *P.infestans*. Y en el tercer lugar, se encuentran los coanoflagelados.

Árboles filogenéticos de las glucoquinazas de *P.infestans* y otros organismos

Para conocer con más exactitud la relación filogenética de estos genes, es decir las relaciones de cercanía evolutiva de los genes, se realizaron los siguientes árboles filogenéticos:

En primer lugar se realizó un árbol filogenético de las glucoquinazas/hexoquinazas de *P.infestans* para determinar la relación filogenética entre las glucoquinazas de *P.infestans* y conocer sus similitudes.

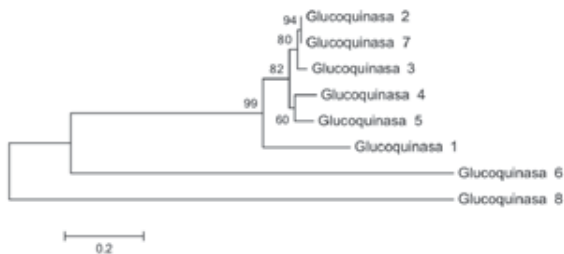


Figura 2. -Árbol filogenético de las glucoquinazas/hexoquinazas de *P.infestans*.

En este árbol filogenético podemos observar que existen dos brazos, uno que lo conforma solamente la glucoquinasa ocho, que es la glucoquinasa que está más distante

de las demás, y otro brazo que está dividido en dos ramas, en la primera están agrupadas las glucoquinazas 1,2,3,4,5 y 7 que son las glucoquinazas que poseen mayores similitudes entre sí, y en la segunda se encuentra la glucoquinasa 6, que aunque no es tan distante a las glucoquinazas 1,2,3,4,5 y 7 como lo es la octava glucoquinasa, está medianamente distante del grupo de glucoquinasa que son bastante similares entre sí, es decir, posee algunas cosas en común con el grupo de glucoquinasa 1,2,3,4,5 y 7 pero no las suficientes como para pertenecer a dicho grupo.

Con este árbol comprobamos que definitivamente existe un grupo de seis glucoquinazas que son muy similares entre sí, y que existen dos glucoquinazas que no pertenecen a este grupo, de las cuales una de ellas es mucho más distinta de las demás que la otra.

A continuación se presenta el árbol filogenético de las glucoquinazas de *P.infestans* y las hexoquinazas de *S.tuberosum* (la papa).

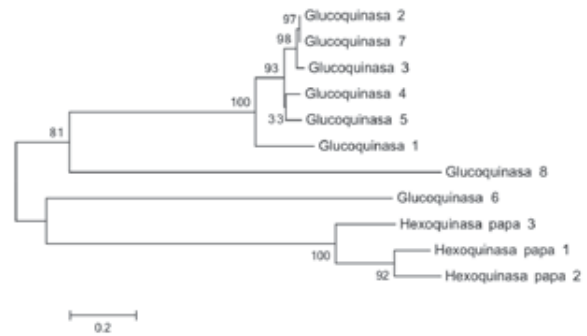


Figura 3. -Árbol filogenético de las glucoquinazas/hexoquinazas de *P.infestans* y *S.tuberosum*.

Este árbol filogenético es el más importante de toda la investigación, debido a que en él se estudian las similitudes del patógeno (*P.infestans*) y el hospedero (*S.tuberosum*).

En el árbol filogenético se puede observar que hay dos ramas, una primera rama que la conforman todas las glucoquinazas de *P.infestans* excepto la glucoquinazas 6, y otro brazo donde se encuentran todas las hexoquinazas de la papa y la glucoquinasa 6 de *P.infestans*.

Esta división en dos brazos que se observa en el árbol filogenético, significa que el programa está separando las glucoquinasas en dos grupos que son muy distintos entre ellos, es decir, los está separando porque las glucoquinasas de los dos grupos son muy distintas entre sí. Estos resultados son muy importantes, debido a que nos expresan que las glucoquinasas de la papa y las glucoquinasas de *P.infestans* son distintas, lo cual convierte a las glucoquinasas de *P.infestans* en posibles blancos de ataque al patógeno.

Este árbol nos indica que cualquiera de las glucoquinasas de *P.infestans* podría ser blanco de ataque al patógeno, excepto la glucoquinasa 6, debido a que esta glucoquinasa como nos indicó el árbol filogenético tiene bastantes

similitudes con las hexoquinasas de papa, por lo tanto no se puede utilizar una enzima homóloga a las glucoquinasas de *S.tuberosum* debido a que podría ocasionarle daños también al hospedero.

Predicción de las estructuras terciarias de las glucoquinasas/hexoquinasas de *P.infestans*.

Las predicciones de las estructuras terciarias de las glucoquinasas/hexoquinasas de *P.infestans* se realizaron a través del portal de *Swiss Model*: <http://swissmodel.expasy.org/> y se editaron a través del programa *PyMOL*.

A continuación se presentan las predicciones de las estructuras terciarias de algunas de

las glucoquinasas de *P.infestans*:

Glucoquinasa 1

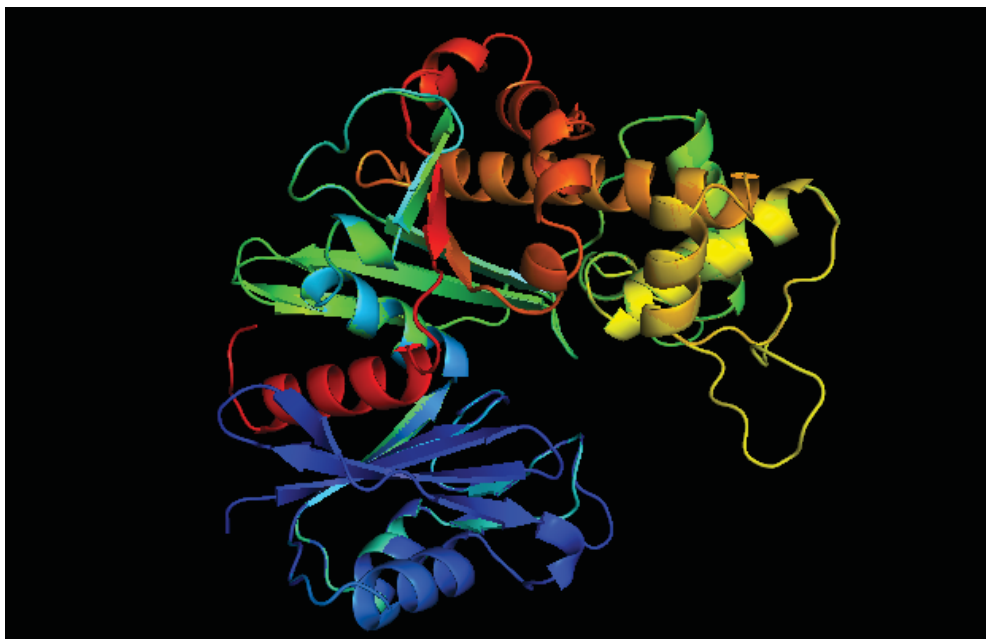


Figura 4. -Predicción de la estructura terciaria de la glucoquinasa 1 de *P.infestans*.

Esta imagen, es la predicción de la estructura terciaria que se obtuvo a través del portal de *Swiss model*, en el cual se introduce la determinada secuencia de un gen y él busca en su base de datos a genes que sean similares y en base a la comparación que realiza de los genes, construye la estructura terciaria del gen que se introdujo, basándose en la secuencia que se le proporcionó y en la comparación con las estructuras de genes similares.

Glucoquinasa 2



Figura 5. -Predicción de la estructura terciaria de la glucoquinasa 2 de *P. infestans*.

A través del programa *PyMOL* se pueden pulir y arreglar las figuras que se generan en el portal de *SwissModel*, es posible cambiarle los colores y como es un programa que diseña figuras en tres dimensiones, se pueden girar las estructuras y colocarlas en la posición que se desee. Luego se convierte la figura en 3D en una imagen 2D, y de esa manera se pueden visualizar en formatos como PDF, PNG y otros, de esta manera se pueden incluir en los documentos como una imagen cualquiera.

Glucoquinasa 3



Figura 6. -Predicción de la estructura terciaria de la glucoquinasa 3 de *P. infestans*.

El programa *PyMOL* también permite al usuario presentar la estructura de distintas maneras, en este caso las estructuras se realizaron utilizando en método *cartoon*.

Glucoquinasa 8



Figura 7. -Predicción de la estructura terciaria de la glucoquinasa 8 de *P.infestans*.

Determinación de las posibles glucoquinasa/hexoquinasa que podrían ser blanco de ataque a *P.infestans*.

Antes de determinar la posible glucoquinasa/hexoquinasa de *P.infestans* que podría representar el blanco de ataque, es importante explicar en qué consiste una ruta de ataque. Una ruta de ataque es como un camino que se busca con la finalidad de convertirlo en una vía de ataque a un determinado gen u organismo. Las rutas de ataque son vías muy eficaces para eliminar patógenos y organismos, pero son caminos muy difíciles de determinar, puesto que se deben de tomar en cuenta diversos factores: se debe buscar una ruta de ataque que elimine al patógeno pero que no le ocasione daños al hospedero, lo cual es algo bastante complejo teniendo en cuenta que en la mayoría de los

casos se atacan enzimas que ambos organismos poseen o procesos que ambos realizan. El punto clave en las rutas de ataque está en identificar una diferencia notable entre el blanco de ataque y la enzima o gen homólogo que posee el hospedero y es esto lo que hace que una ruta de ataque sea eficaz, y que se pueda atacar al patógeno sin ocasionarle daños al hospedero.

El árbol filogenético de las glucoquinasas de *P.infestans* y *S.tuberosum* nos permite decir que la hipótesis de investigación es correcta, pues las glucoquinasas/hexoquinasas de *P.infestans* son posibles blancos de ataque al patógeno, debido a que no son similares a las glucoquinasas del hospedero.

Por tanto, cualquier glucoquinasa/hexoquinasa (excepto la glucoquinasa 6) de *P.infestans* podría representar un blanco de ataque a

P.infestans. Se debe tomar en cuenta que las hexoquinazas de la papa son enzimas que utilizan ATP, mientras que *P.infestans* posee una enzima que utiliza ADP y que constituye un posible blanco de ataque. Con esto, la enzima se diferencia todavía más de las hexoquinazas de la papa y representa un mejor blanco de ataque.

Debido a lo anteriormente planteado se propone a la octava glucoquinasa de *P.infestans* como blanco de ataque al patógeno, debido a que esta glucoquinasa, a diferencia de las demás glucoquinazas que podrían representar un blanco de ataque al patógeno, es una enzima que utiliza ADP, lo cual la convierte en una enzima que comparte menos cosas con el hospedero, convirtiendo el proceso de ataque al patógeno en un proceso más seguro para las enzimas del hospedero.

CONCLUSIONES

- *P.infestans* posee 8 genes que codifican para glucoquinasa/hexoquinasa.
- Se determinó que existe un grupo de seis glucoquinazas de *P.infestans* que son muy similares entre sí y que existe una glucoquinasa dependiente de ADP.
- Se comprobó mediante la construcción de varios árboles filogenéticos que las glucoquinazas/hexoquinazas de *P.infestans* pueden ser blanco de ataque a *P.infestans* debido a que no presentan notables similitudes con las glucoquinazas del hospedero.
- Se demostró que la hipótesis planteada en la investigación era correcta, demostrando de esa manera que las glucoquinazas/hexoquinazas de *P.infestans* son posibles blancos de ataque al patógeno.
- Se propuso a la glucoquinasa 8 (PITG_11459.1) como posible y preferente blanco de ataque a *P.infestans* debido a que no presenta similitudes con las glucoquinazas del hospedero y a que es una glucoquinasa dependiente de ADP mientras que las glucoquinazas del hospedero son dependiente de ATP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CACERES, A. (2009) **Caracterización bioquímica y molecular de las glucosas quinazas de Trypanosoma cruzi y Leishmania spp.**
- GARCÍA R.(2002). **La Candelilla de la Papa (*Phytophthora infestans*) en Venezuela.**
- HASS et al. (2010). **Proyecto genoma *P.infestans*.** <http://www.broadinstitute.org>.
- HENFLIN J. (1987). **El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*.** Boletín de Información técnica 4. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima Perú.
- JARAMILLO S.(2003). **Monografía sobre *Phytophthora infestans* (mont) de Bary.** Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín.
- JGI (2010) **Joint Genome Institute.** <http://genome.jgi-psf.org/>
- LÓPEZ-CALCAGO PE, MORENO J, CEDEÑO L, LABRADOR L, CONCEPCIÓN JL, AVILÁN L.(2009). **Cloning, expression and biochemical characterization of mitochondrial and cytosolic malate dehydrogenase from *Phytophthora infestans*.**
- MORENO, M.(2006). **Contribución a la caracterización poblacional de *Phytophthora infestans* en los estados andinos de Venezuela a través de marcadores moleculares y análisis aloenzimáticos.**
- NCBI (2010/2011). **National Center for Biotechnology Information.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- STRYER, L. (1976) **Bioquímica.** Editorial Reverté. Universidad de Yale.
- SWISSMODEL (2011). **Portal de SwissModel:** <http://swissmodel.expasy.org/>